



UNIVERZITET U NOVOM SADU
FAKULTET SPORTA I FIZIČKOG VASPITANJA

ALTERACIJE BIOMARKERA OKSIDATIVNOG STRESA KOD VRHUNSKIH DŽUDISTA NAKON SUPPLEMENTACIJE MOLEKULARNIM VODONIKOM

Doktorska disertacija

Mentori:

Prof.dr Sergej Ostojić

Prof.dr Patrik Drid

Kandidat:

Tatjana Trivić

Novi Sad, 2017. godina

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	OPŠTI DEO	3
2.1.	Molekularni vodonik i njegova primena	3
	2.1.1. Primena molekularnog vodonika u medicini	3
	2.1.2. Primena vodonika kod fizički aktivne populacije	4
	2.1.3. Uticaj vodonika na reaktivne kiseonične vrste	6
	2.1.4. Načini unošenja molekularnog vodonika u organizam	7
2.2.	Slobodni radikali	9
	2.2.1. Reaktivne kiseonične vrste (ROS)	11
	2.2.2. Produkcija ROS-a u mitohondrijama	15
	2.2.3. Lipidna peroksidacija	16
2.3.	Oksidativni stres	18
	2.3.1. Oksidativni stres u sportu	19
	2.3.2. Antioksidativna zaštita	21
	2.3.3. Enzimske komponente antioksidativnog zaštitnog sistema	22
	2.3.4. Mitohondrijalni antioksidanti sistemi	25
3.	PROBLEM, PREDMET I CILJ RADA	28
4.	HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA	29
5.	MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA	30
5.1.	Uzorak ispitanika	30
5.2.	Eksperimentalni dizajn	30
5.3.	Specifični fitness džudo test (SJFT)	32
5.4.	Protokol	33
5.5.	Metode analize	35
	5.5.1. Određivanje parametara oksidativnog stresa	35
	5.5.1.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)	35
	5.5.1.2. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px)	36
	5.5.1.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)	36
	5.5.1.4. Određivanje lipidne peroksidacije	37
	5.5.1.5. Određivanje redukovanog glutationa (GSH)	37
	5.5.2. Određivanje pH vrednosti	37
5.6.	Metode obrade podataka	38
6.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	39
6.1.	Alteracije biomarkera oksidativnog stresa kod vrhunskih džudista nakon suplementacije molekularnim vodonikom	39
	6.1.1. Efekti eksperimentalnih tretmana na antioksidante	41
	6.1.1.1. Superoksid dismutaza (SOD)	41
	6.1.1.2. Glutation peroksidaza (GSHPx)	42
	6.1.1.3. Katalaza (CAT)	44
	6.1.1.4. Malondialdehid (MDA)	45
	6.1.1.5. Glutation (GSH)	46
	6.1.2. Efekti eksperimentalnih tretmana na biohemijske parametre krvi	47
	6.1.2.1. Kreatin kinaza (CK)	47

		6.1.2.2.	Gamaglutamil transferaza (GGT)	48
		6.1.2.3.	Bikarbonati (BKB)	49
		6.1.3.	Efekti eksperimentalnih tretmana na krvnu sliku	51
	6.2.		Akutni efekti suplementacije molekularnim vodonikom na acido baznu ravnotežu vrhunskih džudiskinja	52
7.			DISKUSIJA	56
8.			ZAKLJUČAK	65
9.			LITERATURA	68

SPISAK SKRAĆENICA

AA - antioksidativna aktivnost	MDA-malondialdehid
ADP- adenzin 5'-difosfat	MnSOD - mangan superoksid dismutaza
AHH-1-humani B limfociti	NADPH - nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat, redukovani oblik
ALT - alanin transaminaza	NO ₂ - azot oksid
AOS - antioksidativni sistem	NO [•] - azot oksid radikal
AS-aritmetička sredina	¹ O ₂ singlet kiseonik
AST - aspartat transaminaza	O ₂ ^{•-} - superoksid anjon radikal
ATP- adenzin 5'-trifosfat	[•] OH - hidroksil radikal
BKB-bikarbonati	8-OH-dG - 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin
CAT – katalaza	OMM – spoljna mitohondrijalna membrana
CK-kreatin kinaza	ONOO ⁻ - peroksinitritni anjon
CuZnSOD- bakar-cink superoksid dismutaza	PBS - phosphate buffer solution fosfatni pufer
DNK- dezoksiribonukleinska kiselina	PHGPx- fosfolipidna hidroperoksidna glutation peroksidaza
EcSOD- ekstracelularna superoksid dismutaza	PUFA - polyunsaturated fatty acids-polinezasićene masne kiseline
FeSOD- gvožđe superoksid dismutaza	RNS- reactive nitrogen species- reaktivne azotne vrste
GGT-gama glutamil transferaza	RO [•] - alkoksil radikal
GR-glutation reduktaza	ROOH - organski hidroperoksid
GSH-redukovani glutation	ROO [•] - peroksi radikal
GSSG-oksidovani glutation	ROS - reactive oxygen species- reaktivne kiseonične vrste
GSH-Px- glutation peroksidaza	RS- reactive species- reaktivne vrste
Hb – hemoglobin	SD-standardna devijacija
Hct- hematokrit	SJFT- Specifični džudo fitness test
Hg-generalna hipoteza	SOD - superoksid dismutaza
H1- pojedinačna hipoteza	SR - slobodni radikali
HOO [•] - perhidroksil radikal	SW- Shapiro-Wilk test
HR- srčana frekvencija	TBA - tiobarbiturna kiselina
HRW- Hydrogen Rich Water	TBARS- Tiobarbituric Acid-Reactive Substances- tiobarbiturne reagujuće supstance
-voda obogaćena molekularnim vodonikom	THD- NADH – transhidrogenaza
I.NT. hlorid- 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)	TOC - tokoferol
-5-feniltetrazolium hlorid	TPx – tioredoksin peroksidaza
IMAC – jonski kanal u unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani	TR – tioredoksin reduktaza
IMM – unutrašnja mitohondrijalna membrana	TRxred – redukovani tioredoksin
IMS – intermembranski prostor	TRxox – oksidovani tioredoksin
L [•] - radikal masne kiseline	U-jedinica enzimске aktivnosti
LDH - laktat dehidrogenaza	VDAC – anjonski kanal zavisian od napona
LOO [•] - peroksi radikal masnih kiselina	ΔΨ _m - membranski potencijal
LOOH - lipidni peroksidi	
LP - lipidna peroksidacija	
MCH- mean cell hemoglobin- prosečni sadržaj hemoglobina u eritrocitu	
MCHC- mean cell hemoglobin concentration prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitu	
MCV- mean cell volume- prosečna zapremina eritrocita	

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
FAKULTET SPORTA I FIZIČKOG VASPITANJA**

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Tatjana Trivić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Sergej Ostojić, vanredni profesor Prof. dr Patrik Drid, vanredni profesor
Naslov rada: NR	ALTERACIJE BIOMARKERA OKSIDATIVNOG STRESA KOD VRHUNSKIH DŽUDISTA NAKON SUPLEMENTACIJE MOLEKULARNIM VODONIKOM
Jezik publikacije: JP	Srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2017.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Lovćenska 16

Fizički opis rada: FO	(9 poglavlja / 81 stranica / 6 slika / 11 grafikona / 3 šeme/ 4 tabele
Naučna oblast: NO	Fizičko vaspitanje i sport
Naučna disciplina: ND	Osnovne naučne discipline u sportu i fizičkom vaspitanju
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Oksidativni stres, vodonik, acido bazna ravnoteža, džudo
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Fakulteta sporta i fizičkog vaspitanja, Univerzitet u Novom Sadu
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	Strana VI
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	
Datum odbrane: DO	2017. godina
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: Prof. dr Dušan Ugarković / redovni profesor / Fakultet sporta i fizičkog vaspitanja, Univerziteta u Beogradu Mentor: Prof. dr Sergej Ostojić/ vanredni profesor / Fakultet sporta i fizičkog vaspitanja, Univerziteta u Novom Sadu mentor: Prof. dr Patrik Drid/ vanredni profesor / Fakultet sporta i fizičkog vaspitanja, Univerziteta u Novom Sadu

University of Novi Sad
Faculty of Sport and Physical Education
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Doctoral Thesis
Author: AU	Tatjana Trivić
Mentor: MN	Assoc. Prof. Sergej M. Ostojic, MD, PhD Assoc. Prof. Patrik Drid, PhD
Title: TI	ALTERATION OF OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN ELITE JUDOKAS AFTER SUPPLEMENTATION WITH MOLECULAR HYDROGEN
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2017
Publisher: PU	Authors reprint
Publication place: PP	Novi Sad

Physical description: PD	(9 chapters/ 81 pages/ 3 shema/ 4 tables/ 6 pictures/ 11 graphs)
Scientific field SF	Physical Education and Sport
Scientific discipline SD	Basic Scientific discipline in Sport and Physical Education
Subject, Key words SKW	Oxidative stress, hydrogen, acid base balance, judo
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Sport and Physical Education, University of Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	Page VI
Accepted on Senate on: AS	
Defended: DE	2017
Thesis Defend Board: DB	<p>president: Prof. dr Dušan Ugarković / full professor / Faculty of Sport and Physical Education, University of Belgrade</p> <p>mentor: Prof. dr Sergej Ostojić / associate professor / Faculty of Sport and Physical Education, University of Novi Sad</p> <p>mentor: Prof. dr Patrik Drid / associate professor / Faculty of Sport and Physical Education, University of Novi Sad</p>

SAŽETAK

Ispitivanja primene vodonika u kliničkim uslovima su prilično nova, međutim efikasnost molekularnog vodonika u dosadašnjim kliničkim ispitivanjima je evidentna. Cilj ovog istraživanja bio je da se ispita uticaj suplementacije sa vodom obogaćenom molekularnim vodonikom (HRW) na bazalne vrednosti parametara oksidativnog stresa kod vrhunskih džudista. Eksperimentalni tretman odvijao se u dve faze. U prvoj fazi ispitanici eksperimentalne grupe (N=6) su bili suplementirani sa HRW (4g) u trajanju od 28 dana, dok je kontrolna grupa (N=6) koristila placebo. Nakon suplementacije ispitanici su imali „Washout“ period u trajanju od 28 dana, a zatim je ponovljen identičan protokol na ispitanicima u trajanju od 28 dana. U drugoj fazi eksperimentalnog tretmana ispitivani su akutni efekti suplementacije molekularnim vodonikom na acido baznu ravnotežu vrhunskih džudistkinja. U ovoj fazi studije ispitanice eksperimentalne grupe (N=4) su suplementirane sa HRW (4g) , dok je kontrolna grupa (N=4) koristila placebo. Nakon suplementacije ispitanice su imale „Washout“ period u trajanju od 4 dana, a zatim je ponovljen identičan protokol na ispitanicama pri čemu su ispitanice eksperimentalne grupe (N=4) koristile placebo, dok je kontrolna grupa (N=4) suplementirana sa HRW. Rezultati ispitivanja aktivnosti antioksidativnih enzima kod Placebo i HRW grupe ukazuju na pojavu statistički značajnih razlika u antioksidativnom statusu kod vrhunskih džudista. Odgovor organizma usled unosa HRW ogleda se u povećanju aktivnosti enzima SOD i sadržaja GSH usled sprovođenja programirane fizičke aktivnosti. Takođe, trend opadanja sadržaja MDA u HRW grupi je bio detektabilan. Primena HRW nije izazvala statistički značajne promene u biohemijsko hematološkim parametrima. Akutni efekti suplementacije sa HRW uticali su statistički značajno na redukciju akumulacije laktata kao i na povećanje pH krvi nakon primene specifičnog džudo fitnes testa (SJFT) kod vrhunskih džudistkinja. Ipak, primena suplementa nije značajno uticala na poboljšanje performansi džudistkinja. Dobijeni rezultati ukazuju na ergogenu antioksidantnu moć molekularnog vodonika, pri čemu su dalja istraživanja neophodna kako bi se podesili uslovi u kojima bi molekularni vodonik ispoljio svoje maksimalno delovanje i u sportu.

ABSTRACT

Research of hydrogen application are quite new in clinical conditions, however the efficiency of molecular hydrogen in previous clinical studies is evident. The aim of this study was to investigate the effect of supplementation with hydrogen rich water (HRW) on baseline oxidative stress parameters in elite male judokas. Experimental treatment was carried out in two phases. In the first phase, experimental group (N=6) were supplemented daily with HRW (4g) for 28 days, while the control group (N=6) was used placebo. After supplementation intake all subjects had "washout" period for 28 days, after which the same protocol was repeated for a period of 28 days. In the second stage of experimental treatment, acute effects of supplementation with molecular hydrogen on acid base balance of elite female judokas were examined. In this phase of the study, subjects from experimental group (N=4) were supplemented daily with HRW (4g), while the control group (N=4) used placebo. After supplementation all subjects had a "washout" period for a 4 days, after which the same protocol was repeated wherein the members of the experimental group (N=4) used placebo, while the control group (N=4) was supplemented daily with HRW. The results of analyzed antioxidant enzymes activity in placebo and HRW group indicated on the occurrence of statistically significant differences in antioxidant status of elite judo athletes. Obtained results indicate that response of the body due to intake HRW is reflected in increasing levels of SOD and GSH due to the implementation of programmed physical activity. Also, trend of MDA decreasing in HRW group was detectable. In addition, application of HRW did not cause negative changes in the biochemical and hematological parameters. Acute effects of supplementation were affected to a statistically significant reduction in lactate accumulation and pH increase after applied special judo fitness test (SJFT) on the top judoka. However, use of supplements had no significant effect on improving performance in elite judokas. Obtained results confirm ergogenic antioxidant power of molecular hydrogen, wherein further studies are necessary in order to adjust the conditions in which molecular hydrogen will exerted its maximum in sport.

1. UVOD

Područje ispitivanja oksidativnog stresa u sportu se značajno proširilo. Povećano interesovanje za ovu temu posledica je spoznavanja uloge reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) u etiopatogenezi brojnih hroničnih bolesti, kao i zbog konstantnog promovisanja vežbanja i fizičke aktivnosti u cilju unapređenja zdravlja, ostvarenja vrhunskih rezultata ali i zbog razvoja i dostupnosti sve većeg broja različitih antioksidanasa. Ekspanzija „zdravog“ načina života kao i podizanje svesti ljudi o pozitivnim efektima bavljenja sportom, u svetu je dovela do naglog razvoja posebne grupe proizvoda – suplemenata. Međutim, suplementi se često upotrebljavaju bez dovoljno znanja o njihovim potencijalno korisnim, odnosno štetnim efektima. Zbog pozitivnog dejstva suplemenata njihova upotreba je u stalnom porastu, a pogotovo u sportu. Rezultati istraživanja pokazuju da se većina sportista informiše o suplementaciji putem medija ili saveta prijatelja (Molinero i Márquez, 2009), pri čemu su izvori informacija često nepouzdana (Zadik i saradnici, 2009). U želji da poboljšaju svoje performanse sportisti često koriste nedovoljno ispitane preparate dovodeći na taj način u pitanje svoje zdravlje (Tian i saradnici, 2009). Činjenica je da velik broj sportista uzima suplemente bez jasnih indikacija i uticaja na sportsku sposobnost, pri čemu se učestalost primene znatno povećava u zavisnosti od ranga sportiste. Suplement (dodatak ishrani) je svaka aktivna materija koja se uzima na usta sa svrhom obogaćivanja ishrane, prevencije bolesti, pojačanja snage i povećanja mišićne mase uz preduslov da nije lek. Svaki čovek je individualan i pored istih fizičkih napora, mase, pola, zdravstvenog stanja potrebno je identifikovati pravu potrebu pojedinca. Intenzivna fizička aktivnost predstavlja metabolički, fizički i psihički stres za organizam i izaziva velike promene u organizmu.

S obzirom da sportisti imaju veću energetske potrošnje tokom intenzivnih treninga, zbog jake oksigenacije ćelija i tkiva, oslobađa se velika količina slobodnih radikala (oko 5 - 10% ukupno utrošenog kiseonika pretvara se u slobodne radikale (Halliwell, 1987)), te endogeni i egzogeni antioksidansi, kao i njihove kombinacije treba da anuliraju njihovo štetno delovanje. Stoga, suplementacija antioksidansima može pružiti značajnu potporu endogenim antioksidansima u cilju transformacije slobodnih radikala i smanjenja ili sprečavanja oksidativnog stresa.

Brojna istraživanja su sprovedena sa ciljem da se odredi efekat antioksidanasa na smanjenje i eliminaciju oksidativnih oštećenja kao posledice intenzivne fizičke aktivnosti (Zembron-Lacny i saradnici, 2009; Pelletier i saradnici, 2013).

Rezultati istraživanja su različiti: pojedine studije ukazuju na smanjenje nivoa parametara oksidativnog stresa (Mastaloudis i saradnici, 2004; McAnulty i saradnici, 2005; Tauler i saradnici, 2006), dok druge studije nisu pokazale povoljne efekte pri unosu antioksidanasa (Aguiló i saradnici, 2005; Cholewa i saradnici, 2008).

Zbog velikog pritiska povećanih zahteva koji se očekuju od sportista, njihova tkiva i organi više se troše i oštećuju pa im je potrebna i redovna "reparacija". Za adekvatan oporavak neophodan je odmor, a svaki trener nastoji da vreme oporavka svede na minimum. Iz navedenog razloga, posebno kada se govori o profesionalnom sportu sportistima bi suplement koji ima višestruke koristi, kao što je molekularni vodonik, doprineo u poboljšanju sportskih performansi. Redovna i umerena fizička aktivnost ima brojne povoljne fiziološke efekte koji unapređuju fizičko stanje organizma i doprinose smanjenju rizika od razvoja brojnih hroničnih bolesti. Međutim, rizik od razvoja bolesti se povećava sa daljim povećanjem intenziteta i trajanja vežbanja. Smatra se da je upravo oksidativni stres veza između intenzivne fizičke aktivnosti i bolesti. Literaturni podaci o uticaju vežbanja na redoks homeostazu kod ljudi su kontroverzni, zbog različite vrste i uslova treninga, i zato ih je veoma teško porediti.

Brojne kliničke studije pokazale su da unos vode bogate vodonikom pozitivno deluje na ukupno zdravstveno stanje organizma i učestvuje u prevenciji većine metaboličkih poremećaja (Jucker i saradnici, 2011; Yu i saradnici, 2011). Međutim, mali broj studija je usmeren na proučavanje parametara oksidativnog stresa i aktivnost enzima antioksidativne odbrane kod fizički aktivne populacije koja je suplementirana vodom obogaćenom vodonikom. Dosadašnja istraživanja nisu ukazala na značajne negativne posledice unosa vode bogate vodonikom po zdravlje (Sakai i saradnici, 2014; Ohta, 2015). Vrhunski sportisti izloženi su pojačanom fizičkom i psihičkom naporu pa je ovaj rad usmeren prema ispitivanju uticaja suplementacije vrhunskih džudista i džudistkinja sa vodom obogaćenom molekularnim vodonikom na bazalne vrednosti parametara oksidativnog stresa. Takođe, dalja istraživanja su neophodna kako bi se podesili uslovi u kojima bi molekularni vodonik ispoljio svoje maksimalno delovanje u sportu.

2. OPŠTI DEO

2.1. Molekularni vodonik i njegova primena

2.1.1 Primena molekularnog vodonika u medicini

Prvo saznanje o vodoniku pripisuje se Paracelzusu (16. vek), koji je utvrdio da se delovanjem sulfatne kiseline na gvožđe izdvaja vodonik. Ipak, za pronalazača vodonika – graditelja vode, smatra se Henri Kevendiš koji je 1766. godine vodonik nazvao zapaljivim vazduhom, jer je dokazao da sagorevanjem vodonika nastaje voda.

Vodonik je prvi u nizu elemenata periodnog sistema. Najlakši je i najzastupljeniji hemijski element. U zemljinoj atmosferi se javlja u malim količinama (1ppm po zapremini). U standardnim uslovima javlja se u obliku dvoatomnog molekula. To je gas bez boje, mirisa i ukusa. Vodonik je lako zapaljiv. Najviše vodonika nalazi se u vodi i organskim jedinjenjima, dok je u slobodnoj formi veoma redak na zemlji (Liu i saradnici, 2011). Njegova uloga u biološkim reakcijama u živim organizmima nije dovoljno istražena. U prirodi, vodonik uglavnom produkuju anaerobni mikroorganizmi (Levitt, 1969). Kod ljudi neke crevne bakterije produkuju vodonik (fermentacijom), koji se eliminiše ekspiracijom (Hammer, 1993). Novija istraživanja su pokazala da molekularni vodonik ima različite fiziološke uloge kod ljudi (Ohta, 2011). Prva primena vodonika u eksperimentalnoj medicini datira od pre 40 godina.

Dole i saradnici (1975) su izložili albino miševe bez dlaka sa karcinomom skvamoznih ćelija hiperbaričnoj smesi od 2,5% kiseonika i 97,5% vodonika. Rezultati istraživanja su pokazali da je došlo do značajne regresije tumora, što je ukazalo na mogućnost dalje primene vodonika u terapiji različitih bolesti. Abraini i saradnici (1994) su došli do zaključka da primena vodonika ublažava neke od simptoma visokog pritiska i nervnog sindroma kod ronioaca. Od tada, delovanje vodonika je intenzivno proučavano u mnoštvu eksperimentalnih modela bolesti i bolesti kod ljudi (Ohno i saradnici, 2012).

Do sada, korisni efekti vodonika potvrđeni su u preko 70 eksperimentalnih modela bolesti i 13 kliničkih studija, posebno kod oboljenja koja su praćena izraženim oksidativnim stresom, kao što su šećerna bolest (Kajiyama i saradnici, 2008), metabolički sindrom (Nakao i saradnici, 2010), infarkt mozga (Ono i saradnici, 2011), karcinom jetre (Kang i saradnici, 2011), hronični upalni procesi kod hemodijaliziranih pacijenata (Nakayama i saradnici, 2010),

inflamatorne i mitohondrijalne miopatije (Ito i saradnici, 2011), Parkinsonova bolest (Yoritaka i saradnici, 2013), i reumatoidni artritis (Ishibashi i saradnici, 2012).

Ispitivanja primene vodonika u kliničkim uslovima su prilično nova, međutim efikasnost molekularnog vodonika u dosadašnjim kliničkim ispitivanjima je evidentna. Brojne kliničke studije utvrdile su povoljne efekte vodonika na različite biohemijske indikatore oksidativnog stresa u serumu i urinu. Većina studija koje su procenjivale efekte kratkoročnog unosa molekularnog vodonika (8 nedelja i manje) imala su relativno mali uzorak. Međutim, količina konzumiranog H₂ kod kliničkih pacijenata nije bila standardizovana. U tom smislu neophodna su dalja istraživanja kako bi se na adekvatan način primena molekularnog vodonika mogla uključiti u terapije u cilju prevencije i lečenja mnogih oboljenja. Kako bi se pružili dokazi o bezbednosti upotrebe H₂ na ljudima, u nekoliko studija su ispitivane moguće nuspojave unosa vodonizirajuće vode na biohemijske parametre, kao i subjektivni osećaj ispitanika tokom njenog unosa. U većini studija nisu primećene nikakve nuspojave kod ljudi koji su tretirani vodonizirajućom vodom (Ostojic i saradnici, 2011; Yoritaka i saradnici, 2013). Međutim, Nakao i saradnici (2010) utvrdili su smanjenje aktivnosti aspartat aminotransferaze, alanin aminotransferaze, sadržaja kreatinina, kao i povećanu aktivnost gama-glutamil transferaze i povećanje ukupnog bilirubina kod ispitanika sa potencijalnim metaboličkim sindromom, koji su unosili do 2 l/dan vodonizirajuće vode. U navedenoj studiji jedan od pet ispitanika je imao dijareju, gorušicu i glavobolje. U drugoj studiji koja se odnosila na unos vodonizirajuće vode u trajanju od 12 nedelja kod pacijenata sa mitohondrijalnim i miopatskim inflamacijama, zabeležena je kod jednog ispitanika povremena nesvestica (Ito i saradnici, 2011). Molekularni vodonik ima brojne prednosti kao nov terapeutski agens, ali ipak neophodna su dalja istraživanja, pre nego što se H₂ prihvati u kliničkoj medicini (Ostojić, 2015).

