

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Gordana M. Dmitrašinović

**UTICAJ MAGNEZIJUMA NA PARAMETRE  
AKTIVNOSTI HIPOTALAMO-HIPOFIZNO-  
NADBUBREŽNE I HIPOTALAMO-HIPOFIZNO-  
GONADNE OSOVINE KOD RAGBISTA**

**doktorska disertacija**

**Beograd, 2016.**

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Gordana M. Dmitrašinović

**THE EFFECT OF MAGNESIUM ON PARAMETERS  
OF HYPOTHALAMIC-PITUITARY-ADRENAL AND  
HYPOTHALAMIC-PITUITARY-GONADAL AXIS  
ACTIVITY IN RUGBY PLAYERS**

**Doctoral dissertation**

**Belgrade, 2016**

**Članovi komisije:**

---

Dr Svetlana Ignjatović, mentor  
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Vesna Pešić, mentor  
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

---

Dr Miloš Žarković  
redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

---

Dr Branimir Radosavljević  
docent, Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Kandidat:

Gordana Dmitrašinović

Farmaceutski fakultet

Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## Zahvalnica

*Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr Svetlani Ignjatović na ukazanom poverenju i dugogodišnjoj saradnji, nesebičnoj podršci, stručnim savetima i ohrabrenju koje mi je pružila tokom doktorskih studija i svim fazama izrade teze.*

*Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr Vesni Pešić na korisnim savetima i angažovanju prilikom osmišljavanja i realizacije eksperimenta kao i na nesebičnoj podršci i stručnoj pomoći prilikom tumačenja rezultata.*

*Prof.dr Milošu Žarkoviću i Doc. dr Branimiru Radosavljeviću zahvaljujem se na korisnim sugestijama i oceni ovog rada.*

*Zahvaljujem se na podršci i doprinosu ovom radu svim kolegama sa Katedre za fiziologiju Farmaceutskog fakulteta, a pre svega asistentima Dušanki Stanić, Jeleni Petrović i Batinić Bojanu.*

*Zahvaljujem se dr sci. Marijani Dajak i osoblju Centra za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbija na pruženoj pomoći pri izvođenju dela eksperimentalnog rada.*

*Zahvaljujem se ragbistima i studentima zahvaljujući čijem dobrovoljnom učešću realizacija ove disertacije je bila izvodljiva.*

*Zahvaljujem se i svojim kolegama iz firme Makler, na kolegijalnoj podršci i razumevanju.*

*Zahvaljujem se prof. dr Nadi Majkić-Singh čiji su mi reč i delo, još tokom osnovnih studija, poslužili kao inspiracija i motivacija za dalje stručno usavršavanje.*

*Mojim roditeljima i sestri koji su me naučili da nikad ne odustajem, zahvaljujem se na razumevanju, ljubavi i podršci koju su mi pružili tokom celokupnog školovanja, a porodici Dmitrašinović na pomoći i podršci prilikom izrade i pisanja doktorske teze.*

*Svom suprugu Nikoli i deci, Leni i Filipu, dugujem posebnu i iskrenu zahvalnost za beskrajno strpljenje i ljubav - bez njih izrada ove disertacije ne bi bila moguća.*

VERBA VOLANT, SCRIPTA MANENT

CAIUS TITUS

# UTICAJ MAGNEZIJUMA NA PARAMETRE AKTIVNOSTI HIPOTALAMO- HIPOFIZNO-NADBUBREŽNE I HIPOTALAMO-HIPOFIZNO-GONADNE OSOVINE KOD RAGBISTA

## *Rezime*

Uravnotežena ishrana, kojom se obezbeđuje unos svih neophodnih hranjivih sastojaka, od posebnog je značaja za sportiste. Zbog savremenog načina ishrane oni često unose nedovoljne količine magnezijuma i veoma su osetljivi na deficijenciju ovog jona koji ima ključne uloge u mnogim ćelijskim reakcijama u organizmu. Savremeno psihosocijalno okruženje postavlja kompleksne zadatke pred mlade ljude koji često vode stresan način života. Osim toga, mlade osobe koje redovno treniraju i učestvuju u takmičenjima, izložene su dodatnom psiho-fizičkom stresu. S obzirom da je magnezijum jon izuzetno važan za normalno odvijanje energetskog metabolizma, kao i da je pokazan njegov uticaj na aktivnost hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne (HPA) osovine, koja je u uskoj sprezi sa aktivnošću hipotalamo-hipofizno-gonadne (HPG) osovine, može se pretpostaviti da dodatak suplemenata magnezijuma ishrani ragbista, može imati višestruk uticaj na fiziološki odgovor koji se javlja kao posledica psiho-fizičkog stresa kojem su ragbisti izloženi tokom takmičenja. Hormonski sistem je veoma kompleksan i da bi se dobila jasna slika na koji način funkcioniše potrebno je simultano ispitati više sistema odjednom.

Cilj rada bio je da se ispita da li magnezijum utiče na parametre aktivnosti HPA i HPG osovine, kao i na njihov međusobni odnos, i da li je taj uticaj različit kod ragbista u odnosu na efekte kod muškaraca istog uzrasta koji se ne bave sportom. Takođe, cilj je bio da se utvrdi da li i na koji način magnezijum menja dinamiku promene parametara aktivnosti HPA i HPG osovine nakon utakmice kod ragbista. U cilju procene aktivnosti HPA osovine vršeno je određivanje nivoa ACTH, kortizola, IL-6 kao i određivanje ukupnog broja leukocita, njihove diferencijalne formule i stepena oštećenja DNK perifernih limfocita. Procena aktivnosti HPG osovine izvršena je određivanjem nivoa FSH, LH i testosterona, kao i koncentracije eritrocita i hemoglobina. Praćenjem testosteron/kortizol (T/C) odnosa dobijeni su značajni podaci o međusobnoj interakciji ove dve osovine.

U ispitivanju su bile uključene dve grupe ispitanika, zdravih muškaraca uzrasta 18 do 25 godina: 1) sedentarna grupa studenata (n=15), koji se nisu bavili nikakvom fizičkom aktivnošću najmanje 6 meseci; 2) grupa aktivnih sportista – amaterskih ragbi igrača (n=23), koji su nakon uzimanja uzoraka za određivanje bazalnih vrednosti, podeljeni u dve grupe: kontrolnu (n=10) i interventnu grupu (n=13). Sedentarna grupa i interventna grupa ragbista uzimali su preparat magnezijuma tokom 28 dana (u ukupnoj dozi od 500 mg na dan). Za procenu razlike uticaja magnezijuma na bazalne vrednosti parametara aktivnosti HPA i HPG osovine kod ragbista i fizički neaktivnih osoba, svi parametri su određivani kod obe grupe ispitanika pre početka suplementacije i 29. dana od početka eksperimenta. Za procenu uticaja magnezijuma na dinamiku promene parametara

aktivnosti HPA i HPG osovine svi parametri su određivani na dan utakmice, kao i prvog, trećeg i šestog dana posle utakmice. Kao biološki uzorci korišćeni su krv i saliva. Za procenu nivoa anksioznosti sportista neposredno pred utakmicu, korišćen je SCAT test (*Sport competition anxiety test*, SCAT) gde su ragbisti na osnovu svojih odgovora klasifikovani u neku od tri grupe (nizak, prosečan i visok nivo anksioznosti). Promena u integritetu DNK lanca i procena stepena njegovog oštećenja utvrđena je izvođenjem Comet testa. Za statističku obradu podataka korišćeni su t-test i dvofaktorska ANOVA, praćena *post hoc* Boniffferoni testom. Vrednost  $p < 0,05$  je smatrana statistički značajnom.

Dobijeni rezultati su ukazali da magnezijum ima ulogu u redukciji imunog odgovora nakon naporne fizičke aktivnosti kao što je ragbi utakmica, što se ogleda u sniženju nivoa IL-6 i odsustvu porasta odnosa neutrofila i limfocita (NE/LY) nakon suplementacije. Ovaj efekat je nezavisan od fizičke aktivnosti jer je uočen kod obe grupe ispitanika. Uočeno je da magnezijum menja dinamiku promene ACTH i kortizola, posebno u danima pred utakmicu, što se može dovesti u vezu sa ulogom magnezijuma u sniženju osećaja napetosti i nelagodnosti koji prethodi utakmici, što je u korelaciji sa rezultatima SCAT testa. Pokazano je da se uticaj magnezijuma na parametre aktivnosti HPG osovine kod fizički aktivnih osoba kao i kod sedentarnih muškaraca ogleda pre svega u promeni nivoa testosterona, dok se nivoi LH i FSH značajno ne menjaju. Magnezijum je snizio nivo kortizola kod obe grupe ispitanika, što je dovelo do porasta T/C odnosa, čime je ostvaren pozitivan uticaj na sposobnost pojedinca da kompenzuje štetne efekte stresa i ukazano na ulogu magnezijuma u održanju anaboličko/kataboličke ravnoteže. Porast u broju eritrocita, koji je uočen samo kod sedentarnih osoba, mogao bi se objasniti porastom nivoa biološki aktivnog testosterona koji ima pozitivan efekat na eritropoezu. Rezultati ovog rada navode na zaključak da naporno vežbanje povećava osetljivost perifernih limfocita krvi na oksidativni stres i da suplementacija magnezijumom pokazuje protektivne efekte u smanjenju nivoa njihovog vodonik-peroksidom indukovano oštećenja DNK, čime se ukazuje na značaj unošenja adekvatne količine magnezijuma kako kod studenata sa sedentarnim načinom života tako i kod fizički aktivnih osoba. Dalja ispitivanja su potrebna da bi se do kraja razjasnili molekularni mehanizmi kojima magnezijum, kod fizički aktivnih osoba, utiče na odgovor imunog i hematopoetskog sistema.

**Ključne reči:** *magnezijum, amaterski ragbi, ACTH, kortizol, IL-6, testosteron, LH, FSH, odnos T/C, oštećenje DNK perifernih limfocita*

**Naučna oblast:** Medicinska biohemija

**Uža naučna oblast:** Medicinska biohemija

**UDK broj:** 546.46:796.077.2:159.944.4(043.3)

**THE EFFECT OF MAGNESIUM ON PARAMETERS OF HYPOTHALAMIC-  
PITUITARY-ADRENAL AND HYPOTHALAMIC-PITUITARY-GONADAL AXIS  
ACTIVITY IN RUGBY PLAYERS**

***Summary***

Balanced diet, with proper dietary intake of all necessary nutrients, is of particular importance for athletes. Due to contemporary dietary habits and suboptimal magnesium intake, athletes are very sensitive to deficiency of this ion involved in key intracellular reactions in human body. Contemporary psychosocial environment puts complex tasks in front of young people who often lead stressful way of life. Furthermore, young athletes, who are involved in trainings and competitions on a regular basis, are exposed to additional psycho-physical stress. Since, magnesium ion is extremely important for normal energy metabolism and its effect on activity of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which is in tight conjunction with activity of hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis, is well proven, it could be presumed that addition of magnesium supplement to the rugby players diet, might have multiple effects on physiological response on psycho-physical stress during rugby competition. In order to get a clear picture of how hormonal system functions, simultaneous examinations of several systems are needed.

The aim of this study was to examine whether magnesium has an effect on parameters of HPA and HPG axis activity, as well on their interaction, and are these effects different in rugby players compared to the age-matched sedentary individuals. Another goal was to examine if magnesium might have an influence on the dynamics of the change of parameters of HPA and HPG axis activity. In order to evaluate HPA axis activity, the levels of ACTH, cortisol, IL-6, total/differential leucocytes counts, as well the degree of peripheral blood lymphocyte (PLB) DNA oxidative damage, were determined. The evaluation of HPG axis activity was done through determination of FSH, LH and testosterone levels, the number of erythrocytes and hemoglobin concentration. Testosterone/cortisol (T/C) ratio gave us important information on reciprocal interaction of these two axes.

The study included two groups of healthy male participants, aged 18-25 years: 1) sedentary group of students (n=15) who had not been involved in any regular exercise for at least six months; 2) the group of active athletes – amateur rugby players (n=23) who were, after basal sampling, randomly assigned to control (N=10) and intervention (N=13) group. The sedentary group and intervention group of rugby players received magnesium supplement during 28 days (total amount 500 mg Mg/day). In order to examine the difference in magnesium effect on basal HPA and HPG axes activity parameters between rugby players and physically non-active persons, all parameters were determined in both groups, before supplementation and on the 29<sup>th</sup> day of the experiment. The evaluation of magnesium influence on the dynamics of the change of HPA and HPG axes parameters' activity was done based on the measurement of all parameters on



the day of the competition, as well on the first, third and sixth day after the game. Blood and saliva were used as specimens. For the estimation of the level of anxiety immediately before competition SCAT test (*Sport competition anxiety test*, SCAT) was used, based on which rugby players had been classified into one of the three categories (low, intermediate and high level of anxiety). Comet assay was used for the measurement of DNA integrity impairment and the level of its damage. Data were analyzed using t-test and two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Boniffferoni *post hoc* test for multiple comparisons. Value  $p < 0,05$  was considered to be statistically significant.

The significant reduction of IL-6 level in supplemented rugby players and the absence of sharp neutrophils to lymphocytes (NE/LY) ratio rise after the rugby match pointed to the significant role that magnesium could have in reducing immune response activation just after the strenuous physical exercise such as a rugby game. These effects are independent of physical activity and are noticed in both groups of participants. Magnesium altered the pattern of change of ACTH and cortisol, most significantly before the game, thus pointing to magnesium's role in reduction of stress-anticipating anxiety immediately preceding the contest that was in correlation with SCAT test's results. Our findings showed that magnesium influence on parameters of HPG axis activity, both in physically active as well in sedentary individuals, was mainly seen through the change in testosterone levels, while no statistically significant changes in the levels of LH and FSH were noted. Magnesium reduced the cortisol level in both groups, which consequently caused the rise in T/C ratio, positively affecting the one's ability to compensate damaging stress effects and suggesting the role of magnesium in maintaining the anabolic/catabolic equilibrium. The rise in erythrocyte number, only seen in the sedentary group, could be explained by the increased bioactivity of testosterone, which has the stimulatory effect on erythropoiesis. Results of this study point to the conclusion that strenuous exercise sensitizes PBLs to oxidative stress, that magnesium supplementation shows protective effects in reducing the level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced PBL DNA damage thus indicating the importance of adequate magnesium intake in both students with sedentary life style and the physically active individuals. Further investigations are needed to closely identify underlying molecular mechanism delineating the association between magnesium and hematopoietic and immune system response in physically active persons.

**Key words:** *magnesium, amateur rugby, ACTH, cortisol, IL-6, testosterone, LH, FSH, T/C ratio, peripheral blood lymphocytes DNA damage*

**Field of Science:** Medical biochemistry

**Scientific subfield:** Medical biochemistry

**UDK number:** 546.46:796.077.2:159.944.4(043.3)

**Skraćenice:**

ACTH – adrenokortikotropni hormon

ATP – adenzin trifosfat

%BA – procenat bazofila

CBG - kortikosteroid-vezujući protein

CRH - kortikotropin-oslobađajući hormon

Csal – nivo kortizola u salivi

Cser – nivo kortizola u serumu

Csal/Cser - saliva/serum kortizol odnos

Dan-1 – dan pre utakmice

Dan 1 – prvi dan nakon utakmice

Dan 3 – treći dan nakon utakmice

Dan 6 – šesti dan nakon utakmice

%EO – procenat eozinofila

FSH – folikulostimulirajući hormon

GABA – gama aminobuterna kiselina

GnRH - gonadotropin-oslobađajući hormon

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- vodonik-peroksid

HPA - hipotalamo-hipofizno-nadbubrežna osovina

HPG - hipotalamo-hipofizno-gonadna osovina

IκBα - inhibitor nuklearnog faktora kapa B alfa

IL-6 - interleukin-6

LH – luteinizirajući hormon

%LY – procenat limfocita

MgO – magnezijum-oksidi

MgSO<sub>4</sub> – magnezijum-sulfat

%MO – procenat monocita

%NE – procenat neutrofila

NE/LY - odnos broja neutrofila i limfocita

NFκB - nuklearni faktor – kapa B

NMDA – N-metil-D-aspartat

ROS - reaktivne kiseonične vrste

RNS - reaktivne azotne vrste

SHBG - seks-hormon-vezujući globulin

T/C - količnik testosteron/kortizol

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Magnezijum – distribucija, homeostaza i fiziološke uloge.....	1
1.2. Magnezijum u ishrani .....	4
1.2.1. Preporučeni dnevni unos.....	4
1.2.2. Preparati magnezijuma i njihova efikasnost.....	6
1.2.3. Magnezijum u ishrani sportista.....	7
1.3. Uticaj stresa na interakciju između HPA i HPG osovine.....	8
1.4. Uticaj vežbanja na parametre aktivnosti HPA i HPG osovine.....	10
1.5. Uticaj magnezijuma na aktivnost HPA i HPG osovine.....	13
1.6. Amaterski ragbi.....	14
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	17
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	19
3.1. Komercijalni reagensi i hemikalije.....	19
3.2. Pribor i aparati.....	20
3.3. Materijal.....	21
3.4. Metode.....	25
3.4.1. Određivanje koncentracije ACTH.....	25
3.4.2. Određivanje koncentracije kortizola u serumu.....	26
3.4.3. Određivanje koncentracije kortizola u salivi.....	28
3.4.4. Određivanje koncentracije IL-6.....	29
3.4.5. Određivanje koncentracije FSH.....	31
3.4.6. Određivanje koncentracije LH.....	32
3.4.7. Određivanje koncentracije testosterona u serumu.....	34
3.4.8. Određivanje koncentracije testosterona u salivi.....	36
3.4.9. Određivanje kompletne krvne slike.....	37
3.4.10. Određivanje oštećenja DNK (comet test).....	38
3.4.11. Test anksioznosti u sportskim takmičenjima .....	40
3.5. Analiza podataka.....	42
<b>4. REZULTATI</b> .....	43
4.1. Bazalni nivoi parametara aktivnosti HPA i HPG osovine kod sedentarnih muškaraca pre i nakon suplementacije magnezijumom.....	43
4.2. Bazalni nivoi parametara aktivnosti HPA i HPG osovine kod ragbista.....	45

4.3. Poređenje vrednosti parametara aktivnosti HPA i HPG osovine između ragbista i sedentarnih muškaraca, pre i posle suplementacije magnezijumom.....	46
4.3.1. Nivo ACTH.....	46
4.3.2. Nivo kortizola u serumu i salivi.....	47
4.3.3. Nivo IL-6.....	49
4.3.4. Nivo FSH i LH.....	49
4.3.5. Nivo testosterona u serumu i salivi.....	51
4.3.6. Odnos T/C u serumu i salivi.....	52
4.3.7. Hematološki parametri.....	53
4.4. Uticaj ragbi utakmice i suplementacije magnezijumom na dinamiku promene parametara aktivnosti HPA i HPG osovine.....	55
4.4.1. Uticaj magnezijuma na dinamiku promene parametara aktivnosti HPA osovine kod ragbista pre i nakon utakmice.....	55
4.4.1.1. Uticaj suplementacije magnezijumom na nivo ACTH.....	55
4.4.1.2. Promena nivoa kortizola u serumu i salivi.....	56
4.4.1.3. Uticaj magnezijuma na nivo IL - 6.....	59
4.4.2. Uticaj magnezijuma na dinamiku promene parametara aktivnosti HPG osovine kod ragbista pre i nakon utakmice.....	60
4.4.2.1. Uticaj magnezijuma na nivo LH i FSH kod ragbista.....	60
4.4.2.2. Uticaj magnezijuma na nivo testosterona kod ragbista.....	62
4.4.2.3. Promena T/C odnosa pod uticajem magnezijuma.....	64
4.5. Procena rezultata SCAT testa kod ragbista pre i nakon suplementacije magnezijumom.....	66
4.6. Uticaj magnezijuma na hematološke parametare kod ragbista pre i nakon utakmice.....	68
4.7. Procena stepena oksidativnog oštećenja DNK perifernih limfocita pre i nakon suplementacije magnezijumom kod obe grupe ispitanika.....	71
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>75</b>
5.1. Razlike u uticaju magnezijuma na bazalne nivoe parametara aktivnosti HPA i HPG osovine između ragbista i sedentarnih muškaraca.....	75
5.2. Uticaj magnezijuma na promenu interakcije između HPA i HPG osovine kod ragbista.....	81
5.3. Magnezijum utiče na stepen oštećenja DNK perifernih limfocita.....	88
5.4. Ograničenja studije.....	91

6. <b>ZAKLJUČCI</b> .....	93
7. <b>LITERATURA</b> .....	95
8. <b>BIOGRAFIJA</b> .....	113
9. <b>PRILOZI</b> .....	114

Izjava o autorstvu

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije rada

Izjava o korišćenju

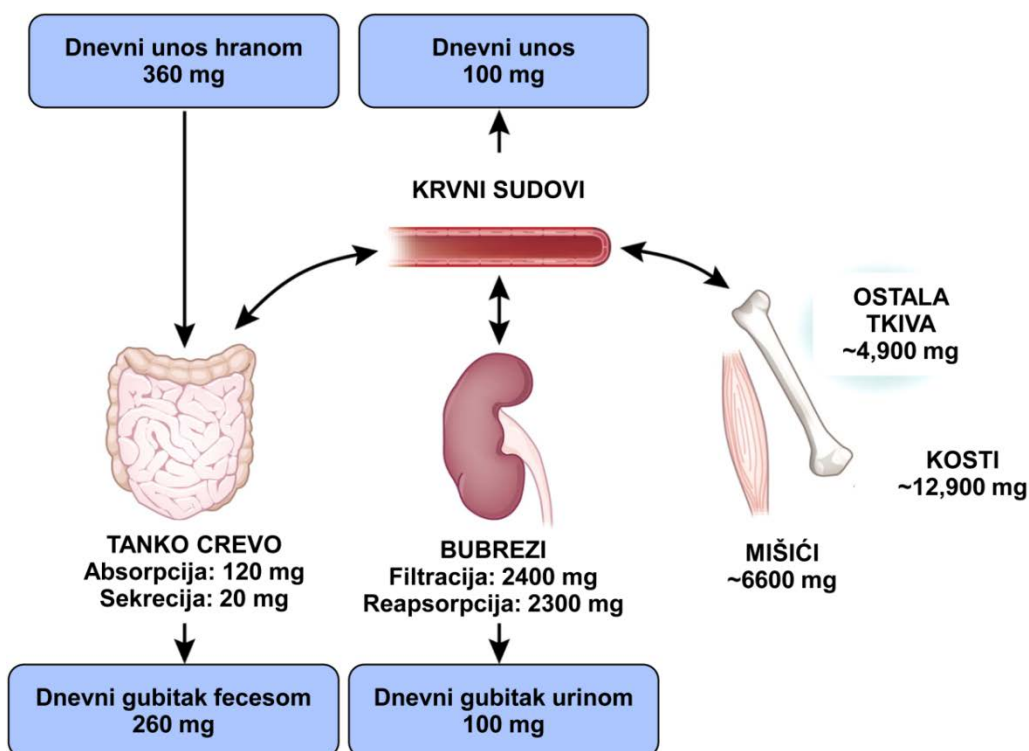
## 1. UVOD

### 1.1. MAGNEZIJUM – DISTRIBUCIJA, HOMEOSTAZA I FIZIOLOŠKE ULOGE

Magnezijum jon je drugi po zastupljenosti intracelularni katjon nakon kalijuma, koji se, kao katjon u organizmu, nalazi na četvrtom mestu. U organizmu odrasle osobe nalazi se oko 20-25 g magnezijuma koji je raspoređen prvenstveno u kostima (53%), zatim u mišićima (27%) i u mekim tkivima (19%). Manje od 1% magnezijuma nalazi se u serumu i eritrocitima, pri čemu se u serumu nalazi prisutan u tri oblika – kao jonizovani, slobodni (oko 62%), zatim vezan za proteine, prvenstveno albumin (blizu 30%) i kompleksiran sa anjonima, kao što su, na primer, citrat i fosfat (7%)(1). Korisni efekti magnezijuma u fiziološkim i patofiziološkim stanjima su poznati već godinama.

Homeostaza magnezijuma u organizmu je zavisna od interakcije tri organa - bubrega, tankog creva i kostiju (*Slika 1*). Najveći deo magnezijuma koji se unese putem hrane apsorbuje se u tankom i u debelom crevu. Apsorbuje se otprilike 30-50% magnezijuma unetog putem hrane, dok se u slučaju da je unos magnezijuma nizak apsorpcija može povećati do 80% (2). Intestinalna apsorpcija je regulisana različitim mehanizmima koji nisu ispitani do kraja, pri čemu se najveći deo magnezijuma apsorbuje pasivno, putem paracelularnog transporta dok se ostatak magnezijuma apsorbuje posredstvom aktivnih transportera magnezijum jona – TRPM6 i TRPM7 (*Transient receptor potential channel melastatin member 6 i 7*) (3) koji se nalaze na luminalnoj strani enterocita cekuma i kolona. Najveći depoi magnezijuma nalaze se u kostima odakle se u slučaju deficijencije magnezijuma, on najlakše nadoknađuje, dok u mišićnom tkivu, delujući kao antagonista kalcijuma, učestvuje u regulaciji kontraktilnosti mišića. Magnezijum se uglavnom ekskretuje putem bubrega, pri čemu se 90-95% filtriranog magnezijuma ponovo reapsorbuje i to najvećim delom u uzlaznom delu Henleove petlje. Renalna eliminacija magnezijuma iz organizma delimično je regulisana dejstvom parathormona (4),

koji povećava njegovu reapsorpciju, i aldosterona, koji stimuliše njegovu eliminaciju. U toku intenzivnog fizičkog napora značajna količina magnezijuma se gubi i putem znoja, tako da deplecija magnezijuma i njegova deficijencija igraju značajnu ulogu u patofiziologiji fizičkog vežbanja.



**Slika 1.** Homeostaza magnezijuma. (modifikovano prema referenci Jeroen H. F. de Baaij i sar., 2012)

Imajući u vidu distribuciju magnezijuma u organizmu kao i činjenicu da se poluživot magnezijuma u organizmu kreće između 41 i 181 dan (5), procena serumske koncentracije magnezijuma ne daje jasnu sliku o statusu magnezijuma u ostalim kompartmentima organizma. Bez obzira na to, određivanje magnezijuma u serumu ima široku primenu, posebno za procenu akutnih stanja kao i u slučaju praćenja terapije onim lekovima koji mogu dovesti do naglog gubitka magnezijuma iz organizma (tiazidni diuretici). Određivanje statusa magnezijuma u organizmu je veoma kompleksno, jer praktično nijedna od metoda koje se primenjuju ne može tačno definisati količinu magnezijuma u ljudskom telu. Metoda izbora za



određivanje magnezijuma je atomska apsorpciona spektrometrija, ali su kolorimetrijske metode zastupljene u svakodnevnoj laboratorijskoj praksi. Referentne vrednosti magnezijuma u serumu, određene atomskom apsorpcionom spektrometrijom iznose se od 0,66 do 1,07 mmol/L. Pored određivanja ukupnog magnezijuma u serumu, može se vršiti određivanje jonizovanog magnezijuma u telesnim tečnostima, sadržaja ukupnog i jonizovanog magnezijuma u eritrocitima, mononuklearnim ćelijama i mišićima, kao i u dvadesetčetvoročasovnom urinu za procenu retencije ili ekskrecije magnezijuma iz organizma. Nuklearna magnetna rezonantna spektroskopija i primena fluorescentnih proba za procenu statusa jonizovanog magnezijuma za sada nalaze svoju primenu samo u istraživačkim laboratorijama (6).

Stanja u kojima je koncentracija magnezijuma u serumu niža od 0,66 mmol/L su označena kao hipomagnezijemija, a osnovni uzroci za njen nastanak su: smanjen unos magnezijuma putem hrane i vode, smanjena apsorpcija i povećan gubitak putem gastrointestinalnog trakta (dijareja, povraćanje, upotreba laksativa), kao i povećan gubitak putem bubrega (kongenitalni ili stečeni poremećaji tubula, diabetes mellitus, alkoholizam, upotreba lekova poput diuretika, ACE inhibitora, aminoglikozida, ciklosporina i cisplatina). Do deficijencije magnezijuma može doći u stanjima kada su potrebe za ovim jonom povećane (trudnoća, laktacija) kao i u slučaju povećanog znojenja (6) čemu su posebno izloženi sportisti. Deficijencija magnezijuma može narušiti integritet ćelijske membrane i njenu funkciju, povećati osetljivost na oksidativni stres, dovesti do kardiovaskularnih oboljenja, razvoja karcinoma, kao i ubrzanog starenja (7). Simptomi koji se mogu javiti kao posledica hipomagnezijemije veoma su slični hipokalcijemiji, a to su mišićni tremor i slabost, poremećaj gutanja, tetanija, zatim poremećaj srčanog rada zbog izlaska  $K^+$  iz ćelije, poremećaj stabilizacije membrane i agregacije trombocita što može biti praćeno poremećajem koagulacije.

Do danas je sproveden veliki broj studija u kojima su opisane višestruke uloge magnezijuma u organizmu. Zbog brojnih uloga u energetskom metabolizmu, kao kofaktor preko 300 enzima, magnezijum mora biti dostupan u adekvatnoj količini u telu kako bi održao odgovarajući nivo fizičke spremnosti sportista (8).

Magnezijum je fiziološki regulator stabilnosti ćelijske membrane i uključen je u neuromuskularnu transmisiju, imunu, hormonsku i kardiovaskularnu funkciju (9). Sinteza i iskorišćenje ATP-a su direktno povezani sa magnezijumom koji aktivira određen broj enzima uključenih u različite funkcije kao što su sinteza DNK i RNK, glikoliza, intraćelijski transport minerala, stvaranje nervnih impulsa, održanje membranskog ćelijskog potencijala, kontrakcija mišića i održanje tonusa krvnih sudova. Moguće je da magnezijum, putem antagonizma sa kalcijumom, utiče na aktiviranje fagocita, a verovatno i aktivaciju nuklearnog faktora – kapa B (NFκB) (10, 11). U centralnom nervnom sistemu magnezijum funkcioniše kao agonista receptora gama aminobuterne kiseline (GABA), antagonist N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora, a antagonistički efekat pokazuje i na receptorima za angiotenzin II. Ovakav efekat magnezijuma zasniva se na kompeticiji sa kalcijumom u procesima koji su važni za stvaranje i sekreciju neurotransmitera (12). Magnezijum se ponaša kao nekompetitivni inhibitor inozitol 1,4,5-trifosfat zavisnih kalcijumovih kanala čime onemogućava vezivanje inozitol 1,4,5-trifosfata za njegov receptor, sprečavajući otvaranje kalcijumovih kanala i ulazak  $Ca^{2+}$  u ćeliju. Osim toga deluje kao antagonist rijanodinskog podtipa receptora za oslobađanje kalcijuma koji je smešten na sarkoplazmatskom retikulumu (13). Magnezijum ima uticaj i na transport  $K^{+}$  kroz membranu jer deluje kao kofaktor enzima  $Na^{+}-K^{+}-ATPaze$ , te u slučaju njegove deficijencije dolazi do izlaska  $K^{+}$  čak i u uslovima snižene intracelularne koncentracije, što dovodi do depolarizacije ćelije. Kao esencijalni element uključen je u regulaciju ćelijskog ciklusa i apoptoze, stabilizuje strukture nukleinskih kiselina (7), štiti DNK od alkilacije, dok je kao kofaktor enzima uključen u DNK replikaciju, reparaciju i gensku ekspresiju (14, 15). Magnezijum smanjuje osetljivost na oksidativni stres i važan je za stabilizaciju DNK jer učestvuje u izgradnji pentozofosfatne kičme DNK (16).

## **1.2. MAGNEZIJUM U ISHRANI**

### **1.2.1. Preporučeni dnevni unos**

Glavnim izvorom magnezijuma u ljudskoj ishrani smatraju se namirnice koje sadrže dijetetska vlakna, poput zelenog lisnatog povrća, integralnih žitarica, oraha,

badema, kikirikija, a osim njih u upotrebi su i mineralne vode bogate magnezijumom. Savremeni procesi obrade hrane, poput prerade žitarica u cilju dobijanja brašna ili kukuruza radi dobijanje skroba, doprinose značajnom sniženju sadržaja magnezijuma u namirnicama dostupnim na teritoriji razvijenih zemalja.

Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije iz 2009. godine (162), tri četvrtine Amerikanaca nije svojom ishranom zadovoljavalo preporučeni dnevni unos, dok podaci koji se odnose na ostale delove sveta, iako ograničeni, idu u prilog činjenici da je unos značajno manji u odnosu na preporučeni. Komisija za referentni dnevni unos elektrolita i vode (*Panel on Dietary Reference Intakes for electrolytes and water*) u okviru Američke akademije nauka (*Food and Nutrition Board*) (163), dala je 2005. godine smernice po kojima je preporučeni dnevni unos magnezijuma za muškarce od 400–420 mg/dan, a za žene od 310–360 mg na dan. Tokom 2015. godine, Komisija za dijetetske proizvode, hranu i alergije (*the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, NDA*) u okviru Evropskog tela za bezbednost hrane (*European Food Safety Authority, EFSA*), je po zahtevu Evropske komisije, ustanovila dijetetske referentne vrednosti za magnezijum, zasnovane na rezultatima 13 studija sprovedenih u 9 zemalja Evropske unije (*Tabela I*) (164). Prosečan unos magnezijuma kretao se od 264–439 mg/dan za muškarce i od 232–357 mg/dan za žene, tako da je Komisija ustanovila da adekvatni unos magnezijuma za muškarce iznosi 350 mg/dan, a za žene 300 mg/dan.

**Tabela I** Preporučeni adekvatan unos magnezijuma

Godine	Adekvatan unos magnezijuma (mg/dan)	
	Muškarci	Žene
7-11 meseci	80	80
1-< 3 godine	170	170
3-< 10 godine	230	230
10-< 18 godina	300	250
≥ 18 godina	350	300

(modifikovano prema referenci EFSA NDA Panel, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2015)

### 1.2.2. Preparati magnezijuma i njihova efikasnost

Značajan izvor magnezijuma predstavljaju i suplementi koji se mogu koristiti kao dodaci ishrani ili u terapijske svrhe. U okviru suplemenata koji su dostupni na svetskom tržištu, magnezijum se nalazi u vidu oksida i različitih soli sa neorganskim i organskim anjonima: magnezijum-oksidi (MgO), magnezijum-hlorid, magnezijum-glukonat, magnezijum-citrat, magnezijum-glicinat, magnezijum-laktat, dok se intrahospitalno primenjuje magnezijum sulfat (MgSO<sub>4</sub>) u vidu i.v. infuzije u tretmanu stanja preeklampsije i eklampsije.

Bioraspoloživost magnezijuma iz suplemenata koji se koriste *per os*, bila je predmet istraživanja velikog broja studija i dobijeni rezultati su relativno kontroverzni. Jedna od studija (17) bavila se ispitivanjem i poređenjem različitih komercijalnih preparata magnezijuma dostupnih na tržištu Sjedinjenih Američkih Država. Šesnaest dobrovoljaca je učestvovalo u ispitivanju, tokom kog su se uzdržavali od konzumiranja hrane bogate magnezijumom. U dozi od 510 mg/dan uzimali su četiri različita jedinjenja: MgO, magnezijum-hlorid, magnezijum-laktat i magnezijum-aspartat. U cilju procene bioraspoloživosti praćena je ekskrecija magnezijuma putem urina. Došlo se do zaključka da je frakciona apsorpcija bila najmanja za MgO u odnosu na ostale soli, te da je njegova bioraspoloživost najmanja u odnosu na ostale preparate. Prema preglednom članku koji je objavljen u časopisu *American Journal of Therapeutics* (18) oralna apsorpcija MgO prema rezultatima niza studija, iznosila je 22,8%, za citrat je bila veća, 29,64% a za hlorid 19,68%. Imajući u vidu da je sadržaj elementarnog magnezijuma u MgO oko 60%, što je znatno više nego u citratu, bez obzira na svoju malu rastvorljivost, preparat MgO se može smatrati dobrim izvorom magnezijuma. Tome ide u prilog činjenica da je grupa istraživača (19) došla do zaključka da je nakon jednomesečne primene MgO sadržaj jonizovanog magnezijuma unutar sublingvalnih epitelnih ćelija bio veći u poređenju sa njegovom koncentracijom po primeni citrata, što je utvrđeno disperzionom analizom uz upotrebu X-zraka. Iako je bila u pitanju studija koja je metodološki dobro osmišljena (dvostruko-slepa studija sa randomizacijom, ukršteni dizajn) pojedini autori osporavaju rezultate ove studije zbog velike razlike u dozi primenjenog MgO i magnezijum-citrata.

Tokom poslednjih dekada upotreba suplemenata magnezijuma je našla svoje mesto u terapiji migrenoznih glavobolja, lečenju bola u mišićima i mišićnog spazma, u terapiji visokog krvnog pritiska, posebno stanja preeklampsije i eklampsije, lečenju nekih depresivnih i anksioznih stanja, tretmanu ventrikularnih aritmija, kongestivne srčane insuficijencije, zatim u terapiji dijabetesa u cilju sniženja insulinske rezistencije, kao i u slučaju drugih različitih stanja.