2.1.2 Primena vodonika kod fizički aktivne populacije

Dosadašnja istraživanja nisu ukazala na značajne negativne posledice unosa vode bogate vodonikom po zdravlje, i s obzirom da su vrhunski sportisti izloženi pojačanom fizičkom i psihičkom naporu veoma je važno da se buduća istraživanja usmere prema uticaju suplementacije vodom obogaćenom vodonikom na sportiste i fizički aktivnu populaciju.

Iako je retka pojava u opštoj populaciji, vežbom izazvana metabolička acidoza predstavlja uobičajeno stanje kod fizički aktivnih pojedinaca. Inicijalni cilj fizički aktivne individue sa acidemijom je sistematsko povećanje pH vrednosti. Voda obogaćena molekularnim vodonikom ima viši pH i povoljno deluje na acidozu izazvanu intenzivnom fizičkom aktivnošću. Nekoliko studija bavilo se proučavanjem efekata vodonizirajuće vode na acidozu kod sportista. Tako je kod 19 mladih muškaraca koji su tokom 7 dana oralno unosili 2 l vode obogaćene molekularnim vodonikom (HRW) istraživana uticaj vodonika na pH vrednosti kao i stepen acidoze indukovane maksimalnim vežbanjem (Ostojić, 2012). Voda obogaćena molekularnim vodonikom je sadržala približno 1.1 mM/l vodonika rastvorenog u vodi, a pH je iznosio 9,3. Utvrđeno je da je unos HRW indukovao porast pH vrednost u krvi nakon fizičke aktivnosti bez neželjenih efekata. Takođe, rezultati randomiziranog, dvostruko slepog kontrolisanog istraživanja sprovedenog na 52 fizički aktivna muškarca ukazali su na povećane vrednosti pH nakon eksperimentalnog tretmana. Ispitanici su unosili 2 l HRW tokom 14 dana, pri čemu su merene vrednosti pH u krvi, parcijalni pritisak ugljen-dioksida ($p\text{CO}_2$), kao i koncentracija bikarbonata na početku, nakon vežbanja i na kraju eksperimentalnog perioda. Unos HRW je značajno povećao vrednosti pH u krvi za 0,07 nakon 14-dnevnog perioda unosa, kao i vrednosti bikarbonata u poređenju sa vrednostima pre početka unosa (Ostojić i Stojanović, 2014). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnim studijama sprovedenim na životinjama koje sugerišu da vodonizirajuća voda može obezbediti određene benefite kao neutralizirajući agens (Abol-Enein i saradnici, 2009). Takođe, istraživanja su pokazala da primena molekularnog vodonika u terapiji sportskih povreda daje povoljne rezultate (Ostojić i saradnici 2014).

Aoki i saradnici (2012) su pilot studijom obuhvatili 10 fudbalera koji su suplementirani sa vodom bogatom vodonikom (hydrogen rich water – HRW) u intervalu od nedelju dana i običnom vodom (placebo) u istom intervalu. Utvrđeno je da je u periodu kada su koristili HRW došlo do smanjenja pojave mišićnog zamora kao i bolje eliminacije laktata. Na osnovu dobijenih rezultata istraživači su sugerisali da HRW može predstavljati adekvatan način hidratacije sportista, što su utvrdili i Maughan i Shirreffs (2010) svojim istraživanjem.

Iako unos H_2 kod sportista pokazuje pozitivne rezultate u smislu potencijalne aplikacije vode obogaćene molekularnim vodonikom, kao alkalnog agensa, kod fizički aktivne populacije, neophodan je dodatan oprez. Predostrožnost je neophodna s obzirom da efekti dugotrajnog unosa H_2 još uvek nisu dovoljno istraženi i poznati (Ostojić, 2015).

1.1.3. Uticaj vodonika na reaktivne kiseonične vrste

Jedna od najvažnijih karakteristika vodonika je njegova sposobnost da difunduje kroz ćelijske membrane i membrane organela i tako ulazi u citosol, mitohondrije i jedro.

Rezultati istraživanja pokazuju da vodonik ima sposobnost smanjenja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) (Ito i saradnici, 2011). Iako veoma snažno implicira smanjenje oksidativnog stresa, rezultati ukazuju da takođe učestvuje u signalnim mehanizmima koji indukuju citoprotektivne faktore (Sun i saradnici, 2009). U procesu starenja, smanjuju se zalihe vodonika koji nas štiti od slobodnih radikala zahvaljujući svojim antioksidantnim osobinama. Utvrđeno je da vodonik poseduje antioksidantna svojstva koja ispoljava smanjujući selektivno citotoksične ROS u tkivima (Ohsawa i saradnici, 2007). Kao antioksidans molekularni vodonik pokazuje i svoje anti-inflamatorne i anti-alergijske efekte (Gharib i saradnici, 2001). Qian i saradnici (2010) su došli do zaključka u svojoj studiji da vodonik selektivno smanjuje hidrosil i peroksinitrit radikale *in vivo*. S obzirom da većina jonizujućih zračenja indukuje oštećenja ćelija, uzrokovanih hidrosilnim radikalima, sprovedena su istraživanja u cilju testiranja pretpostavke da vodonik može biti efektivni radioprotektivni agens (Qian i saradnici, 2013). Rezultati pokazuju da tretiranje ćelija vodonikom pre zračenja, može značajno smanjiti efekat jonizujućeg zračenja, pospešiti ćelijsku apoptozu humanim B limfocitima AHH-1 i povećati vitalnost ćelija *in vitro*. Takođe, tretiranje ćelija vodonikom smanjuje lipidnu peroksidaciju i povećava endogenu antioksidantnu zaštitu *in vitro*. Na osnovu dobijenih rezultata sugerisano je da je vodonik potencijalno efektivan i siguran radioprotektivni agens.

Ren i saradnici (2012) ukazuju na učešće H₂ u regulaciji ekspresije gena i fosforilacije nekoliko signalnih proteina, koji se dovode u vezu sa oksidativnim stresom. Iako su podaci o primeni HRW na zdravlje ljudi limitirani, rezultati istraživanja ukazuju na pozitivne efekte primene HRW u prevenciji bolesti koje se dovode u vezu sa oksidativnim stresom (Kajiyama i saradnici, 2008; Kang i saradnici, 2011; Nakao i saradnici, 2010; Fujita i saradnici, 2009; Hong i saradnici, 2010). Opravdanost upotrebe H₂ u sportu uglavnom proizilazi i iz njegovih antioksidantnih svojstava. Zbog činjenice da intenzivna vežba rezultuje u proizvodnji ROS-a i slobodnih radikala - a posredno i oštećenju tkiva (Powers i saradnici, 2008), upotreba snažnog redukujućeg agensa, kao što je H₂, može umanjiti oksidativni stres i poremećaje vezane za ROS (npr. umor, mikropovrede, upalni procesi, pretreniranost).

1.1.4. Načini unošenja molekularnog vodonika u organizam

U proteklih 20 godina, nekoliko metoda je korišteno za unošenje molekularnog vodonika kod ljudi, različitim putevima sa jasno prezentovanim prednostima i manama aplikacije. Molekularni vodonik može biti unet površinski, potkožno (injekcija) i oralno, a tri najrasprostranjenija načina unosa vodonika su: 1) udisanje vodonika u gasovitom stanju, 2) ubrizgavanje rastvora obogaćenog vodonikom, 3) unos vode obogaćene vodonikom. Dobro poznati način unošenja vodonika je inhalacija gasnog H₂ putem hiperbarične komore, ventilatorna kola, maske za lice ili nazalne cevi (Huang i saradnici, 2010). Iako je H₂ veoma zapaljiv, kada je prisutan u koncentraciji ispod 4% (V/V), ne postoji rizik od eksplozije. Vodonik koji se udiše u gasovitom stanju ima brzo dejstvo i može biti pogodan za odbranu od akutnog oksidativnog stresa (Fukuda i saradnici, 2007). Udisanje vodonika u gasovitom stanju ne utiče na krvni pritisak, za razliku od ubrizgavanja rastvora obogaćenim vodonikom gde je zabeležen jedan slučaj sa negativnim posledicama (Salahudeen, 2004). Međutim, inhalacija vodonikom u gasovitom stanju je često ne praktična za svakodnevnu upotrebu. Ostali površinski putevi administracije H₂ (npr. vodonične kapi za oči) su upotrebljene samo kod životinja (Oharazawa i saradnici, 2010), bez objavljenih studija o upotrebi kod ljudi. Problem administracije predstavlja tendencija H₂ da vremenom „pobegne“ iz medijuma tretmana (kao što je kupka), što dodatno otežava kontrolu primljene koncentracije H₂. Administracija molekularnog vodonika preko injekcionog medija omogućuje precizniju kontrolu unete koncentracije H₂.

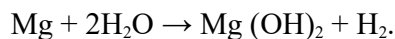
Nakayama i saradnici (2010) aplikovali su rastvor sa molekularnim vodonikom kod pacijenata na dijalizi (koncentracija H₂ ~ 0.24 mM/L). Rastvor je dobijen mešanjem koncentrovanog dijalizata (tečnost koja prolazi kroz membranu ćelije prilikom dijalize) i povratne osmozne vode koja sadrži rastvoreni H₂, generisan elektrolizom vode. Dobijeni rezultati ukazuju da takav bioaktivni hemodijalizni sistem može biti inovativna terapijska opcija za parenteralnu aplikaciju molekularnog H₂ u kontroli uremije. Sa druge strane, intravenozna administracija vodonika nije primenljiva u sportskoj medicini, pošto je intravenozna infuzija, ili bilo koja intravenozna injekcija zabranjena od strane Svetske anti-doping agencije, i može se smatrati kao doping (World Anti-Doping Agency, 2013).

Nasuprot tome, voda obogaćena vodonikom (HRW), mnogo je praktičnija za upotrebu, lako je prenosiva i predstavlja najsigurniji način unosa i isporuke vodonika (Nagata i saradnici, 2009). Prva dokumentovana upotreba vodonizirajuće vode u studijama na ljudima datira iz 2008, kada su Kajiyama i saradnici davali HRW pacijentima sa dijabetesom tipa 2 ili pacijentima sa oštećenom tolerancijom na glukozu. Rezultati istraživanja (Nakashima-Kamimura i saradnici, 2009) pokazali su da unos vode obogaćene molekularnim vodonikom ima identične efekte kao i udisanje vodonika u gasovitom stanju. Takođe, Kitamura i saradnici (2010), utvrdili su da unos vode obogaćene vodonikom i udisanje vodonika u gasovitom stanju poboljšava kvalitet života kod bolesnika podvrgnutih hemo terapiji.

Nekoliko komercijalnih kompanija distribuira sportski napitak koji sadrži vodonik (Ohta i saradnici, 2011). Većina ovih proizvoda je standardizovana, sa koncentracijom vodonika od 0,55 do 0,65 mM/l, dok se u istraživanjima koristi doza od približno 1,0 nM/l. Još jedna inovacija u strategiji oralnog unosa vodonika je nedavno patentirana stabilna tableta H₂ (Miljkovic, 2010). Iako njena efikasnost nije dokazana smatra se da ova lako prenosiva forma (tableta) isporuke vodonika u organizam ima perspektivu u biomedicini.

HRW se može dobiti na nekoliko načina: 1) Rastvaranjem gasovitog vodonika u vodi pod visokim pritiskom 2) rastvaranjem vodonika dobijenog elektrolizom u vodi i 3) reakcijom između magnezijuma i vode.

Stavljanjem metalne šipke magnezijuma u pijaću vodu dolazi do sledeće hemijske reakcije:

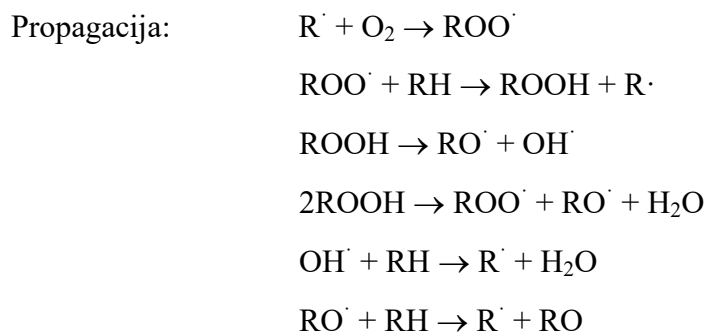


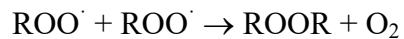
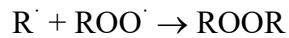
Postiže se koncentracija vodonika od 0,55–0,65 mM

2.2 Slobodni radikali

Slobodni radikali (SR) su termodinamički nestabilni atomi, molekuli ili fragmenti molekula koji u svom sastavu poseduju jedan ili više nesparenih elektrona (Halliwell i Gutteridge, 1985). U hemijskoj terminologiji, slobodni radikali obeležavaju se velikim latiničnim slovom R sa tačkom (R \cdot) koja simbolizuje nespareni elektron. Nespareni elektron je uzrok visoke i neselektivne reaktivnosti SR. Slobodni radikali nastaju homolitičkim raskidanjem kovalentne veze. U organizmima su prisutni u veoma niskim koncentracijama (10^{-5} - 10^{-9} mol/dm 3), međutim kada je stanje organizma takvo da postoji povećana produkcija slobodnih radikala uz smanjenu sposobnost njihovog uklanjanja i neutralizacije, govori se o stanju oksidativnog stresa.

Nastanak slobodnih radikala odvija se u sledeće tri faze: faza inicijacije, faza propagacije i faza terminacije. U fazi inicijacije neradikali primaju ili gube jedan elektron, čime im se značajno menjaju njihove fizičke i hemijske osobine. U fazi propagacije novonastali slobodni radikal aktivira okolne hemijske vrste (ciljni molekul), oduzimajući im jedan elektron, pri čemu se sam stabilizuje, a ciljni molekul se prevodi u formu slobodnog radikala. S obzirom na njihovu veliku reaktivnost, nastali slobodni radikali deluju dalje i za kratko vreme višestruko se umnoži broj slobodnih radikala. Na taj način, dobija se niz sukcesivnih, lančanih reakcija koje se same propagiraju, čime je omogućena brza i intenzivna propagacija ovih hemijskih oblika. Faza terminacije je period zaustavljanja - neutralizacije slobodnih radikala i njihove propagacije. Ove reakcije se dešavaju delovanjem: neenzimskih oksidanasa, enzimskih oksidanasa ili sudarom dva slobodna radikala.





Nastanak slobodnih radikala koji favorizuje oksidaciju i vodi ka oštećenju ćelija pod uticajem je egzogenih i endogenih faktora, koji podstiču nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta (Bocci i saradnici, 1998; Đorđević i saradnici, 2000).

Endogeni izvori nastanka slobodnih radikala:

- Intenzivna fizička aktivnost
- Fiziološki i emocionalni stres
- Fagociti (imuni odgovor)
- Proces starenja

Egzogeni izvori nastanka slobodnih radikala

- Različite vrste zračenja (jonizujuće, UV, vidljivo ili infracrveno)
- Zagađivači vazduha (ozon, oksidi azota)
- Kuvana hrana
- Lekovi
- Dim cigarete, unošenje alkohola u organizam
- Traume, povrede



Slika 1. Neki biološki relevantni egzogeni i endogeni izvori nastanka slobodnih radikala

U normalnim fiziološkim uslovima neprestano nastaju slobodni radikali. U procesu oksidativne fosforilacije stvara se energija neophodna za život. Tokom ovih biohemijskih procesa dolazi do stvaranja slobodnih radikala koji su važni za: antimikrobnu aktivnost fagocitnih ćelija, procese prenošenja signala i regulaciju ćelijskog ciklusa, delovanje nekih enzima. Pored toga, SR su i mutageni, ubrzavaju starenje i stimulišu rast ćelija (Finkel, 2003). Međutim, u uslovima nekontrolisanog stvaranja slobodnih radikala, njihova količina može prevazići antioksidativni kapacitet ćelije i tada nastaje oksidativni stres (Macip i saradnici, 2006).

2.2.1 Reaktivne kiseonične vrste (ROS)

Istraživanja i proučavanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS: Reactive oxygen species) kao finalnih uzročnika i medijatora ćelijskih funkcija i patofizioloških događaja započeta su pre nekoliko decenija (Halliwell i Gutteridge, 1985). Poznato je da ROS imaju dvostruku ulogu u biološkim sistemima, tj. da u isto vreme mogu biti štetni i korisni za ljudski organizam (Valko i saradnici, 2006). Reaktivne kiseonične vrste i reaktivne azotne vrste (*engl.* Reactive nitrogen species-RNS) nastaju tokom normalnih fizioloških procesa u ćeliji i učestvuju u odbrani organizma od infektivnih agenasa, a kao signalni molekuli i regulatori ćelijskih funkcija u

procesima preživljavanja, proliferacije i ćelijske smrti, kao i u regulaciji metabolizma i intercelularnoj komunikaciji (Valko i saradnici, 2007).

Reaktivne vrste kiseonika dele se u dve grupe: slobodni radikali kiseonika i neradikaliski oblici kiseonika (Halliwell i Guteridge, 1999) (Tabela 1).

Tabela 1. Najvažnije reaktivne kiseonične vrste

SLOBODNI RADIKALI		NE-RADIKALSKE VRSTE	
Superoksid anjon radikal	$O_2^{\bullet -}$	Singlet kiseonik	1O_2
Perhidroksil radikal	HOO^{\bullet}	Vodonik peroksid	H_2O_2
Hidroksil radikal	HO^{\bullet}	Organski hidroperoksid	$ROOH$
Alkoksi radikal	RO^{\bullet}	Peroksinitritni anjon	$ONOO^-$
Peroksi radikal	ROO^{\bullet}		
Azot oksid radikal	NO^{\bullet}		

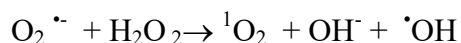
Singletni kiseonik nastaje dovođenjem energije kiseoniku pri čemu dolazi do promene spina jednog od elektrona u π^*_{2p} -orbitalama što značajno uvećava njegovu reaktivnost. Ima visok sadržaj energije, veoma lako može da započne slobodno - radikalske reakcije u organizmu i zato je toksičan.

Singlet kiseonik može nastati u različitim reakcijama:

1. Interakcijom dva superoksid anjon radikala kiseonika:



2. U Haber-Vajsovoj reakciji (Haber-Weiss):

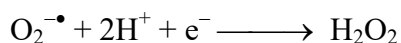
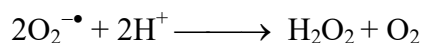
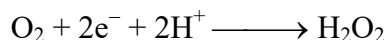


U fotosenzitivnim reakcijama - Singlet kiseonik i druge ROS mogu nastati u koži izloženoj zračenju. Njihovo stvaranje je povećano u prisustvu fotosenzitivnih supstanci.

Superoksid anjon radikal nastaje jednoelektronskom redukcijom kiseonika. Najveći izvor ovog radikala u *in vivo* uslovima su elektron transportni sistem mitohondrija, mikrozoma, a neki enzimi ga i proizvode (ksantin oksidaza, mijeloperoksidaza, itd) (Babior i saradnici, 2002; Fleury i saradnici, 2002). Pored toga može nastati redukcijom kiseonika jonima prelaznih metala (najčešće joni Fe, Cu) itd. Čelije imunog sistema imaju posebnu ulogu u stvaranju superoksid anjon radikala, pošto sadrže enzimski kompleks vezan za membranu, NADPH oksidazu, koja redukuje kiseonik i stvara velike količine ovog radikala koji je neophodan za efikasno ubijanje bakterija. Superoksid anjon radikal može da se transformiše u druge ROS: singlet kiseonik ($^1\text{O}_2$), H_2O_2 , hidroksil radikal (OH^\bullet), hipohlorit radikal (OCl^\bullet) itd.

Ovaj radikal indukuje lipidnu peroksidaciju i tako oštećuje ćelijske membrane. U fiziološkim uslovima ne izaziva toksične efekte jer ga enzim superoksid-dismutaza (SOD) transformiše u manje reaktivan vodonik peroksid. Ali ako reaguje sa azot-monoksidom onda nastaje toksičniji i reaktivniji peroksinitritni anjon (OONO^\bullet).

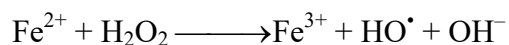
Vodonik peroksid se u ćelijama obrazuje dvoelektronskom redukcijom kiseonika u prisustvu enzima oksidaza (Lenaz i saradnici, 1998). Takođe nastaje dismutacijom superoksid anjon radikala, ili jednoelektronskom redukcijom superoksid radikala:



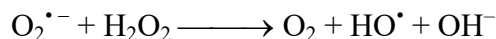
Iako ne spada u slobodne radikale (nema nesparenih elektrona) i mada predstavlja najstabilniji intermedijerni produkt redukcije kiseonika, vodonik peroksid izaziva brojne toksične efekte. To se pre svega odnosi na oksidaciju sulfhidrilnih grupa proteina i poremećaj deponovanja jona kalcijuma u mitohondrijama, koji se nagomilava u citosolu. Ovo je kritičan događaj u genezi ćelijskih oštećenja u oksidativnom stresu.

Toksičan je jer lako prolazi kroz ćelijske membrane, difunduje unutar ćelija, a Fentonovom i Haber Weisovom reakcijom, se transformiše u najtoksičniji hidroksil radikal, OH^\bullet .

Hidroksilni radikal je najreaktivniji, najtoksičniji, intermedijerni produkt delimične redukcije kiseonika. Ako se vodonik-peroksid ne ukloni katalazom, može da reaguje sa fero jonima i da formira hidroksilni radikal (Fentonova reakcija):



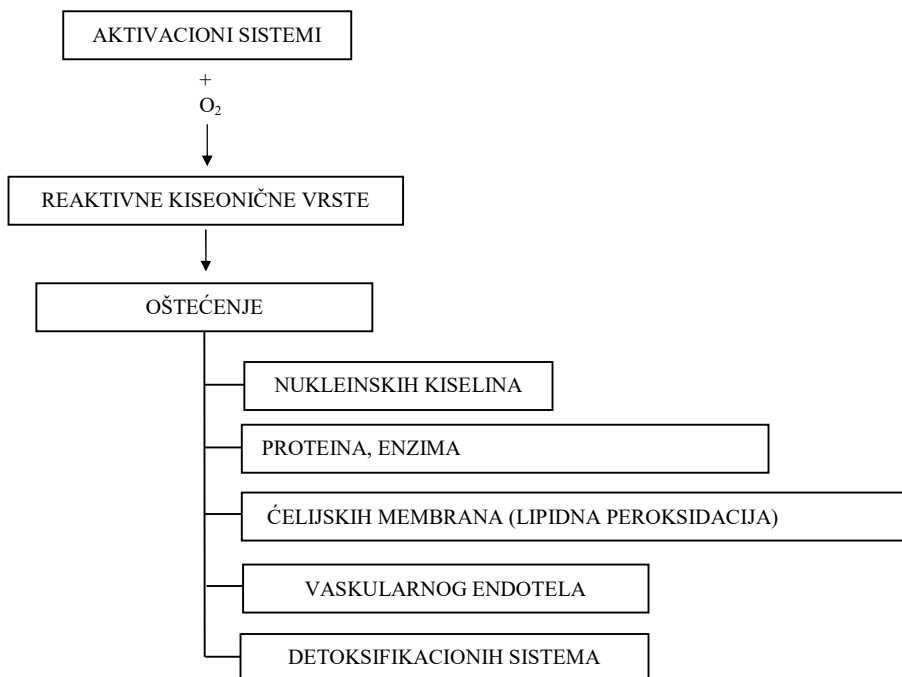
Takođe nastaje u Haber Weisovoj reakciji:



Ovaj radikal izaziva lipidnu peroksidaciju, oštećuje membrane, modifikuje biomolekule: proteine, DNK (Halliwell i Gutteridge, 1984), ugljene hidrate i dovodi do oštećenja ćelije. Poluživot hidroksil radikala je izuzetno kratak (10^{-9} s), jer odmah reaguje sa biomolekulima. Može reagovati sa praktično svakim molekulom u živim ćelijama. Hidroksil radikal reaguje sa različitim tiolima, gradeći **tiol radikale**, koji mogu da reaguju sa kiseonikom, stvarajući **oksi sumpor radikale** koji su uglavnom toksični. S obzirom na visoku reaktivnost i toksičnost u odnosu na biomolekule, hidroksil radikali imaju značajnu ulogu u patofiziološkim procesima kao što su inflamacija, teratogeneza i ćelijska smrt.

Mehanizam oksidativnog oštećenja tkiva odvija se u sledećim fazama (slika 2):

1. stvaranje slobodnih radikala,
2. nastali radikali iniciraju stvaranje još reaktivnijih oksidanasa, i
3. oksidansi oštećuju i inaktiviraju biomolekule (Fridovich i Porter, 1981; Bielski i saradnici, 1983)



Slika 2. Najčešći biohemijski efekti ROS

Peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina, holesterola i drugih klasa lipida dovodi do poremećaja u propustljivosti i fluidnosti konstituenata ćelijskih membrana (Selley i saradnici, 1998).

2.2.2. Produkcija ROS-a u mitohondrijama

Mitohondrijalni respiratorni lanac je glavno mesto produkcije ROS. Superoksid anjon radikal se proizvodi kontinuirano kao nusprodukt disanja, jednoelektronskom redukcijom molekularnog kiseonika.

Mitohondrijalni enzim mangan superoksid dismutaza (MnSOD) dismutira superoksid anjon radikal do vodonik peroksida koji u prisustvu jona gvožđa i jona bakra formira hidroksil radikale koji spadaju u najreaktivnije, najtoksičnije ROS (Chance i saradnici, 1979). Malo je poznato kako ćelije održavaju optimalne rezerve metalnih jona za mitohondrijske funkcije (St-Pierrel i saradnici, 2007). Tako je dostupnost slobodnog jona gvožđa i bakra u mitohondrijama nepoznata. Reakcijom superoksid anjon radikala sa gvožđe sumpor centrom akonitaze oslobađa se divalentno gvožđe (Vasquez-Vivar i saradnici, 2000). Produkcija superoksid anjon radikala u mitohondrijama inicira niz štetnih reakcija u kojima učestvuju i vodonik peroksid, joni

dvovalentnog gvožđa, hidroksil radikali i peroksinitriti, koji mogu oštetiti biomolekule (lipide, proteine, ugljene hidrate i nukleinske kiseline) (James i Murphy, 2002).

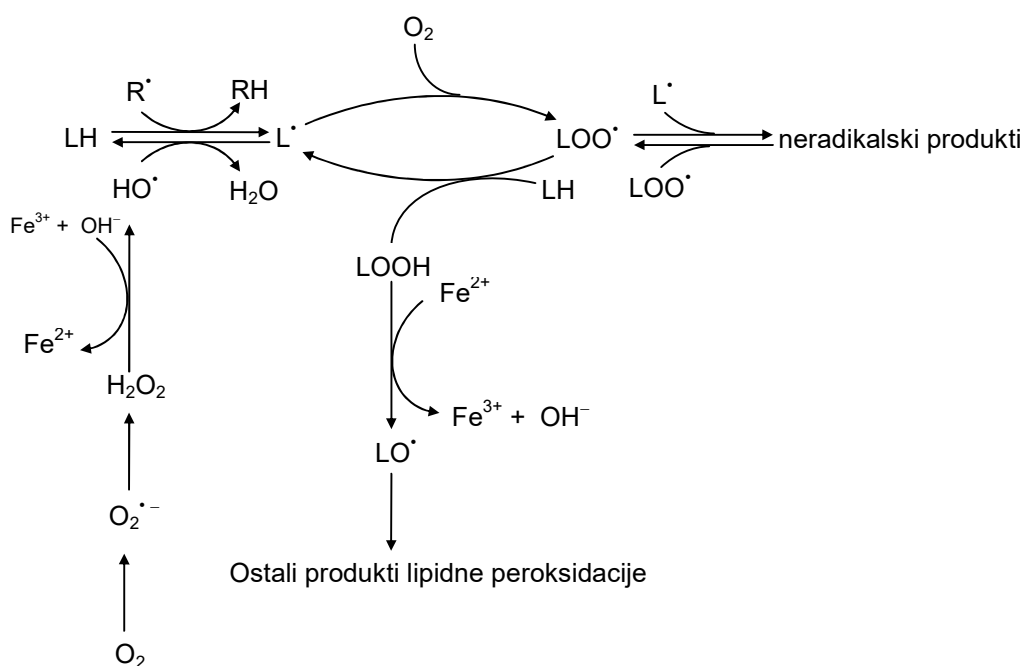
S obzirom na to da su mitohondrije ćelijske „centrale“ koje generišu energiju neophodnu za mnogobrojne funkcije organizma, one su posebno osetljive na oksidativna oštećenja koja dovode do smanjenja sinteze ATP, poremećaja homeostaze jona kalcijuma i promene permeabilnosti mitohondrijalnih membrana, što može dovesti do nekroze ili apoptoze (Vincent i saradnici, 2002).

2.2.3. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija (LP) je proces oksidativnog oštećenja lipida. Lipidi svih bioloških membrana sadrže i višestruko nezasićene masne kiseline. Lipidna peroksidacija kao radikalski inicirana lančana reakcija je samopropagirajuća i nastaje delovanjem slobodnih radikala na nezasićene masne kiseline u membranama ćelija i subćelijskih organela dovodeći do njihovog oštećenja. Zbog oštećenja lipida ćelijske membrane dolazi do smanjenja fluidnosti, povećane propustljivosti, inaktivacije membranskih enzima i gubitka integriteta membrane. Ruptura lizozomskih membrana oslobađa hidrolitičke enzime, što sveukupno dovodi do vitalnih ćelijskih poremećaja i na kraju do smrti ćelije (Đukić, 2008). Slobodni radikali su inicijatori i terminatori procesa lipidne peroksidacije (posebno superoksid anjon radikal) (McCord, 2000). Stepem ćelijskog oštećenja zavisi od toga na kojim subćelijskim membranama (organele, jedro) se odvija lipidna peroksidacija. Proces lipidne peroksidacije može se odvijati na dva načina:

- Enzimskim putem - dejstvom lipoksigenaze i ciklooksigenaze, u zapaljenskim procesima, kada nastaju: oksidovani oblici lipida, medijatori zapaljenskih procesa, i slobodni radikali koji se odmah uklanjaju dejstvom specifičnih sistema;
- Neenzimskim putem: nekontrolisanim napadom ROS na polinezasićene masne kiseline iz lipidnog dvosloja membrane i u kontrolisanoj reakciji biosinteze eikozanoida - prostaglandina i leukotrijena.

Hidroksilni radikal OH^\bullet najčešće prouzrokuje lipidnu peroksidaciju, mada proces peroksidacije mogu pokrenuti i drugi radikali (Štefan i saradnici, 2007). Prisustvo dvostrukih veza u masnim kiselinama slabi C-H veze na atomima ugljenika susednim dvostrukim vezama, i olakšava premeštanje vodonika. U fazi inicijacije OH^\bullet izdvaja H atom iz metilenske ($-\text{CH}_2-$) grupe PUFA (LH), produkujući radikal masne kiseline (L^\bullet). U fazi propagacije L^\bullet reaguje sa O_2 pri čemu nastaju peroksi radikali masnih kiselina (LOO^\bullet). Ovi radikali mogu reagovati sa susednim lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama, izazivajući seriju oštećenja i reaktivnih produkata. Lančana reakcija se može prekinuti (terminacija) samo u slučaju da radikali međusobno reaguju ili da reaguju sa antioksidantom. Iz polinezasićenih masnih kiselina mogu oksidacijom nastati eikosanoidi.



Slika 3. Lipidna peroksidacija

Proizvodi koji nastaju lipidnom peroksidacijom su poznati pod nazivom TBARS (*Tiobarbituric Acid-Reactive Substances*). To su: aldehidi, ketoni, alkani, (pentan, metan, etan), epoksidi, konjugovani dieni, aktivni radikali, malondialdehid (MDA), itd. Neki od ovih produkata su toksični pa dovode do smrti ćelije, a za razliku od TOM mogu difundovati sa mesta

nastanka do ciljnih tkiva gde deluju kao sekundarni toksični mesendžeri. Nivo MDA u tkivima i plazmi najčešće se koristi kao marker lipidne peroksidacije. Kada se ima u vidu da ćelijska membrana predstavlja primarno mesto kontrole ćelijskog rasta, deobe, diferencijacije i smrti ćelije, a da lipidna peroksidacija predstavlja uzrok promena u aktivnosti membranskih enzima, transportu jona, selektivnoj permeabilnosti ćelijske membrane, molekulskej uređenosti i fluidnosti, očigledne su posledice do kojih dovodi disfunkcija ćelijske membrane.

2.3. Oksidativni stres

Kiseonik je neophodan za očuvanje funkcije celokupnog aerobnog sveta i njegov pozitivan efekat na ljudsko zdravlje nije se dovodio u pitanje sve do otkrića slobodnih radikala i procesa lipidne peroksidacije. Međutim, kiseonik je ujedno i najtoksičniji prirodni polutant. Aerobni organizmi svakodnevno su izloženi delovanju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) čiji su efekti pod kontrolom odgovarajućih antioksidantnih sistema (AOS). Kada se ravnoteža između produkcije ROS-a i antioksidantnih sistema naruši dolazi do oksidativnog stresa koji može dovesti do patofizioloških promena.

Oksidativni stres je stanje koje se javlja kada prooksidansi (slobodni radikali) nadvladaju mehanizme antioksidativne zaštite organizma (Sies, 1991). Svakodnevni proces stvaranja energije neophodne za život ljudskog organizma zasniva se na sagorevanju materija pomoću kiseonika, odnosno, oksidaciji. Tokom ovih biohemijskih procesa dolazi do stvaranja slobodnih radikala koji imaju pozitivne fiziološke funkcije, što je posebno izraženo u nekim fazama imunološkog odgovora organizma na prisustvo bakterija i virusa (Hensley i saradnici, 2000). Kada u biološkim sistemima dođe do prevelike produkcije ROS i RNS, ovi molekuli reaguju sa ćelijskim komponentama izazivajući oštećenja DNK, oksidativnu modifikaciju proteina i polinezasićenih masnih kiselina. Posledice ovih reakcija vode ka nastanku degenerativnih procesa, sindroma i bolesti kao što je proces starenja, osteoporoza, ishemijska bolest srca, akutne i hronične inflamatorne bolesti, oboljenja centralnog nervnog sistema i kancera (Halliwell i Gutteridge, 1999; Pešić i saradnici, 2009). Ravnoteža između korisnih i štetnih dejstava slobodnih radikala je veoma značajan aspekt živih organizama i postiže se mehanizmom poznatim pod nazivom „redoks regulacija“.

2.3.1. Oksidativni stres u sportu

Odavno se smatra da je pojava oksidativnog stresa u korelaciji sa svakodnevnim fizičkim opterećenjem štetan fenomen koji je potrebno eliminisati ili redukovati u nastojanju da se poboljšaju sportski rezultati kao i zdravstveni status. Upravo markeri oksidativnog stresa i antioksidativnog statusa mogu biti od velikog značaja kao parametri biološkog praćenja sportista. Naime, studije koje su se odnosile na praćenje redoks homeostaze sportista ukazuju na alteracije u antioksidativnom statusu u zavisnosti od samih trenažnih opterećenja (Varamenti i saradnici, 2012; Marin i saradnici, 2013).

Sistem antioksidativne zaštite podrazumeva niz mehanizama usmerenih protiv štetnog delovanja ROS, što se ostvaruje preveniranjem produkcije, uklanjanjem stvorenih ROS/RNS ili repariranjem nastalih ćelijskih oštećenja. Imajući u vidu da antioksidativni sistem (AOS) podrazumeva i enzimsku i neenzimsku aktivnost, potrebno je da su oba segmenta u funkciji da bi se onemogućilo prekomerno stvaranje i štetno delovanje ROS. Sam nastanak slobodnih radikala koji favorizuje oksidaciju i vodi ka oštećenju ćelija pod uticajem je egzogenih i endogenih faktora, koji podstiču nastanak reaktivnih kiseoničnih vrsta (Aldini i saradnici, 2010).

Među potencijalne faktore povećane produkcije enzimskih antioksidanata spada i fizička aktivnost (Finaud i saradnici, 2006). Smatra se da efikasnost zaštitnog antioksidantnog sistema organizma nakon dvadesete godine opada, a negativni efekti oksidacionih procesa u organizmu postaju sve izraženiji. Savremene dijagnostičke metode omogućavaju otkrivanje latentnih poremećaja zdravstvenog stanja kada još ne postoje vidljivi simptomi promena u organizmu. Određivanje antioksidacionog statusa u organizmu posebno se preporučuje osobama koje su izložene pojačanom psihičkom i fizičkom stresu, sportistima. Sportski život indukuje stres i ujedno podstiče stvaranje slobodnih radikala. Fizička aktivnost pojačanog intenziteta praćena je povećanom potrošnjom kiseonika u celom organizmu, a posebno od strane skeletnih mišića (Popović i saradnici, 2008). Veći deo tog kiseonika se transformiše u mitohondrijama u H₂O, dok manji deo (2-5%) gradi reaktivne kiseonične vrste, toksične oblike kiseonika.

Fizičko opterećenje indukuje oksidativni stres (Alessio, 1993; Apor i Radi, 2006) kao i smanjen antioksidacioni kapacitet organizma. Rezultati brojnih istraživanja ukazuju da redovna i pravilno dozirana fizička aktivnost pozitivno deluje na zdravlje i radnu sposobnost.

Ipak, sve češće kod sportista i nesportista javljaju se neželjeni efekti usled intenzivne fizičke aktivnosti što se može povezati sa delovanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta.

Kada produkcija ROS prevlada nad kapacitetom AOS može doći i do ireverzibilne oksidacije biomolekula: lipida, proteina i ostalih ćelijskih komponenti kao i toksičnog ispoljavanja efekata ROS. U toku fizičkog opterećenja, povećana produkcija ROS najverovatnije je posledica povećane potrošnje kiseonika, ali takođe i nekih alternativnih mehanizama: pojačane funkcije neutrofila ili autooksidacije. Velike količine ili nedovoljno uklanjanje ROS-a, uzrokuje oksidacioni stres (McCord, 2000) koji može oštetiti biološke makromolekule i prouzrokovati metaboličke poremećaje. Reaktivne kiseonične vrste od velike su važnosti u imunološkom odgovoru (Mates i Sanchez-Jimenez, 1999). Aktivirane fagocitotičke ćelije poput monocita, neutrofila, eozinofila i makrofaga, proizvode ROS kao deo mehanizma uništavanja mikroorganizama nakon fagocitoze (Curnutte i Babior, 1987).

Poznato je da akutna aerobna (Davies i saradnici, 1982; Ashton i saradnici, 1998; Lekhi i saradnici, 2007) i anaerobna aktivnost (Groussard i saradnici, 2003; Bailey i saradnici, 2004; Randelović i saradnici, 2006) imaju potencijal za povećanu produkciju slobodnih radikala, koji mogu ili nemogu da dovedu do oksidativnog stresa. Istraživanja su pokazala da intenzivna fizička aktivnost rezultuje pojavom oksidativnog stresa, izazvanog povećanjem lipidne peroksidacije (Rietjens i saradnici, 2007; Guzel i saradnici, 2007; Hoffman i saradnici, 2007), oksidacije proteina (Bloomer i saradnici, 2005), kao i promenama u sadržaju redukovano glutaciona (Vina i saradnici, 2000).

Evidentno je da fizičko opterećenje indukuje proizvodnju (ROS) različitog nivoa u odnosu na stepen i vrstu treninga. Tokom aktivnosti niskog intenziteta, sistem antioksidativne zaštite organizma uspeva da nadvlada produkciju ROS različitog nivoa u odnosu na stepen i vrstu treninga. Tokom aktivnosti niskog intenziteta, sistem antioksidativne zaštite organizma uspeva da se nadvlada produkciju ROS, međutim, sa porastom intenziteta i trajanja fizičkog opterećenja sistem antioksidacione zaštite organizma više nije u mogućnosti da nadvlada ROS što dovodi do oštećenja okolnih tkiva. Faktori koji takođe utiču na stepen oksidativnog oštećenja su životna dob (Sacheck i saradnici, 2006), sportski staž (Steinberg i saradnici, 2007), i režim ishrane (Watson i saradnici, 2005).

2.3.2. Antioksidativna zaštita

Sistem antioksidativne zaštite podrazumeva niz mehanizama usmerenih protiv štetnog delovanja ROS, što se ostvaruje preveniranjem produkcije, uklanjanjem stvorenih ROS/RNS ili repariranjem nastalih ćelijskih oštećenja. Imajući u vidu da antioksidativni sistem (AOS) podrazumeva i enzimsku i neenzimsku aktivnost, potrebno je da su oba segmenta u funkciji da bi se onemogućilo prekomerno stvaranje i štetno delovanje ROS. Antioksidativni sistem ima ulogu da inaktivira ROS i RNS ili da prekida reakcije u kojima oni nastaju. Uklanjanje reaktivnih oblika kiseonika kao i ublažavanje njihovih štetnih dejstava preduslov je života u aerobnim uslovima. Sistem antioksidativne zaštite podrazumeva niz mehanizama usmerenih protiv štetnog delovanja ROS, što se ostvaruje preveniranjem produkcije, uklanjanjem stvorenih ROS/RNS ili repariranjem nastalih ćelijskih oštećenja (Halliwell i saradnici, 2005). Delovanje antioksidanasa zasniva se na njihovoj sposobnosti da deluju kao hvatači (*scavengers*) slobodnih radikala (Masella i saradnici, 2005).

Sa funkcionalnog aspekta antioksidativna zaštita organizma obuhvata tri nivoa delovanja:

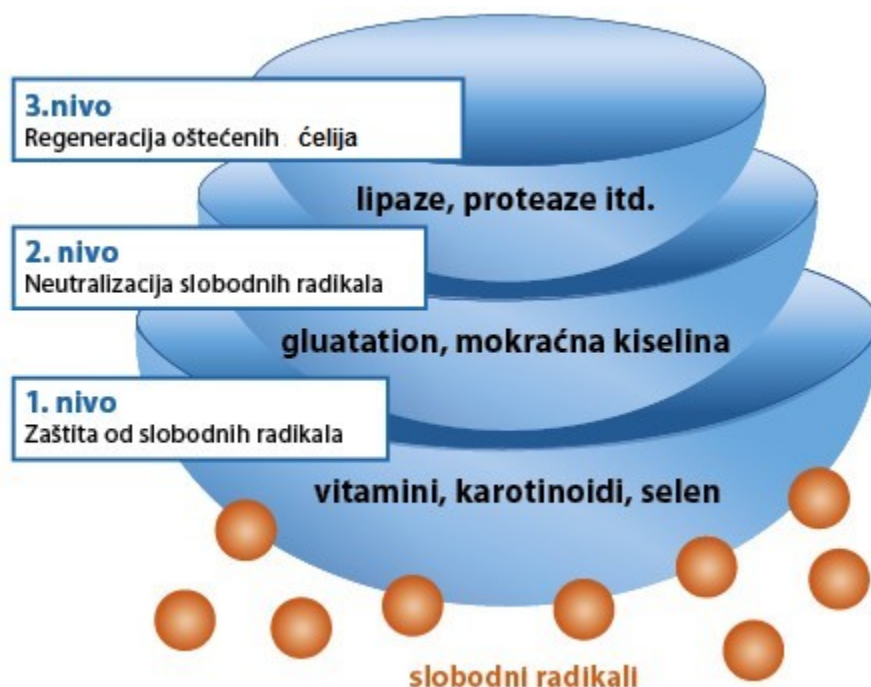
1. Sistemi antioksidativne zaštite koji sprečavaju endogeno stvaranje slobodnih radikala. Ovaj nivo zaštite je obezbeđen prostornom razdvojenošću procesa u kojima se stvaraju slobodni radikali.

2. Angažovanje sistema u uslovima normalnog i pojačanog stvaranja slobodnih radikala.

Prema prirodi i načinu delovanja antioksidanti se dele na:

- enzimske (superoksid-dizmutaze, katalaza, ksantin-oksidaza, peroksidaze, glutation-peroksidaza, glutation-raduktaza, glutation-S-transferaza). Ovi enzimi čine tzv. primarnu liniju antioksidativne zaštite.
- neenzimske ili tzv. sekundarna linija odbrane. Prema rastvorljivosti dele se na:
 - ✓ liposolubilne (vitamin A, vitamin E, β -karoteni, koenzim Q i dr.). Deluju u lipidnoj fazi ćelijske membrane i membrana subcelularnih organela, kao i unutar serumskih lipoproteina.

- ✓ hidrosolubilne (vitamin C, mokraćna kiselina, ceruloplazmin, glutacion, transferin, i dr.). Deluju u vodenoj fazi, a sa liposolubilnim antioksidantima interreaguju na graničnoj površini membrana.
3. Enzimski antioksidanti koji učestvuju u reparaciji nastalog oksidativnog oštećenja lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina. U ovu grupu enzima spadaju: fosfolipaza A2, različite proteaze, glikozilaze, DNK-ligaze, DNK-polimeraze i dr.



Slika 4. Nivoi delovanja antioksidativne zaštite

2.3.3. Enzimске komponente antioksidativnog zaštitnog sistema

Od enzima AOS najznačajniji su: superoksid dismutaza, katalaza, glutacion peroksidaza i glutacion reduktaza. Osim obezbeđivanja dovoljne količine redukcionih ekvivalenata u ćeliji, neophodnih za prevenciju nastajanja ROS, uloga enzima AOS je u biotransformaciji primarnih i sekundarnih RS u manje aktivna jedinjenja (Aldini i saradnici, 2010).

Superoksid dismutaza SOD (E.C. 1.15.1.1)

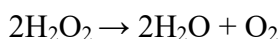
Superoksid dismutaze su grupa od četiri enzima, metaloproteina. To su: bakar-cink (CuZnSOD), mangan (MnSOD), gvožđe (FeSOD) i ekstracelularna (EcSOD) superoksid dismutaza. Kod aerobnih organizama SOD predstavlja primarni mehanizam uklanjanja $O_2^{\cdot-}$. Katalizuje dismutaciju superoksid radikala do H_2O_2 i O_2



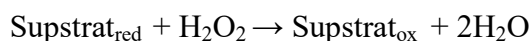
Sve SOD katalizuju istu reakciju dismutacije, međutim razlikuju se po tome što je u različitim organizmima lokalizacija enzima specifična za tkivo i ćeliju (Cheeseman, 1993). SOD je prisutan u svim tkivima, a posebna aktivnost zabeležena je u mozgu. Spada u jedan od najefikasnijih intracelularnih enzima antioksidativne odbrane od superoksid anjon radikala (Powers i Lennon, 1999). CuZnSOD je prevashodno citosolni enzim, mada se u maloj količini nalazi u ćelijskoj membrani, jedru i mitohondrijama (Peeters-Joris i saradnici, 1975). CuZnSOD je sastavljen od dve subjedinice. Svaka subjedinica sadrži u aktivnom mestu jon Cu i Zn. Mn-SOD je jedan od najefikasnijih enzima koji ima antitumorsku aktivnost. Sintetiše se u citosolu, a zatim transportuje signalnim peptidima u mitohondrije (Ishikawa i saradnici, 1987). Ekstracelularna SOD je homotetramer. Nalazi se u intersticijalnom matriksu tkiva, i u manjoj količini u ekstracelularnim tečnostima (plazma, limfa, sinovijalna i cerebrospinalna tečnost) (Alscher i saradnici, 2002).