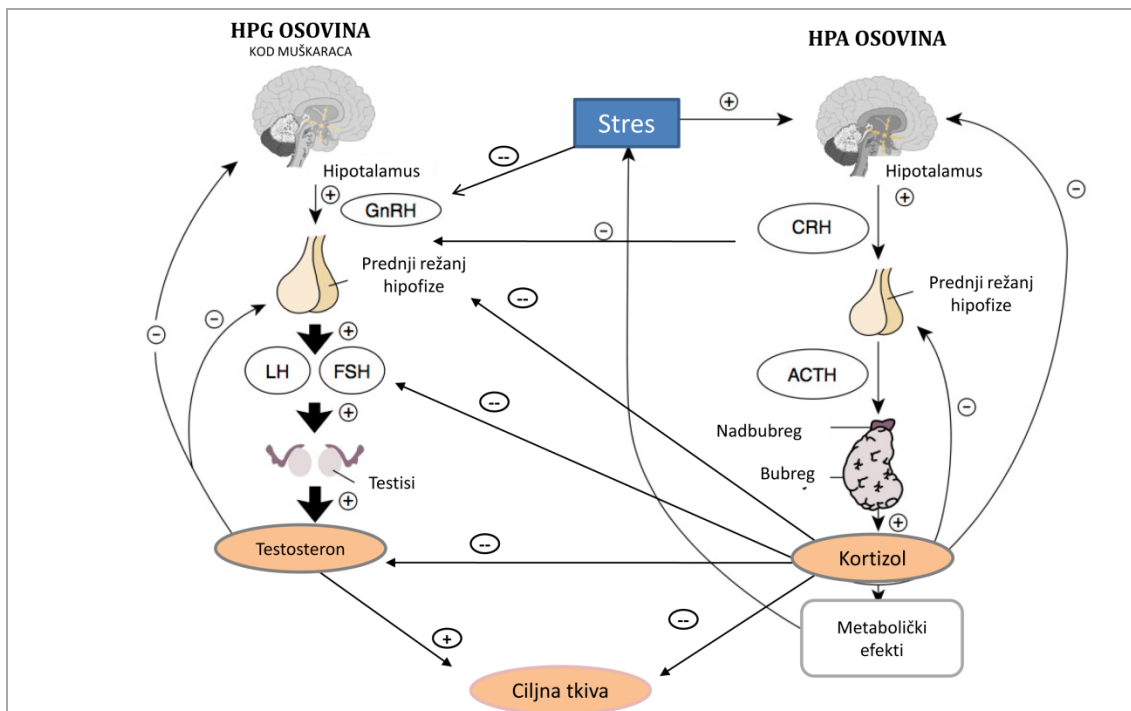
### **1.2.3. Magnezijum u ishrani sportista**

Za sportiste je veoma važna pravilna ishrana koja im obezbeđuje dovoljnu količinu nutrijenata i energije koji su im potrebni za treninge i takmičenja kao i oporavak između njih. Zbog savremenog načina ishrane sportisti često unose suboptimalne količine magnezijuma i veoma su osetljivi na deficijenciju ovog elementa koji igra ključnu ulogu u mnogim ćelijskim reakcijama. U slučaju nedovoljnog unosa može doći do pojave deficijencije magnezijuma koja može nastati tokom izvođenja vežbi velikog intenziteta, zbog disbalansa u homeostazi magnezijuma uzrokovanog povećanim gubitkom magnezijuma putem urina i znoja (20). Poznato je da intenzivna fizička aktivnost (vežbanje) može delovati kao fizički stresor koji dovodi do aktivacije neuroendokrinog sistema i sledstvene promene u koncentraciji različitih parametara ovog sistema. Od velikog značaja su nalazi studija koji ukazuju da je ekskrecija magnezijuma povećana tokom aktivnosti simpatičkog nervnog sistema i hipotalamo-hipofizno-nadbubrežne (HPA) osovine (21, 22), što može biti još samo jedan od uzroka koji mogu dodatno uticati na status magnezijuma u organizmu sportista.

Efekat magnezijuma kao dodatka ishrani sportista je obično posmatran u odnosu na vežbanjem uzrokovanu redistribuciju magnezijuma u organizmu (8, 20), kao i kroz uticaj magnezijuma na fizičke sposobnosti sportista (23-27). Ograničen broj studija se bavio uticajem koji suplementacija magnezijumom ima na različite hematološke parametre (28-30) kao i na aktivnost HPA i hipotalamo-hipofizno-gonadne (HPG) osovine fizički aktivnih osoba (31, 32). Međutim nijedna studija se nije bavila šestodnevim praćenjem ovih parametara kod amaterskih ragbi igrača.

### 1.3. UTICAJ STRESA NA INTERAKCIJU IZMEĐU HPA I HPG OSOVINE

Savremeno psihosocijalno okruženje postavlja kompleksne zadatke pred mlade ljude koji često pate od nedostatka sna, neadekvatne ishrane, nezaposlenosti i nedostatka sredstava za formiranje porodice što zajedno vodi stresnom načinu života. Studenti su zbog niza obaveza koje imaju, izloženi povećanom nivou stresa, što ih čini posebno osetljivim za razvoj intrapersonalnih konflikata, niskog nivoa samopouzdanja, poremećaja spavanja, snižene pažnje, kao i zavisnosti od droga i lekova (33). Osim toga, mlade osobe koje redovno treniraju i učestvuju u takmičenjima, izložene su dodatnom psiho-fizičkom stresu. Takmičenje predstavlja izazovnu situaciju koju karakterišu uzbuđenje i strah od krajnjeg ishoda (34, 35), stoga je fiziološki odgovor organizma koji se javlja u ovim situacijama daleko intenzivniji. Uočeno je da odgovor organizma zavisi od dužine trajanja kao i intenziteta vežbanja. Aktivacija HPA osovine predstavlja snažan neuroendokrini odgovor na stres koji obezbeđuje preživljavanje. Psiho-fizički stres, kojem je organizam izložen tokom utakmice, dovodi do njene aktivacije što je praćeno povećanom sekrecijom adrenokortikotropnog hormona (ACTH) i kortizola (C) (36, 37). Naime, stimulacija HPA osovine dovodi do hipotalamusne sekrecije kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH) koji stimuliše izlučivanje ACTH iz prednjeg režnja hipofize (*Slika 2*), koji stimuliše koru nadbubrežne žlezde, da stvara kortizol, glavni glukokortikoid kod ljudi. Plazma nivoi ovih hormona mogu da porastu dva do tri puta tokom stresa kod ljudi (38). U dosadašnjim ispitivanjima koja su imala za cilj kvantifikovanje i evaluaciju neuroendokrinog odgovora na fizički stres uglavnom je ispitivana promena koncentracije hormona HPA osovine kao i koncentracije kateholamina osobođenih pod uticajem aktivacije simpatičkog nervnog sistema (39).



**Slika 2.** Interakcija HPA i HPG osovine pod uticajem stresa (*modifikovano prema referenci Hiller-Sturmhöfel i Bartke, 1998*) (40).

Iako se smatra da hormoni HPA osovine, pre svega, modulišu odgovor organizma na stres, uočeno je da dolazi do promena u koncentraciji i ostalih hormona (37). Posebno hormoni HPG osovine su pod uticajem aktivnosti HPA osovine. Zbog povećanje endogene sekrecije CRH dolazi do inhibicije sekrecije gonadotropin-oslobađajućeg hormona (GnRH), što za posledicu ima smanjenje sekrecije luteinizirajućeg (LH) i folikulostimulirajućeg (FSH) hormona iz prednjeg režnja hipofize, kao i smanjenje biosinteze testosterona (T) u testisima. Poznato je da aktivnost HPG osovine, pre svega testosterona, korelira sa agresivnim i anksioznim ponašanjem, kao i nivoom motivacije za postizanje pobede tokom takmičenja (34). Pokazano je da u stresu, zbog supresije cirkulišućih gonadotropina i gonadnih steroidnih hormona dolazi do poremećaja normalnog menstrualnog ciklusa (41). Dugotrajna izloženost stresu može dovesti do potpunog poremećaja reproduktivne funkcije (42, 43). Takođe, pokazano je da stres koji nastaje zbog straha od nepredviđene situacije, dovodi do sniženja nivoa testosterona (44).

Hormonski sistem je veoma isprepletan i da bi se dobila jasna slika na koji način funkcioniše potrebno je simultano ispitati više sistema odjednom. U zavisnosti od intenziteta i trajanja fizičkog opterećenja, hormoni sa anaboličkom i kataboličkom aktivnošću, kao što su testosteron i kortizol, pokazuju kvantitativne promene. Kortizol je katabolički hormon koji se sekretuje iz kore nadbubrežne žlezde u odgovoru organizma na psihički i fizički stres. Testosteron se smatra glavnim anaboličkim hormonom sa mnogobrojnim fiziološkim funkcijama u ljudskom organizmu, koji se kod muškaraca uglavnom stvara i sekretuje iz Lajdigovih ćelija testisa. Ovi steroidi čine deo dualnog sistema koji definiše i predviđa brojne patofiziološke procese, tako da se smatra da je njihov odnos od većeg značaja nego njihova pojedinačna koncentracija. Količnik testosteron/kortizol (T/C) se koristi za evaluaciju odgovora organizma na stres kao i za procenu fizičkih sposobnosti sportista. Smatra se da visoka vrednost T/C količnika ukazuje na intenzivnije anaboličke reakcije, i obrnuto, kada je T/C snižen 30% i više, to ukazuje na intenzivne kataboličke procese koji se kod sportista vezuju za stanje pretreniranosti (45). U brojnim ispitivanjima koja se bave kontaktnim sportovima pokazano je da odnos testosterona i kortizola predstavlja biološki marker narušene homeostaze nakon takmičenja (46-49), ali za sada ne postoji jasno objašnjenje postkompetitivnih promena odnosa ova dva hormona (50). Psihološki stres kom su studenti izloženi, takođe, dovodi do porasta u koncentraciji kortizola i sniženja u koncentraciji testosterona (51). HPA osovina osim što interaguje sa reproduktivnim sistemom na više nivoa, ima značajan uticaj na imune i inflamatorne reakcije (52, 53).

### **1.4. UTICAJ VEŽBANJA NA PARAMETRE AKTIVNOSTI HPA I HPG OSOVINE**

Izvestan broj studija je pokazao da se tokom kontrakcije, u mišićnom tkivu sintetiše i oslobađa interleukin-6 (IL-6) što upućuje na to da je sinteza IL-6 deo normalnog fiziološkog odgovora koji se javlja kao posledica vežbanja (54). Takođe se zna da pojedini proinflamatorni citokini (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) imaju sposobnost da aktiviraju HPA osovину, delujući na njene različite komponente (55). Receptori za citokine su detektovani u hipotalamusu, hipofizi i nadbubrežnim žlezdama, a takođe, lokalno produkovani citokini u tkivima ovih organa mogu svojim



parakrinim dejstvom, da pojačaju i održe povišenu aktivnost HPA osovine tokom hronične inflamacije (56). Dokazano je da IL-6 reguliše odgovor na stres i ima sposobnost da aktivira HPA osovinu delujući na njene različite nivoe: kroz stimulaciju oslobađanja kortizola iz nadbubrežnih žlezda, i kroz svoj uticaj na hipotalamus, stimuliše oslobađanje ACTH iz prednjeg režnja hipofize (57). Kod ljudi, davanje IL-6 subkutano, indukuje dozno zavisni porast u koncentraciji ACTH i kortizola u plazmi. IL-6 može delovati kao faktor koji stimuliše oslobađanje ACTH iz hipofize i/ili može delovati direktno na adrenalni korteks i zajedno sa ACTH stimulisati oslobađanje kortizola (58). Takođe, kod osoba sa višom bazalnom koncentracijom IL-6 u plazmi zapažen je veći porast koncentracije kortizola pri stimulaciji sa ACTH, čime je pokazano da i u fiziološkim uslovima IL-6 utiče na odgovor nadbubrežnih žlezda koji se javlja pri stimulaciji sa ACTH (59).

Ispitivanjem povezanosti fizičkog vežbanja i broja i funkcije leukocita, pokazano je da je porast broja leukocita nakon vežbanja proporcionalan intenzitetu i trajanju vežbanja (60, 61). Značajan porast ukupnog broja leukocita i posebno neutrofila je najverovatnije posledica vežbanjem uslovljene inflamatorne reakcije koja se javlja kao odgovor na fizički stres i oštećenje mišićnog tkiva (62). Uočeno je da se broj limfocita neposredno nakon vežbanja smanjuje ispod vrednosti pre početka vežbanja, što može biti posledica imunosupresivnog uticaja uzrokovanog lučenjem hormona stresa - kortikosteroida i kateholamina (63). Osim toga, produženo intenzivno vežbanje, može da indukuje specifični inflamatorni odgovor tela, koji je praćen prolaznom leukocitozom i promenom u diferecijalnoj formuli leukocita (64). Jedna od ranijih studija (65) je pokazala da se odnos broja neutrofila i limfocita (NE/LY), koji se smatra odličnim markerom sistemskog inflamatornog odgovora (66), povećava nakon produženog intenzivnog vežbanja.

Iako se fizičko vežbanje smatra blagotvornim za zdravstveno stanje ljudi, postoje studije koje su pokazale da intenzivno fizičko vežbanje može uzrokovati oksidativni stres koji za posledicu ima oštećenje DNK limfocita (67-69) kao i dovesti do redukcije broja i funkcije limfocita. Izvestan broj studija je pokazao da je oštećenje DNK na nivou perifernih ćelija krvi uglavnom posledica povećane produkcije reaktivnih kiseoničnih (ROS) i reaktivnih azotnih vrsta (RNS),

superoksidnog anjona ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodonik-peroksida ( $H_2O_2$ ), hidroksilnih radikala ( $OH\cdot$ ), hipohloritne kiseline ( $HClO$ ) i azot-oksida ( $NO\cdot$ ) koji ispoljavaju štetno dejstvo na makromolekule poput proteina i lipida, a pre svega DNK, tokom i nakon intenzivnog vežbanja (69, 70). Tokom vežbanja, potrošnja kiseonika može da poraste 10 do 15 puta iznad nivoa mirovanja, čime se privremeno povećava brzina produkcije mitohondrijalnih slobodnih radikala. Takođe, vežbanje može uzrokovati inflamatornu reakciju sličnu odgovoru akutne faze, koji se javlja u slučaju infekcije ili povrede (71).

Svakog dana, humani genom pretrpi oko milion lezija, uključujući pripajanja, modifikacije ili fragmentacije lanaca DNK (72). Ukoliko lanci DNK ostanu nespareni, oštećenje DNK može uzrokovati mutacije kao što su zamena baza ili hromozomalne translokacije što narušava normalnu gensku ekspresiju ili dovodi do stvaranja abnormalnih proteina koji su štetni za ćelijsku funkciju ili varijabilnost (73).

I endogeni kao i egzogeni faktori mogu povećati stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta i dovesti do oštećenja DNK (74). Endogeni faktori uključuju proizvode ćelijskog metabolizma, kao što su ROS stvorene procesom oksidativne fosforilacije u mitohondrijama, ili proizvedene procesom lipidne peroksidacije i tokom procesa fagocitoze. Endogena oštećenja mogu nastati zbog grešaka koje nastaju u normalnom procesu replikacije (75, 76). Egzogeni faktori uključuju neadekvatnu ishranu, konzumiranje alkohola, pušenje i uticaj toksina iz životne okoline (75, 77). Postoje dokazi da su oštećenje DNK uzrokovano oksidativnim stresom i poremećeni reparacioni mehanizmi uključeni u patogenezu karcinoma, ateroskleroze, neurodegenerativnih poremećaja i hroničnih bolesti pluća (78, 79).

Na osnovu ispitivanja koja su do sada urađena može se zaključiti da oksidativni stres predstavlja vezu između oštećenja DNK-a i inflamatornog odgovora koji je posledica vežbanja, kao i da je efekat na stabilnost DNK uslovljen dužinom vežbanja kao i aktivnošću enzima koji vrše reparaciju DNK (80).

Poznato je da od nivoa testosterona u cirkulaciji značajno zavise koncentracija hemoglobina i broj eritrocita. U cilju procene fizioloških sposobnosti različitih

sportista, grupa istraživača ispitivala je uticaj fizičkog opterećenja kojem su sportisti izloženi tokom treninga i utakmica, na hematološke parametre (81, 82), pri čemu je uočeno da su koncentracija hemoglobina i hematokrit sniženi tokom perioda intenzivnog treniranja kao i tokom sezone takmičenja. Takođe, pokazano je da višemesečna primena testosterona dovodi do porasta koncentracije hemoglobina i hematokrita kao i do značajnog porasta nivoa eritropoetina u krvi, čime se može objasniti stimulatивно dejstvo ovog hormona na eritropoezu (83).

### **1.5. UTICAJ MAGNEZIJUMA NA AKTIVNOST HPA I HPG OSOVINE**

Uticaj magnezijuma na aktivnost HPA osovine je neosporan ali slabo ispitan. Malobrojne studije upućuju na efekat smanjenja oslobađanja ACTH pod uticajem magnezijuma, a pretpostavlja se da utiče na osetljivost kore nadbubrežne žlezde na dejstvo ACTH (21, 84). U studijama koje su rađene na eksperimentalnim životinjama uočena je povezanost između niske koncentracije jona magnezijuma i anksioznog i/ili depresivnog ponašanja životinja (85, 86), a takođe je pokazano da suplementacija magnezijumom redukuje njihovo anksiozno ponašanje (87). Nekoliko studija izvedenih na eksperimentalnim životinjama, pokazale su da deficijencija magnezijuma vodi do povećane inflamacije i promene u aktivnosti HPA osovine (88). Osim toga pokazana je značajna korelacija između nekoliko parametara anksioznog ponašanja i koncentracije magnezijuma u plazmi i mozgu (85).

Sinteza citokina je jedan od mogućih načina na koji imuni sistem reaguje u stresnim situacijama. Kod ljudi, akutno davanje IL-6 povećava nivo ACTH i koncentracije kortizola na dozno zavisni način (55, 89). Odgovor HPA osovine na stres zahteva citokine (90), uključujući IL-6 koji, kao medijator, učestvuje u kompleksnom odgovoru HPA osovine na stres ili inflamaciju. Pokazano je da je nivo unosa magnezijuma obrnuto proporcionalan nivou pojedinih inflamatornih markera (91) dok su rezultati o uticaju koji suplementacija magnezijumom ima na nivo IL-6, broj, procentualnu zastupljenost i aktivnost leukocita, prilično kontroverzni (28, 92). Sa druge strane, novije *in vitro* i *in vivo* studije pokazale su da suplementacija magnezijumom smanjuje produkciju IL-6 putem povećanja

bazalnog nivoa inhibitora nuklearnog faktora kapa B alfa ( $I\kappa B\alpha$ ) i snižene aktivacije NF $\kappa$ B (93).

S obzirom da je magnezijum jon izuzetno važan za normalno odvijanje energetskog metabolizma, kao i da je pokazan njegov uticaj na aktivnost HPA osovine koja je u uskoj sprezi sa aktivnošću HPG osovine, može se pretpostaviti da dodatak suplemenata magnezijuma ishrani ragbista, može imati višestruk uticaj na fiziološki odgovor koji se javlja kao posledica psiho-fizičkog stresa kojem su ragbisti izloženi tokom takmičenja. Kako je dokazano da intenzivni mentalni i fizički stres dovode do smanjenja sadržaja magnezijuma i da hipomagnezijemija može biti u vezi sa stanjima sličnim anksioznosti, može se pretpostaviti da suplementacija magnezijumom kod osoba često izloženih stresu, kao što su studenti i sportisti, može sniziti štetne efekte stresa. Osim toga nema puno studija u kojima je ispitivana veza između magnezijuma i anaboličkih hormona kod muškaraca što nam je ostavilo prostor da u okviru ovog rada pokušamo da ustanovimo da li magnezijum dovodi do promene u nivou testosterona kao i hematoloških parametara na koje on može da utiče.

### **1.6. AMATERSKI RAGBI**

S obzirom da sam se u toku pisanja disertacije vrlo često susretala sa pitanjem otkud ragbi u Srbiji smatram da je potrebno u nekoliko reči opisati istorijat ovog timskog sporta u našoj zemlji, a takođe objasniti i neka od osnovnih pravila igre koja će pomoći u razumevanju rezultata dobijenih u okviru sprovedenih ispitivanja.

Ključni delovi teksta koji sledi su preuzeti iz knjige "Esej o prvom eseju u Srbiji", autora Dragana Pavlovića (165).

Ragbi je kontaktni sport koji zahteva snagu, brzinu, izdržljivost i fleksibilnost i koji se zasniva na dva osnovna principa: borba za loptu, koja mora biti pravedna, i održavanje kontinuiteta igre što se postiže dodavanjem, nošenjem, šutiranjem kao i izvođenjem dinamičkih faza igre. Ragbi utakmice izvode se na travnatom terenu i sastoje se od dva poluvremena od po 40 minuta, tako da ukupno traju 80 minuta. U

toku igre na terenu je 15 igrača, dok je ostalih 8 rezervnih. U zavisnosti od pozicija koje igraju igrači su podeljeni u dve grupe tzv. igrači melea (napadači) i igrači linije. *Skram* (mele) predstavlja statičku fazu igre u kojoj se osam igrača jedne ekipe gura protiv osam igrača protivničkog tima, kako bi osvojili loptu, dok je *Aut* druga statička faza igre u kojoj se igrači takođe bore za loptu, postavljeni jedan iza drugog pri čemu razmak između protivnika mora biti 1m. *Rak* i *Mol* su dinamičke faze koje umnogome zavise od same taktike igre koju tim primenjuje, pri čemu dolazi do kontakta više od dva ili tri igrača protivničkog tima, u pokušaju da osvoje ili zadrže loptu. Poeni se postižu ili šutem na protivnički gol ili polaganjem lopte u protivnički prostor za postizanje poena (tzv. *esej*). Cilj tima koji je u napadu je da zadrži loptu, i iskoristi svoju veštinu da je prenese unapred, bacajući loptu isključivo unazad, dok odbrambeni tim pokušava da ga zaustavi, ograničavajući mu prostor i sprečavajući ga da prenosi loptu. Prilikom izvođenja ovih aktivnosti dolazi do smene perioda praćenih aktivnostima visokog intenziteta i kratkog trajanja i relativno velike učestalosti sa periodima aktivnosti nižeg intenziteta. Energija koja je potrebna za ove aktivnosti obezbeđuje se sagorevanjem hranjivih materija kombinacijom anaerobnog metabolizma, koji je zavisan od postojećih rezervi ATP-a, fosfokreatina i glikogena u mišićima, i aerobih procesa sagorevanja ugljenih hidrata, masti i proteina, koji su od posebnog značaja za odbrambene igrače i linijaše koji moraju dosta da trče i da brzo reaguju.

Prema istorijskim podacima pominjanje ragbija na teritoriji Srbije vezuje se za početak dvadesetog veka, kada se u istoriji ragbija i desila najznačajnija podela na Ragbi 15 (*Rugby Union*) i Ragbi 13 (*Rugby League*). Godine 1964. Jugoslavija postaje deo Evropske ragbi porodice ulaskom u Međunarodno udruženje amaterskog ragbija (*Federation Internationale de Rugby Amateur, FIRA*) koje je 2014. godine promenilo svoj naziv u Ragbi Evropa i danas broji 43 zemlje članice. U Srbiji danas ragbi klubovi se nalaze pod okriljem dva udruženja: *Ragbi Savez Srbije* koji čini 21 klub koji igraju Ragbi 15, i *Ragbi 13 federacija Srbije* koja broji 24 kluba koji igraju Ragbi 13.

Kada je reč o Ragbiju 15, svake četvrte godine održava se svetsko prvenstvo (*Rugby World Cup*) čiji je organizator Svetska ragbi federacija (*International Rugby*

*Board, IRB*). Završnica ovog takmičenja je najduže sportsko takmičenje na svetu. Naime, s obzirom da je ragbi izuzetno naporna igra, i da nije moguće igrati utakmice svakodnevno ili na svaka 2-3 dana, IRB je svojim propisima regulisao da najmanji razmak između dve utakmice mora biti 5 – 7 dana, zbog čega svetsko prvenstvo traje i do 45 dana.

Ragbi utakmica predstavlja veoma intenzivnu formu vežbanja koje, kao forma fizičkog stresora, aktivira HPA osovину i simpatički nervni sistem, što indukuje snažan fiziološki odgovor praćen promenom u koncentraciji različitih hormona, citokina, kao i drugih parametara povezanih sa stresom (61, 94, 95). Tokom utakmice ragbi igrači izvode intenzivne i naporene aktivnosti, uz maksimalnim utrošak energije tokom vremena u kom se igra (47).

Niz studija bavilo se ispitivanjem psihičkog i fizičkog stresa kod igrača ragbija (50, 96). Različite studije su se bavile ispitivanjem imunoendokrinih i inflamatornih markera, neutrofilne funkcije (produkcije ROS i fagocitne aktivnosti), kao i vremena oporavka neuromuskularne funkcije, ispitivanjem koncentracije testosterona i kortizola, ispitivanjem poremećaja raspoloženja i oštećenja mišića nakon intenzivne kompetitivne fizičke aktivnosti kakva je ragbi utakmica (47, 50, 61, 95, 97). Svega nekoliko studije se bavilo ispitivanjem korelacije između stresa indukovanoг ragbi utakmicom i nivoa oksidativnog oštećenja (95, 97). U većinu ovih studija su bili uključeni profesionalni ragbi igrači dok su se malobrojne studije bavile ispitivanjem amaterskih ragbi igrača (98).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog naučnog istraživanja je bio da se kod ragbista ispita da li magnezijum utiče na parametre aktivnosti HPA i HPG osovine kao i na njihov međusobni odnos, i da se pokaže da li je taj uticaj različit u odnosu na efekte kod muškaraca istog uzrasta koji se ne bave aktivno sportom.

U tom smislu bilo je neophodno da se:

- Odrede nivoi bazalnih vrednosti hormona HPA osovine (ACTH i kortizola); nivo citokina IL-6 koji aktivno učestvuje u regulaciji aktivnosti HPA osovine; ukupan broj leukocita, kao i procentualna zastupljenost pojedinih tipova leukocita. Osim toga bilo je potrebno evaluirati stepen oštećenja DNK perifernih limfocita, koje može biti posledica pre svega izraženog oksidativnog stresa u kontekstu aktiviranja HPA osovine. Određivanje ovih parametara je izvršeno pre i nakon suplementacije magnezijumom kod ragbista i sedentarnih subjekata sa ciljem da se ukaže na razlike u uticaju magnezijuma na aktivnost HPA osovine kod ragbista u odnosu na sedentarne muškarce.
- Odrede nivoi bazalnih vrednosti hormona HPG osovine (LH, FSH i testosterona) kao i koncentracija hemoglobina i broj eritrocita koji u značajnoj meri zavise i od nivoa testosterona u cirkulaciji. Određivanje koncentracija navedenih parametara HPG osovine je izvršeno pre i nakon suplementacije magnezijumom kod ragbista i zdravih muškaraca istog uzrasta koji se ne bave sportom.
- Ispita na koji način ragbi utakmica utiče na dinamiku promena aktivnosti HPA i HPG osovine s posebnim osvrtom na promenu odnosa testosteron/kortizol u salivi i serumu. Svi parametri su određeni na dan utakmice kao i prvog, trećeg i šestog dana nakon utakmice.

- Ispita da li je uticaj ragbi utakmice na dinamiku promena aktivnosti HPA i HPG osovine različit nakon dugotrajne suplementacije magnezijumom u odnosu na efekat pre dodatka magnezijuma ishrani ragbista.



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. KOMERCIJALNI REAGENSI I HEMIKALIJE

U eksperimentalnom radu su korišćeni sledeći reagensi i hemikalije:

- Elecsys ACTH, 03255751190, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
- Elecsys ACTH CalSet, 03255760190, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
- Elecsys PreciControl Multimarker, 05341787190, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
- Elecsys Cortisol, 11875116122, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
- Elecsys Cortisol CalSet, 11875124122, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
- Elecsys PreciControl Universal, 11731416190, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
- Elecsys Testosterone II, 05200067160, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
- Elecsys Testosterone II CalSet, 05202230190, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
- MAS® Liquimmune®, Level 1, LIG-101, Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA
- MAS® Liquimmune®, Level 2, LIG-202, Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA
- MAS® Liquimmune®, Level 3, LIG-303, Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA
- Access hFSH, 33520, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
- Access hFSH calibrator, 33525, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
- Access hLH, 33510, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
- Access hLH calibrator, 33515, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
- Access Testosterone, 33560, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
- Access Testosterone calibrator, 33565, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
- Access IL-6, A16369, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
- Access IL-6 calibrator, A16370, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA

- Access Cortisol, 33600, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
- Access Cortisol calibrator, 33605, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
- Coulter® LYSE S®IIIIdiff Lytic Reagent, 8448155, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
- Coulter® LH Series Pak Reagent Kit, 8547195, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
- Coulter LATRON Control and COULTER LATRON Primer, 7546914, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
- Coulter ®T 5CT ®T Cell Control, 624506, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA
- Agarose, low gelling point, A9414, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- Agarose, normal gelling point, A9539, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
- Slani fosfatni pufer, PBS, Institut za imunologiju i virusologiju Torlak, Beograd, Srbija
- Vodoni-peroksid, 1.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Lizirajući rastvor – 2.5 mol/L NaCl, 100mmol/L etilen-diamintetra-sirćetna kiselina, 10 mmol/L Tris pufer sa pH 10, 1% Triton X-100 i 10% dimetilsulfoksid, sa NaOH podešen pH 10.
- Alkalni pufer – 300 mmol/L NaOH, 1mmol/L EDTA
- Neutralizujući pufer - 0.4 M Tris, pH7.5
- Etidijum-bromid (20 µg/mL)

### 3.2. PRIBOR I APARATI

Pribor :

- vakutajner epruvete za serum, BD Vacutainer® System, 366430, i vakutajner epruvete sa K<sub>3</sub>EDTA, BD Vacutainer® System, 366450 (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)
- plastične čašice za Access 2 analizator, Sample Cups 2 mL/13 mm, 81902, (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA)
- plastične čašice za Cobas Elecsys analizator, Sample Cups, 10394246001 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
- ependorf i pool epruvete, mikroskopske pločice

Analizatori:

- Imunohemijski Access 2 analizator (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA)
- Imunohemijski Elecsys 2010 analizator (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
- Hematološki analizator LH750 (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA)
- Olympus BX50 svetlosni mikroskop (Olympus Optical Co., GmbH, Hamburg, Germany) sa dodatkom za fluorescentno snimanje (dodatak fluorescentne lampe: Japan, Olympus Reflected Light Fluorescence Attachment BX-FLA) i digitalnom kamerom (Sony Power HAD, Japan, 3CCD Color Video Camera, DXC-950P model)
- Sistem za submarine elektroforezu (Amersham Pharmacia Biotech, USA) koji se sastoji od sistema za izlivanje gelova (HE 100 casting kit, Amersham Pharmacia Biotech), kade za submarine elektroforezu (Hoefler SuperSub, Amersham Pharmacia Biotech), termostatskog cirkulatora – hladnjaka (LKB 2219 Multitemp II) i električnog napajanja za elektroforezu EPS 3500XL

### **3.3. MATERIJAL**

U ovom radu u ispitivanje su bile uključene dve grupe ispitanika, zdravih muškaraca uzrasta 18 do 25 godina:

- sedentarnu grupu je činilo 15 muškaraca, studenata Univerziteta u Beogradu, koji se nisu bavili nikakvom fizičkom aktivnošću (ni aktivno ni rekreativno) najmanje šest meseci pre početka studije i koji su nastavili sa takvim režimom života i tokom trajanja studije.
- grupu aktivnih sportista činila su 23 ragbi igrača, koji su aktivni sportisti beogradskog amaterskog ragbi kluba, treniraju tri puta nedeljno po 2 sata i imaju utakmicu nedeljom popodne. Oni su nakon uzimanja uzoraka za određivanje bazalnih vrednosti, podeljeni u dve grupe: kontrolnu (n=10) i interventnu grupu (n=13) koja je uzimala magnezijum.

Antropometrijski podaci ispitanika uključenih u studiju dati su u *Tabeli II*.

Svi učesnici su, nakon što su u potpunosti bili informisani o eksperimentalnim procedurama, dali pisanu saglasnost. Ispitivanje je odobreno od strane Etičkog komiteta za klinička ispitivanja, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, zavedenog pod brojem 199/2 i 2817/2. Analize hormona i hematološkog statusa ispitanika izvedene su u Centru za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije i na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

**Tabela II** Antropometrijski podaci ispitanika uključenih u studiju.

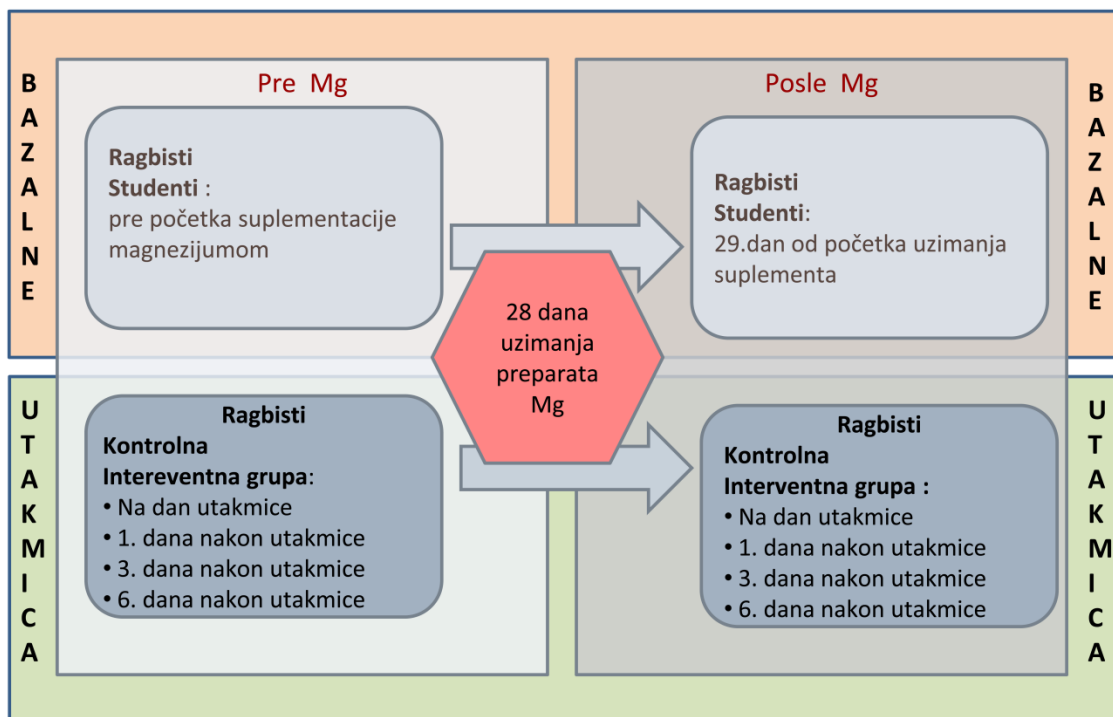
	STUDENTI	RAGBISTI (kontrolna grupa)	RAGBISTI (interventna grupa)
n	15	10	13
Godine	22,3 (0,22)	22,9 (1,18)	23,6 (1,40)
Visina (cm)	185,8 (1,60)	182,0 (2,13)	180,7 (1,65)
Telesna masa (kg)	82,8 (3,04)	84,7 (1,87)	85,1 (3,66)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,4 (0,75)	25,58 (0,43)	25,97 (0,80)

Vrednosti su date kao srednja vrednost (SEM).

Uzorci venske krvi i salive su uzimani u jutarnjim časovima (09-10h), uvek u isto vreme.

Krv je uzimana posle 12 sati gladovanja, u tri epruvete – dve epruvete sa EDTA i jednu biohemijsku epruvetu sa gelom bez aditiva. Jedna od epruveta sa EDTA je korišćena za hematološke analize i Comet test. Druga epruveta je odmah stavljena na led i plazma je izdvajana centrifugiranjem na 3000 obrtaja u minuti na 4 °C (centrifuga sa hlađenjem) tokom 15 minuta. Radi izdvajanje seruma epruvete sa gelom su centrifugirane brzinom od 3000 obrtaja u minuti na sobnoj temperaturi, tokom 15 minuta. Plazma i serum su bili podeljeni u alikvote i čuvani u duplikatu na -80 °C sve do momenta dok nisu izvršene analize. Comet test je bio urađen istog dana po uzorkovanju. Za sakupljanje salive korišćena su po dva pamučna sunđerčića (BD Visispear, Beaver-Visitec International, USA), po ispitaniku. Nakon 60-90 sekundi sakupljanja, sunđerčići su stavljani u epruvetu sa čepom i saliva je

izdvajana centrifugiranjem radi dobijanja dovoljne količine uzorka. Uzorci salive su alikvotirani u roku od 2 sata od uzimanja uzorka, i čuvani u duplikatu na -80 °C do analize. Na *Slici 3.* dat je algoritam ispitivanja.



**Slika 3. Algoritam studije.** *BAZALNE* - Za procenu razlike uticaja magnezijuma na bazalne vrednosti parametara aktivnosti HPA i HPG osovine kod ragbista i fizički neaktivnih osoba, svi parametri su određivani kod Studenata i Ragbista pre početka suplementacije i 29.dana od početka suplementacije, što je Ragbistima bio dan pre utakmice. *UTAKMICA* - Za procenu uticaja magnezijuma na dinamiku promene parametara aktivnosti HPA i HPG osovine svi parametri su određivani na dan utakmice, kao i prvog, trećeg i šestog dana posle utakmice.