Katalaza (CAT) (EC 1.11.1.6.)

Katalaza, je sastavljena od četiri polipeptidna lanca (tetramer); zastupljena je kod gotovo svih organizama. Katalaza je jedan od najrasprostranjenijih enzima u prirodi. Prisutna je u svim tkivima sisara. Nalazi se u mitohondrijama, endoplazmatskom retikulumu, peroksizomima, tj. na mestima gde se stvara H_2O_2 . Kod čoveka se nalazi, u ćelijama jetre i crvenim krvnim zrnima. Optimalni pH za ljudsku katalazu je oko 7, pri čemu deluje na 37^0C . Osnovna uloga katalaze je razgradnja vodonik peroksida:



Katalaza direktno razgrađuje H₂O₂ do vode i molekuskog kiseonika. Izuzetno je efikasna u razgradnji H₂O₂ (ima veliku k_{cat} 10⁶ /s). Kada je H₂O₂ prisutan u visokoj koncentraciji, može se razložiti katalazom u prisustvu donora elektrona uz utrošak jednog molekula vodonik peroksida, ali se reakcija odvija sporo („peroksidazna reakcija”).

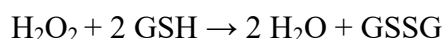


Peroksidaza eliminiše H₂O₂ tako što ga koristi za oksidaciju različitih supstrata (donora elektrona).

Glutation peroksidaza (GSH-Px) (EC 1.11.1.9.)

Glutation peroksidaza je enzim za čiju je aktivnost neophodan selen (Papp i saradnici, 2007). Kod ljudi postoje 4 različite Se-zavisne glutacione peroksidaze (Mates i saradnici, 1999). Aktivni centar GSHPx se nalazi u udubljenju na površini enzima i lako je pristupačan za vezivanje sa supstratima, što uslovljava veliku reakcionu brzinu enzima.

Glutation peroksidaza, zajedno sa katalazom učestvuje u otklanjanju H₂O₂. Ovaj enzim katalizuje redukciju H₂O₂ sa redukovanom glutationom (GSH) pri čemu nastaju oksidovani glutation (GSSG) i voda.



Familija peroksidaza koje sadrže selen ima najmanje četiri tipa enzima. Glutation peroksidaza (cGSHPx) - "klasična", deluje na H₂O₂ i hidroperokside masnih kiselina i holesterola ali ne i na esterifikovane lipide prisutne u lipoproteinima. Podložna je oksidativnoj modifikaciji i inaktivaciji od strane oksidanasa, posebno vodonik peroksida (Arnao i saradnici, 1990), a prisustvo redukujućih agenasa može da sačuva enzim od inaktivacije. Fosfolipidna hidroperoksidna glutaciona peroksidaza (PHGSHPx) je jedini enzim koji redukuje lipidne hidroperokside iz lipoproteina. Ovaj enzim, najverovatnije, ima značajnu ulogu u inhibiciji inicijalnog stadijuma peroksidacije lipida ćelijskih membrana pokrenutim difuzibilnim H₂O₂.

2.3.4. Mitohondrijalni antioksidanti sistemi

U mitohondrijama se nalazi enzim MnSOD koji prevodi superoksid anjon radikal u vodonik peroksid (Forman i Azzi, 1997). U njima se nalazi i enzim glutathion peroksidaza i tioredoksin zavisni enzim peroksiredoksin III, koji detoksifikuju vodonik peroksid. Alternativno, vodonik peroksid može da difunduje u citoplazmu. U mitohondrijama se nalazi i glutathion u oksidovanom i redukovanom obliku, a njihov odnos reguliše izoenzim glutathion reduktaza (Costa i saradnici, 2003).

Unutar mitohondrijalnog fosfolipidnog dvosloja, nalaze se u mastima rastvorni antioksidansi, vitamin E i koenzim Q koji sprečavaju lipidnu peroksidaciju. Koenzim Q takođe reciklira vitamin E i sam se regeneriše respiratornim lancem (Maguire i saradnici, 1989). Mitohondrijalni izoenzim fosfolipid hidroperoksid glutathion peroksidaza degradira lipidne peroksidge u unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani. Kompleks III respiratornog niza proizvodi velike količine superoksidge, transferom jednog elektrona sa ubisemihinon radikala na kiseonik (St-Pierre i saradnici, 2002). Kompleks I takođe generiše superoksidge (Raha i Robinson, 2000).

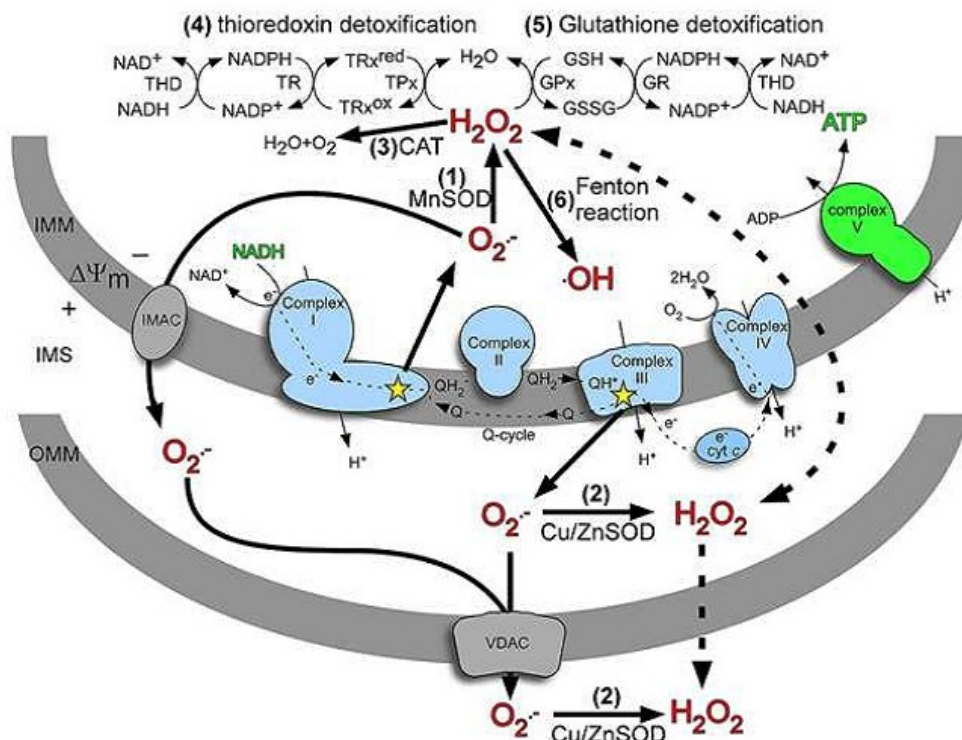
Ranije se smatralo da je proizvodnja mitohondrijalnog ROS srazmerna brzini respiracije. Novija saznanja ukazuju da je proizvodnja mitohondrijalnog ROS favorizovana smanjenjem nivoa prenosioca elektrona u respiratornom nizu, posebno koenzima Q i promenom mitohondrijalnog membranskog potencijala. Ovi uslovi favorizuju proizvodnju superoksidge na nivou kompleksa I (Liu i saradnici, 2002).

S obzirom da je oksidativno oštećenje mitohondrija kritično u patofiziologiji mnogih bolesti, antioksidanti koji se akumuliraju unutar mitohondrija su daleko efikasniji od „ne ciljnih“ antioksidanata (Murphy, 1997). Jedna od strategija za razvoj „ciljnih“ antioksidanata (onih koji ulaze u matriks mitohondrije) je bila da se antioksidanti kovalentno modifikuju vezivanjem trifenilfosfonijum katjona (Murphy i saradnici, 2000).

Delokalizacija pozitivnog naelektrisanja ovog lipofilnog katjona mu omogućuje da lako prolazi kroz lipidni dvosloj i akumulira se unutar mitohondrije nekoliko stotina puta više. Pošto alkiltrifenilfosfonijum katjon lako prolazi kroz lipidni dvosloj bez posredovanja nosača u membrani, on može da uđe u mitohondrije svih tkiva, za razliku od drugih hidrofilih jedinjenja koja mogu da prolaze kroz membrane ciljnih (onih koji imaju odgovarajuće nosače) tkiva (Murphy, 2001).

Antioksidanti koji se unose kao suplementi se moraju kovalentno modifikovati da bi „ciljno” mogli ulaziti u mitohondrije, dok molekularni vodonik slobodnom difuzijom ulazi u matriks mitohondrija što je njegova velika prednost. Spoljna, a posebno unutrašnja membrana mitohondrija su selektivno permeabilne za različite molekule, čak i male jone, te prirodni antioksidanti ne mogu ući u matriks mitohondrija.

Pored drugih prirodnih antioksidanasa, vitamin E i koenzim Q štite mitohondrije od oksidativnih oštećenja *in vivo*, te su ciljni derivati ovih antioksidanasa, koji mogu proći u matriks mitohondrija, prvi razvijeni. Eksperimenti *in vitro* su pokazali da se ciljni derivati, tokoferol (MitoVit E) i ubihinon, modifikovani tako da ulaze u mitohondrije, brzo i selektivno i akumuliraju se u matriksu izolovanih mitohondrija. (Echtay i saradnici, 2002). Prirodni antioksidanti akumulirani u matriksu mitohondrija su daleko efikasniji od „ne ciljnih” antioksidanasa.



Slika 5. Produkcija mitohondrijalnih ROS i odbrana. IMM – unutrašnja mitohondrijalna membrana; IMS – intermembranski prostor; OMM – spoljna mitohondrijalna membrana; MnSOD – mangan superoksid dismutaza; Cu/ZnSOD – bakar, cink superoksid dismutaza; CAT – katalaza; THD-, NADH – transhidrogenaza; TR – tioredoksin reduktaza; TPx – tioredoksin peroksidaza; TR_{xred} – redukovani tioredoksin; TR_{xox} – oksidovani tioredoksin; GSH – redukovani glutation; GSSG – oksidovani glutation; IMAC – jonski kanal unutrašnjoj mitohondrijalnoj membrani; VDAC – anjonski kanal zavisian od napona; $\Delta\Psi_m$ – membranski potencijal.

Iako je tačan mehanizam delovanja vodonika nepoznat, njegovi korisni efekti potvrđeni su u preko 70 eksperimentalnih modela bolesti i kliničkih studija, posebno kod oboljenja koja su praćena izraženim oksidativnim stresom. Pored višestrukog mehanizma delovanja, HRW poseduje povoljnu bioraspoloživost kao i mogućnost ko-aplikacije. Molekularni vodonik se koristi više od 40 godina u eksperimentalnoj i kliničkoj medicini, i do sada nisu potvrđeni značajniji neželjeni efekti molekularnog vodonika.

Suplementacija HRW može biti od posebnog interesa za sportiste koji su podložniji oksidativnom stresu kao dodatna podrška endogenim i neenzimskim zaštitnim sistemima. Zbog svojih dokazanih prednosti i korisnih efekata, kao i odsustva značajnih neželjenih efekata ovaj rad usmeren je prema ispitivanju uticaja suplementacije vrhunskih džudista i džudistkinja sa vodom obogaćenom molekularnim vodonikom. Cilj rada je bio usmeren na ispitivanje uticaja suplementacije molekularnim vodonikom u toku 12 nedelja na bazalne vrednosti parametara oksidativnog stresa kod vrhunskih džudista. Takođe, ispitivan je i uticaj suplementacije molekularnim vodonikom u toku jedne trenажne epizode na bazalne vrednosti parametara acido bazne ravnoteže kod vrhunskih džudistkinja. Iako postoje brojna eksperimentalna i klinička istraživanja o molekularnom vodoniku, neophodno je podesiti uslove u kojima bi molekularni vodonik ispoljio svoje maksimalno delovanje i u sportu.

3. PROBLEM, PREDMET I CILJ RADA

Problem istraživanja: Efekti molekularnog vodonika na antioksidativni status vrhunskih džudista.

Predmet istraživanja: Praćenje i analiza markera oksidativnog stresa kod džudista.

Ciljevi istraživanja:

- Ispitati uticaj suplementacije molekularnim vodonikom u toku 12 nedelja na bazalne vrednosti parametara oksidativnog stresa kod vrhunskih džudista.
- Ispitati uticaj suplementacije molekularnim vodonikom u toku jedne trenajne epizode na bazalne vrednosti parametara acido bazne ravnoteže kod vrhunskih džudistkinja.

4. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Na osnovu problema, predmeta i postavljenih ciljeva aktuelnog istraživanja, kao i ranijih istraživanja koja su se bavila sličnom problematikom izvedena je GENERALNA HIPOTEZA:

Hg – Pojaviće se statistički značajne razlike u antioksidativnom statusu kod vrhunskih džudista pod uticajem suplementacije molekularnim vodonikom tokom 12 nedelja.

Na temelju definisane hipoteze istraživanja formulisana je i pojedinačna hipoteza:

H1 – Pojaviće se statistički značajne razlike u acido baznoj ravnoteži kod vrhunskih džudistkinja pod uticajem suplementacije molekularnim vodonikom u toku jedne trenažne epizode.

5. MATERIJAL I METODE ISTRAŽIVANJA

5.1. Uzorak ispitanika

Uzorak ispitanika činilo je 12 ispitanika (džudista) muškog pola iz Novog Sada, starosti od 19 do 27 godina. Na navedenom uzorku ispitan je uticaj suplementacije molekularnim vodonikom u toku 12 nedelja na bazalne vrednosti parametara oksidativnog stresa. U drugom delu istraživanja uzorak ispitanica činilo je 8 džudistkinja. Na navedenom uzorku ispitan je uticaj suplementacije molekularnim vodonikom u toku trenažne epizode na bazalne vrednosti parametara acido bazne ravnoteže.

Testirani ispitanici u obe studije podvrgnuti su tokom zadnje 4 godine trenažnom tretmanu od minimum 10 sati nedeljno. Svi ispitanici su informisani o zahtevima studije i dali su svoju saglasnost prilikom pristupanja istraživanju. Pre pristupanja istraživanju obavljen je detaljan medicinski pregled prilikom koga je utvrđeno da su svi ispitanici nepušači u odličnom zdravstvenom stanju, bez oboljenja kardiovaskularnog, respiratornog i endokrinog sistema. Ispitanici koji su uključeni u studiju nisu koristili lekove ili suplemente koji utiču na redoks status organizma, najmanje tri meseca pre početka i tokom trajanja studije.

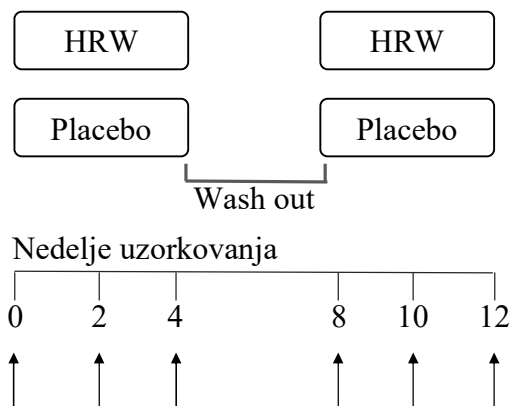
5.2. Eksperimentalni dizajn

Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji. Ispitanici su bili detaljno obavešteni o samoj proceduri studije, potencijalnim rizicima učešća u studiji, kao i o obavezama učešća i mogućnostima povlačenja iz studije u svakom trenutku. Od ispitanika se tražio pristanak za dobrovoljno učešće u studiji. Uticaj aktivnog bavljenja sportom na nivo oksidativnog stresa ispitan je poređenjem parametara oksidativnog stresa i anitoksidativne zaštite vrhunskih džudista.

Na homogenoj grupi od 12 džudista ispitan je uticaj suplementacije sa vodom obogaćenom molekularnim vodonikom (HRW) na parametre oksidativnog stresa i anitoksidativne zaštite u toku 12 nedelja. Eksperimentalni tretman odvijao se u dve faze. U prvoj fazi ispitanici eksperimentalne grupe (N=6) su bili suplementirani sa molekularnim vodonikom u trajanju od 28 dana, dok je kontrolna grupa (N=6) koristila placebo. Tokom studije, treneri su na svakom treningu davali sportistima HRW ili placebo 30 minuta pre treninga. Nakon suplementacije ispitanici su imali „Washout“ period (period u kojem ispitanici nemaju tretman, a

efekti prethodnog tretmana se eliminišu ili minimiziraju) u trajanju od 28 dana koji je primenjivan u cilju minimiziranja efekata suplementacije.

Nakon „Washout“ perioda ponovljen je identičan protokol na ispitanicima u trajanju od 28 dana.

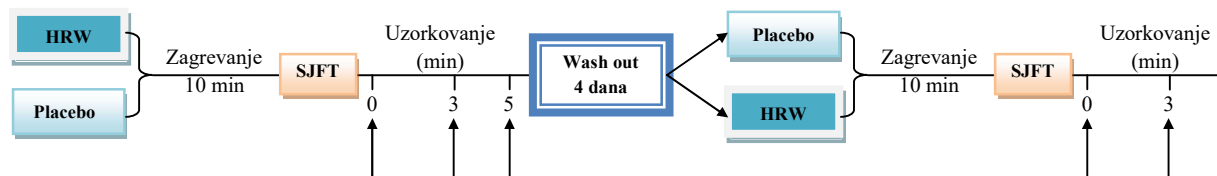


Šema 1. Eksperimentalni tretman i uzorkovanje obe grupe džudista

Uzorci krvi uzimani su iz prednje kubitalne vene. Uzimanje uzoraka krvi sprovodilo se na sledeći način: pre započinjanja trenažnog tretmana prvi uzorci krvi uzimani su ujutru između 7 i 8 sati, 10 sati od poslednjeg obroka.

Sledeće uzorkovanje je vršeno nakon 14 dana trenažnog tretmana i suplementacije vodom bogatom molekularnim vodonikom ili placebo, kao i nakon 28 dana trenažnog tretmana. Nakon „Washout“ perioda, odnosno pre početka nove trenažne faze uzorkovanje je ponovljeno na prethodno opisan način. U toku eksperimentalnog tretmana sportisti su trenirali minimum 10 sati nedeljno.

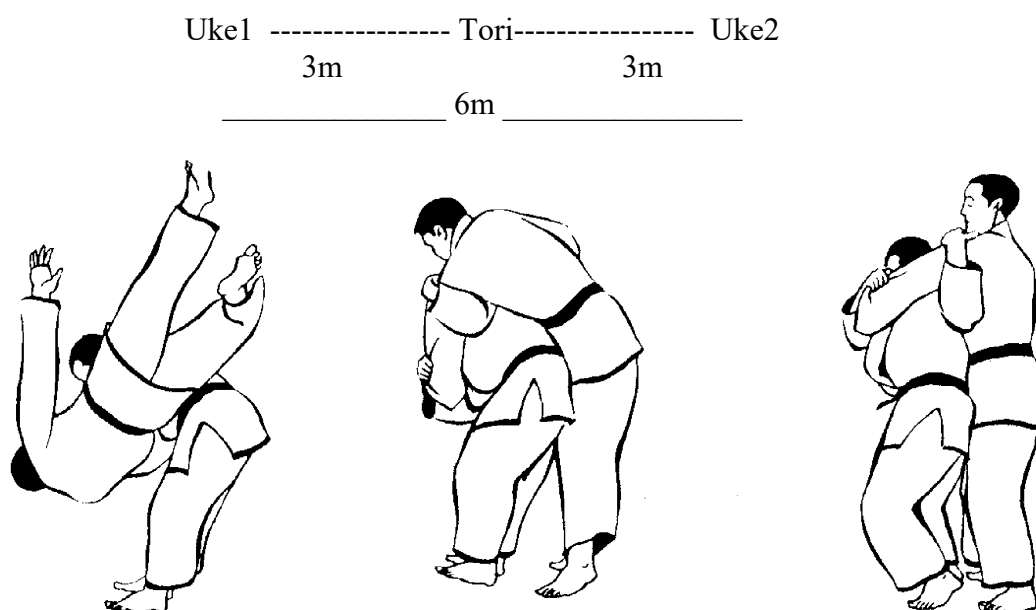
U drugoj fazi eksperimentalnog tretmana ispitivani su akutni efekti suplementacije molekularnim vodonikom na acido baznu ravnotežu vrhunskih džudiskinja. U ovoj fazi randomizirane, dvostruko slepo, placebo kontrolisane studije ispitanice eksperimentalne grupe (N=4) su suplementirane sa molekularnim vodonikom, dok je kontrolna grupa (N=4) koristila placebo. Nakon suplementacije ispitanice su imale „Washout“ period u trajanju od 4 dana, a zatim je ponovljen identičan protokol na ispitanicama pri čemu su ispitanice eksperimentalne grupe (N=4) koristile placebo, dok je kontrolna grupa (N=4) suplementirana sa molekularnim vodonikom. Tokom studije, treneri su na svakom treningu davali sportistima HRW (4g) ili placebo 30 minuta pre izvođenja SJFT. Uzorci krvi uzimani su iz prednje kubitalne vene. Prvo uzorkovanje je vršeno pre započinjanja trenažnog tretmana, 3 i 5 minuta nakon završenog SJFT. Uzorkovanje je vršeno na terenu u jutarnjim časovima, minimum 10 sati od poslednjeg obroka.



Šema 2. Eksperimentalni tretman i uzorkovanje džudistkinja

5.3. Specifični džudo fitness džudo (SJFT)

Za procenu specifične anaerobne radne sposobnosti u ovom istraživanju primenjen je test SJFT. Ovaj test je predložen od strane Sterkoviča (1995) i njegove metrijske karakteristike proverene su na Krakovskoj akademiji fizičke kulture. Test se izvodi na tatamiju i za njegovo izvođenje potrebna su trojica džudista iste težinske kategorije. Džudisti su odeveni u kimono. Testirani džudista se nalazi u sredini, a sparing partneri se nalaze u radijusu od tri metra od njega (šema. 1).



Šema 3. Specifični džudo fitness džudo

Na komandu „Hadžime“ ispitanik počinje da baca svoje partnere tehnikom Ipon-seoi-nage u tri serije: prva serija traje 15 sekundi (A) a druga (B) i treća (C) po 30 sekundi.

Pauze između serija su 10 sekundi. Bacanja se moraju izvoditi u maksimalnom tempu i tehnički ispravno. Srčana frekvencija se pomoću polara prati tokom izvođenja testa a za ovaj test je bitna frekvencija na kraju testa (P_1) i nakon jednog minuta (P_2). Nakon toga se izračunava indeks testa pomoću formule:

$$\text{Index} = (P_1 + P_2) / N$$

gde je N – ukupan broj bacanja. Što je manji indeks, to je bolja ocena.

5.4. Protokol

Biohemijsko hematološki pokazatelji i parametri oksidativnog stresa određeni su na Prirodno matematičkom fakultetu – Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine i u poliklinici sa laboratorijom "EUROLAB" u Novom Sadu. Biohemijski parametri su određeni rutinski, primenom standardnih metoda na automatskom analizatoru Ilab 300sa reagensima proizvođača Biosystems S.A.

Osnovni biohemijski i hematološki parametri koji su određivani:

- Kreatin kinaza (CK)
- Gama glutamil transpeptidaza (GGT)
- Kompletna krvna slika: broj leukocita, eritrocita, trombocita, hemoglobin (Hb), hematokrit (Hct), prosečna zapremina eritrocita (eng. mean cell volume-MCV), prosečni sadržaj hemoglobina u eritrocitu (eng. mean cell hemoglobin-MCH), prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (eng. mean cell hemoglobin concentration-MCHC)
- pH krvi
- bikarbonati

Stepen oksidativnog stresa određen je ispitivanjem sledećih prooksidativnih i antioksidativnih parametara u prikupljenim uzorcima krvi eksperimentalne i kontrolne grupe:

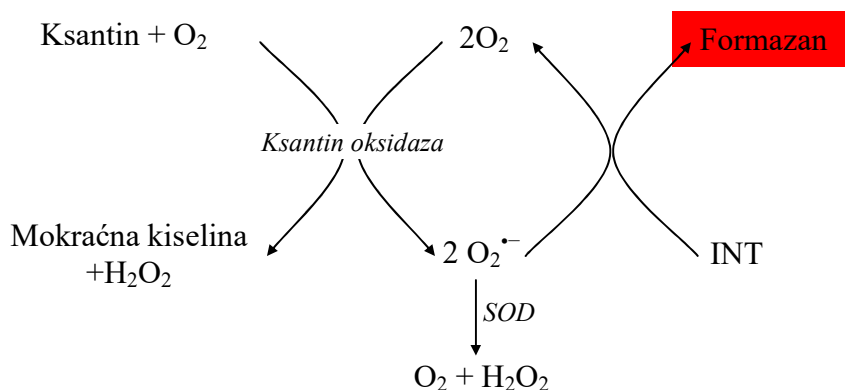
- Superoksid dismutaza (SOD)
- Katalaza (CAT)
- Glutation peroksidaza (GSHPx)
- Glutation (GSH)
- Malondialdehid (MDA)

5.5. Metode analize

5.5.1. Određivanje parametara oksidativnog stresa

5.5.1.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

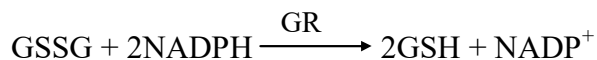
Aktivnost SOD je određena prema metodi Podczasy i Wei (1998). Za određivanje aktivnosti ovog enzima korišćeni su komercijalni Reagensi Biorex (biorex Diagnostics Limited, United Kingdom). Hemolizat: puna krv razblažena je sa destilovanom vodom u odnosu 1+3 (0,25). Ksantin u reakciji sa ksantin oksidazom generiše superoksidni anjon radikal koji reaguje sa hromogenom INT. hloridom (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium hlorid) formirajući crveno obojeni formazan. Enzim SOD iz uzorka deluje na superoksid anjon radikal u konkurentskoj reakciji formirajući kiseonik O_2 i vodu, tako da je inhibicija formiranja formazana proporcionalna aktivnosti SOD-1 u uzorku. Očitavanje se vrši na 505 nm (filterfotometar Prime). Jedinica aktivnosti enzima U definiše se kao količina enzima potrebna za disproporciju 50% superoksid radikala. Aktivnost se izražava se kao U/g Hb, pri čemu je referentni interval 1102-1601 U/gHb.



Slika 6. *Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze*

5.5.1.2. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze (GSH-Px)

Aktivnost glutation peroksidaze određivana je modifikovanom metodom Paglia i Valentine (1967) sa kumen hidroperoksidom kao supstratom. Biorex kit (biorex Diagnostics Limited, United Kingdom) je korišćen za kvantitativno određivanje ukupne glutation peroksidaze (GSH-Px). Glutation peroksidaza katališe oksidaciju redukovanog glutationa sa supstratom kumenhidroperoksidom. U prisustvu glutation reduktaze (GR) oksidisani glutation reaguje sa NADPH i redukuje se a koenzim NADPH se oksidiše do NADP⁺. Meri se pad apsorbance na 340nm, odnosno oksidacija NADPH u NADP⁺. Merenje se vrši na talasnoj dužini 340 nm na spektrofotometru *Agilent 8453*. Aktivnost enzima se izražava kao broj enzimskih jedinica (U) na gram Hb U/g Hb, pri čemu je referentni interval 27,5-73 U/gHb.

**5.5.1.3. Određivanje aktivnosti katalaze (CAT)**

Katalaza je određena metodom po Aebi-ju (1984) sa sa vodonik peroksidom. Princip metode se zasniva na praćenju razlaganja vodonik peroksida merenjem apsorbance na 240nm . Postupak: Promešaju se epruvete sa smešom uzorka i rastvora vodonik peroksida na Vortexu, inkubiraju se 10 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga, reakcija se stopira potapanjem epruveta u vrelu vodu na 90°C 10 sec.

Centrifugira se na 3000 obrtaja/min 10 minuta i prati ekstinkcija dobijenog supernatanta na talasnoj dužini $\lambda = 240$ nm (UV oblast) na spektrofotometru *Agilent 8453* 3 minuta u intervalima od 60 sekundi. Očitavanje ekstinkcija dobijenog supernatanta na talasnoj dužini $\lambda = 240$ nm (UV oblast) je izvršeno na spektrofotometru *Agilent 8453*. Jedinice su nmol/mg Hb/min ili U/g Hb.

5.5.1.4. Određivanje lipidne peroksidacije

Intenzitet lipidne peroksidacije (LP) se određuje merenjem koncentracije malonilaldehida (MDA), krajnjeg produkta razgradnje kratkolančanih lipida, produkta LP (Buege i Aust, 1978). Metoda merenja zasnovana je na reakciji MDA i tiobarbiturne kiseline (rastvor Činidle) i poznata je i kao TBA-RS test (Tiobarbiturna reactive substance test). Ekstinkcija jedinjenja nastalog reakcijom MDA i tiobarbiturne kiseline se nakon inkubacije očitava na talasnoj dužini $\lambda=535\text{nm}$ na UV filter fotometru *Prime*. Intenzitet lipidne peroksidacije se izražava u pmol/mg Hb. Jedinice su prilagođene redu veličine vrednosti.

5.5.1.5. Određivanje redukovanog glutationa (GSH)

Redukovani oblik glutationa je određen spektrofotometrijski na talasnoj dužini 412 nm. Reakcija je zasnovana na reakciji slobodnih sulfhidrilnih grupa –SH redukovane forme glutationa sa Elmanovim reagensom (rastvor 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoeve kiseline))(Ellman, 1959). U reakciji dolazi do formiranja žuto obojenog adukta 2-nitro-5-merkaptobenzoata, čija koncentracija se određuje merenjem apsorbance na 412 nm na UV filter fotometru *Prime*. Sadržaj glutationa se izražava u nmol/mg Hb.

5.5.2. Određivanje pH vrednosti

Merenja pH vrednosti urađena su pomoću Metrohm 744 pH metra sa digitalnim termostatom (Slika 5). Zapremina uzorka za analizu je iznosila 5 cm^3 , pri čemu je staklena elektroda uranjana u rastvor koji je bio pod termostatiranim uslovima uz konstantno mešanje, kako bi se onemogućilo stvaranje stacionarnog sloja uz elektrodu. Tačnost izmerenih rezultata je $\pm 0,01$ pH jedinica.



Slika 7. Metrohm 744 pH metar sa digitalnim termostatom

5.6. Metode obrade podataka

Za sve varijable izračunati su osnovni deskriptivni statistici, aritmetička sredina (AS) i standardna devijacija (SD), posebno za eksperimentalnu i kontrolnu grupu. Normalnost distribucije podataka testirana je primenom Shapiro-Wilk (SW) testa koji je referentan za male homogene uzorke. Efekti primenjenih tretmana suplementom testirani su primenom Dvofaktorske analize varijanse za ponovljena merenja. U okviru ove analize utvrđen je ukupni efekat promena vrednosti varijabli u vremenu (faktor vreme) i ukupni efekat promena razlike između eksperimentalne i kontrolne grupe (interakcija faktora vreme i grupa). Pored toga, testirana je značajnost razlika između pojedinih tačaka merenja, kako bi se utvrdila dinamika promena pod uticajem eksperimentalnog tretmana. Značajnost efekta promena i razlika procenjena je na osnovu vrednosti eta kvadrata po kriterijumu Koena (Cohen, 1988) prema kome: do 0,01 nema efekta, od 0,01-0,06 mali efekat, od 0,06 – 0,14 srednji efekat i preko 0,14 veliki efekat. Pored statističke analize urađena je i uporedna grafička analiza prosečnih vrednosti analiziranih grupa, koja je poslužila za zaključivanje u vezi trenda promena u toku tretmana. Značajnost razlike između pojedinih tačaka merenja za analizirane grupe testirana je primenom t testa za zavisne uzorke. Razlike između grupa za indikatore krvne slike na inicijalnom i finalnom merenju, testirane su primenom t testa za nezavisne uzorke. Za sve primenjene testove alfa nivo statističke značajnosti određen je na $p < 0,05$. Statističke analize su urađene u programskom paketu IBM SPSS 20.0 (SPSS ID: 729225).

6. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

6.1. Alteracije biomarkera oksidativnog stresa kod vrhunskih džudista nakon suplementacije molekularnim vodonikom

U ovom delu istraživanja na homogenoj grupi od 12 džudista ispitivan je uticaj suplementacije sa HRW na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite u toku 12 nedelja. U prvoj fazi suplementacije ispitanici eksperimentalne grupe (N=6) su bili suplementirani sa molekularnim vodonikom u trajanju od 28 dana, dok je kontrolna grupa (N=6) koristila placebo. Nakon suplementacije ispitanici su imali „*Washout*“ period u trajanju od 28 dana koji je primenjivan u cilju minimiziranja efekata suplementacije. Nakon „*Washout*“ perioda ponovljen je identičan protokol na ispitanicima u trajanju od 28 dana.

U varijablama za procenu biomarkera oksidativnog stresa, aktivnosti antioksidantnih enzima SOD, GSHPx, CAT i sadržaja MDA i GSH, nije zabeleženo statistički značajno odstupanje distribucije rezultata u obe analizirane grupe, obzirom da su sve vrednosti Shapiro-Wilk testa iznad granične vrednosti značajnosti. U oba ciklusa primene suplementacije zabeležena je visoka homogenost rezultata u obe grupe ispitanika. Može se zapaziti da su kod kontrolne grupe rezultati dosta ujednačeni, malo variraju tokom vremena, dok su kod eksperimentalne grupe vidljive promene u sukcesivnim tačkama merenja.

U krvnom serumu ispitanika određivane su: aktivnosti GGT i CK i sadržaj bikarbonata pri čemu nije zabeleženo statistički značajno odstupanje distribucije rezultata u obe analizirane grupe (Tabela 2). Nešto veća odstupanja se mogu zapaziti kod distribucije rezultata dobijenih na trećem merenju (nakon 28 dana). U oba ciklusa primene suplementacije zabeležena je visoka homogenost rezultata kod obe grupe ispitanika.

Tabela 2. Promene u biohemijskim parametrima i biomarkerima oksidativnog stresa kod vrhunskih džudista

	Grupa	Prvi tretman				Drugi tretman			
		1	2	3	p	1	2	3	p
SOD (U/g Hb)	Plac	1340,50±187,89	1322,67±171,81	1345,67±146,73	0,622	1321,17±200,64	1320,00±181,10	1312,67±198,22	0,835
	HRW	1255,67±171,91	1321,17±147,61	1397,17±144,36	0,006	1281,50±159,57	1341,67±166,02	1423,00±119,59	0,009
GSHPx (U/g Hb)	Plac	46,00±13,28	46,83±13,23	43,17±16,28	0,581	42,50±8,24	42,83±11,72	40,33±13,98	0,655
	HRW	47,33±15,16	43,83±11,21	32,67±9,73	0,011	47,33±16,67	47,00±17,78	45,17±21,92	0,604
CAT (U/g Hb)	Plac	30,27±7,40	32,28±13,05	25,55±6,54	0,185	29,23±6,57	27,13±3,90	26,20±4,33	0,179
	HRW	29,37±8,70	29,62±5,42	28,62±9,97	0,911	27,25±7,32	28,80±7,72	28,57±6,22	0,498
MDA (pmol/mg Hb)	Plac	32,72±5,17	31,48±6,75	36,55±8,99	0,121	31,03±1,95	29,28±3,74	31,13±5,42	0,315
	HRW	37,52±3,68	32,40±7,36	27,85±4,59	0,002	30,57±5,27	28,33±6,40	25,12±4,59	0,000
GSH (nmol/mg Hb)	Plac	22,17±6,48	20,88±7,00	21,28±4,54	0,744	21,30±5,69	21,15±6,43	21,77±5,71	0,904
	HRW	22,87±7,63	25,73±7,15	30,90±7,02	0,000	23,93±10,85	24,38±9,40	29,47±8,93	0,010
GGT (U/L)	Plac	18,17±4,79	21,50±10,82	22,17±16,57	0,543	20,50±5,86	20,83±9,28	22,67±11,78	0,730
	HRW	22,67±3,50	24,67±4,46	23,50±3,02	0,523	20,83±7,22	20,67±3,93	24,00±4,43	0,156
CK (U/L)	Plac	371,67±163,81	434,17±235,83	383,50±314,38	0,708	359,00±166,15	277,00±120,15	333,83±225,07	0,532
	HRW	404,67±202,60	316,00±139,39	279,83±100,45	0,325	290,00±113,13	268,00±202,58	293,83±131,76	0,824
Bikarbonati (mmol/L)	Plac	20,87±1,56	18,12±0,99	16,17±0,63	0,000	19,35±2,11	17,31±1,71	15,10±1,14	0,000
	HRW	20,80±1,08	21,20±1,16	22,85±1,01	0,000	20,73±1,13	20,26±3,04	22,13±3,02	0,110
MCV (fl)	Plac	91,63±4,07	90,75±4,59	90,88±3,87	0,300	86,77±2,34	89,08±2,45	90,62±3,01	0,007
	HRW	90,43±3,15	89,43±3,45	92,42±3,59	0,103	85,65±4,63	88,17±3,07	89,05±4,84	0,042
MCH (pg)	Plac	31,42±2,05	30,93±1,83	30,23±1,14	0,053	29,90±1,00	29,63±0,71	29,77±0,65	0,610
	HRW	31,23±1,01	30,52±1,25	31,30±1,53	0,225	29,05±1,34	29,25±1,65	29,10±1,60	0,625
MCHC (g/L)	Plac	342,83±13,99	341,83±9,75	330,50±7,64	0,040	340,83±13,57	332,33±1,97	325,00±2,76	0,059
	HRW	345,17±2,79	341,50±6,35	335,33±10,33	0,081	337,50±13,79	332,50±8,87	334,00±19,82	0,710
Leukociti (10 ⁹ /L)	Plac	5,80±1,03	5,68±1,22	4,95±0,79	0,174	6,25±1,64	6,63±1,85	7,13±1,78	0,487
	HRW	5,72±1,53	5,58±1,29	5,52±1,27	0,813	5,53±1,41	5,68±1,48	6,18±1,28	0,039
Eritrociti (10 ¹² /L)	Plac	5,04±0,27	5,01±0,23	4,87±0,24	0,083	4,72±0,29	4,98±0,36	5,10±0,26	0,026
	HRW	5,06±0,33	5,02±0,24	4,94±0,26	0,463	4,96±0,38	5,32±0,44	5,40±0,55	0,024
Hb (g/L)	Plac	158,00±9,51	154,83±8,89	146,00±7,35	0,000	144,33±8,64	149,50±8,85	153,83±9,45	0,086
	HRW	158,17±7,78	152,83±4,45	152,50±7,64	0,079	143,67±12,11	153,83±10,74	153,00±10,02	0,074
Hct (L/L)	Plac	0,46±0,02	0,45±0,01	0,44±0,02	0,067	0,42±0,03	0,45±0,04	0,46±0,03	0,103
	HRW	0,46±0,03	0,45±0,01	0,44±0,02	0,213	0,42±0,04	0,45±0,02	0,45±0,03	0,218
Trombociti (10 ⁹ /L)	Plac	219,67±31,63	220,83±43,25	210,83±30,75	0,272	246,83±44,68	236,83±57,53	241,50±57,39	0,653
	HRW	245,33±48,24	248,33±44,70	223,00±36,29	0,045	244,50±47,42	236,17±45,99	227,33±40,78	0,185

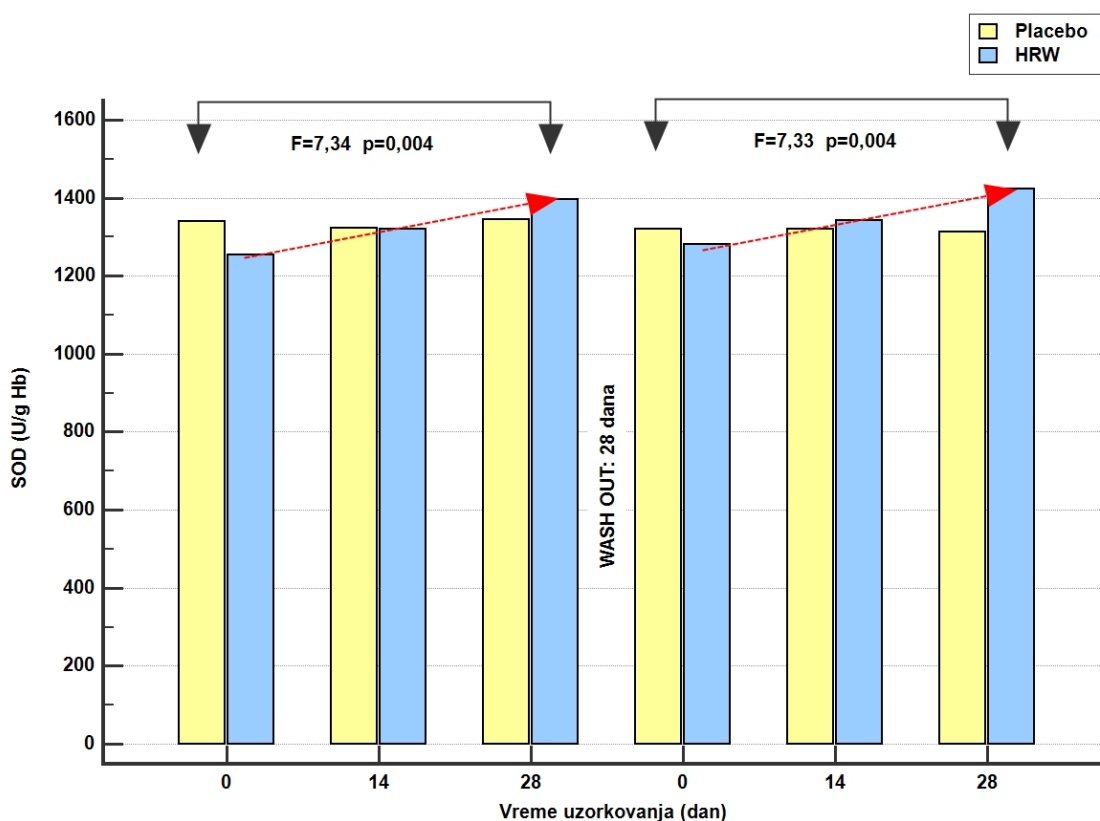
U svim varijablama za procenu krvne slike ispitanika nije zabeleženo statistički značajno odstupanje distribucije rezultata u obe analizirane grupe. U oba ciklusa primene suplementacije zabeležena je visoka homogenost rezultata kod obe grupe ispitanika. Može se zapaziti da kod obe analizirane grupe ispitanika postoje male varijacije u rezultatima, te da nisu primetne veće razlike između eksperimentalne i kontrolne grupe (Tabela 2).

6.1.1. Efekti eksperimentalnih tretmana na antioksidante

6.1.1.1 Superoksid dismutaza (SOD)

Kod varijable SOD u oba ciklusa primene suplementa dobijen je statistički značajan ukupni efekat promena u vremenu, kao i ukupni efekat interakcije faktora vreme i grupa. U oba slučaja radi se o visokim efektima po kriterijumu Koena (Cohen, 1998), pošto su vrednosti Eta^2 značajno iznad granice visokog efekta (0,14).

Na grafikonu 1 može se uočiti da su dobijeni efekti rezultat promena koje su se javile kod eksperimentalne (HRW) grupe. U oba tretmana suplementacije sa molekularnim vodonikom promene kod eksperimentalne grupe su uočljive i gotovo istovetne, u smeru povećanja prosečne vrednosti. Kod kontrolne (Placebo) grupe ispitanika promene prosečne vrednosti aktivnosti SOD su neznatne i nemaju neku pravilnost.



Grafikon 1. Uporedni prikaz prosečnih vrednosti aktivnosti SOD kod analiziranih grupa

U prvom tretmanu suplementacije najveći efekat promena aktivnosti SOD javio se četvrtoj nedelji primene suplementacije, dok je efekat razlike između grupa statistički značajan

posle druge nedelje primene suplementa. Međutim, vrednosti Eta^2 u svim merenjima su iznad granice visokog efekta po kriterijumu Koena, mada ne i previše visoke.

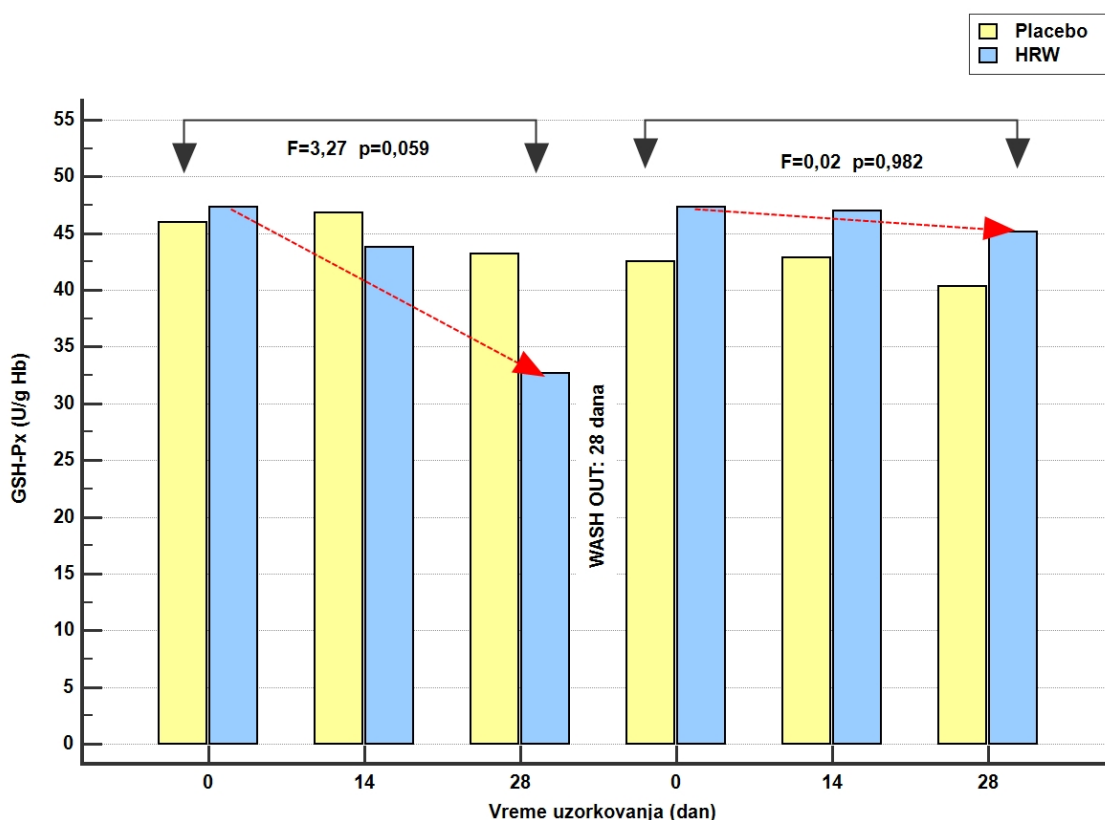
U drugom ciklusu suplementacije nakon wash-out perioda statistički značajan efekat razlika promena u grupama se zapaža na kraju tretmana. Nešto slabiji ukupni efekat promena je zabeležen verovatno zbog opadanja aktivnosti SOD u kontrolnoj grupi što se može videti na grafikonu 1. Obzirom da su gotovo sve vrednosti Eta^2 u zoni visokog efekta po kriterijumu Koena, može se reći da je i u drugom ciklusu primene suplementacije postignuta značajna promena aktivnosti SOD kod eksperimentalne grupe.

Između primenjenih tretmana nema statistički značajne razlike u ukupnom efektu promena i interakcije tretmana i analiziranih grupa. Oba tretmana suplementacije dala su vidne efekte na aktivnost SOD. To potvrđuju i rezultati t testa za zavisne uzorke, gde su dobijeni rezultati pokazali da su kod eksperimentalne grupe u oba ciklusa primene suplementacije dobijene statistički značajne promene aktivnosti SOD ($t_1=-4,26$ $p=0,008$; $t_2=-3,60$ $p=0,016$).