U periodu pre uzimanja magnezijuma, uzeti su uzorci krvi i salive koji su korišćeni za određivanje bazalnih vrednosti svih parametara aktivnosti HPA i HPG osovine (na algoritmu označen kao *BAZALNE*):

- kod studenata, uzorci su uzeti prvog dana, pre početka uzimanja suplementa magnezijuma
- kod ragbista, su uzeti na dan kada nemaju trening, tj. dan pred utakmicu

Pre početka suplementacije, ragbistima su, takođe, uzeti uzorci venske krvi i salive na dan utakmice kao i prvog, trećeg i šestog dana oporavka nakon utakmice kako bi se ispitalo na koji način ragbi utakmica utiče na dinamiku promene aktivnosti HPA i HPG osovine (na algoritmu označen kao UTAKMICA). Nakon bazalnog uzorkovanja ragbisti su podeljeni na kontrolnu grupu (n=10) i interventnu grupu (n=13) koja je uzimala magnezijum.

Sedentarna grupa ispitanika započela je uzimanje preparata magnezijuma dan posle prvog bazalnog uzorkovanja, dok je interventna grupa ragbista započela uzimanje preparata magnezijuma sedmog dana posle utakmice. Tri meseca pre i tokom studije niko od ispitanika nije uzimao vitaminske preparate ili neke druge suplemente. Kao preparat magnezijuma korišćen je Magnezijum 250 mg® tablete (Natural Welth, NBTY Inc., New York, USA), *per os*, dva puta dnevno u ukupnoj dozi od 500 mg. Kod obe grupe ispitanika period suplementacije trajao je 28 dana, a ragbisti su, tokom ovog perioda, imali treninge i utakmice prema predviđenom rasporedu.

Ragbistima je prvi dan po završenoj suplementaciji bio dan pre utakmice, i kao i za grupu studenata, to je bio dvadeset deveti dan od dana kada su započeli suplementaciju. Uzorci salive i krvi uzeti na taj 29.dan, korišćeni su za procenu uticaja magnezijuma na bazalne vrednosti parametara aktivnosti HPA i HPG osovine, kao i za poređenje efekta koji magnezijum ima na ove parametre kod ragbista i kod osoba koje se ne bave aktivno sportom.

Zatim su ragbistima uzimani uzorci venske krvi i salive po istoj šemi kao i u periodu kada nisu uzimali magnezijum: na dan utakmice, kao i prvog, trećeg i šestog dana oporavka nakon utakmice, u cilju procene efekta magnezijuma na dinamiku promene parametara aktivnosti HPG i HPA u postkompetitivnom periodu.

### 3.4. METODE

#### 3.4.1. Određivanje koncentracije ACTH

Određivanje koncentracije ACTH izvršeno je primenom elektrohemiluminiscentne imunometrijske metode na analizatoru Elecsys 2010 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). U pitanju je jednostepeni sendvič imunoesej koji koristi biotinom obložena monoklonska anti-ACTH specifična antitela, mikropartikule obložene streptavidinom i monoklonsko anti-ACTH specifično antitelo u kompleksu sa rutenijumom. Po završenoj jednostepenoj inkubaciji sa specifičnim antitelima reakciona smeša se aspirira u mernu ćeliju gde mikropartikule oblažu površinu elektrode pod uticajem magnetnog privlačenja. ProCell rastvorom se uklanja nevezana supstanca, a napon na elektrodi uzrokuje pojavu hemiluminiscentne emisije čiji se intenzitet meri fotomultiplikatorom. Rezultati se određuju na osnovu kalibracione krive i automatski preračunavaju u koncentracije za svaki uzorak.

Za određivanje korišćeni su reagensi firme Roche koji su spremni za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Elecsys ACTH reagens 03255751190 - uključuje:
  - Streptavidinom obložene mikropartikule (0,72 mg/mL), konzervanse.
  - Anti ACTH-antitelo~biotin (mišje monoklonsko anti ACTH antitelo obloženo biotinom (0,3 mg/L)), MES pufer (50 mmol/L) pH 6,2 i konzervanse
  - Anti ACTH antitelo u kompleksu sa rutenijumom (mišje monoklonsko anti ACTH, 0,3 mg/L rutenijuma), MES pufer (50 mmol/L, pH 6,2) i konzervanse
- Elecsys ACTH CalSet, 03255760190, pakovanje 2 x 1 mL kalibratora nivo 1 i 2. Kalibratori su liofilizati koje je potrebno rastvoriti sa 1mL dejonizovane vode i ostaviti 15 minuta da se rekonstituiše. Stabilnost rekonstituisanih kalibratora je mesec dana na -20 °C ili se koriste odmah i samo jednom na analizatoru na 20-25 °C. Sledljivost: ACTH test je standardizovan gravimetrijski sa sintetičkim ACTH koji je proizveden u Roche-u.

- PreciControl Multimarker, 05341787190, 3 x 2 mL svakog nivoa PreciControl Multimarker 1 i 2. Kontrola je liofilizat zasnovan na konjskom serumskom matriksu. Priprema se rastvaranjem sa 2 mL dejonizovane ili destilovane vode nakon čega treba da odstoji 30 minuta. Kontrole se čuvaju 2-8 °C, po rekonstituciji mogu da se čuvaju u zamrzivaču na -20 °C do 31 dan, 72h na 2-8 °C i 5h na sobnoj temperaturi.

Prema uputstvu proizvođača koriste se samo uzorci koji su prethodno hladeni. Nakon uzorkovanja potrebno je uzorke odmah staviti na led. Da bi se odvojila plazma koristi se centrifuga sa hlađenjem. Uzorak treba odmah da se analizira pošto je stabilan 2 sata na 22 °C, ili odmah da se zaledi, pri čemu je stabilnost 4 nedelje na -20 °C. Merni opseg je 0,220–440 pmol/L, vrednosti ispod ili iznad donje ili gornje granice mernog opsega se izražavaju kao < 0,220 pmol/L ili > 440 pmol/L, proizvođač ne preporučuje razblaženje zbog širokog opsega merenja; očekivane vrednosti 1,6–13,9 pmol/L; donja granica detekcije (analitička osetljivost) je 0,220 pmol/L.

#### **3.4.2. Određivanje koncentracije kortizola u serumu**

Određivanje koncentracije kortizola u serumu izvršeno je primenom hemiluminiscentne imunometrijske metode na analizatoru Access 2 (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA). Access Cortisol test je kompetitivni imunoenzimski test. Princip testa zasnovan je na tome što se uzorak dodaje u reakcionu kivetu zajedno sa zečijim antitelom na kortizol, kortizol-alkalna fosfataza konjugatom i paramagnetskim partikulama obloženim kozijim anti-zečijim antitelom. Kortizol iz uzorka se takmiči sa kortizol-alkalna fosfataza konjugatom za vezujuća mesta na ograničenoj količini specifičnih anti-kortizol antitela. Dobijeni antigen-antitelo kompleks se vezuje za antitela na čvrstoj fazi. Nakon inkubacije u reakcionoj kiveti, materijal vezan za čvrstu fazu održavaju se u magnetnom polju dok se nevezani materijal ispira. Zatim se u reakcionu kivetu dodaje hemiluminiscentni supstrat LumiPhos 530, i svetlost dobijena u reakciji se meri luminometrom. Dobijena svetlost je obrnuto proporcionalna koncentraciji kortizola u uzorku. Količina analita u uzorku se određuje na osnovu kalibracione krive.



Za određivanje korišćeni su reagensi firme Beckman Coulter, Inc., Brea, USA, koji su spremni za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Access Cortisol, 33600, uključuje:
  - Kortizol-alkalna fosfataza (goveđa) konjugat i paramagnetske partikule obložene kozijim anti-zečijim IgG u TRIS puferu, sa surfaktantom, BSA matriksom, i < 0,1% natrijum-azida
  - Zečiji antiserum na kortizol u TRIS puferu, sa surfaktantom, BSA matriksom, i < 0,1% natrijumazida.
- Access Cortisol calibrator, 33605, pakovanje 6 x 4 mL. Sastoji se od 50 kalibratora (Humani serum sa < 0.1% natrijum-azida, i 0.5% ProClin 300. Sadrži 0.0 nmol/L kortizola) i kalibratora S1-S5 (Kortizol /prečišćena hemijska komponenta/ u humanom serumu, u koncentracijama približno 55, 138, 276, 690 i 1655 nmol/L redom, sa < 0,1% natrijumazida, i 0,5% ProClin 300). Sledljivost analita u Access Cortisol kalibratoru je određena prema USP referentnom materijalu, a proces sledljivosti je zasnovan na EN ISO 17511.
- Kao kontrola korišćena je MAS® Liquimmune® Control, Level 1, 2 i 3, Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA; svako pakovanje sadrži 6 x 5 mL. Kontrole se čuvaju u zamrzivaču na -15 °C do -20 °C. Nakon što se odlede, stabilnost neotvorene kontrole je 90 dana na 2-8 °C, odnosno stabilnost otvorene kontrole je 30 dana za sve analite na 2-8 °C.

Serum, plazma (heparin) i urin su preporučeni uzorci. Uzorke seruma treba čuvati na sobnoj temperaturi, ne duže od osam sati, u frižideru na temperaturi 2-8 °C tokom 48 sati ili zamrznuti na -20 °C ili još nižoj temperaturi. Odmrzavanje uzoraka je dozvoljeno samo jednom. Uzorci mogu biti tačno određeni u okviru analitičkog opsega, od donje granice detekcionog limita do najviše vrednosti kalibratora, približno 11-1655 nmol/L. Ako je koncentracija analita u uzorku veća od koncentracije najvišeg nivoa Access Cortisol Kalibratora (S5), izdati rezultat kao veći od te vrednosti > 1655 nmol/L ili razblažiti uz pomoć Access Cortisol Kalibratora (S0). Očekivane vrednosti za muškarce kreću se od 240 do 618 nmol/L. Najniža detektibilna koncentracija kortizola različita od nule sa 95% pouzdanosti

je 11 nmol/L. Za koncentraciju od 138 nmol/L test pokazuje ukupnu nepreciznost manju od 12%, i manju od 10% za više koncentracije.

### 3.4.3. Određivanje koncentracije kortizola u salivi

Određivanje koncentracije kortizola u salivi izvršeno je primenom elektrohemiluminiscentne imunometrijske metode na analizatoru Elecsys 2100 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). U pitanju je kompetitivni imunoesej kod kog se prvo 20  $\mu$ L uzorka inkubira sa biotinom obloženim kortizol specifičnim antitelima i derivatima kortizola koji su u kompleksu sa rutenijumom. U zavisnosti od koncentracije analita i formiranja imunih kompleksa, vezujuće mesto obeleženog antitela je delom okupirano sa analitom iz uzorka, a delom sa haptenom obeleženim rutenijumom. Po dodatku mikropartikula obloženih streptavidinom, imuni kompleks se vezuje za čvrstu fazu putem interakcije biotina i streptavidina. Potom se reakciona smeša aspirira u mernu ćeliju gde mikropartikule oblažu površinu elektrode pod uticajem magnetnog privlačenja. ProCell rastvorom se uklanja nevezana supstanca, a napon na elektrodi uzrokuje pojavu hemiluminiscentne emisije čiji se intenzitet meri fotomultiplikatorom. Rezultati se određuju na osnovu kalibracione krive i automatski preračunavaju u koncentracije za svaki uzorak.

Za određivanje korišćeni su reagensi firme Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany koji su spremni za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Elecsys Cortisol, 11875116122, uključuje:
  - Streptavidinom obložene mikropartikule (0,72 mg/mL), konzervanse.
  - Anti kortizol-antitelo~biotin (ovčje poliklonsko anti-kortizol antitelo obloženo biotinom (90 mg/mL)), MES pufer (100 mmol/L) pH 6,0 i konzervanse
  - Sintetički derivat kortizola u kompleksu sa rutenijumom (25 ng/mL rutenijuma), danazol 20  $\mu$ g/mL, MES pufer (100 mmol/L, pH 6,0) i konzervanse
- Elecsys Cortisol CalSet, 11875124122, pakovanje 4 x 1 mL. Liofilizovani humani serum sa dodatkom kortizola u dva koncentraciona opsega.

Kalibratore je potrebno rastvoriti sa 1 mL dejonizovane vode i ostaviti 15 minuta da se rekonstituišu. Stabilnost rekonstituisanih kalibratora je tri meseca na -20 °C ili se koriste odmah i samo jednom na analizatoru na 20-25 °C. Sledljivost: Kortizol test je standardizovan prema Enzyzumun-Test Kortizol metodi koja je standardizovana prema ID-MS.

- PreciControl Universal, 11731416190, 2 x 3 mL svakog nivoa PreciControl Universal 1 i 2. Liofilizovani humani serum u dva koncentraciona opsega. Priprema se rastvaranjem sa 3 mL dejonizovane ili destilovane vode nakon čega treba da odstoji 30 minuta. Kontrole se čuvaju 2-8 °C , po rekonstituciji mogu da se čuvaju u zamrzivaču na -20 °C do 30 dana, 3 dana na 2-8 °C i 5 sati na sobnoj temperaturi.

Prema uputstvu proizvođača salivu treba sakupiti uz upotrebu Salviette štapića. Mi smo u našoj studiji koristili dva sunđerčića (BD Visispear, Beaver-Visitec International, USA) po ispitaniku. Ne treba koristiti bočice koje sadrže citratnu kiselinu. Pamučni sunđerčić staviti usta i nežno žvakati oko 2 minuta dok se ne natopi salivom. Zatim ga vratiti u konusnu epruvetu sa zatvaračem. Centrifugirati 2 minuta na 1000g da bi se saliva izdvojila u spoljašnju epruvetu. Koristiti bistar supernatant za Elecsys Cortizol test. Koristiti ih na isti način kao i serum i plazmu. Nepreciznost unutar serije za koncentracije 4,68 nmol/L i 19,8 mol/L su bile 6,1% i 2,8%, redom. Centrifugirana saliva stabilna je 5 dana na 2-8 °C, tri meseca na -20 °C. Zalediti samo jednom. Merni opseg je 0,5–1750 nmol/L; prema preporuci proizvođača očekivane vrednosti u jutarnjim satima za salivu su < 19,1 nmol/L; donja granica detekcije (analitička osetljivost) je 0,5 nmol/L.

#### **3.4.4. Određivanje koncentracije IL-6**

Određivanje koncentracije IL-6 u serumu izvršeno je primenom hemiluminscentne imunometrijske metode na analizatoru Access 2 (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA). Access IL-6 je simultani jednostepeni imunoenzimski (sendvič) test. Uzorak se dodaje u reakcionu kivetu i inkubira zajedno sa paramagnetskim partikulama obloženim mišjim monoklonskim anti-humanim IL-6, blokirajućim reagensom i konjugatom alkalne fosfataze. Nakon inkubacije materijali vezani za čvrstu fazu

održavaju se u magnetnom polju, dok se nevezani materijal ispira. Zatim se u reakcionu kivetu dodaje hemiluminiscentni supstrat LumiPhos 530, i svetlost dobijena u reakciji se meri luminometrom. Svetlost dobijena u reakciji je direktno proporcionalna koncentraciji IL-6 u uzorku. Količina analita u uzorku se preračunava iz kalibracione krive dobijene kalibracijom u više tačaka.

Za određivanje korišćeni su reagensi firme Beckman Coulter, Inc., Brea, USA, koji su spremni za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Access IL-6, A16369, uključuje:
  - Paramagnetske partikule obložene kozijim anti-mišijim IgG: mišije anti-humano IL-6 monoklonsko antitelo
  - TRIS fiziološki pufer, proteini (svinjski, goveđi, mišiji, koziji), surfaktant, < 0,1% natrijum-azida i 0.17% ProClin 300
  - Konjugat kozjeg anti-humanog IL-6 i alkalne fosftaze (goveđe), goveđi serumski albumin surfaktant, 0,1% natrijum-azida i 0,17% ProClin 300.
- Access IL-6 calibrator, A16370, pakovanje 1 x 4 mL S0, 5 x 2,5 mL S1-S5. Sastoji se od S0 kalibratora (Puferovani goveđi serumski albumin (BSA) sa surfaktantom, < 0,1% natrijum-azida, i 0,15% ProClin 300) i kalibratora S1-S5 (u puferovani BSA matriks, rekombinantni humani IL-6 sa surfaktantom, < 0,1% natrijum-azida, i 0.15% ProClin 300). Sledljivost analita u Access IL-6 kalibratoru je određena prema radnom kalibratoru proizvođača, a proces sledljivosti je zasnovan na EN ISO 17511.
- Kao kontrola korišćena je MAS® Liquimmune ® Control, Level 1, 2 i 3, Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA; svako pakovanje sadrži 6 x 5 mL. Kontrole se čuvaju u zamrzivaču na -15 °C do -20 °C. Nakon što se odlede, stabilnost neotvorene kontrole je 90 dana na 2-8 °C, odnosno stabilnost otvorene kontrole je 30 dana za sve analite na 2-8 °C.

Serum i plazma (heparin) su preporučeni uzorci. Uzorke treba čuvati na sobnoj temperaturi, ne duže od osam sati, u frižideru na temperaturi 2-8 °C tokom 48 sati ili zamrznuti na -20 °C ili još nižoj temperaturi. Odmrzavanje uzoraka je dozvoljeno samo jednom. Uzorci mogu biti tačno određeni u okviru analitičkog opsega, od donje granice detekcionog limita do najviše vrednosti kalibratora, približno 0,5-

1500 pg/mL. Ako je koncentracija analita u uzorku veća od koncentracije najvišeg nivoa Access IL-6 Kalibratora (S5), izdati rezultat kao veći od te vrednosti, npr. > 1500 pg/mL ili razblažiti sa Access IL-6 kalibratorom S0 ili Access Sample Diluent A reagensom, 81908, u odnosu 1:2. Očekivane vrednosti za muškarce kreću se od 1,9 do 4,0 pg/mL. Najniža detektibilna koncentracija IL-6 različita od nule sa 95% pouzdanosti je 0,5 pg/mL. Za koncentraciju veće od 2 pg/mL test pokazuje ukupnu nepreciznost manju od 12%.

#### **3.4.5. Određivanje koncentracije FSH**

Određivanje koncentracije FSH u serumu izvršeno je primenom hemiluminiscentne imunometrijske metode na analizatoru Access 2 (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA). Access FSH test je sekvencijalni dvostepeni imunoenzimski («sendvič») test. Uzorak se dodaje u reakcionu kivetu i inkubira zajedno sa paramagnetskim partikulama obloženim kozjim anti-mišjim:mišjim anti-hFSH kompleksima i TRIS puferovanim fiziološkim rastvorom sa proteinima. FSH se vezuje za imobilisano mišje anti-FSH antitelo na čvrstoj fazi. Nakon inkubacije u reakcionoj kiveti, materijal vezan za čvrstu fazu održava se u magnetnom polju, dok se nevezani materijal ispira. Zatim se dodaje kozje anti-hFSH antitelo konjugovano sa alkalnom fosfatazom, koje se vezuje za prethodno vezani FSH na partikulama. Drugom separacijom i ispiranjem uklanja se nevezani konjugat. Zatim se u reakcionu kivetu dodaje hemiluminiscentni supstrat LumiPhos 530, i svetlost dobijena u reakciji se meri luminometrom. Svetlost dobijena u reakciji je direktno proporcionalna koncentraciji FSH u uzorku. Količina analita u uzorku se preračunava iz kalibracione krive dobijene kalibracijom u više tačaka.

Za određivanje korišćeni su reagensi firme Beckman Coulter, Inc., Brea, USA, koji su spremni za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Access hFSH, 33520, uključuje:
  - Paramagnetske partikule obložene kozjim anti-mišjim IgG: mišjim monoklonskim anti-hFSH antitelom

- Koziji anti-hFSH-alkalna fosfataza (goveđa) konjugat u TRIS puferu, sa proteinom (goveđi, mišiji,koziji), surfaktant, < 0,1% natrijum-azida i 0,1% ProClin 300
- TRIS pufer sa proteinom (goveđi, mišji, kozji), surfaktant, < 0,1% natrijum-azida i 0,1% ProClin300
- Access hFSH calibrator, 33525, pakovanje 6 x 4 mL. Sastoji se od S0 kalibratora (Puferovani goveđi serumski albumin (BSA) sa surfaktantom, < 0,1% natrijum-azida, i 0,5% ProClin 300. Sadrži 0,0 IU/L hFSH) i kalibratora S1-S5 (hFSH u koncentracijama približno 1, 10, 50, 100 i 200 IU/L, redom, u puferovanom BSA matriksu sa surfaktantom, < 0,1% natrijum-azida, i 0,5% ProClin 300). Sledljivost analita u Access hFSH kalibratoru prema 2. internacionalnom referentnom preparatu SZO za hFSH (78/549), a proces sledljivosti je zasnovan na EN ISO 17511.
- Kao kontrola korišćena je MAS® Liquimmune ® Control, Level 1, 2 i 3, Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA; svako pakovanje sadrži 6 x 5 mL. Kontrole se čuvaju u zamrzivaču na -15 °C do -20 °C. Nakon što se odlede, stabilnost neotvorene kontrole je 90 dana na 2-8 °C, odnosno stabilnost otvorene kontrole je 30 dana za sve analite na 2-8 °C.

Serum i plazma (heparin) su preporučeni uzorci. Uzorke treba čuvati na sobnoj temperaturi, ne duže od osam sati, u frižideru na temperaturi 2-8 °C tokom 48 sati ili zamrznuti na -20 °C ili još nižoj temperaturi. Odmrzavanje uzoraka je dozvoljeno samo jednom. Analitički opseg se kreće od 0,2-200 IU/L. Očekivane vrednosti za muškarce kreću se od 1,27 do 19,26 IU/L. Najniža detektibilna koncentracija hFSH različita od nule sa 95% pouzdanosti je 0,2 IU/L. Za koncentraciju od 9,95 IU/L test pokazuje nepreciznost unutar merenja 3,5%, odnosno ukupnu nepreciznost 5,6%.

#### **3.4.6. Određivanje koncentracije LH**

Određivanje koncentracije LH u serumu izvršeno je primenom hemiluminscentne imunometrijske metode na analizatoru Access 2 (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA). Access LH test je sekvencijalni dvostepeni imunoenzimski («sendvič») test. Uzorak se dodaje u reakcionu kivetu i inkubira zajedno sa paramagnetskim

partikulama obloženim kozjim anti-mišjim:mišjim anti-hLH kompleksima i TRIS puferovanim fiziološkim rastvorom sa proteinima. LH se vezuje za imobilisano mišje anti-hLH antitelo na čvrstoj fazi. Nakon inkubacije u reakcionoj kivetu, materijal vezan za čvrstu fazu se održava u magnetnom polju, dok se nevezani materijal ispira. Zatim se dodaje kozje anti-hLH antitelo konjugovano sa alkalnom fosfatazom, koje se vezuje za prethodno vezani LH na partikulama. Drugom separacijom i ispiranjem uklanja se nevezani konjugat. Zatim se u reakcionu kivetu dodaje hemiluminiscentni supstrat LumiPhos 530, i svetlost dobijena u reakciji se meri luminometrom. Svetlost dobijena u reakciji je direktno proporcionalna koncentraciji LH u uzorku. Količina analita u uzorku se preračunava iz kalibracione krive dobijene kalibracijom u više tačaka.

Za određivanje korišćeni su reagensi firme Beckman Coulter, Inc., Brea, USA, koji su spremni za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Access hLH, 33510, uključuje:
  - Paramagnetske partikule obložene kozijim anti-mišijim IgG: mišijim monoklonskim anti-hLH kompleksima, suspendovane u TRIS puferu, sa goveđim serumskim albuminom (BSA), < 0,1% natrijum-azida i 0,1% ProClin 300.
  - TRIS pufer sa BSA, protein (mišiji, koziji), surfaktant, < 0,1% natrijum-azida i 0,1% ProClin 300.
  - Koziji anti-hLH-alkalna fosfataza konjugat u TRIS puferu sa BSA, protein (koziji), surfaktant, < 0,1% natrijum-azida i 0,1% ProClin 300.
- Access hLH calibrator, 33515, Beckman Coulter, Inc., Brea, USA, 6 x 4 mL. Sastoji se od S0 kalibratora (Puferovani goveđi serumski albumin (BSA) sa surfaktantom, < 0,1% natrijum-azida, i 0,5% ProClin 300. Sadrži 0,0 IU/L hLH) i kalibratora S1-S5 (hLH u koncentracijama približno 2, 10, 25, 100 i 250 IU/L, redom, u puferovanom BSA matriksu sa surfaktantom, < 0,1% natrijum-azida, i 0,5% ProClin 300). Sledljivost analita u Access hLH kalibratoru prema 2. internacionalnom referentnom preparatu SZO za hLH (80/522), a proces sledljivosti je zasnovan na EN ISO 17511.

- Kao kontrola korišćena je MAS® Liquimmune ® Control, Level 1, 2 i 3, Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA; svako pakovanje sadrži 6 x 5 mL. Kontrole se čuvaju u zamrzivaču na -15 °C do -20 °C. Nakon što se odlede, stabilnost neotvorene kontrole je 90 dana na 2-8°C, odnosno stabilnost otvorene kontrole je 30 dana za sve analite na 2-8 °C.

Serum i plazma (heparin) su preporučeni uzorci. Uzorke treba čuvati na sobnoj temperaturi, ne duže od osam sati, u frižideru na temperaturi 2-8 °C tokom 48 sati ili zamrznuti na -20 °C ili još nižoj temperaturi. Odmrzavanje uzoraka je dozvoljeno samo jednom. Uzorci mogu biti tačno određeni u okviru analitičkog opsega, od donje granice detekcionog limita do najviše vrednosti kalibratora, približno 0,2-250 IU/L. Ako je koncentracija analita u uzorku veća od koncentracije najvišeg nivoa Access hLH Kalibratora (S5), izdati rezultat kao veći od te vrednosti > 250 IU/L ili razblažiti sa Access Sample Diluent A reagensom, 81908. Očekivane vrednosti za muškarce kreću se od 1,24 do 8,62 IU/L. Najniža detektibilna koncentracija hLH različita od nule sa 95% pouzdanosti je 0,2 IU/L. Za koncentraciju od 4,01 IU/L test pokazuje nepreciznost unutar merenja 3,8%, odnosno ukupnu nepreciznost 6,4%.

#### **3.4.7. Određivanje koncentracije testosterona u serumu**

Određivanje koncentracije testosterona u serumu izvršeno je primenom hemiluminiscentne imunometrijske metode na analizatoru Access 2 (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA). Access Testosterone test je kompetitivni imunoenzimski test čiji se princip zasniva na tome da se uzorak dodaje u reakcionu kivetu zajedno sa rastvorom za tretman uzorka, mišijim monoklonskim anti-testosteron antitelom, testosteron-alkalna fosfataza konjugatom i paramagnetskim partikulama obloženim kozijim anti-mišijim poliklonskim antitelom. Testosteron iz uzorka se oslobađa od proteina nosača u prisustvu rastvora za tretman uzorka, i takmiči se sa testosteron-alkalna fosfataza konjugatom za vezujuća mesta na ograničenoj količini specifičnih anti-testosteron monoklonskih antitela. Dobijeni antigen-antitelo kompleks se zatim vezuje za čvrstu fazu preko antitela. Nakon inkubacije u reakcionoj kiveti, materijal vezan za čvrstu fazu se održava u



magnetnom polju, dok se nevezani materijal ispira. Zatim se u reakcionu kivetu dodaje hemiluminiscentni supstrat LumiPhos 530, i svetlost dobijena u reakciji se meri luminometrom. Dobijena svetlost je obrnuto proporcionalna koncentraciji testosterona u uzorku. Količina analita u uzorku se određuje iz kalibracione krive.

Za određivanje korišćeni su reagensi firme Beckman Coulter, Inc., Brea, USA, koji su spremni za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Access Testosterone, 33560, uključuje:
  - Paramagnetske partikule obložene kozijim anti-mišije IgG; testosteron-alkalna fosfataza konjugat sa goveđim serumskim albuminom (BSA), < 0,1% natrijum azid i 0,1% ProClin 300.
  - Rastvor za tretman uzorka, < 0,1% natrijum azid
  - Monoklonsko anti-testosteron (mišije), protein (BSA, mišiji, koziji), < 0,1% natrijum azid, 0,1% ProClin 300.
- Access Testosterone calibrator, 33565, Beckman Coulter, Inc., Brea, USA, 6 x 2,5 mL. Sastoji se od S0 kalibratora (Pufеровани goveđi serumski albumin (BSA), < 0,1% natrijum azida i 0,5% ProClin 300) i kalibratora S1-S5 (BSA matriks sa 0,5% ProClin 300 i < 0,1% natrijum azida i testosteron u koncentracijama 1,7, 5,2, 13,9, 27,8 i 55,5 nmol/L). Access testosteron kalibratoru je sledljiv prema USP referentnom materijalu, a proces sledljivosti je zasnovan na EN ISO 17511.
- Kao kontrola korišćena je MAS® Liquimmune ® Control, Level 1, 2 i 3, Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA; svako pakovanje sadrži 6 x 5 mL. Kontrole se čuvaju u zamrzivaču na -15 °C do -20 °C. Nakon što se odlede, stabilnost neotvorene kontrole je 90 dana na 2-8 °C, odnosno stabilnost otvorene kontrole je 30 dana za sve analite na 2-8 °C.

Serum i plazma (heparin) su preporučeni uzorci. Uzorke treba čuvati na sobnoj temperaturi, ne duže od osam sati, u frižideru na temperaturi 2-8 °C tokom 48 sati ili zamrznuti na -20 °C ili još nižoj temperaturi. Odmrzavanje uzoraka je dozvoljeno samo jednom. Uzorci mogu biti tačno određeni u okviru analitičkog opsega, od donje granice detekcionog limita do najviše vrednosti kalibratora, približno 0,35-55,5 nmol/L. Ako je koncentracija analita u uzorku veća od koncentracije najvišeg

nivoa Access testosteron kalibratora (S5), izdati rezultat kao veći od te vrednosti > 55,5 nmol/L ili razblažiti sa Access Testosteron kalibratorom S0. Očekivane vrednosti za muškarce kreću se od 6,07 do 27,10 nmol/L. Najniža detektibilna koncentracija testosterona različita od nule sa 95% pouzdanosti je 0,35 nmol/L. Za koncentraciju od 7,81 IU/L test pokazuje nepreciznost unutar merenja 1,67%, odnosno ukupnu nepreciznost 5,07%.

#### **3.4.8. Određivanje koncentracije testosterona u salivi**

Određivanje koncentracije testosterona u salivi izvršeno je primenom elektrohemijske imunometrijske metode na analizatoru Elecsys 2010 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). U pitanju je kompetitivni imunoesej kod kog se prvo 20 µL uzorka inkubira sa biotinom obloženim kortizol specifičnim antitelima. U zavisnosti od koncentracije analita, vezujuće mesto obeleženog antitela je okupirano sa analitom iz uzorka. U drugom koraku vrši se dodavanje mikropartikula obloženih streptavidinom i derivata testosterona obeleženog rutenijumom. Imuni kompleks se vezuje za čvrstu fazu putem interakcije biotina i streptavidina. Potom se reakciona smeša aspirira u mernu ćeliju gde mikropartikule oblažu površinu elektrode pod uticajem magnetnog privlačenja. ProCell rastvorom se uklanja nevezana supstanca, a napon na elektrodi uzrokuje pojavu hemiluminiscentne emisije čiji se intenzitet meri fotomultiplikatorom. Rezultati se određuju na osnovu kalibracione krive i automatski preračunavaju u koncentracije za svaki uzorak.

Za određivanje korišćeni su reagensi firme Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany koji su spremni za upotrebu i direktno se stavljaju na aparat:

- Elecsys Testosterone II, 05200067160, uključuje:
  - Streptavidinom obložene mikropartikule (0,72 mg/mL), konzervanse.
  - Anti testosteron-antitelo~biotin (ovčje onoklonalno anti-testosteron antitelo obloženo biotinom (40 ng/mL), 2-brom estradiol, MES pufer (50 mmol/L) pH 6,0 i konzervanse
  - derivat testosterona u kompleksu sa rutenijumom (1,5 ng/mL rutenijuma), MES pufer (100 mmol/L, pH 6,0) i konzervanse

- Elecsys Testosterone II CalSet, 05202230190, 2 x 1 mL liofilizovani humani serumi dati u dva koncentraciona opsega. Stabilnost rekonstituisanih kalibratora je tri meseca na -20 °C ili se koriste odmah i samo jednom na analizatoru na 20-25 °C. Sledljivost: Elecsys Testosterone II test je standardizovan upotrebom ID-GC/MS.
- PreciControl Universal, 11731416190, 2 x 3 mL svakog nivoa PreciControl Universal 1 i 2. Liofilizovani humani serum u dva koncentraciona opsega. Priprema se rastvaranjem sa 3 mL dejonizovane ili destilovane vode nakon čega treba da odstoje 30 minuta. Kontrole se čuvaju 2-8 °C, po rekonstituciji mogu da se čuvaju u zamrzivaču na -20 °C do 30 dana, 3 dana na 2-8 °C i 5 sati na sobnoj temperaturi.

Prema uputstvu proizvođača salivu treba sakupiti uz upotrebu Salviette štapića. Mi smo u našoj studiji koristili dva sunderčića (BD Visispear, Beaver-Visitec International, USA) po ispitaniku. Pamučni sunderčić staviti usta i nežno žvakati oko 2 minuta dok se ne natopi salivom. Zatim ga vratiti u konusnu epruvetu sa zatvaračem. Centrifugirati 2 minuta na 1000g da bi se saliva izdvojila u spoljašnju epruvetu. Koristiti bistar supernatant za Elecsys testosteron test. Testosteron je stabilan 7 dana na 2-8 °C, šest meseci na -20 °C. Zalediti samo jednom. Merni opseg je 0,087–52 nmol/L; donja granica detekcije (analitička osetljivost) je 0,087 nmol/L. Prema literaturnim podacima nema generalno ustanovljenih očekivanih vrednosti u jutarnjim satima. Jedna od novijih studija (99) koja ispitivala koncentraciju testosterona u salivi kod mladih muškaraca (18-30 godina, BMI < 30) ustanovila je referentni opseg od 0,19-0,68 nmol/L.

#### **3.4.9. Određivanje kompletne krvne slike**

Određivanje kompletne krvne slike rađeno je na hematološkom analizator LH750 (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA) kod kog se brojanje ćelija vrši pomoću Coulterovog principa – metoda impedance. Ćelije se broje prilikom prolaska kroz aperturu (mali razmak između elektroda). Elektrode su uronjene u rastvor elektrolita. Prilikom prolaska, ćelije prekidaju protok struje što se registruje kao impuls, jer se ćelije ponašaju kao otpornici (ne provode struju). Broj impulsa je jednak broju

ćelija koji je prošao kroz aperturu, a veličina svakog impulsa je srazmerna veličini ćelije. Analizator vrši trostruko brojanje ćelija, koja moraju da se slože u određenim granicama, inače rezultat neće biti izdat (*vote out*).

Diferencijacija leukocita se vrši pomoću VCS metode (V- *volumen* (zapremina), C- *conductivity* (provodljivost), S- *Scatter* (rasipanje svetlosti). Ova tri merenja daju sve potrebne informacije o svakoj pojedinačnoj ćeliji i na taj način omogućavaju razvrstavanje leukocita u pojedinačne subpopulacije. Određivanje zapremine ćelije vrši se upotrebom jednosmerne struje. Zbog svoje membrane, ćelije se ponašaju kao otpornici, ne provode struju, što dovodi do generisanja impulsa koji je proporcionalan veličini ćelije. Pomoću naizmjenične struje viskog napona, dobijamo informacije o zapremini i obliku jedra, odnosu jedra i citoplazme kao i granularnosti. Rasipanje svetlosti daje više podataka o granularnosti (količini granula u citoplazmi), površini ćelija, odnosno o prisustvu različitih proteina (antigena) na površini membrane.

Referentne vrednosti parametara za ispitivanu populaciju muškaraca: Eritrociti  $4,34-5,72 \times 10^{12}/L$ ; Hemoglobin 138-175 g/L; Ukupni leukociti 3,4 do  $9,7 \times 10^9/L$ , procenat neutrofila 44-72%, procenat limfocita 20-46%, procenat monocita 2-12%, procenat eozinofila 0-7%, procenat bazofila 0-2%. Opseg linearnosti za eritrocite je  $0-8 \times 10^6$ ćelija/ $\mu L$ , za leukocite je  $0-100 \times 10^3$ ćelija/ $\mu L$ , dok za hemoglobin iznosi 0-250 g/L.

#### **3.4.10. Određivanje oštećenja DNK (Comet test)**

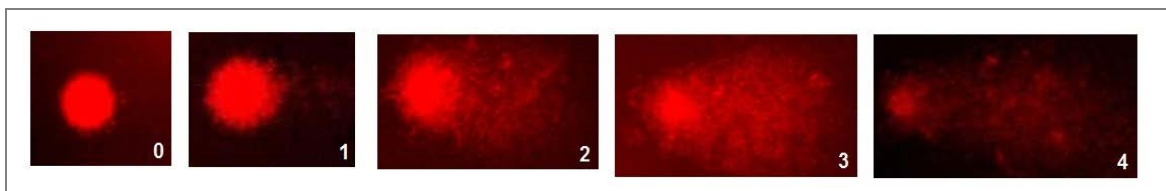
Comet test (gel elektroforeza pojedinačnih ćelija) je visoko reproducibilan, brz i osetljiv metod koji se zasniva na određivanju migracije oštećene DNK iz nukleusa u električnom polju, pri čemu DNK koja migrira podseća na oblik komete. Ovaj test se koristi za procenu promena u integritetu DNK kao što su kidanje lanaca, ukršteno povezivanje i nekompletna reparacija nakon isecanja lanaca DNK.

Comet test je izveden po postupku koji su opisali Singh i saradnici (100). Mikroskopske pločice su obložene sa slojem 1% agaroze sa normalnom tačkom topljenja (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) i ostavljene da se osuše na sobnoj

temperaturi. Uzorak pune krvi od 6  $\mu$ L suspendovan u 0,67% agarozu niske tačke topljenja - *low melting point*, LMP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) u slanom fosfatnom puferu (PBS, Institut za imunologiju i virusologiju Torlak, Beograd, Srbija), aplikovan je na pločicu pripremljenu na prethodno opisan način, i ostavljen 5 minuta na 4 °C, da očvrstne. Zatim je pipetiran drugi sloj 0,5% LMP agaroze. Svaki uzorak je imao odgovarajuću pozitivnu kontrolu koja je tretirana sa vodonik peroksidom (1,5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) i zatim nakon 5 minuta na 4 °C sa drugim slojem 0,5% LMP agaroze. Naredni korak je podrazumevao da su sve pločice uronjene u lizirajući rastvor (2,5 mol/L NaCl, 100 mmol/L etilen-diamintetra-sirćetna kiselina, 10 mmol/L Tris pufer sa pH 10, 1% Triton X-100 i 10% dimetilsulfoksid, sa NaOH podešen pH 10) na 4 °C, i ostavljene preko noći. Nakon toga, omogućeno je da se DNK odvija u liziranim ćelijama u alkalnom puferu (300 mmol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA) tokom 30 minuta. Uzorci su, potom, podvrgnuti elektroforezi tokom narednih 30 minuta na 215mA, 25V, isprani tri puta po 5 minuta sa neutralizujućim puferom (0,4 mol/L Tris, pH 7,5), i obojeni sa etidijum bromidom (20  $\mu$ g/mL). Sistem za submarine elektroforezu koji je korišćen, se sastoji od sistema za izlivanje gelova (HE 100 casting kit, Amersham Pharmacia Biotech), kade za submarine elektroforezu (Hoefler SuperSub, Amersham Pharmacia Biotech), termostatskog cirkulatora – hladnjaka (LKB 2219 Multitemp II) i električnog napajanja za elektroforezu EPS 3500XL. Za izvođenje Comet testa korišćeni su kada, hladnjak i električno napajanje. Po završenoj elektroforezi, stavljene su pokrovne ljušpice na vrh pločica i oštećenje DNK je vizuelno analizirano. Analiza je izvršena uz pomoć svetlosnog mikroskopa Olympus BX 50 opremljenog sa živinom lampom HBO (50W, 516-560 nm, Zeiss) pri 100x uveličanju, sa dodatkom za fluorescentno snimanje (dodatak fluorescentne lampe: Japan, Olympus Reflected Light Fluorescence Attachment BX-FLA) i digitalnom kamerom (Sony Power HAD, Japan, 3CCD Color Video Camera, DXC-950P model).

Ćelije su gradirane vizuelno, kao što su opisali Anderson i saradnici (101), u 5 kategorija na osnovu uočene dužine migracije repa komete i relativnog udela DNK u repu komete: bez oštećenja (<5%, klasa A); nizak nivo oštećenja (5-20%, klasa B); srednji nivo oštećenja (20-40%, klasa C); visok nivo oštećenja (40-95%, klasa

D) i potpuno oštećenje (>95%, klasa E). Za svaki uzorak krvi Comet test je izveden na dve mikroskopske pločice i 100 ćelija je analizirano (50 ćelija po pločici). Na *Slici 4.* dat je prikaz izgleda ćelija bez oštećenja, kao i izgled oštećenih ćelija nakon dejstva H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Slika 4.** Vizuelni izgled ćelija perifernih limfocita posmatranih fluorescentnim mikroskopom nakon izvedenog Comet testa, 5 klasa: (0) bez oštećenja (<5%, klasa A) nizak nivo oštećenja (5-20%); (2) srednji nivo oštećenja (20-40%); (3) visok nivo oštećenja (40-95%); (4) potpuno oštećenje (>95%).

#### **3.4.11. Test anksioznosti u sportskim takmičenjima**

Test anksioznosti (sterpnje, teskobe) u sportskim takmičenjima (*Sport competition anxiety test, SCAT*) je test kojim se kod sportista procenjuje nivo uzbuđenja i stresa pred utakmicu. Test se sastoji od niza pitanja na koje sportista treba da odgovori o tome kako se oseća neposredno pred utakmicu (166). Izvođenje testa podrazumeva da se sportistima objasni na koji način treba da popunjavaju upitnik (*Slika 5.*). Svako pitanje bi trebalo da pročitaju i odluče koji od tri ponuđena odgovora najbolje opisuje emotivno stanje u kom se takmičar nalazi neposredno pred utakmicu. Takmičar odgovara na 15 pitanja koja su data u upitniku, na jedan od tri moguća načina: *Retko, Ponekad* i *Često*. Vreme popunjavanja upitnika nije ograničeno. Nakon toga se za svakog sportistu izračunava SCAT rezultat, na osnovu koga može da se klasifikuje u jednu od tri grupe: < 17 – nizak nivo anksioznosti, od 17 do 24 - prosečan nivo anksioznosti, i >24 - visok nivo anksioznosti. Analiza rezultata se izvodi na taj način što se za svakog sportistu rezultati testa porede sa prethodnim rezultatom – u ovom konkretnom slučaju, ragbisti interventne grupe su radili SCAT test pre i nakon završene suplementacije magnezijumom i izvršeno je poređenje ova dva SCAT rezultata. Pouzdanost rezultata ovog testa zavisi od

toga koliko je striktno test izveden i koliki je nivo individualne motivacije da se uradi ovaj test.

<b>Test anksioznosti u sportskim takmičenjima (SCAT)</b>			
<b>Procena Vaše anksioznosti</b>			
Pročitajte dolenađene tvrdnje i odgovorite da li se tako osećate takmičeći se u Vašem sportu "Retko", "Ponekad" ili "Često" upisivanjem "x" u odgovarajuću kućicu.			
	Retko	Ponekad	Često
1. Takmičenje protiv drugih je zabavno za društvo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Pre utakmice osećam nelagodnost	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Pre utakmice sam zabrinut da neću igrati dobro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Ja sam dobar sportista tokom utakmice	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Tokom utakmice brinem se da ne pogrešim	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Pre utakmice sam smiren	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Za utakmicu je važno da se postavi cilj	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Pred utakmicu osećam nelagodnost u stomaku	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Neposredno pred početak utakmice srce mi brže kuca nego obično	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Volim da se takmičim u sportovima koji zahtevaju veliko fizičko naprezanje	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. Pred utakmicu sam opušten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. Pred utakmicu sam nervozan	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13. Timski sportovi su uzbudljiviji od individualnih sportova	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
14. Postajem nervozan želeći da utakmica počne što pre	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
15. Pred utakmicu postajem napet	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<hr/>			
SCAT Rezultat	<input style="width: 100px; height: 20px;" type="text"/>		

**Slika 5.** Upitnik za procenu nivoa anksioznosti u sportskim takmičenjima (SCAT test) (modifikovano prema referenci Martens R, i sar., 1990)

### 3.5. ANALIZA PODATAKA

Statistička analiza je izvedena primenom odgovarajućih statističkih testova. Ispitivanje raspodele podataka i slaganje sa Gauss-ovom raspodelom procenjeno je primenom Shapiro-Wilkov testa. Ukoliko parametri nisu normalno distribuirani, primenjena je logaritamska transformacija, tako da su za dalju proveru statistički značajnih razlika korišćeni parametarski testovi za proveru razlika između dve grupe (t-test) ili više grupa (ANOVA). T-test je korišćen za:

- Za poređenje bazalnih nivoa svih merenih parametara između sedentarnih i fizički aktivnih muškaraca,
- Za poređene bazalnih vrednosti svih parametara kontrolne i interventne grupe, sa njihovim vrednostima na dan pred utakmicu (Dan-1).

Za analizu rezultata dobijenih pre utakmice i tokom postkompetitivnog perioda oporavka, kod kontrolne i interventne grupe, korišćena je dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA). Ovim testom je analiziran efekat koji može imati suplementacija magnezijumom na dinamiku promene svih merenih parametara, u odgovarajućim tačkama vremena (Dan-1, Utakmica, Dan 1, Dan 3 i Dan 6); Ukoliko bi bila dobijena statistički značajna F vrednost, analiza prostih efekata je sprovedena posebno za vreme i tretman magnezijumom, uz upotrebu Bonniferoni *post hoc* testa za višestruka poređenja i vrednost  $p < 0,05$  je smatrana statistički značajnom. Ukoliko interakcioni efekat nije bio statistički značajan, izvršena je analiza glavnog efekta za svaku nezavisnu varijablu (u ovom slučaju vreme i tretman magnezijumom). Za utvrđivanje postojanja korelacije između koncentracije različitih parametara korišćen je Pirson-ov test. Za statističku analizu podataka su korišćeni programi SPSS verzija 21 (Chicago, IL, USA) i Prism 7 for Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) a podaci su prikazani kao srednja vrednost i standardna greška određivanja.



## 4. REZULTATI

### 4.1. BAZALNI NIVOI PARAMETARA AKTIVNOSTI HPA I HPG OSOVINE KOD SEDENTARNIH MUŠKARACA PRE I NAKON SUPLEMENTACIJE MAGNEZIJUMOM

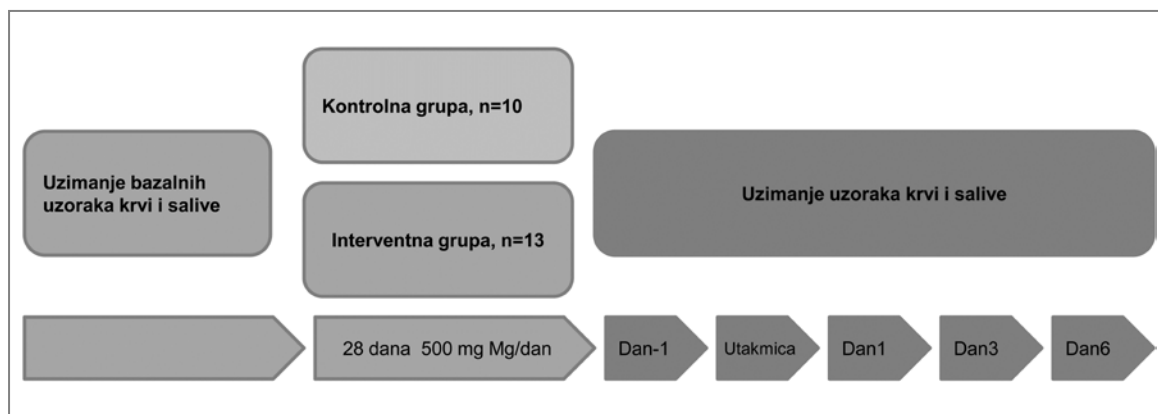
Za utvrđivanje postojanja razlike u vrednosti parametara aktivnosti HPA i HPG osovine kod ispitivane sedentarne populacije, pre i nakon suplementacije magnezijumom, primenjen je t-test parova, koji je ukazao na postojanje statistički značajne razlike u vrednostima četiri parametra, pre i nakon suplementacije magnezijumom (*Tabela III*). Prikazani rezultati ukazuju da, iako nema značajne promene nivoa ACTH u plazmi, uočen je statistički značajno sniženje nivoa kortizola ( $p < 0,05$ ) nakon suplementacije magnezijumom. Interleukin-6 je takođe pokazao statistički značajno sniženje ( $p < 0,05$ ) nakon dugotrajne primene magnezijuma kod sedentarnih muškaraca. Rezultati analize hormona HPG osovine pokazali su trend rasta nivoa FSH nakon četvoronedeljne suplementacije magnezijumom, a takođe je, posle primene magnezijuma, uočen značajan porast izračunatog odnosa T/C u serumu, dok u salivi nije došlo do statistički značajne promene.

**Tabela III** Parametari aktivnosti HPA i HPG osovine kod studenata, pre i nakon suplementacije magnezijumom (n=15).

	pre magnezijuma				posle magnezijuma				p
	Min	Max	$\bar{x}$	SEM	Min	Max	$\bar{x}$	SEM	
<b>Parametri aktivnosti HPA osovine:</b>									
ACTH (pmol/L)	6,45	15,18	9,48	0,777	5,51	24,57	10,57	1,599	0,383
Kortizol u serumu (nmol/L)	243,7	589,5	450,4	28,48	235,9	563,5	381	31,17	<b>0,016</b>
Kortizol u salivi (nmol/L)	3,04	27,41	15,00	2,426	2,42	74,10	19,20	5,651	0,371
Odnos kortizol saliva/ kortizol serum	0,92	5,78	3,21	4,457	0,77	18,61	4,65	1,289	0,219
IL - 6 (pg/mL)	1,00	3,19	1,91	0,188	1,02	2,97	1,57	0,156	<b>0,036</b>
<b>Parametri aktivnosti HPG osovine:</b>									
FSH (IU/L)	1,55	5,61	3,51	0,413	1,06	6,89	3,78	0,451	<b>0,044</b>
LH (IU/L)	2,37	6,26	4,41	0,297	2,12	16,28	5,49	0,951	0,233
Testosteron u serumu (nmol/L)	6,60	19,72	13,39	1,271	7,52	21,6	13,97	1,158	0,283
Testosteron u salivi (nmol/L)	0,62	1,50	1,01	0,072	0,61	1,91	1,15	0,112	0,078
T/C odnos serum	1,12	5,49	3,09	0,320	1,52	5,80	3,90	0,386	<b>0,018</b>
T/C odnos saliva	3,57	20,39	9,49	1,528	2,58	33,06	11,21	2,313	0,396

#### 4.2. BAZALNI NIVOI PARAMETARA AKTIVNOSTI HPA I HPG OSOVINE KOD RAGBISTA

Na *Slici 6.* vizuelno je predstavljen raspored uzorkovanja za ragbiste, pre i nakon suplementacije.



**Slika 6. Algoritam uzorkovanja biološkog materijala kod ragbista.** Pre nego što se započelo sa uzimanjem magnezijuma uzeti su bazalni uzorci, na dan pre utakmice. Igrači su nasumice podeljeni u interventnu (n=13) i kontrolnu (n=10) grupu. Oni koji su dodeljeni interventnoj grupi su tokom narednih 28 dana uzimali 500 mg magnezijuma dnevno, podeljeno u dve jednake doze, dva puta dnevno sa intervalom od 12h između doza. posle 4 nedelje suplementacije (29.dana eksperimenta) što je bio dan pre utakmice, uzeti su uzorci krvi i salive. Uzimanje bioloških uzoraka je takođe urađeno na dan takmičenja (Utakmica), sledećeg dana po završenoj utakmici (Dan 1), trećeg (Dan 3) i šestog dana (Dan 6) nakon utakmice.

Nakon što su ragbi igrači nasumice podeljeni u interventnu (n=13) i kontrolnu (n=10) grupu, bazalne koncentracije svih merenih parametara su poređene primenom Studentovog t-testa. S obzirom da nije bilo statistički značajne razlike u merenim parametrima između dve grupe, pre nego što je interventna grupa započela suplementaciju magnezijumom, bazalne vrednosti svih igrača koji su učestvovali u istraživanju su prikazane kao jedinstvene bazalne vrednosti za ragbiste, na svim *Slikama* i u *Tabelama*. Bazalne vrednosti svih određivanih parametara kod ragbista date su u *Tabeli IV*.

**Tabela IV** Bazalni nivoi ispitivanih parametara aktivnosti HPA i HPG osovine kod ragbista (n=23).

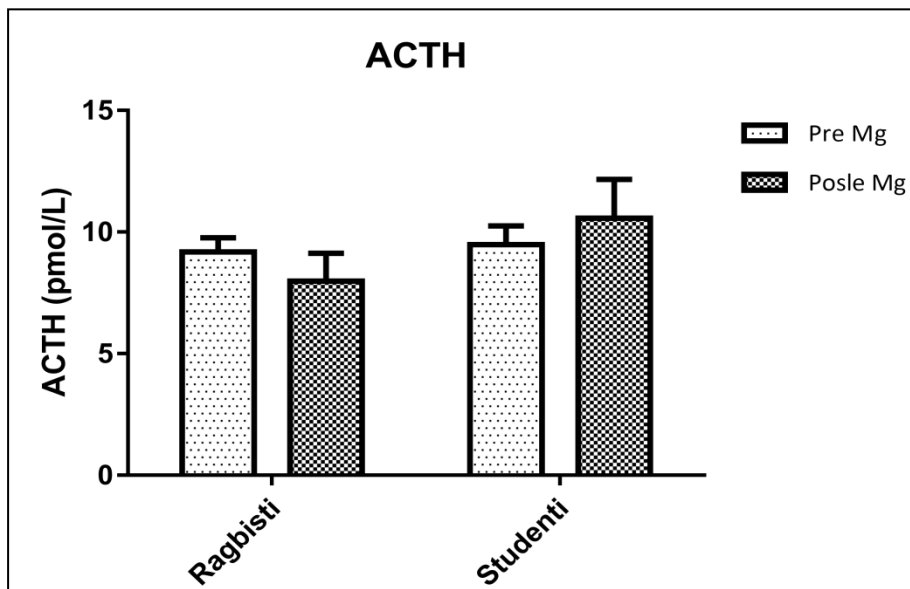
	Min	Max	$\bar{x}$	SEM
<b>Parametri aktivnosti HPA osovine:</b>				
ACTH (pmol/L)	3,62	13,55	9,18	0,598
Kortizol u serumu (nmol/L)	345,1	655,3	475,5	15,34
Kortizol u salivi (nmol/L)	7,64	39,3	19,74	1,899
Odnos kortizol saliva/ kortizol serum	1,53	10,61	4,19	0,427
IL - 6 (pg/mL)	0,49	2,14	1,57	0,093
Ukupan broj leukocita ( $\times 10^9/L$ )	5,32	11,00	7,45	0,26
Neutrofili (%)	36,7	66,6	51,56	1,607
Limfociti (%)	19,4	47,00	34,37	1,542
Monociti (%)	6,35	13,60	10,18	0,415
Eozinofili (%)	0,99	6,40	3,07	0,343
Bazofili (%)	0,40	2,22	0,83	0,078
<b>Parametri aktivnosti HPG osovine:</b>				
FSH (IU/L)	1,89	8,08	4,90	0,372
LH (IU/L)	2,24	6,44	4,64	0,270
Testosteron u serumu (nmol/L)	13,2	26,99	20,00	0,756
Testosteron u salivi (nmol/L)	0,58	1,66	0,89	0,049
T/C odnos serum	2,67	5,97	4,27	0,188
T/C odnos saliva	1,69	10,12	5,42	0,524
Eritrociti ( $\times 10^{12}/L$ )	4,4	5,26	4,75	0,063
Hemoglobin (g/L)	132	168	150,91	1,921

#### 4.3. POREĐENJE VREDNOSTI PARAMETARA AKTIVNOSTI HPA I HPG OSOVINE IZMEĐU RAGBISTA I SEDENTARNIH MUŠKARACA, PRE I POSLE SUPLEMENTACIJE MAGNEZIJUMOM

##### 4.3.1. Nivo ACTH

Na *Slici 7.* grafički je predstavljen odnos između nivoa ACTH u plazmi, kod studenata i kod ragbista, pre i nakon suplementacije magnezijumom. Sa grafika se može uočiti da ne postoji statistički značajna razlika u bazalnoj koncentraciji ACTH kako kod studenata, tako i kod ragbista, pre i nakon suplementacije

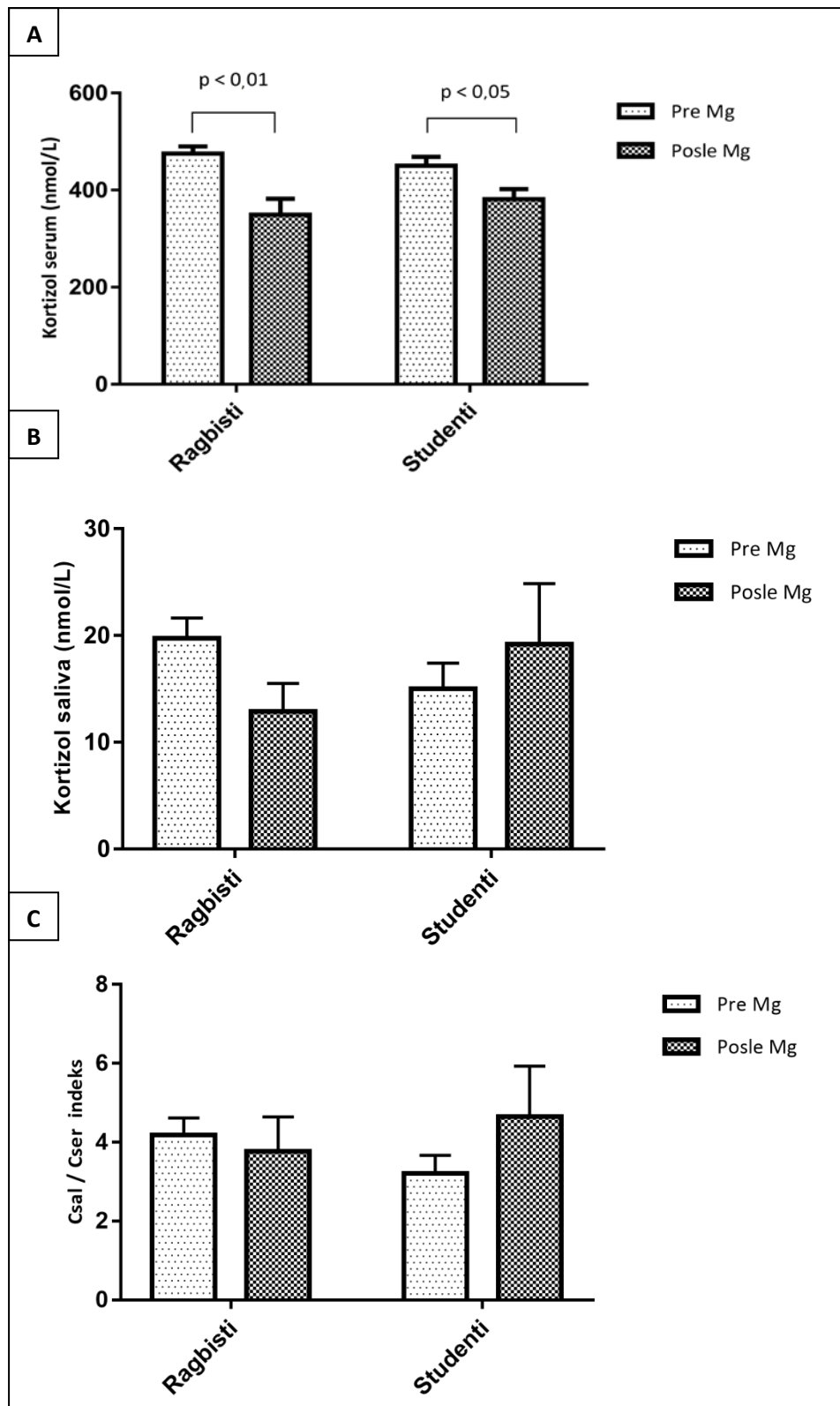
magnezijumom. Može se primetiti da je nivo ACTH niži kod ragbista u poređenju sa studentima, što postaje posebno uočljivo nakon suplementacije magnezijumom.



**Slika 7.** Bazalna koncentracija ACTH u plazmi kod ragbista i studenata, pre i nakon uzimanja magnezijuma.

#### 4.3.2. Nivo kortizola u serumu i salivi

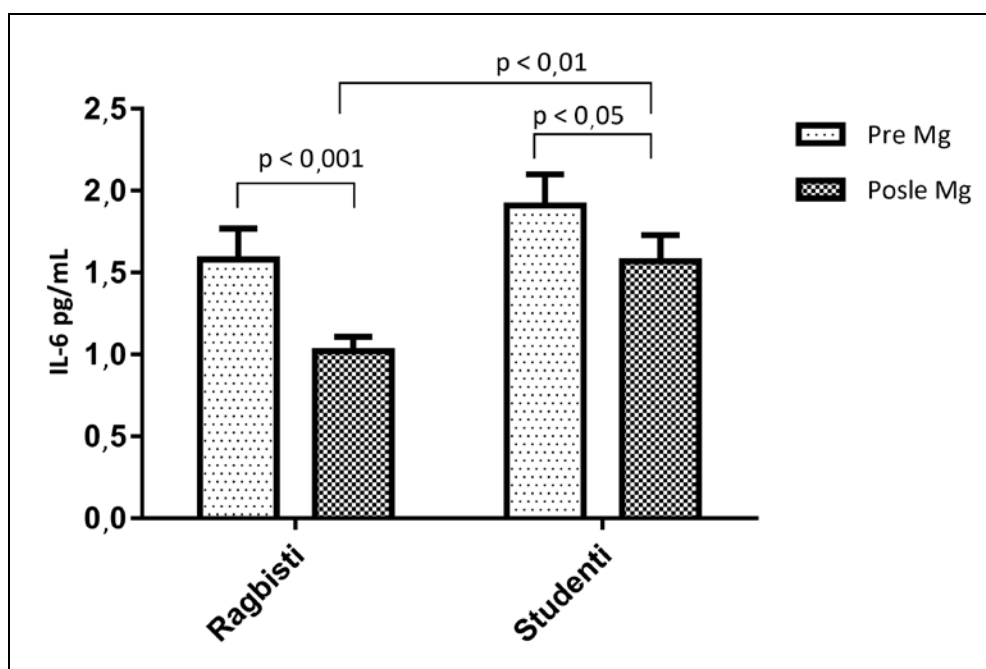
Kod studenata je uočeno statistički značajno sniženje nivoa kortizola ( $p < 0,05$ ) nakon suplementacije magnezijumom. Kod ragbista, nakon suplementacije magnezijumom, sniženje u nivou serumskog kortizola u odnosu na bazalni nivo pre početka suplementacije, je još značajnije ( $p < 0,01$ ). Za razliku od serumskog kortizola, za salivarni kortizol nije pokazano postojanje statistički značajne razlike u koncentraciji ni za jednu grupu ispitanika, ni pre niti posle završene suplementacije (*Slika 8*). Slična situacija je uočena i kada je izračunat indeks salivarni/serumski kortizol.



**Slika 8.** Bazalna koncentracija kortizola (A) u serumu , (B) u salivi i (C) odnosa Csal/Cser, kod ragbista i studenata, pre i nakon uzimanja magnezijuma.

#### 4.3.3. Nivo IL-6

Interleukin-6 je, takođe, pokazao statistički značajno sniženje ( $p < 0,05$ ) nakon dugotrajne primene magnezijuma kod sedentarnih muškaraca, dok je kod ragbista sniženje bazalne koncentracije IL-6 još izraženije ( $p < 0,001$ ). Pokazalo se da je, po završenoj četvoronedeljnoj suplementaciji, došlo do statistički značajnog sniženja bazalne koncentracije ovog parametra između ove dve populacije muškaraca ( $p < 0,01$ ) što se može videti na *Slici 9*.

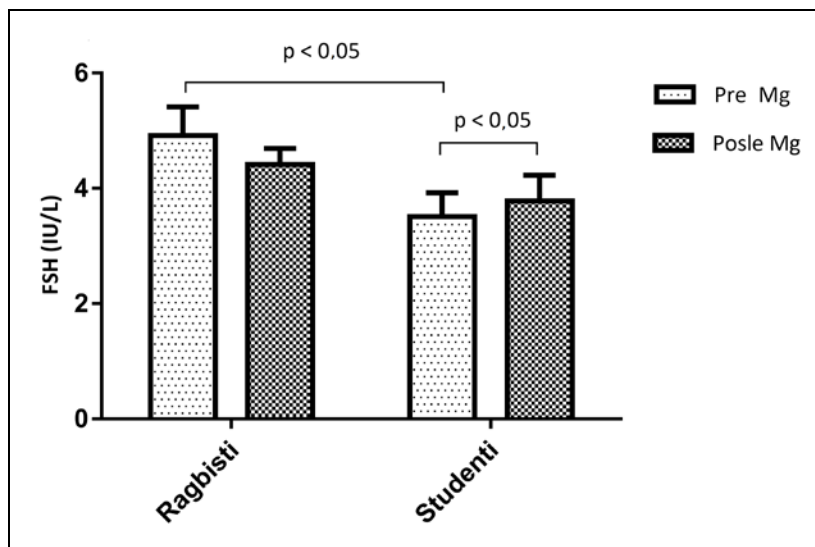


**Slika 9.** Bazalna koncentracija IL-6 u serumu kod ragbista i studenata, pre i nakon uzimanja magnezijuma.

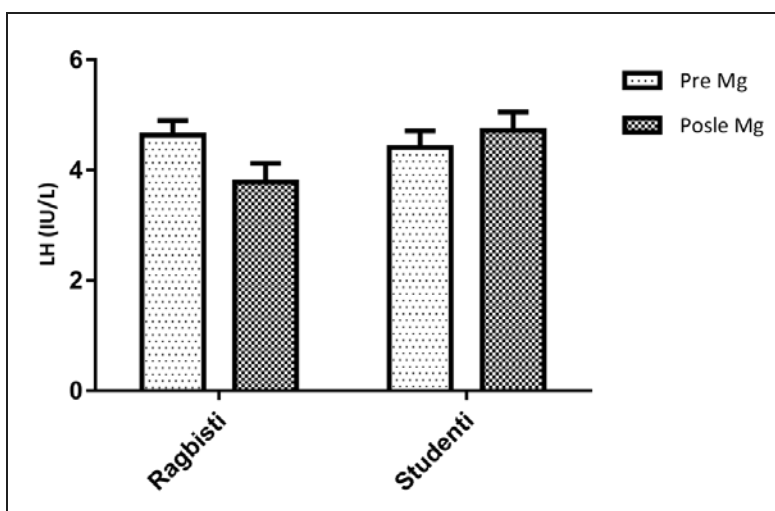
#### 4.3.4. Nivo FSH i LH

Rezultati dobijeni u studiji pokazali su da je, pre uzimanja magnezijuma, nivo FSH statistički značajno viši ( $p < 0,05$ ) kod ragbista u odnosu na vrednosti kod sedentarnih muškaraca, dok nakon završetka četvoronedeljne suplementacije magnezijumom ova razlika prestaje da bude statistički značajna, jer FSH kod ragbista pokazuje trend pada, dok se kod studenata uočava trend rasta ovog parametra (*Slika 10.*)

Što se tiče nivoa LH, iako primenom t-testa nije dokazano postojanje statistički značajne razlike u nivou ovog parametra između ragbista i studenata, slično kao i za FSH uočava se razlika u trendu kretanja koncentracije LH kod ove dve različite populacije muškaraca (Slika 11.). Naime, kao i FSH, nakon dugotrajnog uzimanja magnezijuma LH kod ragbista pokazuje trend pada, dok se kod studenata uočava neznatni porast koncentracije ovog hormona.



**Slika 10.** Bazalna koncentracija FSH u serumu kod ragbista i studenata, pre i nakon uzimanja magnezijuma.

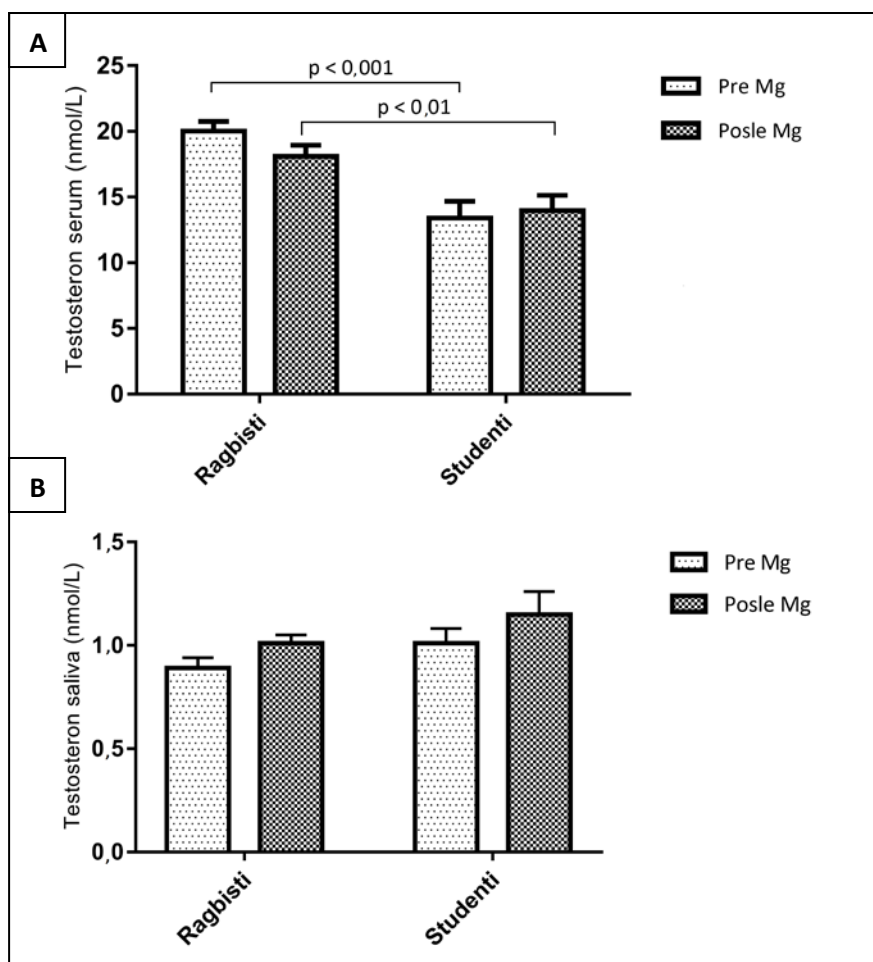


**Slika 11.** Bazalna koncentracija LH u serumu kod ragbista i studenata, pre i nakon uzimanja magnezijuma.



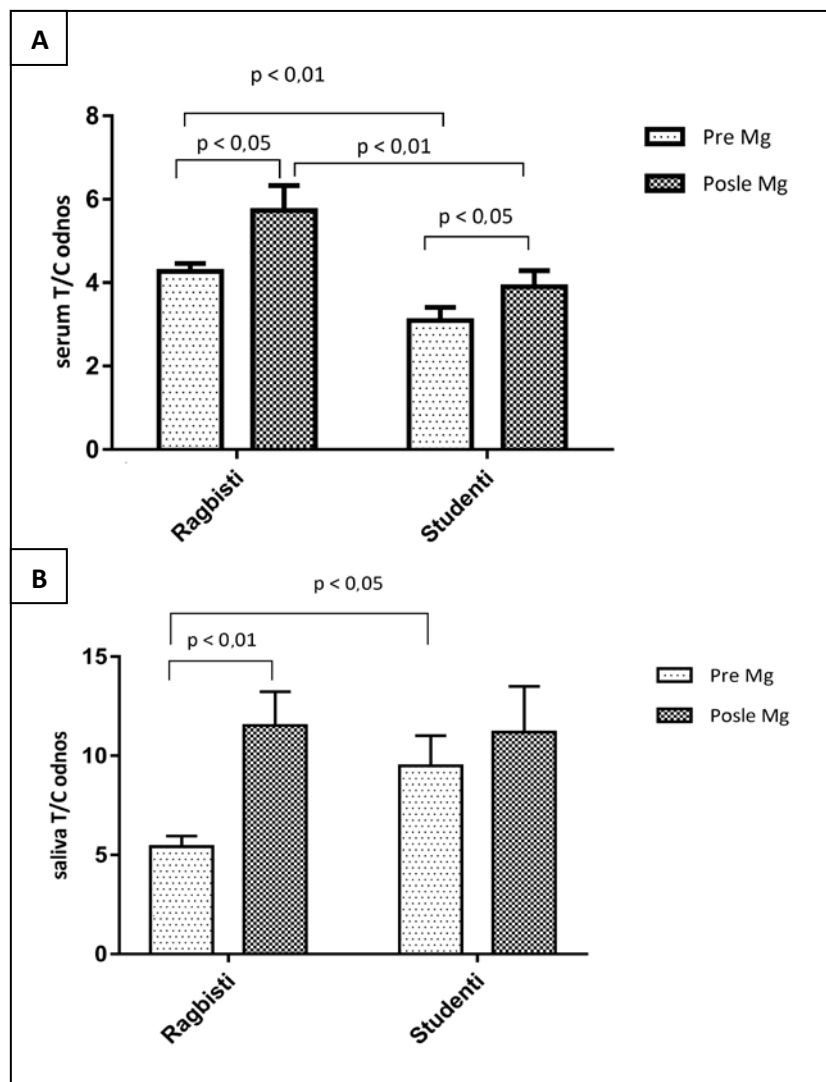
#### 4.3.5. Nivo testosterona u serumu i salivi

Na *Slici 12A*. uočava se da su bazalne koncentracije testosterona u serumu kod ragbista statistički značajno više nego kod sedentarnih muškaraca, kako pre suplementacije magnezijumom ( $p < 0,001$ ) tako i nakon četvoronedeljne primene magnezijuma ( $p < 0,01$ ). Ako se svaka od ove dve populacije posmatra zasebno, može se primetiti da primena magnezijuma ne utiče značajno na promenu koncentracije testosterona u serumu. Za razliku od testosterona u serumu, nivo testosterona u salivi nije značajno različit između ove dve populacije muškaraca, niti se nakon primene magnezijuma uočava statistički značajna promena u koncentracije ovog hormona u salivi, ni kod jedne grupe ispitanika (*Slika 12B*.)



**Slika 12.** Bazalna koncentracija testosterona (A) u serumu i (B) salivi, kod ragbista i studenata, pre i nakon uzimanja magnezijuma.

#### 4.3.6. Odnos T/C u serumu i salivi



**Slika 13.** Bazalna koncentracija serumskog i salivarnog T/C odnosa kod ragbista i studenata, pre i nakon uzimanja magnezijuma.