Testiranje razlika između dva tretmana, nakon perioda oporavka, pokazalo je da se kod kontrolne grupe nisu desile značajnije promene, dok je kod eksperimentalne grupe zabeležena statistički značajna promena. Vrednost aktivnosti SOD na početku drugog eksperimentalnog tretmana je bila značajno niža nego na kraju prvog tretmana. Međutim, na grafikonu se može uočiti da je ta vrednost bila veća nego na početku prvog tretmana (za 25,8U/gHb).

6.1.1.2. Glutation peroksidaza (GSHPx)

Kod enzima GSHPx u prvom tretmanu suplementacije sa HRW dobijen je statistički značajan ukupni efekat promena u vremenu i ukupni efekat interakcije faktora vreme i grupa. Kod ukupne promene u vremenu dobijena je visoka statistička značajnost, dok je kod razlika u efektu promena kod analiziranih grupa statistička značajnost na granici prihvatljive ($p=0,059$). Ipak, vrednost Eta^2 je iznad granice visokog efekta po kriterijumu Koena. U drugom eksperimentalnom tretmanu oralnog unosa HRW u trajanju od 28 dana nisu uočene statistički značajne promene kod analizirane grupe sportista.



Grafikon 2. Uporedni prikaz prosečnih vrednosti aktivnosti GSHPx kod analiziranih grupa

U prvom eksperimentalnom tretmanu u trajanju od 28 dana uočava se izuzetno veliki efekat promena u četvrtoj nedelji primene HRW, kada je došlo do statistički značajnog pada aktivnosti GSHPx u grupi koja je primala suplement. U toj nedelji je došlo i do statistički značajne razlike između placebo i suplement grupe ispitanika.

U drugom tretmanu suplementom došlo je do blagog opadanja aktivnosti GSHPx kod obe analizirane grupe, ali te promene nisu statistički značajne.

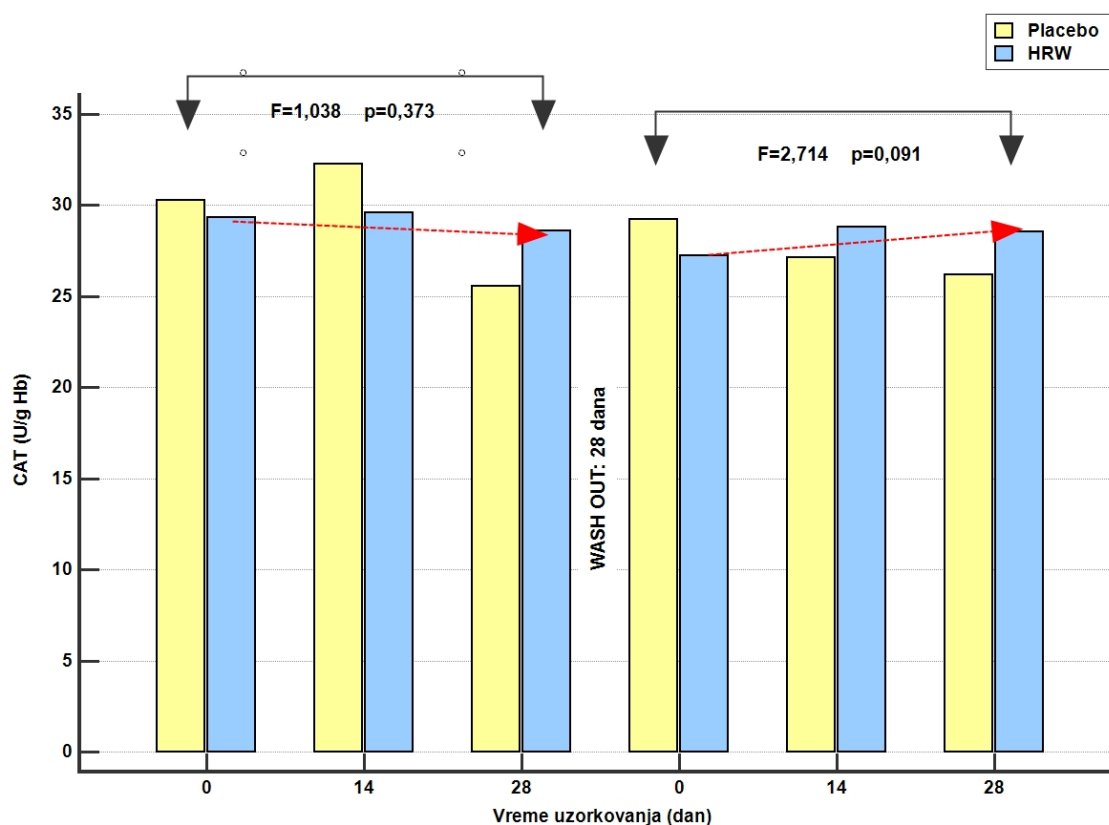
Testiranje razlika između primenjenih tretmana pokazalo je da postoje statistički značajne razlike u ukupnom efektu interakcije tretmana i analiziranih grupa. Prvi tretman suplementacije dao je vidni ukupni efekat na aktivnost GSHPx.

Rezultat t testa za zavisne uzorke, pokazao je da je kod eksperimentalne grupe došlo do statistički značajne promene aktivnosti GSHPx na početku drugog tretmana u odnosu na krajnju prosečnu vrednost u prvom tretmanu (za 14,66 U/gHb). Nakon *washout* perioda prosečne

vrednosti aktivnosti GSHPx na početku drugog eksperimentalnog tretmana su bile približne inicijalnim vrednostima prvog eksperimentalnog tretmana.

6.1.1.3. Katalaza (CAT)

Nisu zabeležene statistički značajne promene u aktivnosti CAT kod suplementirane grupe sportista u oba eksperimentalna tretmana. Nešto veći efekat razlika između analiziranih grupa je dobijen u drugom tretmanu suplementacije ($\text{Eta}^2=0,213$), mada ni te promene nisu statistički značajne. Takođe, u četvrtoj nedelji prvog ciklusa primene suplementa kod eksperimentalne grupe zabeležen je značajniji pad aktivnosti CAT.

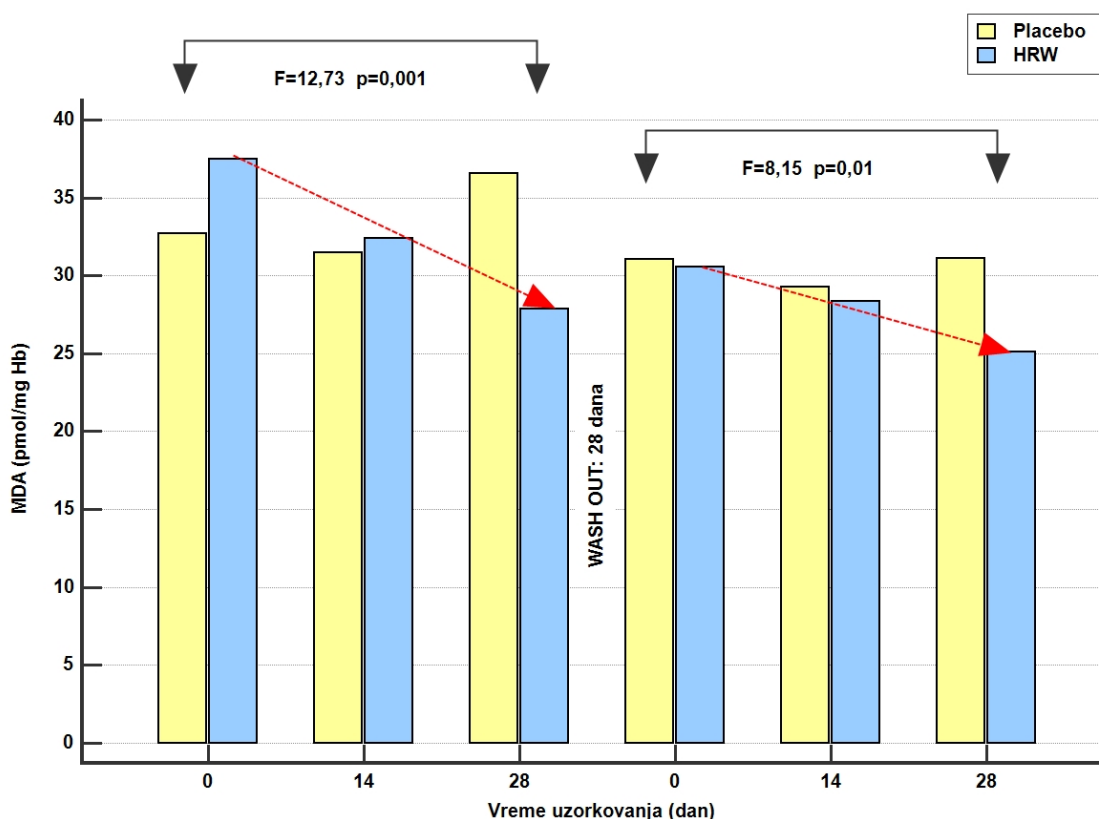


Grafikon 3. Upporedni prikaz prosečnih vrednosti aktivnosti CAT kod analiziranih grupa

Analiza razlika između dva tretmana suplementom nije pokazala statističku značajnost. Isto tako, nisu zabeležene statistički značajne razlike između završne vrednosti prvog tretmana i početne vrednosti drugog tretmana suplementacije kod obe grupe.

6.1.1.4. Malondialdehid (MDA)

Kod varijable MDA u oba eksperimentalna tretmana primene HRW dobijeni su značajni efekti promena u vremenu, a posebno u drugom tretmanu gde su ti efekti i visoko statistički značajni. U prvom ciklusu tretman je proizveo vidni ukupni efekat promena ali nije prešao nivo statističke značajnosti. Ukupni efekat razlika između placebo i suplement grupe je u oba ciklusa primene suplementacije pokazao visok i statistički značajan nivo.



Grafikon 4. Uporedni prikaz aritmetičkih sredina sadržaja MDA kod analiziranih grupa

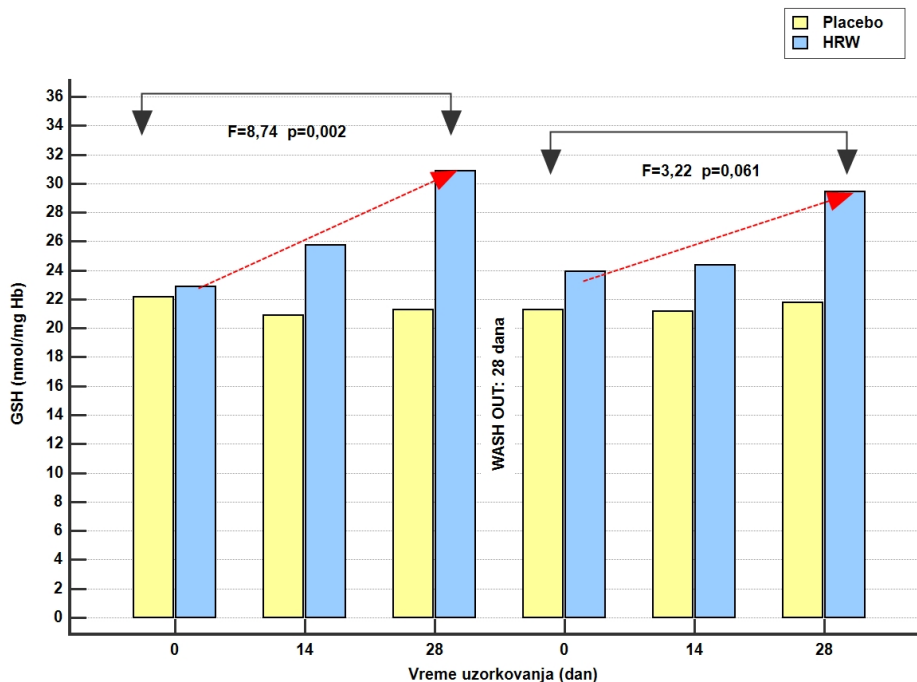
Analiza ukupnog efekta tretmana između pojedinih merenja, pokazala je visok i statistički značajan nivo efekta u drugoj nedelji primene suplementacije kod oba tretmana, kada je kod obe grupe zabeležen pad količine MDA. Međutim, efekat razlika između grupa je statističku značajnost dostigao tek na kraju oba tretmana. Tada je prosečna vrednost sadržaja MDA kod suplement grupe opala, dok se istovremeno kod placebo grupe, posle početnog opadanja vrednosti, povećala.

Analiza razlika između dva primenjena tretmana pokazala je da je ukupni efekat promena statistički značajan, što ukazuje na razlike u efektu primenjenih tretmana. Na grafikonu 4 može se jasno uočiti da su promene u sadržaju MDA kod suplement grupe veće u prvom tretmanu suplementacije. Razlika između placebo i suplement grupe nije bila statistički značajna, pre svega zbog različitih smerova promene sadržaja MDA kod ove dve grupe. Dok je kod suplement grupe u oba tretmana jasan trend opadanja sadržaja MDA, kod placebo grupe je u prvoj nedelji tretmana zabeležen blagi pad a u drugoj porast te vrednosti (Grafikon 4).

Testiranje razlike između završne vrednosti prvog i početne vrednosti drugog tretmana nije pokazalo statističku značajnost. Kod suplement grupe ta je razlika veća i blizu je statistički značajnog nivoa.

6.1.1.5. Glutation (GSH)

Kod varijable GSH ukupni efekti promena u vremenu i razlika između grupa statistički su značajni za prvi tretman suplementacije.



Grafikon 5. Uporedni prikaz prosečnih vrednosti sadržaja GSH kod analiziranih grupa

Posebno je uočljiv veoma visok efekat interakcije faktora vreme i grupa, što ukazuje na razlike u promenama koje su se desile kod analiziranih grupa. Pod uticajem suplementa kod grupe koja ga je unosila došlo je do vidnog rasta prosečne vrednosti sadržaja GSH, dok kod placebo grupe nisu uočene značajnije promene (Grafikon 5). U drugom eksperimentalnom tretmanu primene HRW ukupne promene su manje izražene ali su statistički značajne, dok efekat razlike između grupa nije pokazao statističku značajnost iako je razlika vidljiva.

Kod oba primenjena tretmana prosečne vrednosti sadržaja GSH su se statistički značajno povećale u četvrtoj nedelji suplementacije. Dok su kod placebo grupe prosečne vrednosti ujednačene u svim tačkama merenja, kod HRW grupe je uočen trend povećanja prosečnih vrednosti sadržaja GSH.

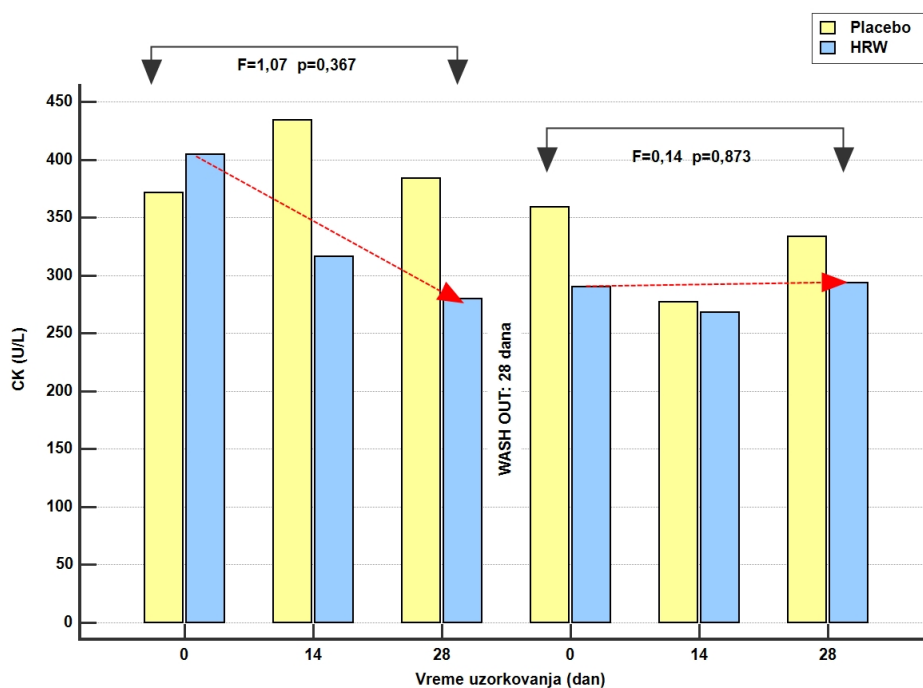
Testiranje razlika između dva primenjena tretmana pokazalo je da te razlike nisu statistički značajne, odnosno da su promene u vremenu veoma slične kod oba tretmana i da je razlika između grupa u vremenu takođe slična. Ispitanici su slično reagovali u oba tretmana u odnosu na sadržaj GSH.

Razlika između završne prosečne vrednosti sadržaja GSH prvog tretmana i prve prosečne vrednosti drugog tretmana statistički je značajna kod suplement grupe. Došlo je do vidnog snižavanja prosečne vrednosti sadržaja GSH, odnosno njenog vraćanja približno na nivo na početku prvog tretmana. Kod placebo grupe ta razlika nije statistički značajna.

6.1.2. Efekti eksperimentalnih tretmana na biohemijske parametre krvi

6.1.2.1. Kreatin kinaza (CK)

Kod varijable CK nisu dobijene statistički značajni efekti ni u jednom od primenjenih tretmana. Jedino se u prvom tretmanu kod interakcije faktora vreme i grupe mogu zapaziti vidljivije promene prosečne vrednosti aktivnosti CK. Na grafikonu 6. se može zapaziti trend opadanja prosečne vrednosti aktivnosti CK u prvom tretmanu kod suplement grupe uz istovremeni porast kod placebo grupe. Takav, različit trend promena uslovio je nizak nivo statističke značajnosti efekta promena kod placebo i HRW grupe.



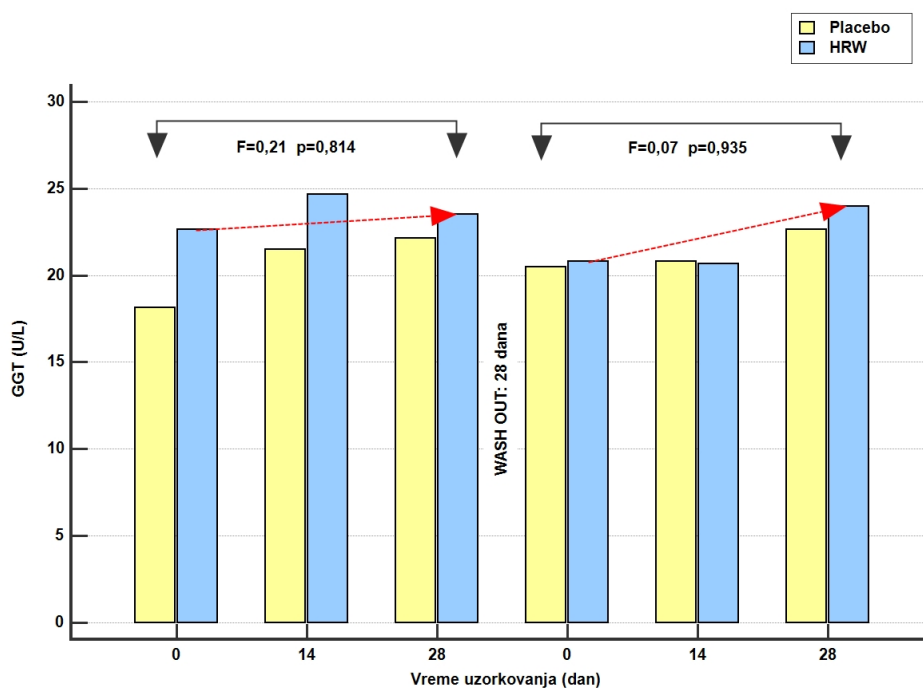
Grafikon 6. Uporedni prikaz aritmetičkih sredina aktivnosti CK kod analiziranih grupa

Testiranje značajnosti promena između pojedinih merenja, pokazalo je da nema statistički značajnih efekata u oba primenjena tretmana. Nešto veći efekat razlika između grupa zabeležen je u prvom eksperimentalnom tretmanu nakon druge nedelje primene suplementa ($\eta^2 = 0,11$). Između dva primenjena tretmana, postoji dosta visoka razlika ukupnog efekata promena ali nije i statistički značajna ($\text{Eta}^2 = 0,20$).

Razlika između završne prosečne vrednosti aktivnosti prvog tretmana i prve prosečne vrednosti drugog tretmana nije statistički značajna kod obe analizirane grupe.

6.1.2.2. Gamaglutamil transferaza (GGT)

Kod varijable GGT nisu dobijeni statistički značajni efekti ni u jednom od primenjenih tretmana. Promene prosečnih vrednosti aktivnosti u toku oba tretmana su male i nemaju vidljive trendove promena (Grafikon 7).



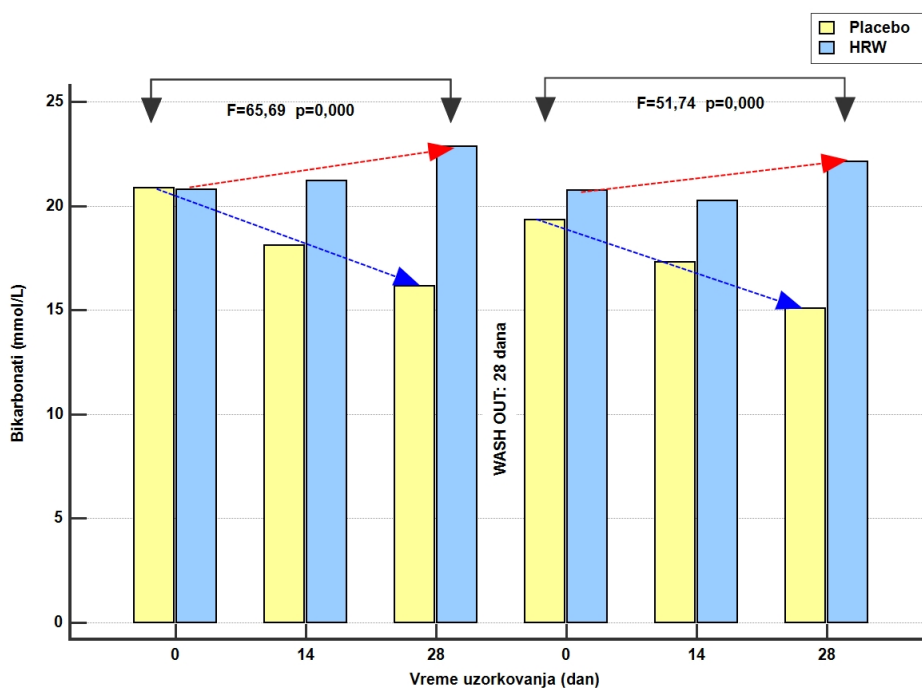
Grafikon 7. Uporedni prikaz aritmetičkih sredina aktivnosti GGT kod analiziranih grupa

Kod promena između pojedinih tačaka merenja dobijena je statistički značajnost jedino kod drugog tretmana u četvrtoj nedelji primene suplementacije.

Kod enzima GGT nisu uočene razlike u efektima primene dva tretmana, kao ni značajne razlike u prosečnim vrednostima aktivnosti GGT na kraju prvog i početku drugog tretmana.

6.1.2.3. Bikarbonati (BKB)

Kod varijable BKB dobijeni su visoki, statistički značajni efekti ukupnih promena i razlika između placebo i suplement grupe ispitanika. Ti su efekti izraženi u oba primenjena tretmana uz gotovo identične promene prosečnih vrednosti koncentracije BKB kod analiziranih grupa. Kod suplement grupe u oba tretmana je došlo do rastakonzentracije BKB, a kod placebo grupe do smanjenja (Grafikon 8).