Na osnovu rezultata studentske populacije i fizički aktivnih muškaraca (*Slika 13.*) dobijeno je, da je vrednost izračunatog serumskog T/C odnosa statistički značajno veća kod ragbista, kako pre ( $p < 0,01$ ) tako i nakon dugotrajnog uzimanja magnezijuma ( $p < 0,01$ ). Kod obe grupe je uočeno da suplementacija magnezijumom dovodi do značajnog porasta odnosa T/C ( $p < 0,05$ ). Za razliku od serumskog, salivarni T/C odnos, posle 4 nedelje uzimanja magnezijuma, se značajno povećava kod ragbista dok kod studentske populacije porast T/C odnosa nije statistički značajan. Primećeno je da je pre primene suplementa magnezijuma, postojala

značajna razlika u vrednosti salivarnog T/C odnosa, između dve populacije muškaraca, da bi se po završenoj suplementaciji ovi odnosi praktično izjednačili.

#### 4.3.7. Hematološki parametri

Analiza kompletne krvne slike rađena je kod ragbista i studenata, kako pre tako i nakon suplementacije magnezijumom. Za poređenje bazalnih vrednosti, kod ragbista su korišćeni podaci dobijeni iz uzoraka interventne grupe, uzetih 29. dana od početka suplementacije, što je zapravo bio dan pred utakmicu (Dan-1). Vrednosti hematoloških parametara, za obe grupe ispitanika, prikazane su tabelarno (*Tabela V*).

Naša studija je, za grupu studenata, ukazala na značajan porast u broju eritrocita ( $p < 0,001$ ), što nije bilo praćeno porastom koncentracije hemoglobina dok je ukupan broj leukocita ostao nepromenjen (*Tabela V*).

**Tabela V** Rezultati krvne slike kod sedentarnih muškaraca i amaterskih ragbi igrača, pre i nakon završene suplementacije magnezijumom.

STUDENTI	Eitrociti ( $\times 10^{12} L^{-1}$ )	Hemoglobin (g/L)	Ukupni leukociti ( $\times 10^9 L^{-1}$ )
Pre Mg suplementacije	5,08 (0,098)***	157,1 (1,89)	6,77 (0,371)
Posle Mg suplementacije	5,34 (0,109)	157,4 (2,57)	6,98 (0,473)

RAGBISTI	Eitrociti ( $\times 10^{12} L^{-1}$ )	Hemoglobin (g/L)	Ukupni leukociti ( $\times 10^9 L^{-1}$ )
Pre Mg suplementacije	4,75 (0,063)	150,9 (1,92)	7,45 (0,260)
Posle Mg suplementacije	4,91 (0,091)	147,4 (2,37)	6,42 (0,338)*

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost (SEM). \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Treba da se napomene da za razliku od studenata, gde dolazi do značajnog porasta u broju eritrocita po završenoj suplementaciji magnezijumom, kod ragbista nema značajne promene niti u broju eritrocita niti u koncentraciji hemoglobina. Takođe, može se primetiti da je broj eritrocita kao i koncentracija hemoglobina, kod fizički aktivnih muškaraca, kako pre tako i nakon suplementacije, niži u odnosu na sedentarne muškarce iste uzrasne dobi. S druge strane, kod ragbista je uočeno

statistički značajno sniženje ukupnog broja leukocita po završenoj suplementaciji ( $p < 0,05$ ), u odnosu na ukupan broj leukocita pre početka suplementacije.

Bez obzira što kod studenata nije uočena promena u broju leukocita došlo je do promene u leukocitarnoj diferencijalnoj formuli. Naime, uočeni su statistički značajno sniženje u procentu neutrofilnih granulocita ( $p < 0,05$ ), kao i trend porasta ( $p = 0,064$ ) procenta limfocita (*Tabela VI*). Kod ragbista se može uočiti statistički značajno sniženje u procentu bazofila u odnosu na vrednost pre početka suplementacije ( $p < 0,01$ ) kao i sniženje broja monocita. Ukoliko se posmatra NE/LY odnos, uočava se da kod ragbista nema značajne promene u vrednosti ovog parametra dok se kod studenata, po završenoj suplementaciji magnezijumom, njegova vrednost smanjuje za oko 45%.

**Tabela VI** Rezultati diferencijalne leukocitarne formule kod sedentarnih muškaraca i amaterskih ragbi igrača, pre i nakon završene suplementacije magnezijumom.

STUDENTI	NE%	LY%	EO%	BA%	MO%	NE/LY odnos
Pre Mg suplementacije	56,66 (1,54)	31,46 (1,53)	2,80 (0,44)	0,50 (0,56)	8,54 (0,55)	1,80 (0,50)
Posle Mg suplementacije	53,57 (1,85)*	34,10 (1,55)	2,59 (0,37)	0,46 (0,86)	9,06 (0,46)	1,57 (0,62)**

RAGBISTI	NE%	LY%	EO%	BA%	MO%	NE/LY odnos
Pre Mg suplementacije	51,56 (1,61)	34,37 (1,54)	3,07 (0,34)	0,83 (0,08)	10,18 (0,41)	1,50 (0,84)
Posle Mg suplementacije	52,55 (1,28)	33,75 (1,19)	4,29 (0,78)	0,43 (0,08)**	8,98 (0,48)	1,55 (0,81)

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost (SEM), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

#### **4.4. UTICAJ RAGBI UTAKMICE I SUPLEMENTACIJE MAGNEZIJUMOM NA DINAMIKU PROMENE PARAMETARA AKTIVNOSTI HPA I HPG OSOVINE**

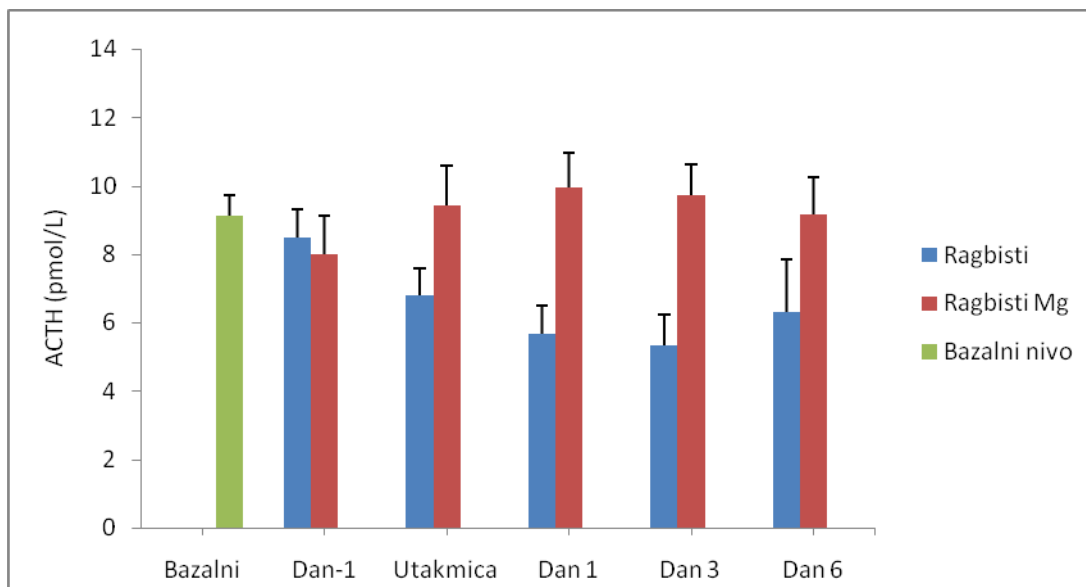
##### **4.4.1. UTICAJ MAGNEZIJUMA NA DINAMIKU PROMENE PARAMETARA AKTIVNOSTI HPA OSOVINE KOD RAGBISTA PRE I NAKON UTAKMICE**

###### **4.4.1.1. Uticaj suplementacije magnezijumom na nivo ACTH**

Dvofaktorska analiza varijanse nije pokazala statistički značajnu interakciju između efekta suplementacije magnezijumom i vremena u odnosu na koncentraciju ACTH ( $F_{(4,105)}=1,695$ ,  $p=0,157$ ) što znači da je uticaj magnezijuma na koncentraciju ACTH nezavisan od vremena.

Na *Slici 14.* se može uočiti različit obrazac promene nivoa ACTH kod ragbista koji su uzimali magnezijum i kontrolne grupe. Za razliku od glavnog (marginalnog) efekta vremena koji je pokazao da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji ACTH kako pre tako i nakon primene magnezijuma, glavni efekat suplementacije magnezijumom pokazao je statistički značajnu razliku u koncentraciji ACTH između interventne i kontrolne grupe ( $F_{(1,105)} = 16,207$ ,  $p < 0,001$ ). Postoji statistički značajan porast od 2,73 (6,79) pmol/L u koncentraciji ACTH u interventnoj u odnosu na kontrolnu grupu.

Takođe, ne postoji statistički značajna razlika između bazalne koncentracije ACTH i koncentracije određene dan pre utakmice (Dan-1), kako za ragbiste u kontrolnoj grupi ( $t_{18,663} = 0,620$ ,  $p > 0,05$ ), tako i za ragbiste koji su uzimali suplement magnezijuma ( $t_{18,663} = 0,873$ ,  $p > 0,05$ ).

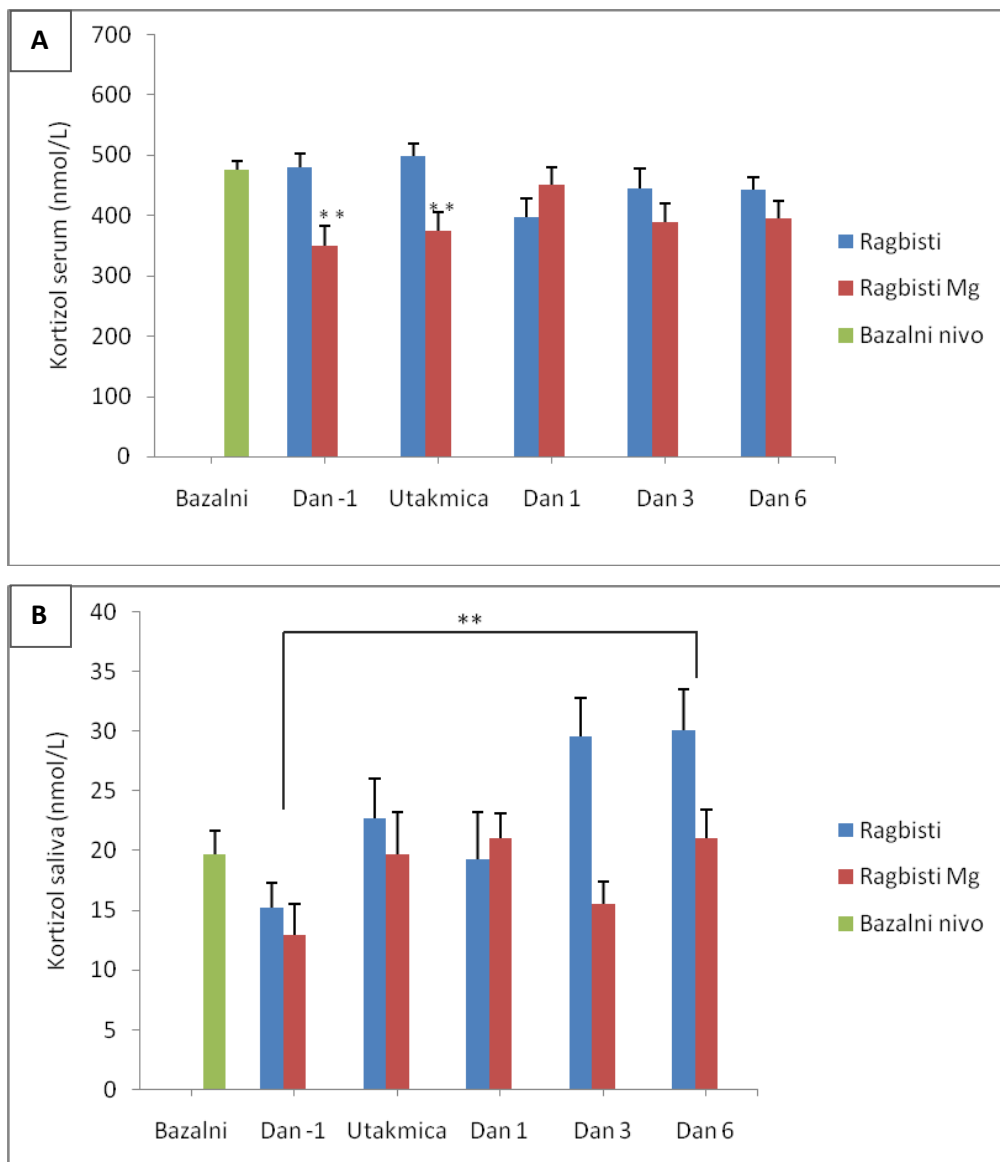


**Slika 14.** Uticaj magnezijuma na obrazac promene nivoa ACTH kod ragbista, pre i nakon takmičenja. Promena u nivou ACTH tokom svih vremenskih tačaka, za kontrolnu grupu (plavi), interventnu grupu (crveni), sa bazalnim vrednostima (zeleni).

#### 4.4.1.2. Promena nivoa kortizola u serumu i salivi

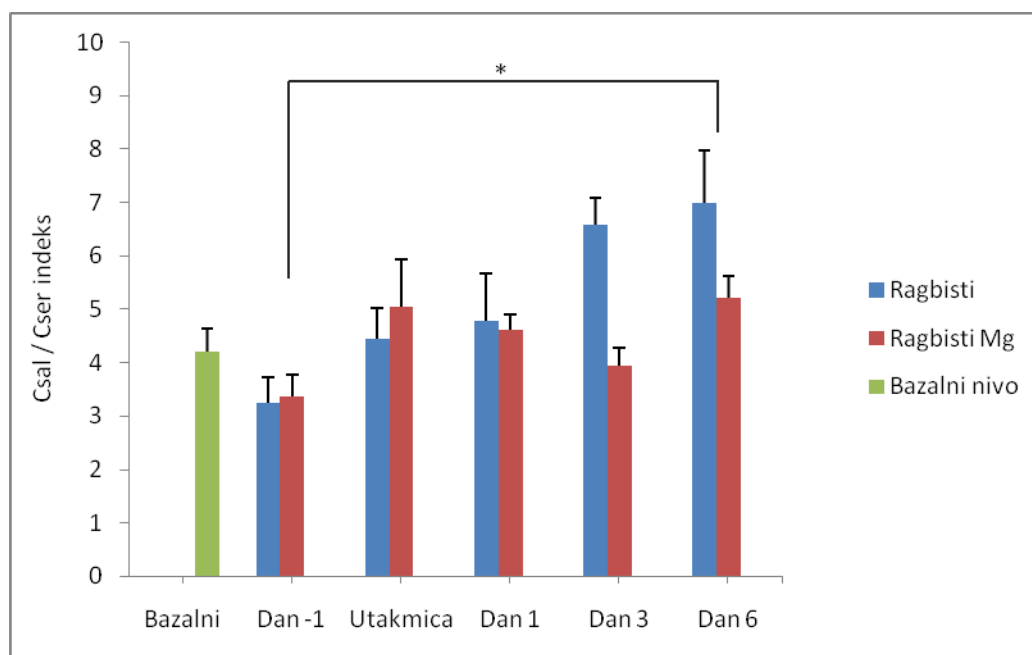
U odgovoru organizma na intenzivno fizičko vežbanje, pod uticajem magnezijuma dolazi do promene u obrascu kretanja nivoa kortizola *Slika 15*. Naši rezultati su pokazali da postoji statistički značajna interakcija između efekta suplementacije magnezijumom i vremena u odnosu na koncentraciju kortizola u serumu ( $F_{(4,105)}=3,261$ ,  $p=0,015$ ). S obzirom da postoji značajna interakcija, primenjena je tehnika tumačenja podataka označena kao analiza prostih efekata. Analiza prostog efekta tretmana magnezijumom pokazala je statistički značajno sniženje u koncentraciji serumskog nivoa kortizola ( $C_{ser}$ ) kod interventne grupe u poređenju sa kontrolnom grupom ( $F_{(1,105)}=10,923$ ,  $p=0,001$ ) (*Slika 15A*). *Post hoc* analiza sa Bonifferoni testom pokazala je da je ovo smanjenje u koncentraciji kortizola između ispitivanih grupa, najveće dan pre utakmice (Dan-1) i na sam dan takmičenja (Utakmica). Za razliku od ragbista koji su uzimali magnezijum i kod kojih postoji značajno sniženje u nivou kortizola na dan pre utakmice (Dan-1) u odnosu na bazalni nivo ( $p<0,01$ ), kod kontrolne grupe ove razlike nisu uočene. Iako dvofaktorska analiza varijanse nije pokazala statistički značajnu interakciju između efekta suplementacije magnezijumom i vremena u odnosu na

koncentraciju salivarnog kortizola ( $F_{(4,105)} = 2,301$ ,  $p = 0,064$ ), kao što se može videti na *Slici 15B*, glavni efekat suplementacije magnezijumom pokazao je statistički značajnu razliku u koncentraciji salivarnog kortizola (Csal) između dve grupe ( $F_{(1,105)} = 8,533$ ,  $p = 0,004$ ).



**Slika 15.** Uticaj magnezijuma na obrazac promene nivoa kortizola kod ragbista, pre i nakon takmičenja. Promena u nivou kortizola tokom svih vremenskih tačaka, za kontrolnu grupu (plavi), interventnu grupu (crveni), sa bazalnim vrednostima (zeleni). (A) Promena nivoa kortizola u serumu: \*\*  $p < 0,01$  za odgovarajuće tačke vremena za kontrolnu grupu u odnosu na grupu koja je uzimala magnezijum. (B) Promena nivoa kortizola u salivi: \*\*  $p < 0,01$  za razliku u srednjoj vrednosti koncentracije kortizola između Dan-6 i Dan-1 nivoa (glavni efekat vremena).

Postoji statistički značajno sniženje od 5,34 (1,83) nmol/L u koncentraciji salivarnog kortizola u interventnoj u odnosu na kontrolnu grupu. Glavni efekat vremena pokazao je statistički značajno povećanje ( $p < 0,01$ ) od 11,53 (2,89) nmol/L u srednjoj koncentraciji salivarnog kortizola između šestog dana nakon utakmice (Dan 6) i dana pre takmičenja (Dan-1). Ni za jednu grupu nije uočena statistički značajna razlika između srednjeg bazalnog i Dan-1 nivoa salivarnog kortizola. Zatim je izračunat Csal/Cser indeks, pri čemu je u kontrolnoj grupi uočen njegov porast kroz sve tačke vremena (Slika 16.). Ne postoji statistički značajna interakcija između vremena i suplementacije magnezijumom u odnosu na Csal/Cser indeks ( $F_{(4,105)} = 1,575$ ,  $p = 0,186$ ). Slično kao i u slučaju salivarnog kortizola, glavni efekat vremena pokazao je statistički značajno povećanje ( $p < 0,05$ ) od 2,81 (0,85) nmol/L u srednjoj vrednosti Csal/Cser indeksa između šestog dana nakon utakmice (Dan 6) i dana pre takmičenja (Dan-1). Dodatno, nije uočena statistički značajna razlika između srednjeg bazalnog i Dan-1 nivoa Csal/Cser indeksa niti za kontrolnu niti za interventnu grupu.

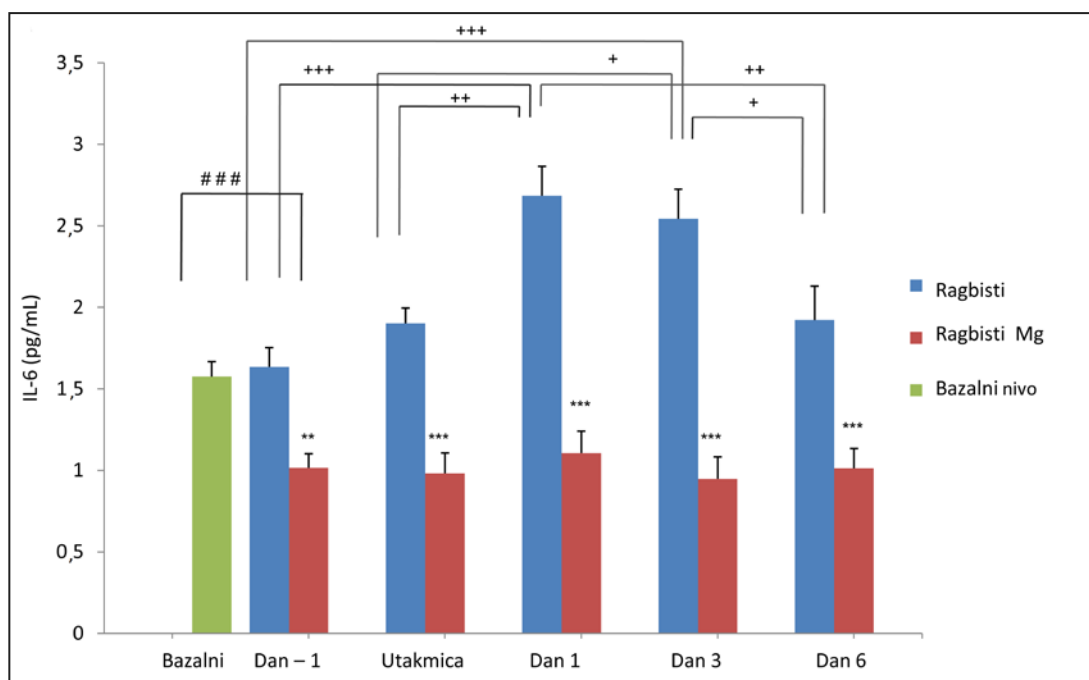


**Slika 16.** Uticaj magnezijuma na obrazac promene Csal/Cser indeksa kod ragbista, pre i nakon takmičenja. Promena u nivou Csal/Cser indeksa tokom svih vremenskih tačaka, za kontrolnu grupu (plavi), interventnu grupu (crveni), sa bazalnim vrednostima (zeleni). \*\*  $p < 0,05$  za razliku u srednjoj vrednosti Csal/Cser indeksa između Dan-6 i Dan-1 nivoa (glavni efekat vremena).



#### 4.4.1.3. Uticaj magnezijuma na nivo IL-6

Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je statistički značajnu interakciju između efekta suplementacije magnezijumom i vremena u odnosu na koncentraciju IL-6 ( $F_{(4,105)} = 4,896$ ,  $p < 0,001$ ), što znači da je uticaj magnezijuma na koncentraciju IL-6 zavisian od vremena. Efekat ragbi utakmice na promenu nivoa IL-6 je uočljiv samo u kontrolnoj grupi (Slika 17.) što je i potvrđeno izvođenjem analize prostog efekta vremena koji je pokazao statistički značajnu razliku ( $F_{(4,105)} = 9,195$ ,  $p < 0,001$ ) u srednjoj koncentraciji IL-6 između različitih dana. Analiza prostog efekta tretmana magnezijumom pokazala je statistički značajno sniženje u koncentraciji nivoa IL-6 kod ragbista koji su uzimali magnezijum u poređenju sa kontrolnom grupom, u svakoj tački vremena. Postoji statistički značajna razlika između bazalne koncentracije IL-6 i koncentracije određene dan pre utakmice (Dan-1) kod ragbista koji su uzimali suplement magnezijuma ( $t_{32,297} = 4,424$ ,  $p < 0,001$ ).

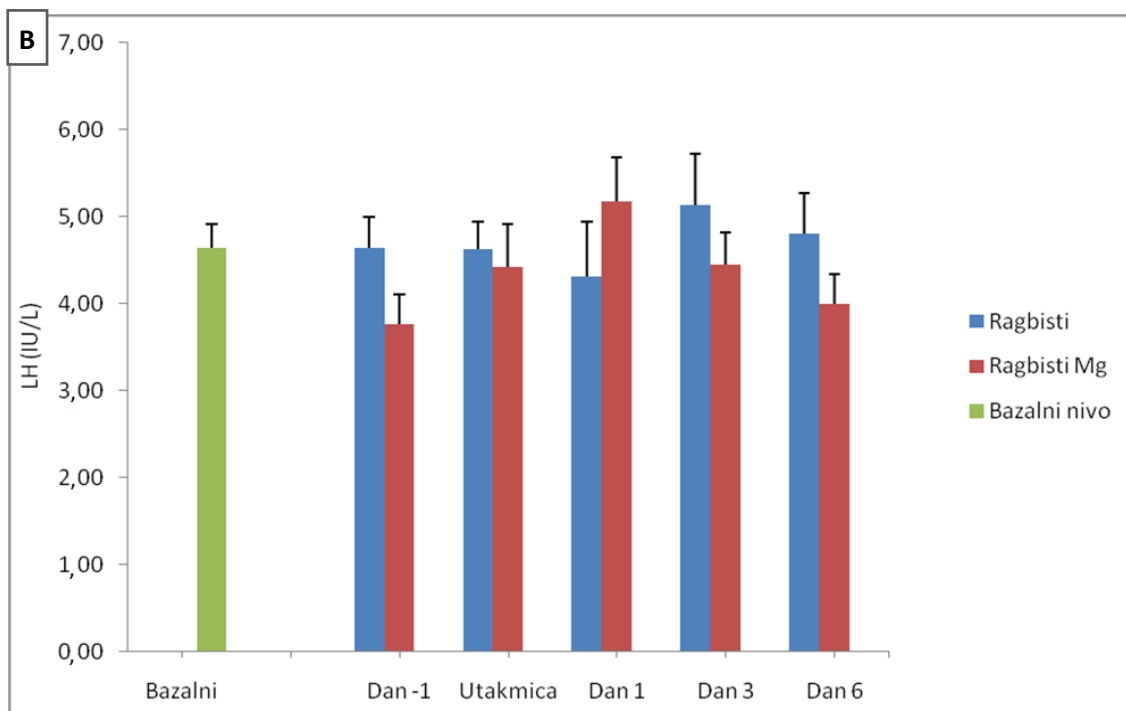
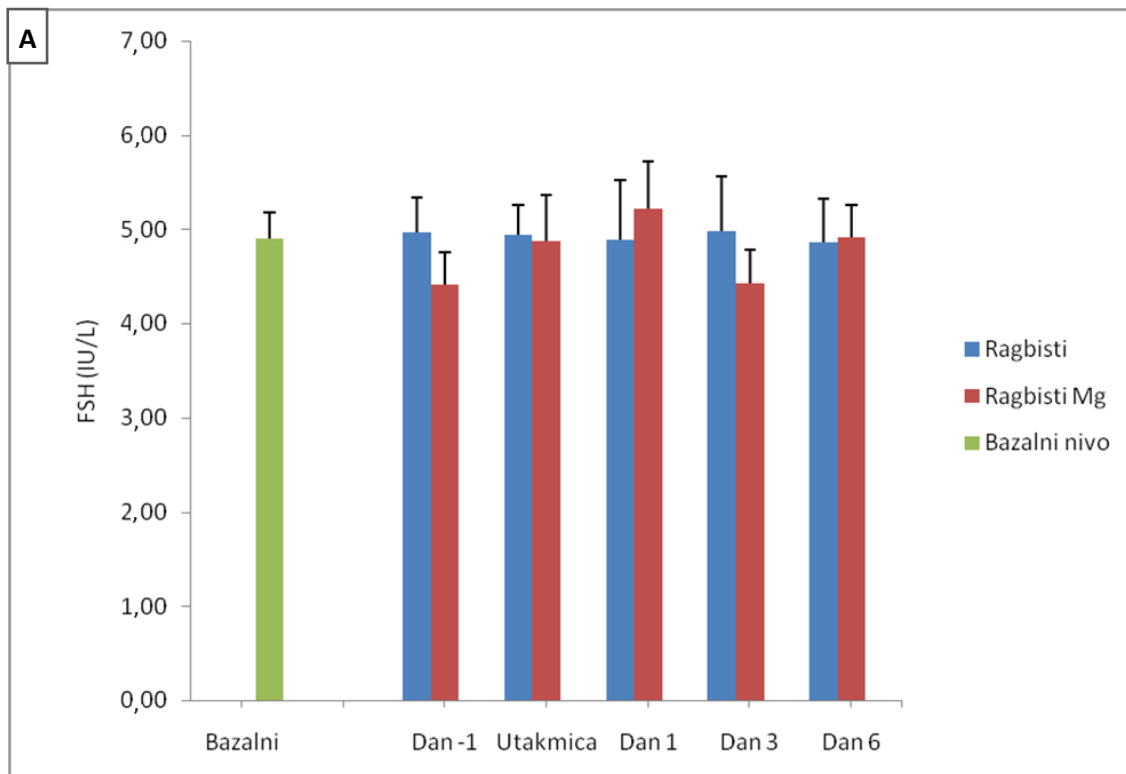


**Slika 17.** Suplementacija magnezijumom značajno utiče na IL-6 kod ragbista. Promena nivoa IL-6 tokom svih vremenskih tačaka, za kontrolnu grupu (plavi), interventnu grupu (crveni), sa bazalnim vrednostima (zeleni). \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$  za odgovarajuće tačke vremena za kontrolnu grupu u odnosu na grupu koja je uzimala magnezijum; +  $p < 0,05$ , ++  $p < 0,01$  i +++  $p < 0,001$  u kontrolnoj grupi za različite tačke vremena; ###  $p < 0,001$  za nivo IL-6 kod ragbista koji su uzimali magnezijum dan pre utakmice (Dan-1) vs. bazalni IL-6 nivo.

#### **4.4.2. UTICAJ MAGNEZIJUMA NA DINAMIKU PROMENE PARAMETARA AKTIVNOSTI HPG OSOVINE KOD RAGBISTA PRE I NAKON UTAKMICE**

##### **4.4.2.1. Uticaj magnezijuma na nivo LH i FSH kod ragbista**

Dvofaktorska analiza varijanse nije pokazala statistički značajnu interakciju između efekta suplementacije magnezijumom i vremena u odnosu na koncentraciju FSH ( $F_{(4,105)}=0,335$ ,  $p=0,854$ ), kao i u odnosu na koncentraciju LH ( $F_{(4,105)}=1,285$ ,  $p=0,281$ ), što znači da je uticaj magnezijuma na koncentraciju ova dva hormona nezavisan od vremena. Na *Slici 18.* se može uočiti sličan obrazac promene nivoa FSH i LH kod ragbista koji su uzimali magnezijum, pri čemu oba hormona imaju nižu vrednost dan pred utakmicu (Dan-1) u odnosu na kontrolnu grupu, dok svoju maksimalnu vrednost dostižu dan nakon utakmice (Dan 1). Međutim, primena glavnog efekta vremena pokazala je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji LH i FSH kako pre tako ni nakon primene magnezijuma. Osim toga, ni glavni efekat suplementacije magnezijumom nije pokazao statistički značajnu razliku u koncentraciji LH i FSH između interventne i kontrolne grupe. Ne postoji statistički značajna razlika između bazalne koncentracije ni LH niti FSH, i odgovarajućih koncentracija ovih hormona određenih dan pre utakmice (Dan-1), kako za ragbiste u kontrolnoj grupi ( $p > 0,05$ ), tako i za ragbiste koji su uzimali suplement magnezijuma ( $p > 0,05$ ).

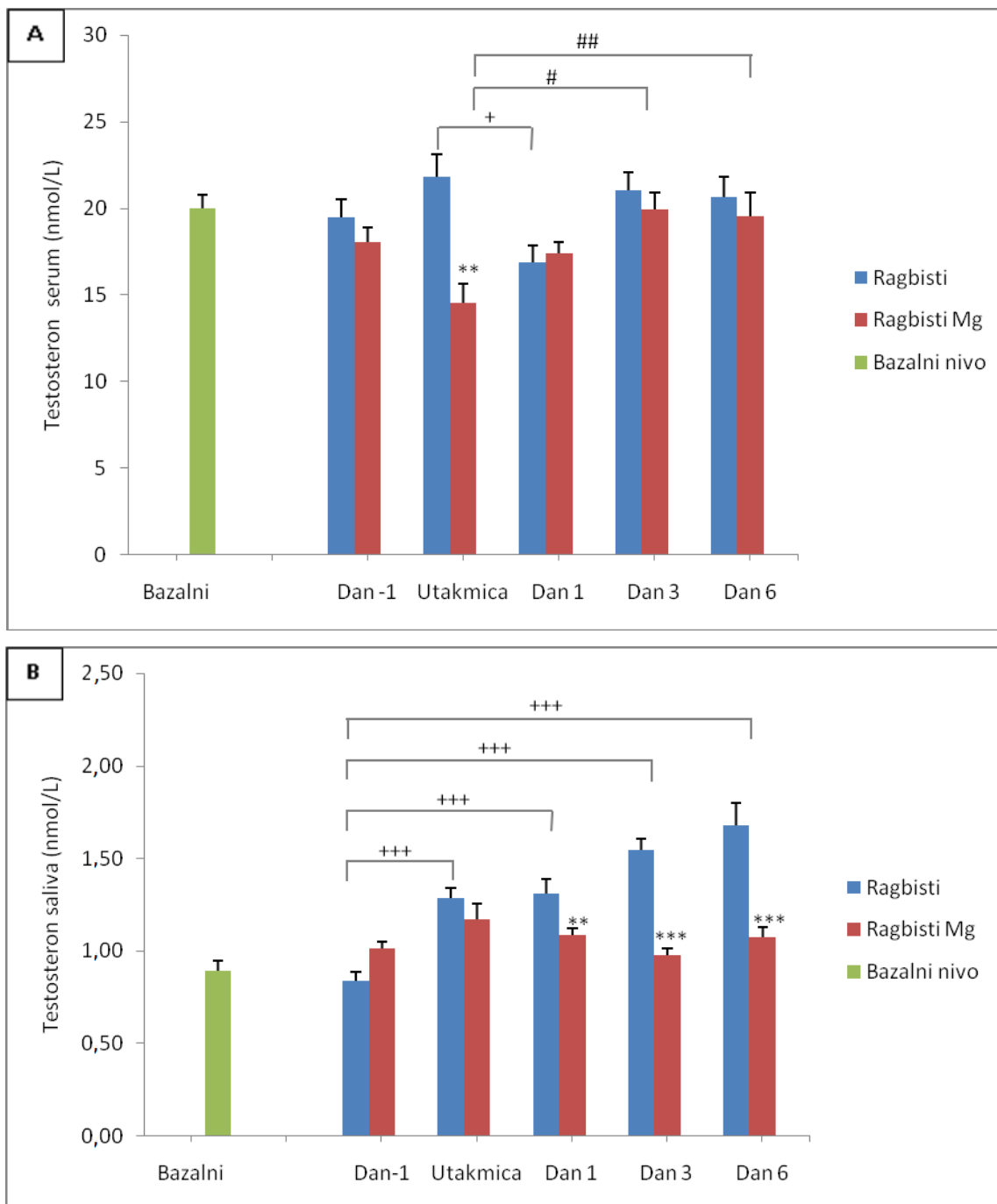


**Slika 18.** Uticaj magnezijuma na obrazac promene nivoa FSH i LH kod ragbista, pre i nakon takmičenja. Promena u nivou FSH i LH tokom svih vremenskih tačaka, za kontrolnu grupu (plavi), interventnu grupu (crveni), sa bazalnim vrednostima (zeleni). (A) Promena nivoa FSH u serumu. (B) Promena nivoa LH u serumu.

#### 4.4.2.2. Utica j magnezijuma na nivo testosterona kod ragbista

Naši rezultati su pokazali da postoji statistički značajna interakcija između efekta suplementacije magnezijumom i vremena u odnosu na koncentraciju testosterona u serumu ( $F_{(4,105)}=3,950$ ,  $p=0,005$ ). S obzirom da postoji značajna interakcija, primenjena je tehnika tumačenja podataka označena kao analiza prostih efekata. Analiza prostog efekta tretmana magnezijumom pokazala je statistički značajno sniženje u koncentraciji serumskog nivoa testosterona (Tser) kod interventne grupe u poređenju sa kontrolnom grupom ( $F_{(1,105)}=22,638$ ,  $p<0,001$ ) (*Slika 19A*). *Post hoc* analiza Boniffferoni testom pokazala je da je ovo smanjenje u koncentraciji testosterona između ispitivanih grupa, najveće na sam dan takmičenja (Utakmica). Analiza prostog efekta za vreme ukazala je da u kontrolnoj grupi dolazi do statistički značajnog sniženja u koncentraciji testosterona na Dan1 u odnosu na dan utakmice ( $p=0,025$ ), dok nakon suplementacije magnezijumom, uočljiv je statistički značajan porast u koncentraciji testosterona trećeg ( $p<0,05$ ) i šestog dana ( $p<0,01$ ) nakon utakmice, u odnosu na dan utakmice.

Dvofaktorska analiza varijanse pokazala je statistički značajnu interakciju između efekta suplementacije magnezijumom i vremena u odnosu na koncentraciju testosterona u salivi ( $F_{(4,105)}=13,767$ ,  $p<0,001$ ), što znači da je utica j magnezijuma na koncentraciju testosterona u salivi zavisao od vremena. Efekat ragbi utakmice na promenu nivoa testosterona u salivi može se uočiti samo u kontrolnoj grupi (*Slika 19B*.) što je i potvrđeno izvođenjem analize prostog efekta vremena koji je pokazao statistički značajnu razliku ( $F_{(4,105)}=23,489$ ,  $p<0,001$ ) u koncentraciji testosterona u salivi između različitih dana. Analiza prostog efekta tretmana magnezijumom pokazala je statistički značajno sniženje u koncentraciji nivoa salivarnog testosterona kod ragbista koji su uzimali magnezijum u poređenju sa kontrolnom grupom, u svakoj tački vremena, osim za Dan-1, kada je neznatno viši. Dodatno, nije uočena statistički značajna razlika između srednjeg bazalnog i Dan-1 nivoa testosterona u serumu i salivi, niti za kontrolnu niti za interventnu grupu.



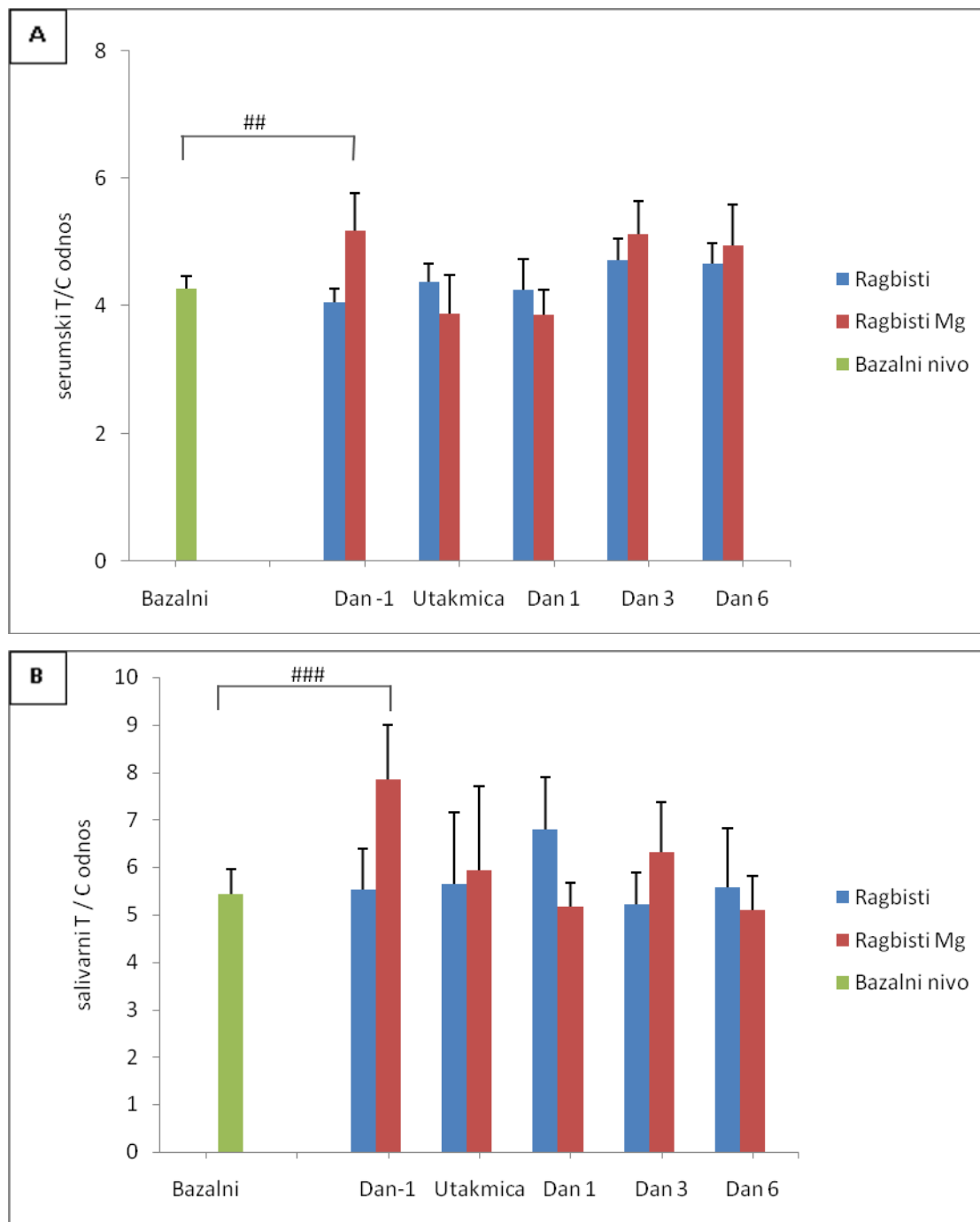
**Slika 19.** Uticaj magnezijuma na obrazac promene nivoa testosterona kod ragbista, pre i nakon takmičenja. Promena u nivou kortizola tokom svih vremenskih tačaka, za kontrolnu grupu (plavi), interventnu grupu (crveni), sa bazalnim vrednostima (zeleni). (A) Promena nivoa testoterona u serumu. (B) Promena nivoa testosterona u salivi. \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$  za odgovarajuće tačke vremena za kontrolnu grupu u odnosu na grupu koja je uzimala magnezijum; +  $p < 0,05$  i +++  $p < 0,001$  u kontrolnoj grupi za različite tačke vremena; #  $p < 0,05$  i ##  $p < 0,01$  za različite tačke vremena kod ragbista koji su uzimali magnezijum.

#### 4.4.2.3. Promena T/C odnosa pod uticajem magnezijuma

Primenom dvofaktorskog ANOVA testa, pokazano je da ne postoji statistički značajna interakcija između efekta suplementacije magnezijumom i vremena u odnosu na nivo odnosa T/C u serumu ( $F_{(4,105)}=1,251$ ,  $p=0,294$ ), što znači da je uticaj vremena na promenu T/C odnosa potpuno nezavisan od uticaja magnezijuma. Ni glavni efekat vremena, kao ni glavni efekat suplementacije magnezijumom, nisu ukazali na postojanje statistički značajnih razlika u vrednostima ovog parametra, kako pre tako ni posle suplementacije magnezijumom. Ipak, ukoliko se posmatra *Slika 20A*, može se uočiti da je u kontrolnoj grupi iz dana u dan promena ovog odnosa neznatna, dok po završenoj suplementaciji nivo T/C dostiže svoj maksimum dan pred utakmicu, da bi nakon toga imao trend pada i dostigao svoju minimalnu vrednost dan nakon utakmice.

Kada je reč o salivarnom T/C odnosu, posmatrano kroz statistički obrađene podatke, situacija je ista kao i u serumu - ne postoji statistički značajna interakcija između vremena i efekta suplementacije magnezijumom u odnosu na nivo odnosa T/C u salivi ( $F_{(4,105)}=1,773$ ,  $p=0,140$ ). Takođe, ni glavni efekat vremena, ni glavni efekat suplementacije magnezijumom nisu dali statistički značajne razlike. Pa ipak, ukoliko pogledamo grafički prikaz promena ovog parametra (*Slika 20B*.) uočavaju se izvesne razlike u odnosu na kretanje ovog parametra u serumu. Naime, u kontrolnoj grupi, ovaj parametar ima trend rasta i svoj maksimum dostiže dan nakon utakmice, da bi nakon toga opet krenuo da pada. Kada je reč o grupi ragbista koji su uzimali magnezijum, vrednost salivarnog T/C odnosa je najveća dan pred utakmicu, da bi svoj minimum dostigla dan nakon utakmice (Dan 1).

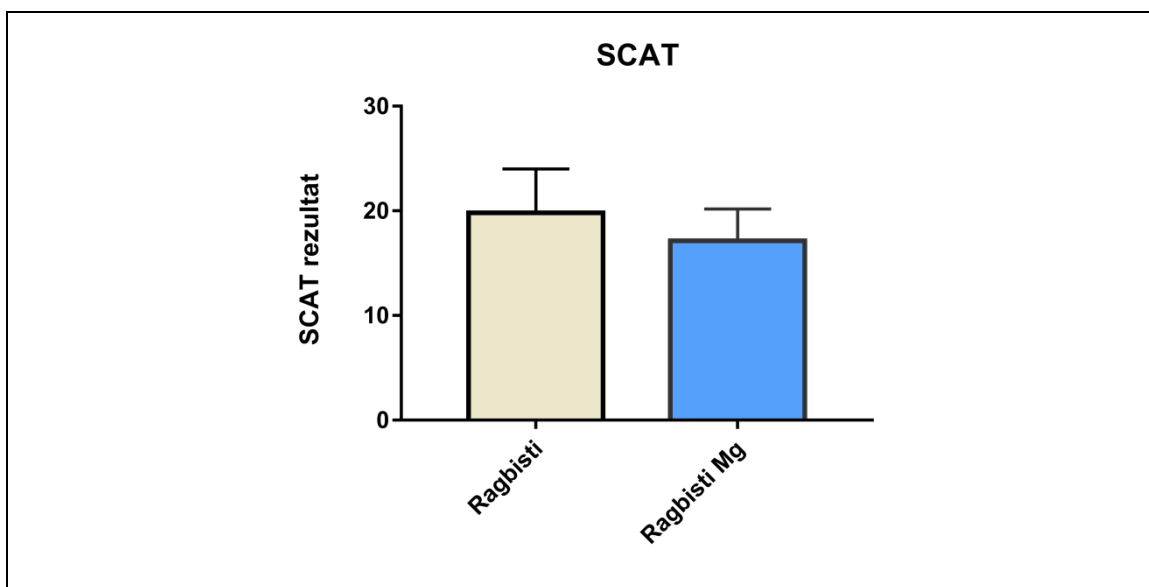
Između bazalne vrednosti T/C odnosa i vrednosti određene dan pre utakmice (Dan-1) kod ragbista koji su uzimali suplement magnezijuma, postoji statistički značajna razlika i za serum ( $t_{14,391} = -2,322$ ,  $p < 0,05$ ) i za salivu ( $t_{14,304} = -3,436$ ,  $p < 0,01$ ), dok se za kontrolnu grupu ova razlika ne uočava.



**Slika 20.** Uticaj magnezijuma na obrazac promene nivoa T/C odnosa kod ragbista, pre i nakon takmičenja. Promena u nivou T/C odnosa tokom svih vremenskih tačaka, za kontrolnu grupu (plavi), interventnu grupu (crveni), sa bazalnim vrednostima (zeleni). (A) Promena nivoa T/C odnosa u serumu. (B) Promena nivoa T/C odnosa u salivi. ## p<0,01 i ### p<0,001 za nivo T/C odnosa kod ragbista koji su uzimali magnezijum na dan pre utakmice (Dan-1) vs. bazalni nivo T/C.

#### 4.5. PROCENA REZULTATA SCAT TESTA KOD RAGBISTA PRE I NAKON SUPLEMENTACIJE MAGNEZIJUMOM

Test anksioznosti u sportskim takmičenjima (*Sport competition anxiety test, SCAT*) je test kojim se kod sportista procenjuje nivo uzbuđenja i stresa pred utakmicu. Ragbisti koji su selektovani u interventnu grupu, radili su ovaj test neposredno pred utakmicu, i na osnovu rezultata koji su dobijeni svrstani su u neku od tri kategorije: < 17 - nizak nivo anksioznosti, od 17 do 24 - prosečan nivo anksioznosti, i >24 - visok nivo anksioznosti. Analiza rezultata je izvedena tako što je za svakog ragbistu interventne grupe vršeno poređenje rezultata SCAT testa pre i nakon završene suplementacije magnezijumom, i ovi rezultati su prikazani na *Slici 21*. Iako razlika u vrednostima SCAT rezultata nije statistički značajna uočava se da je po suplementaciji magnezijumom, vrednost SCAT rezultata niža što govori o smanjenju nivoa anksioznosti pred utakmicu.

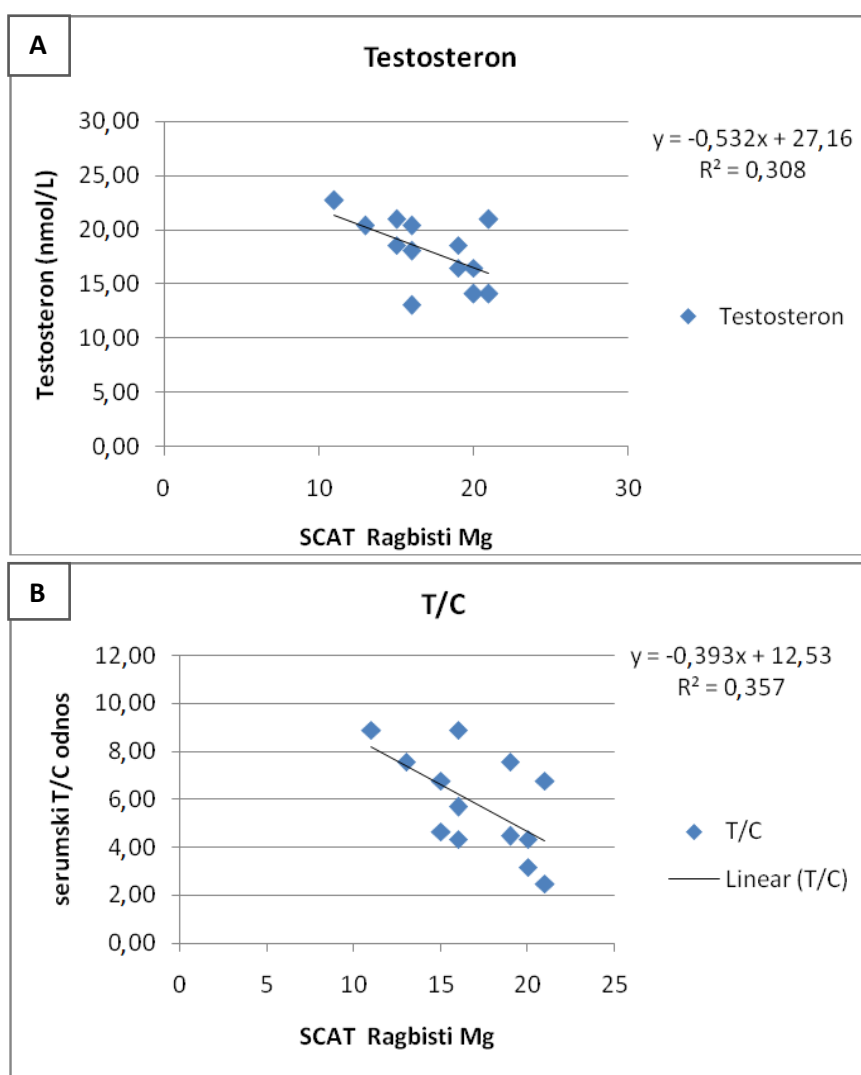


**Slika 21.** Rezultati SCAT testa ragbista interventne grupe, pre i nakon suplementacije magnezijumom.

Na osnovu izračunatog Pearson-ovog koeficijenta korelacije, utvrđeno je da ne postoji značajna korelacija između SCAT testa i nivoa kortizola, kao ni između SCAT testa i nivoa testosterona ali ni T/C odnosa na dan utakmice.



Međutim, kako je uočeno da je dan pred utakmicu kod interventne grupe odnos T/C bio statistički značajno viši u odnosu na bazalne vrednosti, ispitano je postoji korelacija između ovih vrednosti i rezultata SCAT testa po završenoj suplementaciji. Uočena je negativna korelacija između SCAT rezultata i serumskog T/C odnosa ( $r=-0,598$ ,  $n=13$ ,  $p=0,031$ ) kao i između SCAT rezultata i nivoa testosterona ( $r=-0,555$ ,  $n=13$ ,  $p=0,049$ ). Grafikoni rasipanja (*scatter plots*) sumiraju rezultate (*Slika 22.*). Postojanje negativne korelacije ukazalo je da sa porastom T/C odnosa dan pre utakmicu dolazi do sniženja SCAT rezultata, što ukazuje da je pre svega odnos ova dva hormona, važan za ponašanje i odgovor na stres u takmičenju, kod muškaraca.



**Slika 22.** (A) Korelacija između rezultata SCAT testa i nivoa testosterona. (B) Korelacija između rezultata SCAT testa i T/C odnosa.

#### 4.6. UTICAJ MAGNEZIJUMA NA HEMATOLOŠKE PARAMETARE KOD RAGBISTA PRE I NAKON UTAKMICE

Za razliku od ostalih parametara, određivanje hematoloških parametara je vršeno u uzorcima uzetim dan pred utakmicu (Dan-1), dan nakon utakmice (Dan 1) i šestog dana nakon utakmice (Dan 6). Dvofaktorska analiza varijanse je takođe korišćena kako bi se analizirao uticaj koji suplementacija magnezijumom može da ima na dinamiku promene hematoloških parametara, u određenim tačkama vremena.

Ova studija ukazala je da je nakon četiri nedelje primene magnezijuma, ukupan broj leukocita u interventnoj grupi značajno niži u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0,05$ ), a takođe su primećene promene u diferencijalnoj formuli (*Table VII*). Dokazano je da postoji statistički značajna interakcija između efekta suplementacije magnezijumom i vremena u odnosu na procenat neutrofila (%NE) ( $F_{(2,63)} = 3,359$ ,  $p = 0,041$ ). U kontrolnoj grupi, dan nakon utakmice, uočeni su porast u procentu neutrofila i sniženje procenta limfocita, što dovodi do porasta u vrednosti odnosa neutrofila i limfocita (NE/LY odnos). Kada je reč o ragbistima koji su uzimali magnezijum, glavne razlike su nađene dan nakon utakmice (Dan 1): analiza prostog efekta suplementacije magnezijumom za %NE, pokazala je statistički značajno sniženje od skoro 12% u %NE, dok je glavni efekat suplementacije magnezijumom za limfocite, pokazao statistički značajan porast od 9% u %LY, u odnosu na njihove vrednosti u kontrolnoj grupi, što je dovelo do sniženja NE/LY odnosa. U kontrolnoj grupi, bazofili su pokazali statistički značajno sniženje na Dan1 ( $p < 0,05$ ), i zatim ponovo porast na Dan6 ( $p < 0,05$ ), dok je nakon uzimanja magnezijuma došlo do značajnog sniženja u procentu kako bazofila (%BA) tako i monocita (%MO) u interventnoj u poređenju sa kontrolnom grupom. T-test je ukazao na statistički značajnu razliku između bazalnih vrednosti i Dan-1 vrednosti za ukupne leukocite i %BA kod grupe ragbista koji su bili na suplementaciji magnezijumom, dok ostale populacije leukocita nisu uočene razlike, niti za kontrolnu niti za interventnu grupu.

Za razliku od ćelija bele loze, kod eritrocita, kao i za koncentraciju hemoglobina, dvofaktorska ANOVA je pokazala da ne postoji statistički značajna interakcija između vremena i suplementacije magnezijumom, odnosno da je uticaj magnezijuma na ove parametre nezavisan od vremena. Analiza glavnog efekta vremena i suplementacije, nije pokazala da postoje statistički značajne razlike u koncentraciji ovih parametara, na Dan-1, Dan1 i Dan6. Dodatno, nije uočena statistički značajna razlika između srednjeg bazalnog i Dan-1 broja eritrocita i hemoglobina, niti za kontrolnu niti za interventnu grupu.

**Tabela VII** Hematološki parametri u kontrolnoj i interventnoj grupi amaterskih ragbi igrača.

Parametar	Bazalne vrednosti	Dan-1		Dan1		Dan6	
		Ragbisti	Ragbisti Mg	Ragbisti	Ragbisti Mg	Ragbisti	Ragbisti Mg
Ukupni leukociti , x 10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup>	7,45 (0,26)	7,60 (0,27)	6,42 (0,34) <sup>a</sup>	6,73 (0,22)	6,29 (0,28)	6,65 (0,28)	6,94 (0,26)
Neutrofili , %	51,56 (1,61)	51,83 (1,79)	52,55 (1,28)	56,81 (1,64)	50,49 (1,38) <sup>a</sup>	52,77 (1,70)	53,70 (1,72)
Limfociti , %	34,37 (1,54)	33,85 (1,86)	33,75 (1,19)	29,72 (1,15)	35,98 (1,21) <sup>a</sup>	32,76 (1,23)	35,72 (1,66)
Monociti , %	10,18 (0,41)	10,47 (0,65)	8,98 (0,48) <sup>a</sup>	10,35 (0,91)	9,38 (0,48)	10,32 (0,92)	6,83 (0,43)
Bazofili , %	0,83 (0,08)	0,73 (0,06)	0,43 (0,08) <sup>a</sup>	0,47 (0,06) <sup>b</sup>	0,45 (0,04)	0,81 (0,04) <sup>c</sup>	0,37 (0,06) <sup>a</sup>
Eozinofili , %	3,07 (0,34)	3,12 (0,47)	4,29 (0,78)	2,65(0,39)	3,71 (0,66)	3,13 (0,52)	3,38 (0,64)
NE / LY odnos	1,50 (0,84)	1,53 (0,72)	1,55 (0,81)	1,91 (0,60)	1,40 (0,08) <sup>a</sup>	1,61(0,07)	1,50 (0,90)
Eritrociti , x 10 <sup>12</sup> L <sup>-1</sup>	4,75 (0,063)	4,76 (0,105)	4,91 (0,091)	4,67 (0,115)	4,71 (0,073)	4,91 (0,145)	4,88 (0,069)
Hemoglobin, g/L	150,9 (1,92)	150,8 (1,94)	147,4(2,37)	146,2 (2,49)	148,4 (2,16)	153,1 (3,10)	146,3 (1,51)

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost (SEM). Promena u ukupnom broju leukocita i diferencijalnoj formuli, kao i u broju eritrocita i koncentraciji hemoglobina, određena je na dan pre takmičenja (Dan-1), 24h nakon završene utakmice (Dan1) i šestog dana postkompetitivnog perioda (Dan6). <sup>a</sup>p<0,05 u poređenju sa istom tačkom vremena za kontrolnu grupu, <sup>b</sup>p<0,05 u poređenju sa Dan-1 u kontrolnoj grupi, <sup>c</sup>p<0,05 u poređenju sa Dan1 u kontrolnoj grupi.

#### **4.7. PROCENA STEPENA OKSIDATIVNOG OŠTEĆENJA DNK PERIFERNIH LIMFOCITA PRE I NAKON SUPLEMENTACIJE MAGNEZIJUMOM KOD OBE GRUPE ISPITANIKA**

Za procenu uticaja magnezijuma na stepen oštećenja DNK, izvršena je nasumična selekcija studenata, kao i ragbista kontrolne i interventne grupe, koji su podeljeni u četiri grupe:

*Grupa 1:* studenti sa sedentarnim stilom života, bez suplementacije magnezijumom (n=5).

*Grupa 2:* studenti sa sedentarnim stilom života, koji su uzimali 500 mg/dan magnezijuma tokom 28 dana (n=5).

*Grupa 3:* ragbisti, bez suplementacije magnezijumom (n=5).

*Grupa 4:* ragbisti, koji su uzimali 500 mg/dan magnezijuma tokom 28 dana (n=8).

Uzorci krvi ragbista su uzeti dan nakon utakmice (Dan 1), otprilike 20h po završetku meča.

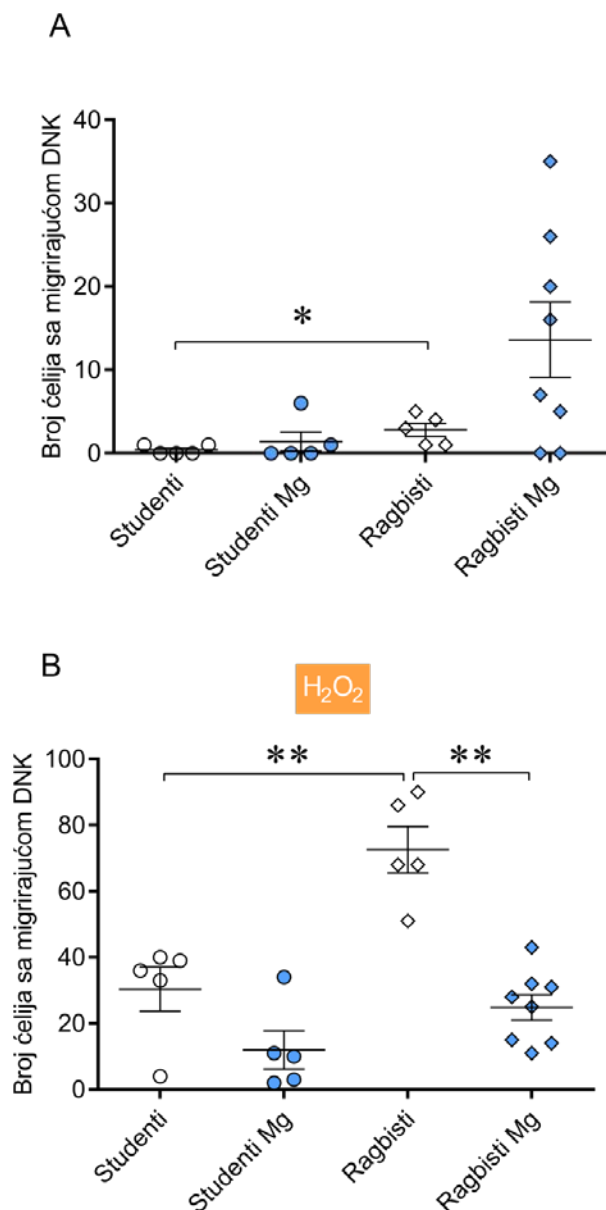
Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je nivo bazalnog endogenog oštećenja DNK, prikazanog kao broj ćelija sa migrirajućom DNK (*Slika 23A.*), pre početka suplementacije magnezijumom, bio veći kod ragbista u odnosu na studente (p=0,042). Slično tome, nivo oštećenja DNK u ćelijama izloženim dejstvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je bio značajno viši kod ragbi igrača (*Slika 23B.*). Nakon četiri nedelje suplementacije, nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom broju ćelija sa oštećenim jedrom, u prisustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, između studenata koji vode sedentarni način života i ragbi igrača koji su uzimali magnezijum (*Slika 23B.*).

Osim toga, urađena je evaluacija stepena DNK oštećenja i dobijeni skorovi su podeljeni na nisko + srednje oštećenje i visoko + potpuno oštećenje. Rezultati su prikazani na *Slici 24*. Nije uočena statistički značajna razlika između grupa kada ćelije nisu bile izložene dejstvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

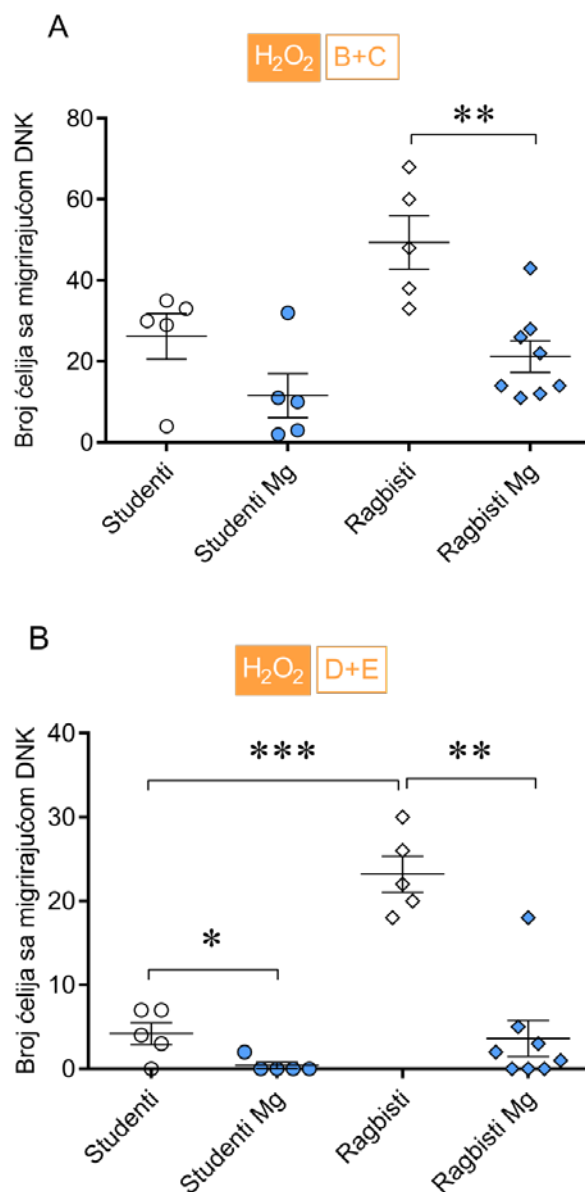
Nakon četiri nedelje suplementacije magnezijumom, broj ćelija sa niskim + srednjim oštećenjem (B+C), nakon izlaganja dejstvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je statistički značajno manji kod ragbista u poređenju sa odgovarajućom kontrolnom grupom ragbista

( $p=0,002$ ) (*Slika 24A.*). Ono što je zanimljivo je da ovakav uticaj nije uočen u studentskoj populaciji u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu studenata ( $p=0,099$ ) (*Slika 24A.*).

Na slici *Slici 24B.* prikazano je da je suplementacija magnezijumom bila efikasna u snižavanju broja ćelija sa teškim oštećenjem DNK kod obe grupe ispitanika u odnosu na njihove odgovarajuće kontrole. Nakon izlaganja dejstvu  $H_2O_2$  broj ćelija sa visokim i potpunim oštećenjem DNK (D+E kategorije) je značajno niži kod studenata ( $p=0,025$ ) i ragbi igrača ( $p=0,002$ ) koji uzimali magnezijum. Takođe, broj ćelija sa visokim i potpuno oštećenim jedrom je značajno viši kod ragbista nego kod studenata koji nisu uzimali suplement magnezijuma ( $p<0,001$ ).



**Slika 23.** Efekat četvoronedeljne suplementacije magnezijumom na broj perifernih limfocita sa oštećenjem DNK, evaluiran pomoću Comet testa. Ispitanici su podeljeni u 4 grupe, u zavisnosti od suplementacije magnezijumom i nivoa fizičke aktivnosti: sedentarni (Studenti), sedentarni sa suplementacijom magnezijumom (Studenti Mg), ragbi igrači (Ragbisti) i ragbi igrači sa suplementacijom magnezijumom (Ragbisti Mg). Broj ispitanika po grupi: Studenti (n=5), Studenti Mg (n=5), Ragbisti (n=5) i Ragbisti Mg (n=8). (A) Bazalni broj ćelija sa migrirajućom DNK. (B) Broj ćelija sa migrirajućom DNK nakon izlaganja dejstvu 1,5mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost (SEM). Dobijena razlika je smatrana statistički značajnom kada je p<0,05 (\*p<0,05; \*\*p<0,01).



**Slika 24.** Efekat četvoronedeljne suplementacije magnezijumom na stepen oštećenja DNK perifernih limfocita nakon izlaganja dejstvu 1,5 mmol/L  $H_2O_2$ , evaluiran pomoću Komet testa. Ispitanici su podeljeni u 4 grupe, u zavisnosti od suplementacije magnezijumom i nivoa fizičke aktivnosti: sedentarni (Studenti), sedentarni sa suplementacijom magnezijumom (Studenti Mg), ragbi igrači (Ragbisti) i ragbi igrači sa suplementacijom magnezijumom (Ragbisti Mg). Broj ispitanika po grupi: Studenti (n=5), Studenti Mg (n=5), Ragbisti (n=5) i Ragbisti Mg (n=8). (A) Broj ćelija sa niskim i srednjim stepenom oštećenja DNK (B i C). (B) Broj ćelija sa visokim i potpunim stepenom oštećenja DNK (D i E). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost (SEM). Dobijena razlika je smatrana statistički značajnom kada je  $p < 0,05$  (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).



## 5. DISKUSIJA

### 5.1. RAZLIKE U UTICAJU MAGNEZIJUMA NA BAZALNE NIVOE PARAMETARA AKTIVNOSTI HPA I HPG OSOVINE IZMEĐU RAGBISTA I SEDENTARNIH MUŠKARACA

U prvom delu našeg rada bavili smo se ispitivanjem razlika između uticaja koji magnezijum ima na parametre aktivnosti HPA i HPG osovine ragbista i njihovu međusobnu interakciju, u odnosu na efekte koje ispoljava kod muškaraca istog uzrasta koji se ne bave aktivno sportom.

Pokazano je da četvoronedeljna suplementacija magnezijumom kod obe grupe muškaraca, ima diskretne efekte na nivo hormona hipotalamo-hipofizno-gonadne osovine, sa značajnim povećanjem T/C odnosa, koji je praćen porastom u broju eritrocita pre svega u studenskoj populaciji (*Tabela V*). Osim toga suplementacija magnezijumom je dovela do sniženja u koncentraciji kortizola i nivoa IL-6, kao i do promena u leukocitarnoj diferencijalnoj formuli, koji su posebno izraženi u grupi ragbista koji su uzimali magnezijum.

Literaturni podaci o uticaju magnezijuma na HPA osovinu dobijeni u okviru studija na eksperimentalnim životinjama, kao i u okviru studija na ljudima, su prilično kontroverzni. U jednoj od njih (84) između ostalog, ispitivan je uticaj koji akutna *i.v.* administracija  $MgSO_4$  ima na nokturalnu sekreciju hormona kod deset zdravih muškaraca, i pokazano je da se nivo ACTH smanjuje, dok nivo kortizola, kao i hormona rasta, prolaktina, i melatonina, ostaje nepromenjen. Rezultati navedene studije su bili konzistentni sa polaznom pretpostavkom od koje se krenulo u istraživanju - da magnezijum jon ispoljava GABA-agonistički i NMDA-antagonistički efekat na nokturalnu sekreciju hormona. S druge strane, u drugoj studiji (102) u koju su bile uključene starije osobe, pokazano je da je subhronična suplementacija magnezijumom redukovala nivo kortizola bez promene u nivou

ACTH. Izvestan broj studija izvedenih na eksperimentalnim životinjama kod kojih je praćen uticaj hipomagnezijemije na ponašanje (87), pokazao je da kod životinja sa deficiencijom magnezijuma dolazi do porasta u koncentraciji ACTH koji je praćen izrazito anksioznim ponašanjem (86) kao i da su životinje kojima je dat magnezijumom bogat suplement, imale značajno niži nivo salivarnog kortizola praćen sniženjem agresivnog ponašanja (103). Za razliku od toga, Cinar i saradnici (31) su pokazali porast u koncentraciji ACTH nakon jednomesečne suplementacije magnezijumom kod sedentarnih osoba i osoba koje su se bavile taekvandom. Naši rezultati su u saglasnosti sa studijama u kojima je subhronična ili hronična primena magnezijuma redukovala nivo kortizola, bez uticaja na nivo ACTH. Ukoliko uporedimo efekat suplementacije magnezijumom kod ragbista i studenata uočeno je sniženje koncentracije kortizola kod obe grupe ispitanika, dok kada je reč o ACTH, suplementacija nije imala nikakav efekat na nivo ovog hormona ni kod jedne ispitivane grupe muškaraca. Postoji nekoliko mogućnosti koje mogu doprineti takvim rezultatima. Jedna od mogućnosti je da akutna primena magnezijuma ima centralne efekte, na nivou hipotalamusa, hipokampusu ili amigdala, pod čijim uticajem se snižava sinteza CRH u paraventricularnom nukleusu, što vodi sniženju koncentracije kortizola. Drugi korak, koji treba razmotriti, je uticaj magnezijuma na prelazak kortizola kroz krvno-moždanu barijeru putem p-glikoprotein zavisnih (p-gp) puteva, s obzirom da je magnezijum koaktivator p-gp i pomaže u transportu kortizola van mozga (21). Za akutnu primenu magnezijuma bi se očekivalo da snizi centralni mehanizam povratne sprege, ali efekat dugotrajne primene suplementacije i p-gp ekspresije zahteva detaljnija ispitivanja. Ipak, ne može se pouzdano tvrditi da ovaj mehanizam negativne povratne sprege ima ključnu ulogu u regulaciji nivoa kortizola nakon dugotrajne suplementacije magnezijumom. Druga mogućnost, koja je verovatnija, je direktan inhibitorni efekat magnezijuma na ćelije kore nadbubrega i sintezu/sekreciju glukokortikoida, što može biti posledica smanjene osetljivosti nadbubrega na dejstvo ACTH, kao što je predložio Murck (21). Svakako su potrebna dalja ispitivanja potencijalnih molekularnih mehanizama koji leže u osnovi ovakvog efekta magnezijuma.

Neuroendokrini i imuni sistem imaju blisku međusobnu komunikaciju putem citokina i steroidnih hormona, što obezbeđuje adekvatan odgovor organizma na promene u životnom okruženju (104). Dobro je poznato da IL-6 ima sposobnost da aktivira HPA osovinu tako što stimuliše oslobađanje CRH i povećava nivo ACTH i kortizola (55, 89). Postoji i obrnut efekat u kome odgovor kortizola na ACTH stimulaciju korelira sa koncentracijom IL-6 u krvi. Prema rezultatima naše studije (Slika 9.), bazalni nivo IL-6 je bio značajno smanjen nakon suplementacije i kod fizički neaktivnih ispitanika i kod ragbista, pri čemu je po završenoj suplementaciji uočeno da je nivo IL-6 kod ragbista značajno niži nego kod studenata. Ovako izražena razlika u koncentraciji IL-6 između dve grupe ispitanika navodi na pretpostavku da magnezijum može biti aktivno uključen u interakciju između HPA osovine i IL-6, što bi trebalo potvrditi dodatnim studijama koje bi ispitale ovu vezu. Nedavno je grupa istraživača otkrila potencijalni mehanizam uticaja magnezijuma na oslobađanje citokina, s obzirom da su pokazali da  $MgSO_4$  smanjuje produkciju citokina od strane lipopolisaharid-stimuliranih ćelija endotela i placentarnih eksplantata (105, 106). Rochelson i saradnici (105) su pokazali da je tretman endotelnih ćelija humane umbilikalne vene sa  $MgSO_4$ , pre lipopolisaharid stimulacije, inhibirao produkciju inflamatornih medijatora i ekspresiju ćelijskih adhezionih molekula i to na dozno zavisni način, najverovatnije putem supresije nuklearne translokacije i aktivacije NF- $\kappa$ B. Niz studija je pokazalo da suplementacija magnezijumom *in vivo* i *in vitro* povećava bazalni nivo I $\kappa$ B $\alpha$  i snižava aktivaciju NF- $\kappa$ B, čime se snižava produkcija citokina i hemokina (93, 105, 106). Dalje, pokazano je da kratkotrajno izlaganje klinički efikasnoj koncentraciji  $MgSO_4$  *in vitro*, dovodi do smanjenja produkcije TNF-alfa i IL-6 od strane neonatalnih monocita, smanjene ekspresije gena za citokine i proteine. (93). Iako su monociti glavni izvor sekrecije citokina, naša studija nije pokazala promenu u njihovom broju kod studenata nakon dugotrajne suplementacije magnezijumom, već je samo došlo do sniženja broja neutrofila, što je u skladu sa predloženim antiinflamatornim efektom magnezijuma (107). Takođe, zbog promena u broju neutrofila i limfocita, došlo je do sniženja odnosa neutrofila i limfocita (NE/LY). Odnos neutrofila i limfocita nalazi svoju primenu kao marker inflamacije, i njegova prediktorna uloga ispitivana je u vezi sa letalnim ishodom kod karcinoma i

kardiovaskularnih oboljenja (108, 109). Interesantan rezultat naše studije leži u činjenici da kod ragbista po završenoj suplementaciji, nije uočeno sniženje ovog odnosa pre utakmice, ali se on značajno menja dan nakon utakmice, što će naknadno biti diskutovano. Međutim, za razliku od studenata, po završenoj suplementaciji kod ragbista je uočeno značajno sniženje procenta bazofila i monocita. Ovi rezultati zajedno sa sniženjem IL-6 sugerišu da produžena suplementacija magnezijumom može potencijalno delovati kao anti-inflamatorni agens.