Grafikon 8. Uporedni prikaz aritmetičkih sredina koncentracije BKB kod analiziranih grupa

U prvom tretmanu efekti razlika su statistički značajni nakon druge i četvrte nedelje primene suplementacije, dok su u drugom tretmanu one izražene u četvrtoj nedelji.

Između primenjenih tretmana nije bilo statistički značajne razlike ali je efekat ukupnih promena kod tretmana dosta visok ($\text{Eta}^2 = 0,23$). Efekat razlika između grupa u tretmanima nije pokazao statističku značajnost.

Kod obe analizirane grupe razlika između krajnje prosečne vrednosti koncentracije prvog tretmana i početne prosečne vrednosti drugog tretmana je statistički značajna. Kod placebo grupe došlo je do povećanja prosečne vrednosti koncentracije BKB a kod suplement grupe do smanjenja te vrednosti.

6.1.3. Efekti eksperimentalnih tretmana na krvnu sliku

Na inicijalnom merenju indikatori krvne slike nisu pokazali statistički značajne razlike između placebo i suplement grupe ispitanika. Kod obe grupe su te vrednosti u granicama referentnih vrednosti.

Na finalnom merenju mogu se uočiti izvesne promene u prosečnim vrednostima analiziranih indikatora krvne slike, ali one nisu velike i ne pokazuju statistički značajnu razliku između placebo i suplement grupe.

Testiranje kvantitativnih razlika između inicijalnog i finalnog merenja analiziranih grupa nakon primenjenih tretmana suplementacije, pokazalo je izvesne promene u prosečnim vrednostima nekih parametara krvne slike. U prvom tretmanu statistički su značajne promene varijable MCH kod placebo grupe, MCHC kod obe grupe i hemoglobina kod placebo grupe, gde su registrovane povišene prosečne vrednosti. U drugom tretmanu statistički su značajne promene varijable MCV uz smanjenje prosečne vrednosti kod obe grupe, MCHC kod placebo grupe uz povećanje prosečne vrednosti, leukocita kod suplement grupe uz smanjenje prosečne vrednosti, eritrocita kod obe grupe uz smanjenje prosečne vrednosti i hemoglobina kod suplement grupe uz smanjenje prosečne vrednosti.

6.2. Akutni efekti suplementacije molekularnim vodonikom na acido baznu ravnotežu vrhunskih džudistkinja

U ovoj fazi studije ispitanice eksperimentalne grupe (N=4) su suplementirane sa molekularnim vodonikom, dok je kontrolna grupa (N=4) koristila placebo. Nakon suplementacije ispitanice su imale „Washout“ period u trajanju od 4 dana, a zatim je ponovljen identičan protokol na ispitanicima pri čemu su ispitanice eksperimentalne grupe (N=4) koristile placebo, dok je kontrolna grupa (N=4) suplementirana sa molekularnim vodonikom. Tokom studije, treneri su na svakom treningu davali sportistima HRW (4g) ili placebo 30 minuta pre izvođenja SJFT.

U Tabeli 3. prikazane su vrednosti SJFT po serijama, pri čemu se može zapaziti da ni u jednoj seriji nije došlo do statistički značajnih razlika između grupa, kao ni u ukupnom broju bacanja. Takođe, statistički značajne razlike nisu uočene ni u srčanoj frekvenci odmah nakon izvođenja testa, kao ni u prvom minutu oporavka. Iako nisu utvrđene razlike u indexu SJFT kod HRW i placebo tretmana, zapaža se na osnovu dobijenih rezultata i prema standardnoj klasifikaciji SJFT (Franchini i saradnici, 2009), da su sve ispitanice imale odlične vrednosti. Prosečne vrednosti SJFT indeksa bile su slične nakon placebo ($13,36 \pm 1,02$) i HRW unosa ($13,39 \pm 0,98$).

Tabela 3. Srčana frekvencija i vrednosti SJFT kod obe grupe džudistkinja

	HRW	Placebo	f	p
A serija	5,89±0,33	6,11±0,33	2,000	0,179
B serija	10,44±0,73	10,66±0,70	0,467	0,506
C serija	9,55±0,72	9,44±0,88	0,089	0,770
Ukupan broj bacanja (n)	25,88±1,36	26,22±1,78	0,208	0,655
HR nakon testa (bpm)	182,33±0,36	182,44±4,71	0,054	0,820
HR 1min nakon SJFT (bpm)	163,33±8,71	166,44±7,33	0,511	0,486
Index SJFT	13,39±0,98	13,36±1,02	0,031	0,863

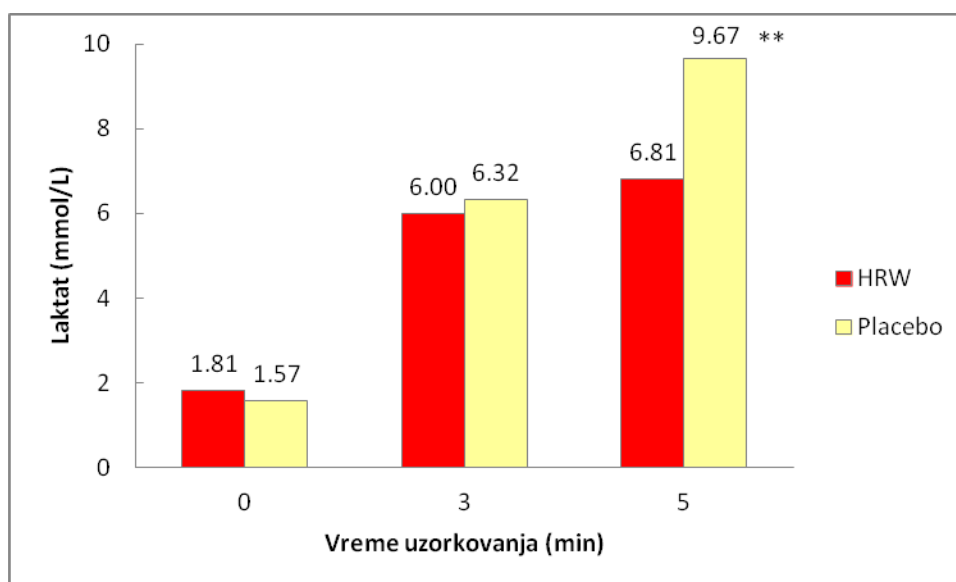
HR= srčana frekvencija

Promene u biomarkerima acido bazne ravnoteže i oporavku nakon izvođenja SJFT prikazani su u Tabeli 4. Na osnovu dobijenih rezultata zapaža se da je unos HRW statistički značajno uticao na pH krvi kao i na koncentraciju laktata u odnosu na placebo. Koncentracija bikarbonata u serumu je ostala statistički nepromenjena između placebo i HRW unosa.

Tabela 4. Promene u biohemijskim markerima acidobazne ravnoteže kod vrhunskih džudistkinja nakon izvođenja SJFT

		HRW	Placebo	F	p
Laktati (mmol.L ⁻¹)**	Pre	1,81 (0,31)	1,57 (0,20)	3,211	0,095
	Posle 3 min	6,00 (1,92)	6,32 (1,52)	0,140	0,714
	Posle 5 min	6,81 (2,26)	9,67 (1,75)	7,985	0,013
		$F=6,768$	$P=0,004$		
Bikarbonati (mmol.L ⁻¹)	Pre	24,71 (0,74)	25,75 (2,12)	1,692	0,214
	Posle 3 min	14,05 (1,52)	15,51 (2,02)	2,674	0,124
	Posle 5 min	12,61 (1,97)	15,18 (2,06)	6,519	0,023
		$F=1,747$	$P=0,193$		
pH**	Pre	7,39 (0,04)	7,45 (0,07)	4,224	0,059
	Posle 3 min	7,41 (0,14)	7,44 (0,08)	0,199	0,662
	Posle 5 min	7,47 (0,12)	7,42 (0,08)	1,022	0,329

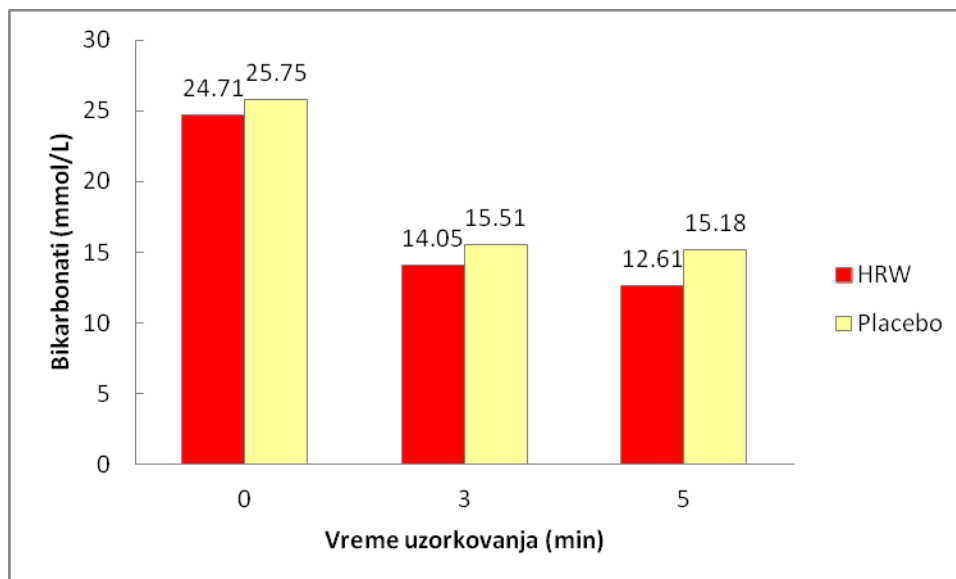
Na osnovu dobijenih rezultata, zapaža se da se nivo laktata nakon SJFT statistički značajno povećao u HRW i Placebo grupi, pri čemu su vrednosti laktata statistički značajno niže kod ispitanica tretiranih sa HRW (Grafikon 9).

**Grafikon 9.** Promene koncentracije laktata nakon izvođenja SJFT

Na osnovu dobijenih rezultata (Grafikon 9), može se uočiti da su vrednosti nivoa koncentracije laktata detektabilno više u periodu unosa placeba, u poređenju sa HRW tretmanom. Statistički značajno više vrednosti u koncentraciji laktata nakon izvođenja SJFT u periodu unosa placeba detektovane su nakon trećeg i petog minuta oporavka. Iako su povećane

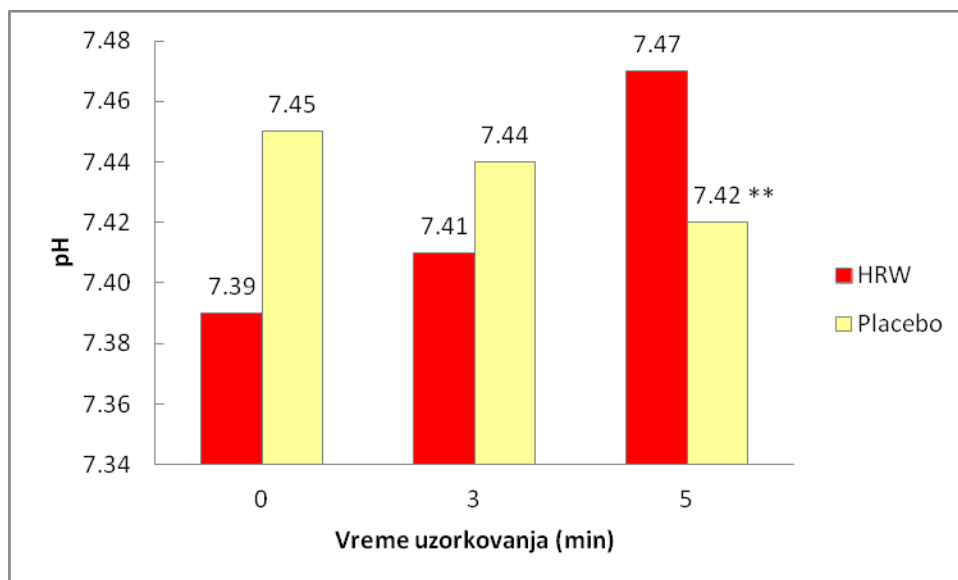
vrednosti koncentracije laktata uočene nakon unosa placeba i HRW, ove vrednosti nakon HRW tretmana bile su statistički značajno niže.

Koncentracija bikarbonata u serumu se nije statistički značajno menjala nakon primenjenih tretmana (Grafikon 10). Međutim, uočeno je smanjenje koncentracije bikarbonata u trećem i petom minutu oporavka nakon izvođenja SJFT.



Grafikon 10. Promene koncentracije bikarbonata u serumu nakon izvođenja SJFT

Statistički značajan porast pH vrednosti nakon izvođenja SJFT uočava se nakon unosa HRW (Grafikon 11). Unos HRW je indukovao najveći porast pH vrednosti u petom minutu oporavka, pri čemu je došlo do smanjenja pH kod placebo tretmana.



Grafikon 11. Promene pH u serumu nakon izvođenja SJFT

7. DISKUSIJA

Sportska aktivnost u borilačkim sportovima nesumnjivo zavisi od velikog broja faktora. Borba u džudou traje 5 minuta aktivnog vremena i predstavlja visoko intenzivni napor anaerobnog tipa (Bompa, 1999) sa segmentima aktivne borbe i odmora (Svischev, 2001). Tokom trajanja borbe fiziološki zahtevi opterećuju kako aerobni tako i anaerobni sistem. Specifičnost ovog sporta kao i bogata struktura pokreta omogućuje džudisti da u odnosu na individualne morfološke karakteristike odabere tehnike kao i stil borbe koji će uticati na njegov uspeh. Džudo spada u grupu olimpijskih sportova koji se odvijaju u dinamičkim uslovima, što podrazumeva primenu velikog broja tehnika bacanja, držanja, gušenja i poluga u cilju destrukcije protivnika. Zbog svoje složenosti, džudo postavlja visoke zahteve pred borce s obzirom da se borba odvija uz stalne promene dinamičkog režima rada pri čemu je nemoguće predvideti sledeću situaciju. Uspeh takmičara u ovom olimpijskom sportu rezultat je usvojenih tehničkih veština, motoričkih sposobnosti (snaga, brzina i izdržljivost), kao i odlične taktičke pripremljenosti (Lech i Sterkowicz, 2004). Savremene dijagnostičke metode omogućavaju otkrivanje latentnih poremećaja zdravstvenog stanja kada još ne postoje vidljivi simptomi promena u organizmu. Upravo zbog visokih zahteva koje džudo postavlja pred borce, neophodno je da se takmičari upućuju na redovne kontrole biohemijsko-hematoloških parametara, kako bi se izvršile na vreme određene korekcije u treningu, ishrani i suplementaciji. Intenzivni džudo trening je povezan sa povećanom produkcijom slobodnih radikala i oksidativnim stresom, što može smanjiti kapacitet antioksidativne zaštite. Suplementacija sa HRW delimično sprečava povećanu produkciju slobodnih radikala i smanjenje kapaciteta neenzimske antioksidativne zaštite kod džudista. Uzimajući u obzir modifikaciju antioksidativnih zaštitnih mehanizama pod uticajem intenzivnih treninga i nedovoljan unos antioksidanasa, suplementacija sa HRW doprinosi adekvatnoj hidrataciji sportista uz povoljan uticaj na antioksidativni odbrambeni sistem kod džudista u toku kao i nakon intenzivnih treninga. Funkcija krvi je održavanje homeostaze unutrašnje sredine jer ima ulogu glavne raskrsnice između unosa materija potrebnih za život i eliminacije metabolita nastalih u tkivima. Osim toga, krv prenosi do ciljnih organa hormone endokrinih žlezda i bilo koja promena krvnih elemenata ovog tečnog tkiva ukazuje na neku patologiju bilo same krvi ili drugih tkiva. Na sastav telesnih tečnosti, a to znači i krvi mogu uticati i određeni fiziološki faktori kao što su telesna masa, način ishrane i fizička aktivnost. Poznato je da neprilagođeni

treninzi mogu dovesti do oksidativnog stresa koji može menjati biohemijske parametre krvne slike. Evidentno je da svi oblici fizičke aktivnosti, aerobni i anaerobni, imaju potencijal za povećanom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta uz nastanak oksidativnog stresa. Kontinuirano praćenje i analiza krvne slike sportista doprinosi prevenciji nastanka latentnih poremećaja zdravstvenog stanja i kontroli kvalitetnog procesa treninga. U ovom radu su ispitivani su hronični i akutni efekti primene HRW na parametre oksidativnog stresa i acido bazne ravnoteže kod vrhunskih džudista i džudistkinja.

Prema našim saznanjima, kao i dostupnoj literaturi, nema podataka o upotrebi HRW u dužem periodu (12 nedelja) kod vrhunskih džudista. Dobijeni rezultati u ovom radu ukazuju na pozitivne efekte unosa HRW kod vrhunskih džudista. U analiziranoj grupi sportista tokom kao i nakon primene suplementa nisu zabeleženi negativni efekti unosa HRW. Ispitivanje promena u hematološkim parametrima privlači veliku pažnju zbog izuzetnog uticaja na fizičke performanse sportiste. U ovom radu, analizom varijabli za procenu krvne slike ispitanika nije zabeleženo statistički značajno odstupanje distribucije rezultata u obe analizirane grupe u inicijalnom kao ni u finalnom merenju kod oba eksperimenta. Vrednosti standardnih hematoloških parametara: broj leukocita, eritrocita, trombocita, hemoglobin, hematokrit, MCV, MCH, MCHC pre i nakon oba eksperimentalna tretmana HRW i Placebo grupe bile su u granicama referentnih iako su uočene izvesne promene u prosečnim vrednostima pojedinih parametara. Testiranje kvantitativnih razlika između inicijalnog i finalnog merenja analiziranih grupa nakon primenjenih tretmana suplementacije, pokazalo je izvesne promene u prosečnim vrednostima kod nekih parametara krvne slike. U prvom tretmanu uočene su statistički značajne promene varijable MCH kod placebo grupe, MCHC kod obe grupe i hemoglobina kod placebo grupe, gde su registrovane povišene prosečne vrednosti. U drugom tretmanu statistički su značajne promene varijable MCV uz smanjenje prosečne vrednosti kod obe grupe, MCHC kod placebo grupe uz povećanje prosečne vrednosti, leukocita kod suplement grupe uz smanjenje prosečne vrednosti, eritrocita kod obe grupe uz smanjenje prosečne vrednosti i hemoglobina kod suplement grupe uz smanjenje prosečne vrednosti. Iako su opisane promene dostigle statističku značajnost srednje vrednosti ovih parametara se i dalje nalaze u opsegu referentnih vrednosti. Daljom analizom biohemijskih parametara CK, GGT i bikarbonata nije zabeleženo statistički značajno odstupanje distribucije rezultata u obe analizirane grupe. U našoj studiji aktivnosti CK su značajno povišene

i iznad referentnih vrednosti tokom posmatranog perioda, što se može videti na grafikonu 6. Poznato je da visoko intenzivni treninzi dovode do značajnog povećanja aktivnosti CK u serumu, što ukazuje na izuzetno visoke fiziološke zahteve džudoa. Iako nisu dobijeni statistički značajni efekti ni u jednom od primenjenih tretmana, može se zapaziti da je u prvom tretmanu vidljiv trend opadanja prosečne vrednosti aktivnosti CK tokom vremena kod suplement grupe uz istovremeni porast kod placebo grupe. Nešto veća odstupanja se mogu zapaziti kod distribucije rezultata dobijenih na trećem merenju. U oba ciklusa primene suplementacije zabeležena je visoka homogenost rezultata kod obe grupe ispitanika. Kod obe grupe aktivnost CK se nakon washout perioda vratila na vrednosti dobijene nakon 28 dana u prvom tretmanu. Kreatin kinaza predstavlja jedan od markera oštećenja ćelija mišića i može biti i indirektni marker oksidativnog stresa s obzirom da lipidna peroksidacija izaziva oštećenja ćelijskih membrana. Međutim, kreatin kinaza nije specifični marker oksidativnog stresa posebno kod sportista. Karakteristično je da sportisti imaju više bazalne vrednosti aktivnosti CK što je i dobijeno na početku kao i tokom trajanja studije. Aktivnost CK u serumu odražava promene u normalnoj strukturi membrane mišićnih ćelija pa se povećane vrednosti aktivnosti CK u serumu smatraju indirektnim markerom oštećenja mišićnih vlakana (Bloomer, 2007). Iako su tokom posmatranog perioda vrednosti kod obe grupe sportista bile znatno veće od referentnih, uočava se blagi trend opadanja u HRW grupi što ukazuje da primena HRW može uticati na smanjenje oštećenja mišića u manjem stepenu.

GGT se nalazi na spoljnoj membrani ćelije i degradira ekstracelularni GSH ali sa druge strane pri tom stvara aminokiseline, prekursore za resintezu intracelularnog GSH. Ovaj enzim se smatra delom sistema za zaštitu ćelija od oksidativnog stresa. S druge strane GGT izvedeni pro-oksidansi mogu modulirati važne redoks osetljive procese i funkcije u ćeliji, uticati na ravnotežu proliferacija-apoptoza, koja ima važne implikacije u progresiji tumora. U ovom radu promene nivoa prosečnih vrednosti aktivnosti GGT u toku oba tretmana bile su male i nisu pokazale vidljive trendove promena. Aktivnost GGT nije bila statistički značajno izmenjena ni u jednom od primenjenih tretmana. Pre i nakon primenjenih tretmana sve vrednosti aktivnosti ovog enzima su bile u okviru referentnih vrednosti. Podaci u literaturi o uticaju HRW na aktivnost GGT su veoma oskudni.

Nakao i saradnici (2010) su utvrdili da primena HRW kod pacijenata sa metaboličkim sindromom dovodi do porasta nivoa GGT za 24%, pri čemu su vrednosti ostale u granicama

referentnih. Literaturni podaci ukazuju da promene u aktivnosti GGT mogu nastati i usled dijetetskog režima ishrane (Lee i saradnici, 2004).

Acido bazna ravnoteža predstavlja jednu od važnih komponenata homeostatskih mehanizama unutrašnje sredine. U zavisnosti od intenziteta metaboličkih procesa u organizmu, nastaju promene odnosa kiselih i baznih ekvivalenata. Bikarbonat jon, bazni elektrolit, deluje kao pufer u organizmu i ima sposobnost održavanja kiselo-bazne ravnoteže. Bikarbonatni puferski sistem funkcioniše i služi kao efikasan neutralizator promene koncentracije jona vodonika koji može nastati pojavom različitih endogenih i egzogenih kiselina ili baza. Unos alkalnih agenasa pre vežbanja može povećati vanćelijski puferski kapacitet. U ovom radu HRW kao alkalni agens indukovao je porast vrednosti bikarbonata u u oba tretmana, dok je kod placebo grupe došlo do smanjenja vrednosti kao što je i očekivano. Zabeleženi su visoki i statistički značajni efekti ukupnih promena i razlika između placebo i suplement grupe ispitanika. U prvom tretmanu efekti razlika su statistički značajni nakon druge i četvrte nedelje primene suplementacije, dok su u drugom tretmanu one izražene u četvrtoj nedelji. Kod placebo grupe došlo je do povećanja prosečne vrednosti, a kod suplement grupe do smanjenja vrednosti bikarbonata na kraju prvog i početku drugog tretmana. S obzirom da oralni unos bikarbonata može izazvati određene neželjene efekte (Maughan and Burke, 2002), dobijeni rezultati ukazuju da HRW indukuje porast bikarbonata bez neželjenih nuspojava. U tom smislu, HRW ima svojstva alkalnog agensa tokom fizičke aktivnosti, što je potvrđeno u prethodnoj studiji (Ostojic i Stojanovic, 2014).