Prema rezultatima naše studije, izgleda da je uticaj magnezijuma na hipofizno-gonadne hormone delikatniji nego njegov uticaj na hipofizno-adrenalne komponente. Promene koje su uočene nisu bile statistički značajne, ali zanimljivo je primetiti da je kod studenata uočen porast u serumskoj koncentraciji sva tri hormona (FSH, LH i testosterona), dok je kod ragbista došlo do sniženja njihovog nivoa (prikazano na *Slikama 10-12.*). Uticaj magnezijuma na muške polne hormone nije puno ispitivan i rezultati su oskudni i kontradiktorni. U studiji koju su izveli Zofkova (110) i saradnici učestvovalo je 10 zdravih muškaraca, kod kojih je nakon intravenske infuzije  $MgSO_4$  uočeno blago sniženje serumskog testosterona, bez uticaja na nivo FSH i LH. Studija u kojoj su učestvovali sportisti i sedentarni ispitanici (32) pokazala je da je iscrpljujuće vežbe dovode do porasta u nivou i ukupnog i slobodnog testosterona kako kod sedentarnih ispitanika tako i kod osoba koje su redovno vežbale, kao i da je po završenoj jednomesečnoj suplementaciji magnezijumom, nivo testosterona veći kod osoba koje su uzimale magnezijum i vežbale za razliku od sedentarnih osoba. Brilla i saradnici (167) su pokazali da nivo ukupnog i slobodnog testosterona kod fudbalera raste nakon osam nedelja suplementacije sa ZMA preparatom (30 mg cink monometionin aspartat, 450 mg magnezijum aspartat i 10,5 mg vitamina B6). Statistički značajna razlika u koncentraciji testosterona između studenata i ragbista je u vezi sa opšte poznatom činjenicom proisteklom iz prethodnih ispitivanja koja su dokazala da čak i dovoljno dugo izvođenje vežbi koje su niskog intenziteta može dovesti do značajnog porasta u nivou testosterona (111). Rezultati naše studije za obe grupe ispitanika su ukazali da suplementacija magnezijumom dovodi do porasta u

bazalnim salivarnim koncentracijama testosterona, za koji se smatra da je pouzdan marker biloške raspoloživosti testosterona i da odlično korelira sa slobodnim testosteronom koji je biološki aktivna forma ovog hormona (112). Ipak, neki literaturni podaci govore o tome da dugotrajno vežbanje može dovesti do sniženja nivoa testosterona, što može biti posledica njegove smanjene sinteze na nivou testisa ili zbog centralne disfunkcije HPG osovine, što može biti u vezi sa povećanjem nivoa hormona povezanih sa stresom (113, 114). Maggio (115) i saradnici su pokazali u svojoj studiji o magnezijumu i anaboličkim hormonima kod starije populacije, da je unos magnezijuma povećao bioaktivnost testosterona kao i da je pozitivno uticao na sekreciju insulinu sličnog faktor rasta 1, čime su pretpostavili da magnezijum može biti važan modulator anaboličko/kataboličke ravnoteže, koja je posebno narušena kod starijih osoba. U prilog ove činjenice govori i studija koja je ukazala da postoji nekompetitivna inhibicija između magnezijuma jona i testosterona za vezivanje za seks-hormon-vezujući globulin (*sex hormon-binding globulin, SHBG*) što dovodi do porasta u bioraspoloživosti testosterona (116). Naime, poznato je da je kod muškaraca oko 65% testosterona vezano za SHBG, oko 33% za albumin, dok je svega 2-3% dostupno kao slobodan testosteron. Ovaj slobodni testosteron, zajedno sa albumin vezanom frakcijom zapravo predstavlja biološki aktivni testosteron koji tačnije reflektuje androgeni status osobe (117). Druga studija, koja je saglasna sa prethodno navedenim efektima koje unos magnezijuma ima na funkciju muških gonada, je skorija studija izvedena na Wistar pacovima koja je pokazala da magnezijum povećava aktivnost androgenih enzima i serumski nivo testosterona (118). Rezultati su bili izraženiji u grupi životinja koja je u dužem periodu bila izložena tretmanu i autori su smatrali da je to posledica direktnog efekta viška magnezijuma na muške gonade. Dalja ispitivanja u ovoj oblasti su neophodna, kako bi se ispitaio uticaj koji magnezijum ima na reproduktivni sistem. Jedna od mogućnosti kojima se može objasniti dejstvo magnezijuma na parametre aktivnosti HPG osovine, može biti u vezi sa inhibitornim efektom koje magnezijum na produkciju citokini koji putem aktivacije HPA osovine, inhibiraju oslobađanje gonadotropnog oslobađajućeg hormona, čime snižavaju sekreciju LH, s jedne strane, a s druge delujući na ciljna tkiva na nivou

testisa, dovode do smanjene sekrecije testosterona kao posledice smanjene osetljivosti na LH (115, 119).

Značajan rezultat našeg istraživanja je povećanje odnosa nivoa testosterona i kortizola (T/C) po završetku suplementacije magnezijumom kod obe grupe ispitanika (*Slika 13.*), jer se smatra da je odnos ova dva hormona značajniji nego njihove pojedinačne koncentracije. Ovakvi rezultati ukazuju da bi magnezijum mogao da modifikuje anaboličko/kataboličku ravnotežu u situacijama gde je ovaj odnos narušen. Količnik T/C se koristi za evaluaciju odgovora organizma na stres kao i za procenu fizičkih sposobnosti sportista (45). Imajući u vidu rezultat naše studije, može se zaključiti da je osnovni razlog porasta ovog količnika, sniženje nivoa kortizola koje se kod obe grupe ispitanika uočava nakon završene suplementacije magnezijumom, dok se nivo testosterona neznatno menja. S obzirom da je kod ragbista, kao fizički aktivnih osoba, nivo testosterona viši i po završenoj suplementaciji, dok je sniženje koncentracije kortizola znatno veće, T/C zadržava kod ragbista viši nivo u odnosu na studente. Kao što je već objašnjeno, potencijalni uticaj magnezijuma na nivo kortizola leži u njegovoj interakciji sa različitim nivoima HPA osovine. Visok nivo T/C odnosa govori u prilog činjenici da sportisti bolje kompenzuju efekat stresa, jer da bi se ovaj odnos narušio tačnije snizio T/C odnos, sportisti mogu da kompenzuju mnogo veće fluktuacije u nivo kortizola a da ova ravnoteža ne bude narušena. Naime, aktivacija HPA osovine pod uticajem fizičke aktivnosti, obrnuto je proporcionalna nivou utreniranosti, jer se treningom zapravo povećava kapacitet organizma da podnese veće opterećenje uz manju aktivaciju HPA osovine (36).

Cinar i saradnici (29, 120) su pokazali da nakon suplementacije magnezijumom značajno raste nivo leukocita, eritrocita, hemoglobina i trombocita. U ovim studijama doza magnezijuma koja je korišćena je bila značajno viša (10 mg/kg telesne mase što je 800-900 mg Mg/dan) od doze koju smo mi koristili u našoj studiji, u kojoj smo uočili samo blagi porast u koncentraciji crvenih krvnih zrnaca kod studentske populacije dok kod ragbista nije uočena promena u broju eritrocita (*Tabela V*). Ova razlika može delimično biti posledica doze koja je korišćena, i može se smatrati da doza od 500 mg po danu tokom mesec dana ima

blagi stimulatorni efekat na eritropoezu kod mladih muškaraca. Pošto je dobro poznat stimulatorni efekat testosterona na sintezu eritropoetina koji vodi do porasta u broju eritrocita, iako se nivo testosterona nije značajno promenio, porast u broju eritrocita može se objasniti time što je povećana bioraspoloživost testosterona. Za razliku od fizički neaktivnih muškaraca, kod ragbista je uočeno značajno sniženje ukupnog broja leukocita po završenoj suplementaciji, kao i sniženje u broju monocita koji su glavna mesta produkcije citokina. Za razliku od ragbista, kod studenata dolazi do sniženja NE/LY odnosa po završenoj suplementaciji magnezijumom, što zajedno može ukazati na zaštitni potencijal magnezijuma u očuvanju integriteta imunog sistema.

## **5.2. UTICAJ MAGNEZIJUMA NA PROMENU INTERAKCIJE IZMEĐU HPA I HPG OSOVINE KOD RAGBISTA**

Poznato je da intenzitet vežbanja određuje koji će se energetske sistem primarno koristiti tokom vežbanja ili perioda odmora. S obzirom na prirodu ragbija, u kom se periodi intenzivne aktivnosti smenjuju sa kratkim periodima nepotpunog odmora, pretpostavlja se da je aktivacija i aerobnih i anaerobnih puteva energetskog metabolizma uključena u održanje nivoa ATP-a neophodnog za obezbeđenje dovoljne količine energije (121). Niz studija se bavilo ispitivanjem uticaja koji ima pozicija igrača na različite biohemijske i endokrinološke parametre ragbista (122, 123). Pretpostavlja se postojanje razlika u metabolizmu i fizičkoj spremnosti između igrača melea i igrača linije, tako da se prilikom odabira igrača za kontrolnu i interventnu grupu, težilo tome da u obe grupe budu podjednako zastupljena oba tipa igrača. Kako nije uočena razlika između bazalnih vrednosti ispitivanih parametara za ispitivane grupe igrača, bazalne vrednosti su posmatrane kao jedinstvene (*Tabela IV*).

Većina dostupnih literaturnih podataka koja govori o igračima ragbija, vezana je za elitni (profesionalni) ragbi. Gabbett je jedan od retkih autora koje sproveo niz ispitivanja vezanih za antropometrijske i fiziološke karakteristike igrača amaterskog ragbija. Naime, u ispitivanju koje je uključilo 35 amaterskih igrača ragbija (98), ispitivane su antropometrijske karakteristike (visina, težina, BMI),

zatim mišićna snaga (praćenjem vertikalnog skoka), brzina (sprint na 10 m i 40 m) kao i maksimalna aerobna snaga (multistepeni fitnes test). Došlo se do zaključka da su fiziološke i antropometrijske karakteristike amaterskih igrača slabo razvijene, da se ne primenjuje specifičan program treninga u zavisnosti od pozicije koju igrači igraju, i da ovakvi rezultati mogu biti u vezi sa tim što je intenzitet igre značajno slabiji, kao i sa tim što ne postoji adekvatna finansijska stimulacija, kao što je to u slučaju profesionalnog ragbija.

Rezultati našeg istraživanja ukazali su da četvoronedeljna suplementacija magnezijumom kod amaterski ragbi igrača, ne utiče samo na obrazac promena u koncentraciji parametara aktivnosti HPA i HPG osovine u danima nakon utakmice, već utiče na njihovu koncentraciju i pre same utakmice.

U kontrolnoj grupi, nakon ragbi utakmice dolazi do sniženja nivoa kortizola zajedno sa ACTH. Ovi rezultati su u skladu sa ispitivanjima koja su vršena na ragbi igračima (47) i dizačima tegova (124), gde je uočeno da su neposredno nakon napornih fizičkih aktivnosti, nivoi ovih hormona bili povećani, dok su se u roku od nekoliko sati njihove vrednosti spustile ispod bazalnih nivoa. Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ovog rada, suplementacija magnezijumom menja ovaj obrazac promene koncentracije hormona. Najznačajnija razlika je odsustvo porasta nivoa kortizola neposredno pred utakmicu, dok je kod kontrolne grupe on uočljiv (*Slika 15*). Ovi rezultati ukazuju da je moguće da su ragbisti koji su uzimali magnezijum bili manje osetljivi na stres koji se javlja neposredno pred utakmicu.

Postoji niz dokaza koji potvrđuju ulogu magnezijuma u odgovoru organizma na stres kao i ulogu u nastanku anksioznog ponašanja, ali mehanizam koji je u osnovi ovih efekata, još uvek nije razjašnjen. Pokazano je da magnezijum jon ima svojstva NMDA-antagoniste i agoniste GABA receptora (21) stoga porast njegove koncentracije može doprineti sniženju osećaja anksioznosti. S druge strane, pokazano je da deficijencija magnezijuma može dovesti do anksioznog ponašanja i narušavanja ravnoteže HPA osovine, koja upotrebom anksiolitika i antidepresiva može biti ponovno uspostavljena (86).



Rezultati dobijeni nakon suplementacije magnezijumom su u skladu sa jednom od studija koja se bavila uticajem magnezijuma na hormonski i imunski odgovor utreniranih sportista (31). U toj studiji, ispitan je uticaj jednomesečne suplementacije magnezijumom u dozi od 10 mg/kg/dan, i programa vežbi na nivo ACTH i kortizola kod mladih taekvondo igrača i sedentarnih ispitanika. Pokazano je da su, kod obe grupe ispitanika, kako pri odmaranju, tako i pri velikoj iscrpljenosti, nivoi ACTH i kortizola nakon unosa magnezijuma, bili značajno veći kod svih ispitanika. Iako je dnevna doza magnezijum suplementa koju smo koristili u ovom radu, bila manja, kod ragbista je uočen značajan porast u koncentraciji ACTH posebno u postkompetitivnom periodu: Dan1 (+75%), Dan3 (+82%) i Dan6 (+46%) (Slika 14.).

Suplementacija magnezijumom je najviše uticala na koncentraciju kortizola u serumu pre utakmice, što se može dovesti u vezu sa ulogom magnezijuma u sniženju osećaja napetosti i nelagodnosti koji prethodi utakmici. Uticaj na nivo salivarnog kortizola, koji se može smatrati slobodnom frakcijom hormona, je bio najočigledniji na kraju postkompetitivnog perioda. Poznato je da se samo 3-10% ukupnog cirkulirajućeg kortizola nalazi u nevezanom slobodnom stanju, dok se većina preostalog kortizola vezuje visokim afinitetom za kortikosteroid-vezujući protein (CBG), i oko 10-15% slabim afinitetom za albumin (125). Nivo CBG može biti značajno izmenjen tokom inflamatornog odgovora organizma, kada dolazi do značajne redukcije njegovog nivoa (126). Proteolizom njegovog "reactive center loop" (RCL) mesta dolazi do ireverzibilnog gubitka sposobnosti da steroide vezuje visokim afinitetom, što olakšava otpuštanje glukokortikoida na mestu oštećenja tkiva ili inflamacije. Proinflamatorni citokini poput IL-6 dovode do smanjene produkcije CBG u jetri (127) i njihova povećana koncentracija održava nizak nivo CBG tokom inflamacije. Osim toga, povećanje ACTH u odgovoru na stres, uzrokuje porast produkcije glukokortikoida što može prevazići inače smanjeni kapacitet CBG za vezivanje hormona i dovesti do porasta slobodnog kortizola (128). Salivarni kortizol odlično korelira sa slobodnim kortizolom u krvi (129). Porast salivarnog kortizola, koji se u kontrolnoj grupi, uočava trećeg i šestog dana nakon utakmice može biti posledica upravo sniženja proizvodnje CBG, dok s druge strane,

nivo ukupnog kortizola posle utakmice ostaje na skoro konstantantnom nivou, što zajedno može biti uzrok visokog odnosa slobodnog/ukupnog kortizola koji je dat kao saliva/serum kortizol odnos (Csal/Cser). Kod ragbista koji su uzimali suplement magnezijuma ne uočava se porast Csal/Cser odnosa u postkompetitivnom periodu što može biti posledica antiniflamatornog dejstva koje magnezijum ostvaruje kroz sniženje nivoa proiniflamatornog citokina IL-6.

Poznato je da su hormoni HPG osovine pod uticajem aktivnosti HPA osovine. Pošto je, na osnovu dosadašnjih saznanja dobijenih iz studija izvedenih na eksperimentalnim životinjama, kao i na ljudima, dokazano da magnezijum učestvuje u modulaciji aktivnosti HPA osovine, pretpostavljeno je da će ostvariti izvestan uticaj i na parametre aktivnosti HPG osovine, pa je iz tog razloga i ispitivana dinamika promene LH, FSH i testosterona, kako pre tako i nakon utakmice. Međutim, u našoj studiji uočeno je da magnezijum ne utiče značajno na dinamiku promene LH i FSH u pre- i post – kompetitivnom periodu. Dok je nivo testosterona u kontekstu intenziteta i učestalosti fizičke aktivnosti, detaljno ispitivan, veoma mali broj studija bavio se praćenjem nivoa LH i FSH. Neke od njih su pokazale da je izvođenje vežbi velikog intenziteta doprinelo sniženju nivoa testosterona tokom noći, praćenog sniženom sekrecijom LH i povećanom sekrecijom kortizola (130) što ukazuje da bi centralni mehanizmi hipotalamo-hipofizne osovine mogli biti delimično odgovorni za testikularnu steroidogenezu. MacConnie i saradnici (131) su pokazali da akutno vežbanje nije dovelo do promene u koncentraciji LH merenoj tokom 8 sati, što je takođe potvrđeno u ispitivanju (132) u okviru kog je praćen uticaj anaerobne i aerobne aktivnosti na reproduktivne hormone muškaraca, gde je pokazano da se nivo FSH ne razlikuje značajno od kontrolne grupe, dok dolazi do prolaznog povećanja nivoa testosterona, prolaktina i kortizola. U drugoj studiji (133) uočen je značajan porast u koncentraciji LH tokom perioda oporavka nakon fizčke aktivnosti kod utreniranih sportista (133). Uticaj magnezijum na nivo reproduktivnih hipofiznih hormona (FSH i LH) kod sportista je slabo ispitano, jer se većina studija bazirala na ispitivanju uticaja koji magnezijum može da ima na nivo testosterona, kao i na

odnos testosterona i kortizola koji služi kao mera narušene anaboličko-kataboličke ravnoteže u organizmu.

Poslednjih decenija vlada veliko interesovanje za utvrđivanje povezanosti nivoa androgena i stepena agresivnosti pojedinca i u tom smislu izveden je veliki broj psihoendokrinoloških ispitivanja zasnovanih na statističkoj obradi podataka dobijenih za pojedine grupe osoba, posebno asocijalnog i agresivnog ponašanja, kakvi su kriminalci. Postoje dokazi da uticaj testosterona na agresivno ponašanje nije uvek statistički značajan, ali da svakako postoji pozitivna korelacija (134). Visok nivo testosterona dovodi se i u vezu sa očekivanjem pozitivnog ishoda odnosno nivoom motivisanosti za postizanje pobjedničkog rezultata u sportu ili poboljšanja statusne pozicije u svakodnevnom životu. Ovakav lični doživljaj doprinosi ili povećanju nivoa testosterona ili održanju njegovog povišenog nivoa (135). Psihološki stres je u vezi sa povećanim nivoom kortizola, koji dovodi do stimulacije sinteze SHBG u jetri, što sledstveno dovodi do sniženja nivoa slobodnog testosterona a samim tim i sniženja odnosa T/C.

U istraživanju koje su sproveli Papacosta i saradnici (136) ispitivana je veza između nivoa salivarnog kortizola, testosterona, T/C odnosa, salivarnog sekretornog IgA i stepena anksioznosti pobjednika i onih koji su izgubili meč tokom internacionalnog džudo takmičenja. Određivanje je vršeno tri puta: neposredno pre, u toku takmičenja i nakon takmičenja, pri čemu je prvi uzorak, zajedno sa rezultatima upitnika, korišćen za procenu kongnitivne i somatske anksioznosti. Uočili su da su pobjednici imali viši nivo kortizola, niži T/C odnos tokom utakmice, bez promene u nivou testosterona, kao i visok nivo kongnitivne anksioznosti neposredno pred utakmicu, što je ukazalo na bolju psihološku pripremu pobjednika, koji su tokom takmičenja mogli bolje da kontrolišu nivo stresa. Ovi rezultati su skladu sa ranijom studijom koji su sproveli Salvador i saradnici (34) gde je takođe uočen porast kortizola neposredno pred takmičenje, dok je izostao porast testosterona za koji su očekivali da će sa nivoom motivacije biti viši. Rečeno je da sniženje ovog odnosa za više od 30% može ukazati na stanje pretreniranosti, pri tome treba voditi računa o tumačenju ovih rezultata imajući u vidu da uzrok sniženja ovog odnosa može biti porast nivoa kortizola i/ili pad testosterona. Grupa

istraživača (45) poredila je rezultate upitnika o stanju pretreniranosti ragbista sa nivoom testosterona i T/C odnosa, koji su pokazali negativnu korelaciju između nivoa testosterona kao i T/C odnosa, dok za kortizol nije uočena korelacija. Rezultati naše studije pokazali su da je suplementacija magnezijumom dovela do statistički značajnog sniženja u koncentraciji testosterona na dan utakmice, dok se za salivarni testosteron, koji odgovara slobodnoj frakciji testosterona, najveće razlike uočavaju u postkompetitivnom periodu (Dan1, Dan3 i Dan6) kada dolazi do značajnog sniženja njegovog nivoa (*Slika 20.*). Kako je magnezijum takođe doveo do sniženja u nivou salivarnog kortizola za isti period vremena, uticaj na T/C odnos je izostao. Za razliku od salivarnog kortizola, kod serumskog kortizola je uočeno značajno sniženje koncentracije dan pre utakmice kao i na dan same utakmice. Kako je na dan utakmice došlo do sniženja i nivoa testosterona i nivoa kortizola kod ragbista koji su uzimali magnezijum, odnos T/C se održao na istom nivou. Upravo iz tog razloga nije uočeno postojanje korelacije između rezultata SCAT testa i T/C odnosa, ni pre ni nakon suplementacije magnezijumom. Međutim, naši rezultati su ukazali na značajan porast serumskog T/C odnosa kod ragbista koji su uzimali magnezijum, na dan pre utakmice, što je u vezi sa značajnim sniženjem nivoa kortizola koji prethodi takmičenju. Sniženje rezultata SCAT testa nakon završene suplementacije magnezijumom, pokazuje negativnu korelaciju sa nivoom testosterona i T/C odnosa na Dan-1, dok nije utvrđeno postojanje korelacije sa kortizolom.

Četvoronedeljna suplementacija magnezijumom pokazala je značajan uticaj na nivo IL-6 posebno u postkompetitivnom periodu. Naime porast nivoa IL-6 koji se uočava nakon utakmice u kontrolnoj grupi, potpuno je izostao kod ragbista koji su koristili suplement magnezijuma. Studije koje su obuhvatale različite populacije ukazale su na značajan porast nivoa IL-6 nakon vežbanja: kako kod sportista, naročito nakon 24h od utakmice (50), tako i od fizički aktivnih volontera koji nisu navikli da intenzivno vežbaju (137). Rezultati istraživanja na ragbistima koji nisu koristili magnezijum, su u skladu sa rezultatima prethodno navedenih studija. Rezultati koji su dobijeni za studentsku populaciju takođe ukazuju da je sniženje u koncentraciji serumskog kortizola praćeno i redukcijom nivoa IL-6. Postoje brojni

podaci proistekli iz niza studija, koji ukazuju na značajnu ulogu koju magnezijum ima u produkciji citokina, koji modulišu aktivnost HPA osovine i/ili imuni odgovor. Ove studije su ukazale da deficijencija magnezijuma doprinosi porastu koncentracije C-reaktivnog proteina (138), aktivaciji fagocita i posledično visokoj produkciji citokina (11). Sugimoto i sar. (93) su pokazali da  $MgSO_4$  suplementacija, kako *in vivo* tako i *in vitro*, povećava nivo  $I\kappa B\alpha$ , dovodeći do snižene aktivacije  $NF\kappa B$  i smanjene produkcije IL-6 i  $TNF-\alpha$ .

Značajan rezultat ovog rada je i promena u odnosu neutrofila i limfocita (NE/LY odnos) koji se može smatrati markerom subkliniče inflamacije (139). Najveća promena je uočena 24 sata nakon takmičenja (Dan1), nakon suplementacije magnezijumom, kada je procenat neutrofila snižen, dok je procenat limfocita povećan, u odnosu na njihove vrednosti u kontrolnoj grupi, što je dovelo do sniženja od blizu 36% u NE/LY odnosu (Tabela VII). Smatra se da je porast u ukupnom broju leukocita, pre svega neutrofila, posledica inflamatorne reakcije indukovane vežbanjem (62) i da je ovaj porast proporcionalan intenzitetu i trajanju vežbanja (61). Naporne fizičke vežbe mogu dovesti do oksidativnog stresa, koji dovodi do oštećenja DNK limfocita i sledstvenog smanjenja u njihovom broju i funkciji (69). U skladu sa nalazima prethodnih studija, da intenzivno vežbanje dovodi do redukcije u broju bazofila kao posledice njihove degranulacije (140), su i rezultati dobijeni u okviru ovog rada, za kontrolnu grupu ragbista. Nakon četiri nedelje uzimanja suplemenata magnezijuma, nije uočena značajna promena u broju bazofila ni dan pre niti nakon takmičenja. Dokazano je da magnezijum smanjuje osetljivost na oksidativni stres i da je neophodan za stabilizaciju DNK (16). Ovi rezultati zajedno sa sniženjem IL-6 i procentom monocita i bazofila, sugerišu da produžena suplementacija magnezijumom može potencijalno delovati kao anti-inflamatorni agens.

Uticaj treninga i takmičenja na vrednosti hematoloških parametara, bio je predmet ispitivanja velikog broja studija u koje su bili uključeni pripadnici različitih sportskih disciplina. Grupa autora na čelu sa Banfijem (141) sagledala je rezultate prethodnih ispitivanja i posebno istakla značaj određivanja ovih parametara tokom cele sezone takmičenja. Oni su kod ragbista i skijaša uočili sniženje broja

retikulocita, koje je pratilo sniženje u nivou hemoglobina, dok kod biciklista i fudbalera nisu uočene značajne promene. U eksperimentalnoj studiji na pacovima (142) pokazano je da deficijencija magnezijuma dovodi do stvaranja eritrocita koji, iako imaju normalan izgled, daleko su podložniji razvoju biohemijskih i morfoloških abnormalnosti sa starenjem ćelije. Efekat magnezijuma na hematološke parametre praćen je u studiji (29) u kojoj je učestvovalo 30 taekvondo takmičara, u mirovanju i nakon velikog napora, koji su tokom četiri nedelje uzimali preparat magnezijuma u količini od 10 mg Mg/kg /dan. Pokazali su da nivo eritrocita i hemoglobina, po završenoj suplementaciji raste kod obe grupe, kao i da je uočen porast u broju leukocita. Za razliku od ove studije, naše istraživanje nije pokazalo da suplementacija magnezijumom utiče na nivo hemoglobina i eritrocita kod ragbista (*Tabela VII*). Iako je nakon suplementacije magnezijumom, uočljiv statistički značajan porast u koncentraciji testosterona u serumu trećeg ( $p < 0.05$ ) i šestog dana ( $p < 0.01$ ) nakon utakmice, u odnosu na dan utakmice, izgleda da je efekat koji testosteron ima na eritropoezu izostao jer je nivo slobodnog testosterona, kojem bi odgovarao salivarni testosteron, značajno niži kod interventne grupe nego u kontrolnoj grupi (*Slika 19.*). Kontroverzni rezultati ispitivanja hematoloških parametara kod sportista, ostavljaju prostor za dalja ispitivanja, kojima bi se tačno objasnio mehanizam dejstva magnezijuma na ove strukture.

### **5.3. MAGNEZIJUM UTIČE NA STEPEN OŠTEĆENJA DNK PERIFERNIH LIMFOCITA**

U našem radu upoređivali smo oštećenje DNK koje se javlja u perifernim limfocitima krvi ragbi igrača i grupe sedentarnih mladića iste uzrasne dobi, nakon četvoronedeljne suplementacije magnezijumom. Stepem DNK oštećenja je procenjen izvođenjem Comet testa, u prisustvu i odsustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Rezultati naše studije su ukazali da je DNK lanac perifernih limfocita ragbista značajno osetljiviji na oštećenje nego što je to slučaj sa DNK perifernih limfocita sedentarnih mladića, kako u prisustvu tako i u odsustvu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Takođe, naša studija je pokazala da, iako suplementacija magnezijumom nije imala efekat na oštećenje DNK kod

netretiranih limfocita, smanjila je broj ćelija sa velikim oštećenjem DNK kod obe grupe ispitanika.

U našoj studiji, stepen oštećenja DNK koji je izražen kao broj ćelija sa migrirajućom DNK, bio je značajno povećan kod ragbi igrača nakon utakmice, u poređenju sa sedentarnim studentima, ukazujući da intenzivno vežbanje ima negativne efekte na integritet DNK (*Slika 23.*). Rezultati naše studije su u skladu sa podacima koji dokazuju da naporna fizička aktivnost može dovesti do nestabilnosti DNK, s obzirom da je dokazano da akutno i naporno vežbanje dovode do oksidativnog stresa, zbog povećanje produkcije reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta (70, 143). Ipak, rezultati studija koje se bave uticajem vežbanja (treninga i utakmica) na stabilnost DNK, su i dalje kontroverzni. Niess i saradnici (144) su dokazali prisustvo oštećenja DNK kod 10 od 12 učesnika u polumaratonu, 24 sata nakon trke. Slične promene u stepenu oštećenja DNK registrovali su i Hartmann i saradnici (145). Upotrebom Comet testa, dokazana je migracija DNK kod šest atletičara 24h nakon kratkog triatlona koji se smatra vežbom izdrživosti. U obe studije poređena je migracija DNK 24h pre i nakon trke. Hartman i saradnici (145) su uzimali uzorke krvi i sedam puta tokom narednih pet dana, pri čemu je nivo migracije DNK je ostao povećan 5 dana nakon trke. Iako je većina studija pokazala povećan nivo migracije DNK 24h nakon kompetitivnih vežbi izdržljivosti, Briviba i saradnici (146) primenom Comet testa, nisu uočili promene u strukturi lanaca DNK, kod deset učesnika, nakon polu maratona i maratona. Naravno ograničenje u interpretaciji rezultata ovih studija (144-146) predstavlja činjenica da su korišćeni različiti protokoli, obuhvaćen je mali broj učesnika koji se se međusobno razlikovali po nivou utreniranosti.

U našoj studiji pokazali smo da su ragbisti koji su uzimali magnezijum imali značajno niži broj perifernih limfocita sa oštećenjem DNK nakon tretmana  $H_2O_2$  u poređenju sa ragbistima kontrolne grupe. Suplementacija magnezijumom je očigledno imala zaštitni efekat na oksidativno oštećenje DNK kod ragbista, s obzirom da su se i nivo srednjeg i nivo teškog  $H_2O_2$  indukovano oštećenja DNK smanjili u odnosu na odgovarajuće nivoe kod ragbista koji nisu uzimali suplementaciju. Osim toga ovaj efekat je bio više izražen kod ragbista u odnosu na

studente, kod kojih je suplementacija magnezijumom bila praćena sniženjem DNK oštećenja ali efekat je bio statistički znaćajan samo u smanjenju broja limfocita sa velikim oštećenjem DNK. Moguće objašnjenje za razliku u uticaju magnezijuma na nivo oštećenja perifernih limfocita između ragbista i studenata leži u činjenici da intenzivna fizićka aktivnost povećava potrebu za magnezijumom. Postoje dokazi da i kratko vežbanje visokim intenzitetom kao i naporne dugotrajne vežbe dovode do znaćajnog gubitka magnezijuma putem znoja i urina (20). Takođe, tokom vežbanja dolazi do redistribucije magnezijuma u određene delove tela, uz povećanu produkciju energije i reaktivnih kiseonićnih vrsta (147, 148). Stoga, neki autori predlažu da bi kratkotrajne, kao i dugotrajne naporne vežbe, trebalo da budu praćene povećanjem unosa magnezijuma za 10-20% u odnosu na dnevne preporuke za osobe istog pola i uzrasta sa sedentarnim naćinom života (20).

Studije izvedene na ljudima, kao i na eksperimentalnim životinjama, ukazale su da deficijencija magnezijuma ima negativni uticaj na fizićku sposobnost (149). Ali to nije jedini negativan uticaj: istraživanja izvedena na eksperimentalnim životinjama pokazala su da u nedostatku magnezijuma dolazi do uvećanja mitohondrija, pojave dezorganizovanog sarkoplazmatskog retikuluma u skeletnim mišićima, do povećanog formiranja lipidnih radikala i azot oksida, remete se endogeni zaštitni mehanizmi kao što su oni vezani za metabolizam glutaciona (150, 151). Takođe je pokazano da energićne vežbe indukuju inflamatorni odgovor zbog oštećenja tkiva, dovodeći do povećane produkcije ROS, naroćito u aktiviranim fagocitima (71, 152-154). Takahashi i saradnici (61) nisu uoćili znaćajnu promenu u produkciji ROS u neutrofilima neposredno nakon ragbi utakmice, ali su uoćili da se 4 sata nakon utakmice ona znaćajno povećava. Neki od autora su ukazali da dugotrajno vežbanje umerenim intenzitetom, može indukovati adaptivni odgovor u ljudskom organizmu putem povećane ekspresije antioksidativnih enzima kao što su Cu/Zn superoksid dizmutaza i sniženjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u mitohondrijama mišićnog tkiva (155, 156). Efikasnost adaptivnih mehanizama u oksidativnom stresu indukovanih redovnom fizićkom aktivnošću takođe zavisi od individualnog životnog stila, ishrane i ekspresije gena koji su uključeni u reparacione mehanizme DNK (157, 158). Buduće studije koje bi se bavile ispitivanjem uticaja napornog vežbanja na



stabilnost DNK, bi trebalo duže da traju i prate integritet DNK najmanje pet dana s obzirom da neki od autora tvrde da je za velike promene u DNK reparacionim mehanizmima potrebno više od 24 sata (67, 71, 159, 160).

Prethodna istraživanja ukazala su na štetno dejstvo deficijencije magnezijuma na lipidnu peroksidaciju u kardiovaskularnom sistemu kao i da su tkivni homogenati magnezijum deficijentnih životinja daleko osetljiviji na lipidnu peroksidaciju nego oni dobijeni od životinja koje su unosile adekvatne količine magnezijuma putem hrane (161). Može se zaključiti da što je veći stepen deficijencije magnezijumom, to su periferni limfociti krvi više osetljivi na oksidativni stres uzrokovan sa  $H_2O_2$ .

Rezultati naše studije navode na zaključak da naporno vežbanje povećava osetljivost perifernih limfocita krvi na oksidativni stres i da suplementacija magnezijumom pokazuje protektivne efekte u smanjenju nivoa njihovog  $H_2O_2$  indukovano oštećenja DNK, čime se ukazuje na značaj unošenja adekvatne količine magnezijuma kako kod studenata sa sedentarnim načinom života tako i kod fizički aktivnih osoba.

#### **5.4. OGRANIČENJA STUDIJE**

Rezultati naše studije podržavaju pretpostavku da čak i relativno niske doze od 500 mg Mg na dan, nakon jednomesečne primene kod mladih muškaraca, redukuju nivo hormona stresa i imaju blag stimulatorni efekat na hipofizno-gonadni sistem. Postoje indikacije da magnezijum, kao esencijalni katjon, posebno učestvuje u regulaciji anaboličko/kataboličke ravnoteže, kao i da zbog svog antiinflamatornog potencijala, može imati ulogu u imunoregulaciji. Podaci dobijeni u ovom radu pokazuju da suplementacija magnezijumom može pozitivno uticati na pojedine psihološke parametre koji mogu biti poremećeni kod mladih muškaraca koji se svakodnevno susreću sa različitim izazovima koji utiču na kvalitet života.

Ograničenje studije je to što nije bila randomizirana placebo kontrolisana studija i što su rezultati ovde dobijeni preliminarni, tako da su potrebna dalja ispitivanja na većoj populaciji. Tokom studije, moguće je da su se pojavili faktori koji su bili nepoznati ili teški za merenje i mogli su da utiču na dobijene podatke, kao što su

iznenadni stres u privatnom životu, bolest ili fizička povreda koje nisu bile od velikog značaja da bi ih ispitanici prijavili.

Glavno ograničenje ovog rada je relativno mali broj ragbi igrača koji su bili uključeni u studiju i nedostatak striktnog praćenja dijetetskog unosa pre izvođenja ispitivanja. Uprkos tome, ovo je prva prospektivna observaciona studija koja je ispitivala povezanost između parametara aktivnosti HPA i HPG osovine kod amaterskih ragbi igrača. Da bi se identifikovali osnovni molekularni mehanizmi koji razjašnjavaju vezu između magnezijuma, imunog odgovora i interakcije između HPA i HPG osovine kod fizički aktivnih osoba, potrebna su dalja i više kontrolisana ispitivanja.

## 6. ZAKLJUČCI

- Magnezijum ima ulogu u smanjenju imunog odgovora nakon naporne fizičke aktivnosti kao što je ragbi utakmica, što se ogleda u sniženju nivoa IL-6 i odsustvu porasta NE/LY odnosa nakon suplementacije. Ovaj efekat je nezavisan od fizičke aktivnosti jer je uočen kod obe grupe ispitanika.
- Magnezijum utiče na dinamiku promene ACTH i kortizola, pre svega neposredno pred utakmicu, što se može dovesti u vezu sa ulogom magnezijuma u sniženju osećaja napetosti i nelagodnosti koji prethodi utakmici. Efekat magnezijuma na nivo kortizola je nezavisan od fizičke aktivnosti jer je uočen kod obe grupe ispitanika.
- Uticaj magnezijuma na parametre aktivnosti HPG osovine kod fizički aktivnih osoba kao i kod sedentarnih muškaraca ogleda se pre svega u promeni nivoa testosterona, dok se nivoi LH i FSH značajno ne menjaju.
- Promena T/C odnosa govori o interakciji HPA i HPG osovine kao i sposobnosti individue da se nosi sa stresom – suplementacija magnezijumom je dovela do porasta ovog odnosa neposredno pred utakmicu, pre svega zbog sniženja nivoa kortizola, čime je pozitivno uticao na sposobnost pojedinca da kompenzuje štetne efekte stresa, što je u korelaciji sa rezultatima SCAT testa po završenoj suplementaciji. Efekat magnezijuma na odnos T/C je nezavisan od fizičke aktivnosti jer je uočen kod obe grupe ispitanika.
- Magnezijum povećava nivo slobodnog biološki aktivnog testosterona kod sedentarnih osoba čime se može objasniti pozitivan efekat magnezijuma na eritropoezu praćen povećanjem broja eritrocita, dok je

kod fizički aktivnih osoba ovaj efekat izostao, najverovatnije zbog sniženja u nivou slobodnog testosterona u postkompetitivnom periodu. Dalja ispitivanja su potrebna da bi se ovakav uticaj magnezijuma do kraja razjasnio.

- Kod sedentarne populacije suplementacija magnezijumom dovodi do značajnog smanjenja broja perifernih limfocita sa velikim oštećenjem DNK što je posledica zaštitnog efekta koji magnezijum ima na oksidativno oštećenje DNK.
- Kod fizički aktivne populacije ragbista suplementacija magnezijumom pokazuje protektivne efekte dovodeći do smanjenja nivoa srednjeg i teškog oštećenja DNK perifernih limfocita indukovano vodoničnim peroksidom.

## 7. LITERATURA

1. Elin RJ. Magnesium: the fifth but forgotten electrolyte. *American journal of clinical pathology*. 1994;102(5):616-22.
2. Graham LA, Caesar JJ, Burgen AS. Gastrointestinal absorption and excretion of Mg 28 in man. *Metabolism: clinical and experimental*. 1960;9:646-59.
3. de Baaij JH, Hoenderop JG, Bindels RJ. Regulation of magnesium balance: lessons learned from human genetic disease. *Clinical kidney journal*. 2012;5(Suppl 1):i15-i24.
4. Zofkova I, Kancheva RL. The relationship between magnesium and calciotropic hormones. *Magnesium research*. 1995;8(1):77-84.
5. Watson WS, Hilditch TE, Horton PW, Davies DL, Lindsay R. Magnesium metabolism in blood and the whole body in man using 28magnesium. *Metabolism: clinical and experimental*. 1979;28(1):90-5.
6. Fawcett WJ, Haxby EJ, Male DA. Magnesium: physiology and pharmacology. *British journal of anaesthesia*. 1999;83(2):302-20.
7. Anastassopoulou J, Theophanides T. Magnesium-DNA interactions and the possible relation of magnesium to carcinogenesis. Irradiation and free radicals. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2002;42(1):79-91.
8. Laires MJ, Monteiro C. Exercise, magnesium and immune function. *Magnesium research*. 2008;21(2):92-6.
9. Lukaski HC. Magnesium, zinc, and chromium nutriture and physical activity. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;72(2 Suppl):585S-93S.
10. Mazur A, Maier JA, Rock E, Gueux E, Nowacki W, Rayssiguier Y. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2007;458(1):48-56.

11. Libako P, Nowacki W, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A. Phagocyte priming by low magnesium status: input to the enhanced inflammatory and oxidative stress responses. *Magnesium research*. 2010;23(1):1-4.
12. Noronha JL, Matuschak GM. Magnesium in critical illness: metabolism, assessment, and treatment. *Intensive care medicine*. 2002;28(6):667-79.
13. Volpe P, Vezu L. Intracellular magnesium and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: molecular mechanisms of interaction, physiology and pharmacology. *Magnesium research*. 1993;6(3):267-74.
14. Klungland A, Rosewell I, Hollenbach S, Larsen E, Daly G, Epe B, i sar. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(23):13300-5.
15. Moller P, Wallin H. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutation research*. 1998;410(3):271-90.
16. Hartwig A. Role of magnesium in genomic stability. *Mutation research*. 2001;475(1-2):113-21.
17. Firoz M, Graber M. Bioavailability of US commercial magnesium preparations. *Magnesium research*. 2001;14(4):257-62.
18. Ranade VV, Somberg JC. Bioavailability and pharmacokinetics of magnesium after administration of magnesium salts to humans. *American journal of therapeutics*. 2001;8(5):345-57.
19. Shechter M, Saad T, Shechter A, Koren-Morag N, Silver BB, Matetzky S. Comparison of magnesium status using X-ray dispersion analysis following magnesium oxide and magnesium citrate treatment of healthy subjects. *Magnesium research*. 2012;25(1):28-39.
20. Nielsen FH, Lukaski HC. Update on the relationship between magnesium and exercise. *Magnesium research*. 2006;19(3):180-9.
21. Murck H. Magnesium and affective disorders. *Nutritional neuroscience*. 2002;5(6):375-89.

22. Murck H. Ketamine, magnesium and major depression--from pharmacology to pathophysiology and back. *Journal of psychiatric research*. 2013;47(7):955-65.
23. Newhouse IJ, Finstad EW. The effects of magnesium supplementation on exercise performance. *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*. 2000;10(3):195-200.
24. Santos DA, Matias CN, Monteiro CP, Silva AM, Rocha PM, Minderico CS, i sar. Magnesium intake is associated with strength performance in elite basketball, handball and volleyball players. *Magnesium research*. 2011;24(4):215-9.
25. Kass LS, Skinner P, Poeira F. A pilot study on the effects of magnesium supplementation with high and low habitual dietary magnesium intake on resting and recovery from aerobic and resistance exercise and systolic blood pressure. *Journal of sports science & medicine*. 2013;12(1):144-50.
26. Veronese N, Berton L, Carraro S, Bolzetta F, De Rui M, Perissinotto E, i sar. Effect of oral magnesium supplementation on physical performance in healthy elderly women involved in a weekly exercise program: a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. 2014;100(3):974-81.
27. Setaro L, Santos-Silva PR, Nakano EY, Sales CH, Nunes N, Greve JM, i sar. Magnesium status and the physical performance of volleyball players: effects of magnesium supplementation. *Journal of sports sciences*. 2014;32(5):438-45.
28. Mooren FC, Golf SW, Volker K. Effect of magnesium on granulocyte function and on the exercise induced inflammatory response. *Magnesium research*. 2003;16(1):49-58.
29. Cinar V, Nizamlioglu M, Mogulkoc R, Baltaci AK. Effects of magnesium supplementation on blood parameters of athletes at rest and after exercise. *Biological trace element research*. 2007;115(3):205-12.
30. Gravina L, Ruiz F, Diaz E, Lekue JA, Badiola A, Irazusta J, i sar. Influence of nutrient intake on antioxidant capacity, muscle damage and white blood

- cell count in female soccer players. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2012;9(1):32.
31. Cinar V, Mogulkoc R, Baltaci AK, Polat Y. Adrenocorticotrophic hormone and cortisol levels in athletes and sedentary subjects at rest and exhaustion: effects of magnesium supplementation. *Biological trace element research*. 2008;121(3):215-20.
  32. Cinar V, Polat Y, Baltaci AK, Mogulkoc R. Effects of magnesium supplementation on testosterone levels of athletes and sedentary subjects at rest and after exhaustion. *Biological trace element research*. 2011;140(1):18-23.
  33. Yusoff MS, Abdul Rahim AF, Baba AA, Ismail SB, Mat Pa MN, Esa AR. Prevalence and associated factors of stress, anxiety and depression among prospective medical students. *Asian journal of psychiatry*. 2013;6(2):128-33.
  34. Salvador A, Suay F, Gonzalez-Bono E, Serrano MA. Anticipatory cortisol, testosterone and psychological responses to judo competition in young men. *Psychoneuroendocrinology*. 2003;28(3):364-75.
  35. Passelergue P, Robert A, Lac G. Salivary cortisol and testosterone variations during an official and a simulated weight-lifting competition. *International journal of sports medicine*. 1995;16(5):298-303.
  36. Mastorakos G, Pavlatou M, Diamanti-Kandarakis E, Chrousos GP. Exercise and the stress system. *Hormones*. 2005;4(2):73-89.
  37. Kageyama K. Regulation of gonadotropins by corticotropin-releasing factor and urocortin. *Frontiers in endocrinology*. 2013;4:12.
  38. Ranabir S, Reetu K. Stress and hormones. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2011;15(1):18-22.
  39. Hackney AC. Stress and the neuroendocrine system: the role of exercise as a stressor and modifier of stress. *Expert review of endocrinology & metabolism*. 2006;1(6):783-92.
  40. Hiller-Sturmhofel S, Bartke A. The endocrine system: an overview. *Alcohol health and research world*. 1998;22(3):153-64.



41. Cameron JL. Stress and behaviorally induced reproductive dysfunction in primates. *Seminars in reproductive endocrinology*. 1997;15(1):37-45.
42. Lachelin GC, Yen SS. Hypothalamic chronic anovulation. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1978;130(7):825-31.
43. Helmreich DL, Parfitt DB, Lu XY, Akil H, Watson SJ. Relation between the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during repeated stress. *Neuroendocrinology*. 2005;81(3):183-92.
44. Choi JC, Chung MI, Lee YD. Modulation of pain sensation by stress-related testosterone and cortisol. *Anaesthesia*. 2012;67(10):1146-51.
45. Maso F, Lac G, Filaire E, Michaux O, Robert A. Salivary testosterone and cortisol in rugby players: correlation with psychological overtraining items. *British journal of sports medicine*. 2004;38(3):260-3.
46. Lac G, Berthon P. Changes in cortisol and testosterone levels and T/C ratio during an endurance competition and recovery. *The Journal of sports medicine and physical fitness*. 2000;40(2):139-44.
47. Elloumi M, Maso F, Michaux O, Robert A, Lac G. Behaviour of saliva cortisol [C], testosterone [T] and the T/C ratio during a rugby match and during the post-competition recovery days. *European journal of applied physiology*. 2003;90(1-2):23-8.
48. Kraemer WJ, Spiering BA, Volek JS, Martin GJ, Howard RL, Ratamess NA, et al. Recovery from a national collegiate athletic association division I football game: muscle damage and hormonal status. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*. 2009;23(1):2-10.
49. McLellan CP, Lovell DI, Gass GC. Creatine kinase and endocrine responses of elite players pre, during, and post rugby league match play. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*. 2010;24(11):2908-19.
50. Cunniffe B, Hore AJ, Whitcombe DM, Jones KP, Baker JS, Davies B. Time course of changes in immunoendocrine markers following an international rugby game. *European journal of applied physiology*. 2010;108(1):113-22.

51. Khaksari M, Mahmoodi M, Rezvani ME, Sajjadi MA, Karam GA, Hajizadeh S. Differences between male and female students in cardiovascular and endocrine responses to examination stress. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC.* 2005;17(2):15-9.
52. Kalantaridou SN, Zoumakis E, Makrigiannakis A, Lavasidis LG, Vrekoussis T, Chrousos GP. Corticotropin-releasing hormone, stress and human reproduction: an update. *Journal of reproductive immunology.* 2010;85(1):33-9.
53. Fitzgerald LZ, Robbins WA, Kesner JS, Xun L. Reproductive hormones and interleukin-6 in serious leisure male athletes. *European journal of applied physiology.* 2012;112(11):3765-73.
54. Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund Pedersen B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *The Journal of physiology.* 2000;529 Pt 1:237-42.
55. Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1993;77(6):1690-4.
56. Silverman MN, Pearce BD, Biron CA, Miller AH. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. *Viral immunology.* 2005;18(1):41-78.
57. Gleeson M. Immune function in sport and exercise. *Journal of applied physiology.* 2007;103(2):693-9.
58. Dunn AJ. Interleukin-6 access to the axis. *Endocrinology.* 2004;145(8):3578-9.
59. Zarkovic M, Ignjatovic S, Dajak M, Ciric J, Beleslin B, Savic S, i sar. Cortisol response to ACTH stimulation correlates with blood interleukin 6 concentration in healthy humans. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies.* 2008;159(5):649-52.
60. Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL, Donohue KM, Chritton DB, Haddock BL, Stout RW, i sar. The effects of acute moderate exercise on leukocyte and

- lymphocyte subpopulations. *Medicine and science in sports and exercise*. 1991;23(5):578-85.
61. Takahashi I, Umeda T, Mashiko T, Chinda D, Oyama T, Sugawara K, i sar. Effects of rugby sevens matches on human neutrophil-related non-specific immunity. *British journal of sports medicine*. 2007;41(1):13-8.
62. Tsubakihara T, Umeda T, Takahashi I, Matsuzaka M, Iwane K, Tanaka M, i sar. Effects of soccer matches on neutrophil and lymphocyte functions in female university soccer players. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*. 2013;28(2):129-35.
63. Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiological reviews*. 2000;80(3):1055-81.
64. Lippi G, Banfi G, Montagnana M, Salvagno GL, Schena F, Guidi GC. Acute variation of leucocytes counts following a half-marathon run. *International journal of laboratory hematology*. 2010;32(1 Pt 2):117-21.
65. Nieman DC, Simandle S, Henson DA, Warren BJ, Suttles J, Davis JM, i sar. Lymphocyte proliferative response to 2.5 hours of running. *International journal of sports medicine*. 1995;16(6):404-9.
66. Guthrie GJ, Charles KA, Roxburgh CS, Horgan PG, McMillan DC, Clarke SJ. The systemic inflammation-based neutrophil-lymphocyte ratio: experience in patients with cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2013;88(1):218-30.
67. Mastaloudis A, Yu TW, O'Donnell RP, Frei B, Dashwood RH, Traber MG. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free radical biology & medicine*. 2004;36(8):966-75.
68. Neubauer O, Reichhold S, Nersesyan A, Konig D, Wagner KH. Exercise-induced DNA damage: is there a relationship with inflammatory responses? *Exercise immunology review*. 2008;14:51-72.
69. Wagner KH, Reichhold S, Neubauer O. Impact of endurance and ultraendurance exercise on DNA damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1229:115-23.

70. Packer L, Cadenas E, Davies KJ. Free radicals and exercise: an introduction. *Free radical biology & medicine*. 2008;44(2):123-5.
71. Tsai K, Hsu TG, Hsu KM, Cheng H, Liu TY, Hsu CF, i sar. Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free radical biology & medicine*. 2001;31(11):1465-72.
72. Skoner JM, Sigmon J, Larcom LL. Suppressed DNA repair capacity of peripheral lymphocytes in pregnant women. *Molecular and cellular endocrinology*. 1995;108(1-2):179-83.
73. Furness DL, Dekker GA, Roberts CT. DNA damage and health in pregnancy. *Journal of reproductive immunology*. 2011;89(2):153-62.
74. Jenkins FJ, Van Houten B, Bovbjerg DH. Effects on DNA Damage and/or Repair Processes as Biological Mechanisms Linking Psychological Stress to Cancer Risk. *Journal of applied biobehavioral research*. 2014;19(1):3-23.
75. Gidron Y, Russ K, Tissarchondou H, Warner J. The relation between psychological factors and DNA-damage: a critical review. *Biological psychology*. 2006;72(3):291-304.
76. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001;411(6835):366-74.
77. Moller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-biological interactions*. 1996;102(1):17-36.
78. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*. 1990;186:1-85.
79. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2004;339(1-2):1-9.
80. Reichhold S, Neubauer O, Bulmer AC, Knasmuller S, Wagner KH. Endurance exercise and DNA stability: is there a link to duration and intensity? *Mutation research*. 2009;682(1):28-38.

81. Banfi G, Del Fabbro M, Mauri C, Corsi MM, Melegati G. Haematological parameters in elite rugby players during a competitive season. *Clinical and laboratory haematology*. 2006;28(3):183-8.
82. Banfi G, Lundby C, Robach P, Lippi G. Seasonal variations of haematological parameters in athletes. *European journal of applied physiology*. 2011;111(1):9-16.
83. Bachman E, Travison TG, Basaria S, Davda MN, Guo W, Li M, i sar. Testosterone induces erythrocytosis via increased erythropoietin and suppressed hepcidin: evidence for a new erythropoietin/hemoglobin set point. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 2014;69(6):725-35.
84. Murck H, Steiger A. Mg<sup>2+</sup> reduces ACTH secretion and enhances spindle power without changing delta power during sleep in men -- possible therapeutic implications. *Psychopharmacology*. 1998;137(3):247-52.
85. Laarakker MC, van Lith HA, Ohl F. Behavioral characterization of A/J and C57BL/6J mice using a multidimensional test: association between blood plasma and brain magnesium-ion concentration with anxiety. *Physiology & behavior*. 2011;102(2):205-19.
86. Sartori SB, Whittle N, Hetzenauer A, Singewald N. Magnesium deficiency induces anxiety and HPA axis dysregulation: modulation by therapeutic drug treatment. *Neuropharmacology*. 2012;62(1):304-12.
87. Poleszak E, Szewczyk B, Kedzierska E, Wlaz P, Pilc A, Nowak G. Antidepressant- and anxiolytic-like activity of magnesium in mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2004;78(1):7-12.
88. Rayssiguier Y, Libako P, Nowacki W, Rock E. Magnesium deficiency and metabolic syndrome: stress and inflammation may reflect calcium activation. *Magnesium research*. 2010;23(2):73-80.
89. Tsigos C, Papanicolaou DA, Defensor R, Mitsiadis CS, Kyrou I, Chrousos GP. Dose effects of recombinant human interleukin-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure. *Neuroendocrinology*. 1997;66(1):54-62.
90. Wirtz PH, von Kanel R, Emini L, Suter T, Fontana A, Ehlert U. Variations in anticipatory cognitive stress appraisal and differential proinflammatory

- cytokine expression in response to acute stress. *Brain, behavior, and immunity*. 2007;21(6):851-9.
91. Song Y, Ridker PM, Manson JE, Cook NR, Buring JE, Liu S. Magnesium intake, C-reactive protein, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women. *Diabetes care*. 2005;28(6):1438-44.
  92. Moslehi N, Vafa M, Rahimi-Foroushani A, Golestan B. Effects of oral magnesium supplementation on inflammatory markers in middle-aged overweight women. *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*. 2012;17(7):607-14.
  93. Sugimoto J, Romani AM, Valentin-Torres AM, Luciano AA, Ramirez Kitchen CM, Funderburg N, i sar. Magnesium decreases inflammatory cytokine production: a novel innate immunomodulatory mechanism. *Journal of immunology*. 2012;188(12):6338-46.
  94. Crewther BT, Sanctuary CE, Kilduff LP, Carruthers JS, Gaviglio CM, Cook CJ. The workout responses of salivary-free testosterone and cortisol concentrations and their association with the subsequent competition outcomes in professional rugby league. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*. 2013;27(2):471-6.
  95. West DJ, Finn CV, Cunningham DJ, Shearer DA, Jones MR, Harrington BJ, i sar. Neuromuscular function, hormonal, and mood responses to a professional rugby union match. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*. 2014;28(1):194-200.
  96. Mashiko T, Umeda T, Nakaji S, Sugawara K. Position related analysis of the appearance of and relationship between post-match physical and mental fatigue in university rugby football players. *British journal of sports medicine*. 2004;38(5):617-21.
  97. Lindsay A, Healy J, Mills W, Lewis J, Gill N, Draper N, i sar. Impact-induced muscle damage and urinary pterins in professional rugby: 7,8-dihydroneopterin oxidation by myoglobin. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 2016;26(3):329-37.

98. Gabbett TJ. Physiological and anthropometric characteristics of amateur rugby league players. *British journal of sports medicine*. 2000;34(4):303-7.
99. Gonzalez-Sanchez V, Moreno-Perez O, Garcia de Guadiana L, Sanchez-Pellicer P, Alfayate R, Mauri M, i sar. Reference ranges for serum and salivary testosterone in young men of Mediterranean region. *Endocrinologia y nutricion : organo de la Sociedad Espanola de Endocrinologia y Nutricion*. 2015;62(1):4-10.
100. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 1988;175(1):184-91.
101. Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation research*. 1994;307(1):261-71.
102. Held K, Antonijevic IA, Kunzel H, Uhr M, Wetter TC, Golly IC, i sar. Oral Mg(2+) supplementation reverses age-related neuroendocrine and sleep EEG changes in humans. *Pharmacopsychiatry*. 2002;35(4):135-43.
103. O'Driscoll K, O'Gorman DM, Taylor S, Boyle LA. The influence of a magnesium-rich marine extract on behaviour, salivary cortisol levels and skin lesions in growing pigs. *Animal : an international journal of animal bioscience*. 2013;7(6):1017-27.
104. Druker J, Liberman AC, Acuna M, Giacomini D, Refojo D, Silberstein S, i sar. Molecular understanding of cytokine-steroid hormone dialogue: implications for human diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1088:297-306.
105. Rochelson B, Dowling O, Schwartz N, Metz CN. Magnesium sulfate suppresses inflammatory responses by human umbilical vein endothelial cells (HuVECs) through the NFkappaB pathway. *Journal of reproductive immunology*. 2007;73(2):101-7.
106. Dowling O, Chatterjee PK, Gupta M, Tam Tam HB, Xue X, Lewis D, i sar. Magnesium sulfate reduces bacterial LPS-induced inflammation at the maternal-fetal interface. *Placenta*. 2012;33(5):392-8.

107. Romani AM. Magnesium homeostasis in Mammalian cells. *Metal ions in life sciences*. 2013;12:69-118.
108. Gibson PH, Croal BL, Cuthbertson BH, Small GR, Ifezulike AI, Gibson G, i sar. Preoperative neutrophil-lymphocyte ratio and outcome from coronary artery bypass grafting. *American heart journal*. 2007;154(5):995-1002.
109. Varol E, Aksoy F, Ozaydin M, Erdogan D, Dogan A. Association between neutrophil-lymphocyte ratio and mitral annular calcification. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis*. 2014;25(6):557-60.
110. Zofkova I, Lamberg-Allardt C, Kancheva RL, Starka L. Effect of hypermagnesemia on the adenohipophyseal-gonadal function, parathyroid hormone secretion and some other hormonal indicators. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 1993;25(1):29-33.
111. Galbo H, Hummer L, Peterson IB, Christensen NJ, Bie N. Thyroid and testicular hormone responses to graded and prolonged exercise in man. *European journal of applied physiology and occupational physiology*. 1977;36(2):101-6.
112. Arregger AL, Contreras LN, Tumilasci OR, Aquilano DR, Cardoso EM. Salivary testosterone: a reliable approach to the diagnosis of male hypogonadism. *Clinical endocrinology*. 2007;67(5):656-62.
113. Wheeler GD, Singh M, Pierce WD, Epling WF, Cumming DC. Endurance training decreases serum testosterone levels in men without change in luteinizing hormone pulsatile release. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1991;72(2):422-5.
114. Cumming DC, Wheeler GD, McColl EM. The effects of exercise on reproductive function in men. *Sports medicine*. 1989;7(1):1-17.
115. Maggio M, Ceda GP, Lauretani F, Cattabiani C, Avantaggiato E, Morganti S, i sar. Magnesium and anabolic hormones in older men. *International journal of andrology*. 2011;34(6 Pt 2):e594-600.
116. Excoffon L, Guillaume YC, Woronoff-Lemsi MC, Andre C. Magnesium effect on testosterone-SHBG association studied by a novel molecular



- chromatography approach. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2009;49(2):175-80.
117. Emadi-Konjin P, Bain J, Bromberg IL. Evaluation of an algorithm for calculation of serum "bioavailable" testosterone (BAT). *Clinical biochemistry*. 2003;36(8):591-6.
118. Chandra AK, Sengupta P, Goswami H, Sarkar M. Effects of dietary magnesium on testicular histology, steroidogenesis, spermatogenesis and oxidative stress markers in adult rats. *Indian journal of experimental biology*. 2013;51(1):37-47.
119. Kyrou I, Tsigos C. Chronic stress, visceral obesity and gonadal dysfunction. *Hormones*. 2008;7(4):287-93.
120. Cinar V, Mogulkoc R, Baltaci AK, Nizamlioglu M. Effect of magnesium supplementation on some plasma elements in athletes at rest and exhaustion. *Biological trace element research*. 2007;119(2):97-102.
121. Deutsch MU, Maw GJ, Jenkins D, Reaburn P. Heart rate, blood lactate and kinematic data of elite colts (under-19) rugby union players during competition. *Journal of sports sciences*. 1998;16(6):561-70.
122. Deutsch MU, Kearney GA, Rehrer NJ. Time - motion analysis of professional rugby union players during match-play. *Journal of sports sciences*. 2007;25(4):461-72.
123. Coutts A, Reaburn P, Abt G. Heart rate, blood lactate concentration and estimated energy expenditure in a semi-professional rugby league team during a match: a case study. *Journal of sports sciences*. 2003;21(2):97-103.
124. Passelergue P, Lac G. Saliva cortisol, testosterone and T/C ratio variations during a wrestling competition and during the post-competitive recovery period. *International journal of sports medicine*. 1999;20(2):109-13.
125. Levine A, Zagoory-Sharon O, Feldman R, Lewis JG, Weller A. Measuring cortisol in human psychobiological studies. *Physiology & behavior*. 2007;90(1):43-53.
126. Savu L, Zouaghi H, Carli A, Nunez EA. Serum depletion of corticosteroid binding activities, an early marker of human septic shock. *Biochemical and biophysical research communications*. 1981;102(1):411-9.

127. Bartalena L, Hammond GL, Farsetti A, Flink IL, Robbins J. Interleukin-6 inhibits corticosteroid-binding globulin synthesis by human hepatoblastoma-derived (Hep G2) cells. *Endocrinology*. 1993;133(1):291-6.
128. Hammond GL. Plasma steroid-binding proteins: primary gatekeepers of steroid hormone action. *The Journal of endocrinology*. 2016.
129. Lewis JG. Steroid analysis in saliva: an overview. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*. 2006;27(3):139-46.
130. Nindl BC, Kraemer WJ, Deaver DR, Peters JL, Marx JO, Heckman JT, i sar. LH secretion and testosterone concentrations are blunted after resistance exercise in men. *Journal of applied physiology*. 2001;91(3):1251-8.
131. MacConnie SE, Barkan A, Lampman RM, Schork MA, Beitins IZ. Decreased hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion in male marathon runners. *The New England journal of medicine*. 1986;315(7):411-7.
132. Hackney AC, Premo MC, McMurray RG. Influence of aerobic versus anaerobic exercise on the relationship between reproductive hormones in men. *Journal of sports sciences*. 1995;13(4):305-11.
133. Tremblay MS, Copeland JL, Van Helder W. Effect of training status and exercise mode on endogenous steroid hormones in men. *Journal of applied physiology*. 2004;96(2):531-9.
134. Christiansen K. Behavioural effects of androgen in men and women. *The Journal of endocrinology*. 2001;170(1):39-48.
135. Mazur A, Lamb TA. Testosterone, status, and mood in human males. *Hormones and behavior*. 1980;14(3):236-46.
136. Papacosta E, Nassis GP, Gleeson M. Salivary hormones and anxiety in winners and losers of an international judo competition. *Journal of sports sciences*. 2016;34(13):1281-7.
137. Philippou A, Bogdanis G, Maridaki M, Halapas A, Sourla A, Koutsilieris M. Systemic cytokine response following exercise-induced muscle damage in humans. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2009;47(6):777-82.
138. King DE. Inflammation and elevation of C-reactive protein: does magnesium play a key role? *Magnesium research*. 2009;22(2):57-9.

139. Uslu AU, Deveci K, Korkmaz S, Aydin B, Senel S, Sancakdar E, i sar. Is neutrophil/lymphocyte ratio associated with subclinical inflammation and amyloidosis in patients with familial Mediterranean fever? *BioMed research international*. 2013;2013:185317.
140. Mucci P, Durand F, Lebel B, Bousquet J, Prefaut C. Basophils and exercise-induced hypoxemia in extreme athletes. *Journal of applied physiology*. 2001;90(3):989-96.
141. Banfi G, Del Fabbro M. Behaviour of reticulocyte counts and immature reticulocyte fraction during a competitive season in elite athletes of four different sports. *International journal of laboratory hematology*. 2007;29(2):127-31.
142. Elin RJ, Utter A, Tan HK, Corash L. Effect of magnesium deficiency on erythrocyte aging in rats. *The American journal of pathology*. 1980;100(3):765-78.
143. Wagner KH, Reichhold S, Holzl C, Knasmuller S, Nics L, Meisel M, i sar. Well-trained, healthy triathletes experience no adverse health risks regarding oxidative stress and DNA damage by participating in an ultra-endurance event. *Toxicology*. 2010;278(2):211-6.
144. Niess AM, Baumann M, Roecker K, Horstmann T, Mayer F, Dickhuth HH. Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leucocytes. *The Journal of sports medicine and physical fitness*. 1998;38(2):111-5.
145. Hartmann A, Pfuhler S, Dennog C, Germadnik D, Pilger A, Speit G. Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or induction of micronuclei. *Free radical biology & medicine*. 1998;24(2):245-51.
146. Briviba K, Watzl B, Nickel K, Kulling S, Bos K, Haertel S, i sar. A half-marathon and a marathon run induce oxidative DNA damage, reduce antioxidant capacity to protect DNA against damage and modify immune function in hobby runners. *Redox report : communications in free radical research*. 2005;10(6):325-31.

147. Madsen K, Pedersen PK, Djurhuus MS, Klitgaard NA. Effects of detraining on endurance capacity and metabolic changes during prolonged exhaustive exercise. *Journal of applied physiology*. 1993;75(4):1444-51.
148. Cordova A, Escanero JF, Gimenez M. Magnesium distribution in rats after maximal exercise in air and under hypoxic conditions. *Magnesium research*. 1992;5(1):23-7.
149. Lukaski HC, Nielsen FH. Dietary magnesium depletion affects metabolic responses during submaximal exercise in postmenopausal women. *The Journal of nutrition*. 2002;132(5):930-5.
150. Rock E, Astier C, Lab C, Vignon X, Gueux E, Motta C, i sar. Dietary magnesium deficiency in rats enhances free radical production in skeletal muscle. *The Journal of nutrition*. 1995;125(5):1205-10.
151. Weglicki WB, Bloom S, Cassidy MM, Freedman AM, Atrakchi AH, Dickens BF. Antioxidants and the cardiomyopathy of Mg-deficiency. *The American journal of cardiovascular pathology*. 1992;4(3):210-5.
152. Sjodin B, Hellsten Westing Y, Apple FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports medicine*. 1990;10(4):236-54.
153. Zerba E, Komorowski TE, Faulkner JA. Free radical injury to skeletal muscles of young, adult, and old mice. *The American journal of physiology*. 1990;258(3 Pt 1):C429-35.
154. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, i sar. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *The Journal of experimental medicine*. 1995;182(2):367-77.
155. Delaney CA, Green IC, Lowe JE, Cunningham JM, Butler AR, Renton L, i sar. Use of the comet assay to investigate possible interactions of nitric oxide and reactive oxygen species in the induction of DNA damage and inhibition of function in an insulin-secreting cell line. *Mutation research*. 1997;375(2):137-46.
156. Wink DA, Laval J. The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*. 1994;15(10):2125-9.

157. Tomasello B, Grasso S, Malfa G, Stella S, Favetta M, Renis M. Double-face activity of resveratrol in voluntary runners: assessment of DNA damage by comet assay. *Journal of medicinal food*. 2012;15(5):441-7.
158. Goto S, Naito H, Kaneko T, Chung HY, Radak Z. Hormetic effects of regular exercise in aging: correlation with oxidative stress. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2007;32(5):948-53.
159. Reichhold S, Neubauer O, Hoelzl C, Stadlmayr B, Valentini J, Ferik F, i sar. DNA damage in response to an Ironman triathlon. *Free radical research*. 2009;43(8):753-60.
160. Reichhold S, Neubauer O, Ehrlich V, Knasmuller S, Wagner KH. No acute and persistent DNA damage after an Ironman triathlon. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2008;17(8):1913-9.
161. Busserolles J, Gueux E, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y. High fructose feeding of magnesium deficient rats is associated with increased plasma triglyceride concentration and increased oxidative stress. *Magnesium research*. 2003;16(1):7-12.
162. Cotruvo J, Bartram J, eds. *Calcium and Magnesium in Drinking-water : Public health significance*, Geneva, World Health Organization, 2009. 21pp
163. Institute of Medicine (U.S.). Panel on Dietary Reference Intakes for Electrolytes and Water. *Dietary reference intakes for water, potassium, sodium, chloride, and sulfate / Panel on Dietary Reference Intakes for Electrolytes and Water, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board*.
164. EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2015. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for magnesium. *EFSA Journal* 2015;13(7):4186, 63 pp.
165. Pavlović D. Esej o prvom eseju u Srbiji. Udruženje ragbi trenera Srbije, 2014.

166. Martens R, Vealey RS, Burton D. Competitive anxiety in sport. Human kinetics books, 1990.
167. Brilla LR, Conte V. Effects of a novel zinc-magnesium formulation on hormones and strength. Journal of Exercise Physiology Online. 2000;3:26-36.

## 8. BIOGRAFIJA

Gordana Dmitrašinović rođena je 20. aprila 1979. godine u Beogradu. Osnovnu školu završila u Zemunu kao nosilac diplome "Vuk Karadžić", a 1998. godine maturirala u Zemunskoj gimnaziji, prirodno-matematički smer. Upisala diplomske osnovne studije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, profil diplomirani farmaceut – medicinski biohemičar, školske 1998/99. godine, a diplomirala 24.06.2004. godine sa prosečnom ocenom 9,16. Po obavljenom jednogodišnjem pripravničkom stažu u biohemijskoj laboratoriji Kliničko-bolničkog centra „Bežanijska kosa” u Beogradu, položila je stručni ispit 2005.godine. Na doktorske studije iz medicinske biohemije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu prebačena je sa magistarskih poslediplomskih studija školske 2006/2007. godine. U periodu od januara 2012. godine do decembra 2013. godine bila odgovorna za praćenje kliničkog ispitivanja obavljenog u Urološkoj klinici Kliničkog centra Srbije, pod nazivom „Evaluacija testa za određivanje 2proPSA markera za ranu detekciju karcinoma prostate“.

Od maja 2005. godine do avgusta 2009. godine zaposlena u preduzeću Olympus d.o.o. kao stručni saradnik u sektoru Olympus Dijagnostike. Od avgusta 2009. zaposlena u firmi Makler d.o.o., gde i danas radi kao stručni saradnik za oblast biohemije i imunohemije u Sektoru za aplikacije i registracije. Član Društva medicinskih biohemičara Srbije (DMBS).

## **9. PRILOZI**



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_Гордана М. Дмитрашиновић\_

број индекса 73/06

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

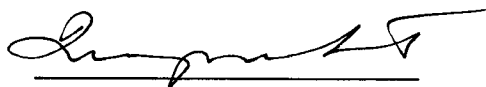
Утицај магнезијума на параметре активности хипоталамо-хипофизно-надбубрежне и

хипоталамо-хипофизно-гонадне осовине код рагбиста

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

Потпис докторанда

У Београду, \_\_31.мај 2016.\_\_\_\_



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Гордана М. Дмитрашиновић

Број индекса 73/06

Студијски програм Медицинска биохемија

Наслов рада Утицај магнезијума на параметре активности хипоталамо-хипофизно-надбубрежне и хипоталамо-хипофизно-гонадне осовине код рагбиста

Ментори

Проф. др Светлана Игњатовић, редовни професор Фармацеутског факултета  
Универзитета у Београду

Проф. др Весна Пешић, ванредни професор Фармацеутског факултета  
Универзитета у Београду

Потписана Гордана М. Дмитрашиновић

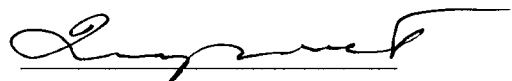
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, 31. мај 2016.



**Прилог 3.**

## **Изјава о коришћењу**

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

Утицај магнезијума на параметре активности хипоталамо-хипофизно-надбубрежне и хипоталамо-хипофизно-гонадне осовине код рагбиста

која је моје ауторско дело.

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

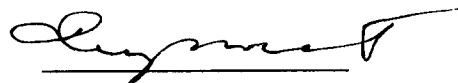
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, 31.мај 2016.



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 употребу дела.
3. **Ауторство - некомерцијално – без прераде.** 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 коришћења дела.
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 прераде.** 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 употребу дела.
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 отвореног кода.