Ispitivanje povezanosti oksidativnog stresa i fizičke aktivnosti tema je velikog broja studija. Utvrđeno je da aerobna i anaerobna fizička aktivnost može dovesti do povećane produkcije slobodnih radikala, što za posledicu može imati oksidativna oštećenja važnih biomolekula (Powers i saradnici, 2004). Ipak, povećana produkcija slobodnih radikala u toku treninga predstavlja i neophodan stimulus za indukciju optimalnog adaptivnog odgovora i povećanja aktivnosti antioksidativnih zaštitnih mehanizama (FisherWellman i Bloomer, 2009). Enzimski i neenzimski antioksidanti igraju značajnu ulogu u zaštiti tkiva od prevelikih oksidativnih oštećenja, što je posebno važno tokom intenzivne fizičke aktivnosti. Proizvodnja slobodnih radikala u zavisnosti je od intenziteta, trajanja fizičke aktivnosti, kao i stanja utreniranosti organizma. Potvrđeno je da unos antioksidanata poboljšava antioksidantni status, ali ne i performanse sportista (Jones, 2008). Ipak, sastav, trajanje i doze antioksidantnih suplemenata moraju biti strogo kontrolisani (Finaud i saradnici, 2006).

Razumevanje promena u redoks ravnoteži koje nastaju kao posledica redovnih treninga u džudou mogu pružiti nova saznanja o efektima koje džudo ima na organizam i mogućnostima primene preventivnih mera koje se zasnivaju na suplementaciji. Suplementacija sa HRW ispitivana u ovoj studiji imala je pozitivan efekat na aktivnost ispitivanih antioksidativnih enzima. U svim varijablama za procenu biomarkera oksidativnog stresa nije zabeleženo statistički značajno odstupanje distribucije rezultata u obe analizirane grupe. Na osnovu dobijenih rezultata zapaža se visoka homogenost rezultata u obe grupe ispitanika u oba ciklusa primene suplementacije. Naime, kod kontrolne grupe rezultati su dosta stabilni, dok su kod eksperimentalne grupe vidljive promene u sukcesivnim tačkama merenja.

Superoksid dismutaza ima veoma važnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti tokom dugotrajnih i intenzivnih treninga (Finaud i saradnici, 2006). Povećana aktivnost SOD poboljšava otpornost na oksidativni stres (Urso i Clarkson, 2003). U našoj studiji kod aktivnosti varijable SOD u oba ciklusa primene suplementa dobijen je statistički značajan ukupni efekat promena u vremenu, kao i ukupni efekat interakcije faktora vreme i grupa. Primena HRW u oba eksperimentalna tretmana indukovala je promene kod eksperimentalne grupe u smeru povećanja prosečne vrednosti. Nasuprot, kod kontrolne grupe ispitanika promene prosečne vrednosti aktivnosti SOD su neznatne. U prvom tretmanu suplementacije najveći efekat promena aktivnosti SOD javio se četvrtoj nedelji primene suplementacije.

U drugom ciklusu suplementacije nakon wash-out perioda statistički značajan efekat razlika promena u grupama se zapaža na kraju tretmana. Nešto slabiji ukupni efekat promena je zabeležen verovatno zbog opadanja vrednosti SOD u kontrolnoj grupi. Oba tretmana suplementacije dala su vidne efekte u aktivnosti SOD. To potvrđuju i rezultati t testa za zavisne uzorke, gde su dobijeni rezultati pokazali da su kod eksperimentalne grupe u oba ciklusa primene suplementacije dobijene statistički značajne kvantitativne promene vrednosti SOD ($t_1=-4,26$ $p=0,008$; $t_2=-3,60$ $p=0,016$). Promene aktivnosti enzima usled treninga mogu ići u smeru adaptacije, odnosno povećanja aktivnosti ili smanjenja aktivnosti enzima ukoliko oksidativni stres prevazilazi kapacitete antioksidativne zaštite (Finaud i saradnici, 2006). Evidentno je da je primena HRW indukovala porast aktivnosti SOD nakon oba eksperimentalna tretmana. Naši rezultati su u saglasju sa autorima (Hong i saradnici, 2010) koji ukazuju da primena HRW indukuje porast aktivnosti SOD kod eksperimentalnih životinja. Prema dostupnoj literaturi, naša

studija je prva humana studija koja ispituje uticaj HRW na aktivnost SOD usled redovnih treninga. Najveći broj studija pokazuju da usled fizičke aktivnosti različitog intenziteta dolazi do povećanja aktivnosti SOD (Naghizadeh i saradnici, 2009; Melikoglu i saradnici, 2008; El Abed i saradnici, 2011), mada nisu retke ni studije koje su pokazale da se aktivnost SOD ne menja (García-López i saradnici, 2007), ili opada (Hubner-Wozniak i saradnici, 1994). Ispitivani džudisti u ovoj studiji, imali su značajno veću aktivnost SOD u odnosu na kontrolnu grupu. Povećana aktivnost enzimske antioksidativne zaštite sprečava štetne efekte slobodnih radikala i oksidativnog stresa. Nasuprot, visoka produkcija slobodnih radikala dovodi do inhibicije aktivnosti SOD (Knez i saradnici, 2007). Povoljan efekat HRW na aktivnost enzima SOD je evidentan, shodno činjenici da se aktivnost SOD povećava kao odgovor na oksidativni stres usled redovnih treninga. Sa aspekta ovog dela istraživanja pokazano je da HRW tretman u doznom i vremenskom zavisnom obrascu povećava antioksidativni kapacitet, povećavajući upravo aktivnost SOD, čime se istovremeno prevenira pojava različitih degenerativnih oboljenja (Rowinski i saradnici, 2013).

Glutation peroksidaza prisutna je u gotovo svim ćelijama i ima funkciju da redukuje H_2O_2 , hidroperokside masnih kiselina i druge perokside u prisustvu GSH pri čemu se GSH oksidiše do GSSG. U prvom eksperimentalnom tretmanu u trajanju od 28 dana uočava se statistički značajni pad aktivnosti GSHPx u grupi koja je primala suplement. Detektabilne promene u smislu statistički značajne razlike između placebo i suplement grupe ispitanika takođe se uočavaju. Blagi trend opadanja aktivnosti GSHPx može se zapaziti kod obe analizirane grupe, ali te promene nisu statistički značajne. GSH-Px ima veći afinitet za vodonik-peroksid od katalaze pri niskim koncentracijama H_2O_2 u ćeliji ili u plazmi. U uslovima intenzivnih treninga, kada je koncentracija H_2O_2 u ćeliji ili plazmi visoka, katalaza je znatno efikasnija u njegovoj detoksikaciji. U takvim okolnostima, kao odgovor organizma na intenzivno vežbanje, dolazi do povećanja aktivnosti katalaze koja degradira H_2O_2 do H_2O i O_2 . Za razliku od aktivnosti SOD i GSPX koji su se razlikovali između grupa statistički značajne promene u aktivnosti CAT nisu zabeležene. Međutim, rezultati ispitivanja aktivnosti katalaze nisu konzistentni u već publikovanim radovima. Pojedini istraživači ukazuju na smanjenje aktivnosti katalaze (Djordjevic i saradnici, 2011), dok druge studije nisu utvrdile promene u aktivnosti katalaze usled kao treninga (Metin i saradnici, 2003; Lekhi i saradnici, 2007).

Oksidativni stres i oštećenja nastala usled oksidativnog stresa, procenjuju se ili merenjem antioksidativnih supstanci ili produkata nastalih pod dejstvom radikalskih kiseoničnih vrsta (Jin i saradnici, 2013). Malonilaldehid je glavni i najviše proučavani produkt peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina. Koristi se u brojnim istraživanjima kao pokazatelj procesa lipidne peroksidacije i mere njenog intenziteta (Valko i saradnici, 2007). Rezultati istraživanja sprovedeni na sportistima ukazuju na povećan nivo MDA usled aerobnih i anaerobnih treninga. Naime, razlike su utvrđene između sportista i ispitanika koji se ne bave sportom. Rvači su imali značajno viši nivo lipidnih peroksida u poređenju sa kontrolnom grupom (Kürkcü i saradnici, 2010), dok je kod džudista pokazan povećan nivo MDA (El Abed i saradnici, 2011). Različit stepen lipidne peroksidacije uočava se pri različitim tipovima sporta, u zavisnosti od intenziteta i vremena vežbanja, uzorka ispitanika i metode kojom se određuje lipidna peroksidacija (Miyazaki i saradnici, 2001). U našoj studiji efekat razlika između grupa je statističku značajnost dostigao tek na kraju oba tretmana. Prosečna vrednost sadržaja MDA kod suplement grupe je opala, dok se istovremeno kod placebo grupe, posle početnog opadanja vrednosti, povećala. U oba eksperimentalna tretmana evidentan je trend opadanja sadržaja MDA u HRW grupi. Na osnovu dobijenih rezultata u oba eksperimentalna tretmana utvrđen je povoljan efekat unosa HRW u trajanju od 4 nedelje koji može smanjiti peroksidaciju lipida, i koji se ogleda u smanjenju sadržaja MDA. Utvrđeno je da H₂ ima sposobnost smanjenja lančane reakcije, lipidne peroksidacije, koja dovodi do generisanja markera oksidativnog stresa, kao što je MDA (Niki, 2014). Slične efekte kod životinja tretiranih sa HRW su dobili i drugi autori (Mao i saradnici, 2009; Zhang i saradnici, 2014; Zhang i saradnici, 2015). Nasuprot dobijenim rezultatima u našoj studiji, brojne studije ukazuju na povećanje sadržaja MDA kod sportista i nesportista nakon fizičke aktivnosti bez primene suplemenata (Knez i saradnici, 2007; Kiyici i Kishali, 2012).

Dinamika promene sadržaja glutaciona (GSH) je promenljiva. Naime, pod uticajem unosa suplementa došlo je do vidnog rasta prosečne vrednosti sadržaja GSH u HRW grupi, dok kod placebo grupe nisu uočene značajnije promene. U drugom eksperimentalnom tretmanu primene HRW ukupne promene su manje izražene ali su statistički značajne, dok efekat razlike između grupa nije pokazao statističku značajnost iako je razlika vidljiva. Poznato je da su ćelije sa smanjenim nivoem glutaciona osetljivije na oksidativni stres. Njegova uloga je veoma važna jer uz katalazu ima ključnu ulogu u odbrani od oksidativnog stresa. Iz tog razloga njegova uloga proučavana je u brojnim prooksidativnim stanjima.

Porast koncentracije GSH evidentan je u grupi koja je primala HRW, za razliku od placebo grupe gde se koncentracija GSH nije značajnije menjala. Povoljan efekat primene H₂ na sadržaj GSH i njegovo povećanje detektabilan je u oba eksperimentalna tretmana. Rezultati istraživanja ukazuju da je pad koncentracije GSH odgovoran za evoluciju oksidativnih oštećenja i ujedno pojavu kliničkih korelata (Kidd, 2001), što nije bio slučaj u grupi koja je primala H₂. Nasuprot, primena H₂ potencirala je povećanje sadržaja GSH u oba eksperimentalna tretmana i ujedno antioksidativnog kapaciteta. U našem istraživanju očigledna je opravdanost suplementacije sportista sa HRW, uzimajući u obzir činjenicu da usled intenzivne fizičke aktivnosti postoji opasnost od povećane produkcije slobodnih radikala. Naša studija ukazuje da markeri oksidativnog stresa nisu konzistentni i da variraju kao odgovor na fizičku aktivnost, uz preporuku da fizički aktivna populacija unosi H₂ kao potencijalni antioksidans. S obzirom da fizička aktivnost može izazvati neravnotežu između ROS i antioksidanasa, HRW može biti koristan alkalizirajući agens i potencijalno poboljšati performanse uz smanjenje acidoze i rizika nastanka oksidativnog stresa. Na osnovu dobijenih rezultata kao i postavljenih ciljeva aktuelnog istraživanja potvrđuje se generalna hipoteza **Hg** - utvrđene su statistički značajne razlike u antioksidativnom statusu kod vrhunskih džudista pod uticajem suplementacije molekularnim vodonikom tokom 12 nedelja.

Iako su neophodna dalja istraživanja, rezultati studije jasno ukazuju da unos H₂ može sprečiti negativan uticaj ROS i pratećih reakcija iniciranih tokom i nakon vežbanja.

Akutni efekti suplementacije molekularnim vodonikom na acido baznu ravnotežu vrhunskih džudiskinja

Poznato je da brz oporavak nakon intenzivne fizičke aktivnosti omogućava brojne benefite za sportiste, kao što su poboljšanje performansi i smanjena mogućnost pretreniranosti (Kentta i Hassinen, 1998; Bishop i saradnici, 2008). Optimalan oporavak je od posebnog značaja u džudou i drugim visoko intenzivnim borilačkim sportovima (Kellmann, 2010; Morales i saradnici, 2014). Poznato je da treninzi visokog intenziteta mogu uzrokovati poremećaj u acido baznoj ravnoteži, pri čemu vežbom izazvana acidoza može negativno uticati na performanse i oporavak sportiste (Robergs i saradnici, 2004). U cilju regulisanja vežbom izazvane metaboličke acidize, sportisti često koriste razne nutritivne i farmakološke agense koji mogu uticati na vrednosti pH u krvi i mišiću (Carr i saradnici, 2011). Rezultati istraživanja (Mueller i saradnici,

2013) ukazuju da je suplementacija bikarbonatima korisna u snižavanju acidoze kao i poboljšanju sportskih performansi. Međutim, u literaturi su navedeni i brojni negativni efekti (dijareja, mučnina, bol u stomaku) oralnog unosa bikarbonata (McNaughton i saradnici, 1999).

U ovom radu rezultati ukazuju da akutni unos HRW značajno redukuje akumulaciju laktata i povećava pH nakon primene SJFT kod vrhunskih džudistkinja. Suplementacija molekularnim vodonikom je statistički značajno uticala na acido baznu ravnotežu vrhunskih džudistkinja tokom i nakon primene SJFT, što sugerise na moguću ergogenu snagu HRW. Na temelju dobijenih rezultata, potvrđena je i pojedinačna hipoteza **H1** – utvrđene su statistički značajne razlike u acido baznoj ravnoteži kod vrhunskih džudistkinja pod uticajem suplementacije molekularnim vodonikom u toku jedne trenažne epizode.

Međutim, rezultati SJFT vrhunskih džudistkinja bili su približno jednaki nakon oralnog unosa HRW i Placeba. Nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji bikarbonata iako rezultati istraživanja (Ostojic and Stojanovic, 2014) ukazuju da unos HRW povećava nivo bikarbonata nakon fizičke aktivnosti. Uzrok razlici u dobijenim rezultatima u ovoj i prethodnoj studiji može biti drugačiji trenažni protokol ili primenjene doze HRW.

Bikarbonati imaju značajnu ulogu u acido baznoj ravnoteži. S obzirom da HRW povećava pH očekivano je da njena primena poveća koncentraciju bikarbonata, dok fizička aktivnost uzrokuje pad koncentracije bikarbonata. Iako nije došlo do značajnijih razlika u koncentraciji bikarbonata u ovoj studiji usled unosa HRW, hidratacija sa HRW ukazuje na brojne prednosti u cilju prevencije i kontrole vežbanjem izazvane acidoze. Ubrzan pad srčane frekvencije nakon visoko intenzivnih treninga može ukazivati na ubrzan oporavak, kao odgovor na smanjenje kardiovaskularnog stresa i harmonizovanja autonomnog nervnog sistema (Ostojic i saradnici, 2010). Ipak, u ovoj studiji nije utvrđen značajan pad srčane frekvencije nakon maksimalnog napora, kao ni poboljšanje izvođenja SJFT između dva primenjena tretmana. U skladu sa dobijenim rezultatima čini se da unos HRW nema direktni uticaj na oporavak ženskih džudistkinja kada se pojedinačna doza od 6g unosi 30 minuta pre intenzivne fizičke aktivnosti. U tom smislu neophodna su dalja istraživanja koja bi obuhvatila veći uzorak, duži primenu i različite doze HRW kako bi se preciznije odredila potencijalna ergogena moć molekularnog vodonika. Akutni odgovor organizma na primenu HRW nije indukovao promene koje bi negativno uticale na performanse i zdravlje ispitivanih sportistkinja.

8. ZAKLJUČAK

Na osnovu postavljenih ciljeva, hipoteza i prezentovanih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ✓ Primena HRW nije izazvala negativne promene u biohemijско hematološkim parametrima tako da se njegoва dalja primena preporučuje uz kontrolisane treninge i trenažna opterećenja.
- ✓ Ispitivanja aktivnosti antioksidativnih enzima kod Placebo i HRW grupe ukazuju na pojavu statistički značajnih razlika u antioksidativnom statusu kod vrhunskih džudista pod uticajem suplementacije molekularnim vodonikom tokom 12 nedelja.
- ✓ Suplementacija HRW može biti od posebnog interesa za sportiste koji su podložniji oksidativnom stresu kao dodatna podrška endogenim i neenzimskim zaštitnim sistemima. Naime, dobijeni rezultati ukazuju da se odgovor organizma usled unosa HRW ogleda u značajnom povećanju nivoa aktivnosti enzima SOD i sadržaja GSH usled sprovođenja programirane fizičke aktivnosti. Takođe, trend opadanja sadržaja MDA u HRW grupi je detektabilan. Utvrđeno je da H₂ ima sposobnost smanjenja lančane reakcije, lipidne peroksidacije, koja dovodi do generisanja markera oksidativnog stresa, kao što je MDA.
- ✓ Shodno činjenici da intenzivna fizička aktivnost rezultuje povećanom produkcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta i dovodi do oštećenja tkiva slobodnim radikalima, upotreba snažnog antioksidanta kao što je vodonik može smanjiti oksidativni stres i poremećaje koje izazivaju reaktivne kiseonične vrste. Kao potencijalni agens snižavanja acidoze, alkalno obogaćena voda vodonikom bi se mogla koristiti kod ljudi u borbi protiv acidoze izazvane fizičkim vežbanjem.

- ✓ Akutni efekti suplementacije ukazuju na statistički značajne razlike u acido baznoj ravnoteži kod vrhunskih džudistkinja u toku jedne trenažne epizode.
- ✓ Unos HRW 30 minuta pre aktivnosti ne utiče na poboljšanje performansi u džudou. HRW nema direktni uticaj na oporavak ženskih džudistkinja kada se pojedinačna doza unosi 30 minuta pre intenzivne fizičke aktivnosti. Ipak, primena suplementa ukazuje na pozitivne akutne efekte organizma nakon pojedinačnog treninga.
- ✓ Akutni unos HRW značajno redukuje akumulaciju laktata i povećava pH nakon primene SJFT vrhunskih džudistkinja. Suplementacija molekularnim vodonikom značajno utiče na acido baznu ravnotežu vrhunskih džudistkinja tokom i nakon primene SJFT, što sugerira na moguću ergogenu snagu HRW. Stoga se preporučuje dalje korišćenje HRW u cilju bržeg oporavka sportista nakon iscrpljujućih treninga, otklanjanja i sprečavanja prekomernog nakupljanja laktata, štetnih metabolita organizma.
- ✓ Iako je tačan mehanizam delovanja vodonika nepoznat, poznato je da molekularni vodonik deluje kao „hvatač“ hidroksilnih radikala, što može dovesti do smanjenja oksidativnog stresa, zbog manje količine ROS. Dobijeni rezultati ukazuju na ergogenu antioksidantnu moć molekularnog vodonika. Dalja istraživanja su neophodna kako bi se podesili uslovi u kojima bi molekularni vodonik ispoljio svoje maksimalno delovanje i u sportu.

9. LITERATURA

- Abol-Enein, H., Gheith, O. A., Barakat, N., Nour, E., Sharaf, A. E. (2009). Ionized alkaline water: new strategy for management of metabolic acidosis in experimental animals. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 13(3), 220-224.
- Abraïni, J. H., Gardette-Chauffour, M. C., Martinez, E., Rostain, J. C., Lemaire, C. (1994). Psychophysiological reactions in humans during an open sea dive to 500 m with a hydrogen-helium-oxygen mixture. *Journal of Applied Physiology*, 76(3), 1113-1118.
- Aebi, H. (1984) Catalase in Vitro. *Method in Enzymology*, 105, 121- 126.
- Aguiló, A., Tauler, P., Fuentespina, E., Tur, J. A., Córdova, A., Pons, A. (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology behavior*, 84(1), 1-7.
- Aldini, G., Kyung-Jin. Y., Etsuo, N., Russell, M. (2010). Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications. Wiley-Blackwell.
- Alessio, H. M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and science in sports and exercise*, 25(2), 218-224.
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1331-1341.
- Aoki, K., Nakao, A., Adachi, T., Matsui, Y., Miyakawa, S. (2012). Pilot study: Effects of drinking hydrogen-rich water on muscle fatigue caused by acute exercise in elite athletes. *Medical gas research*, 2(1), 1.
- Apor, P., Radi, A. (2006). Physical exercise, oxidative stress and damage. *Orvosi hetilap*, 147(22), 1025-1031.
- Arnao, M. B., Acosta, M., Del Rio, J. A., Garcia-Canovas, F. (1990). Inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide and its protection by a reductant agent. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1038(1), 85-89.
- Ashton, T., Rowlands, C. C., Jones, E., Young, I. S., Jackson, S. K., Davies, B., Peters, J. R. (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 77(6), 498-502.
- Babior, B. M., Lambeth, J. D., Nauseef, W. (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 397(2), 342-344.
- Bailey, D. M., Young, I. S., McEneny, J., Lawrenson, L., Kim, J., Barden, J., Richardson, R. S. (2004). Regulation of free radical outflow from an isolated muscle bed in exercising humans. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 287(4), 1689-1699.

- Bielski, B. H., Arudi, R. L., Sutherland, M. W. (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂-with unsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 258(8), 4759-4761.
- Bishop, P. A., Jones, E., Woods, A. K. (2008). Recovery from training: a brief review: brief review. *The Journal of Strength Conditioning Research*, 22(3), 1015-1024.
- Bloomer, R. J. (2007). The role of nutritional supplements in the prevention and treatment of resistance exercise-induced skeletal muscle injury. *Sports Medicine*, 37(6), 519-532.
- Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H., Wideman, L., McKenzie, M. J., Consitt, L. A. (2005). Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *The Journal of Strength Conditioning Research*, 19(2), 276-285.
- Bocci, V., Valacchi, G., Corradeschi, F., Aldinucci, C., Silvestri, S., Paccagnini, E., Gerli, R. (1998). Studies on the biological effects of ozone: 7. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 12(3), 67-75.
- Bompa, T.O. (1999). *Periodization. Theory and Methodology of Training*. Champaign, Ill: Human Kinetics.
- Buege J.A., Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation, in *Methods in Enzymology* (Fleischer, S., Packer, L., eds.) 52 (C), 302-310.
- Carr, A. J., Hopkins, W. G., Gore, C. J. (2011). Effects of acute alkalosis and acidosis on performance. *Sports medicine*, 41(10), 801-814.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59(3), 527-605.
- Cheeseman, K. H., Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49(3), 481-493.
- Chen, C.H., Manaenko, A., Zhan, Y., Liu, W.W., Ostrowki, R.P., Tang, J., et al. (2010). Hydrogen gas reduced acute hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation in a focal ischemia rat model. *Neuroscience* 169, 402-414.
- Cholewa, J., Poprzęcki, S., Zajac, A., Waskiewicz, Z. (2008). The influence of vitamin C on blood oxidative stress parameters in basketball players in response to maximal exercise. *Science Sports*, 23(3), 176-182.
- Cohen, J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2nd ed. Hillsdale, New Jersey: Erlbaum.
- Costa, N. J., Dahm, C. C., Hurrell, F., Taylor, E. R., Murphy, M. P. (2003). Interactions of mitochondrial thiols with nitric oxide. *Antioxidants and Redox Signaling*, 5(3), 291-305.

- Curnutte, J.T., Babior, B.M. (1987). Chronic granulomatous disease. *Advances in human genetics* (pp. 229-297). Springer US.
- Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A., Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and biophysical research communications*, 107(4), 1198-1205.
- Dole, M., Wilson, F. R., Fife, W. P. (1975). Hyperbaric hydrogen therapy: a possible treatment for cancer. *Science*, 190(4210), 152-154.
- Đorđević, V., Pavlović, D., Kocić, G. (2000). *Biohemija slobodnih radikala*. Medicinski fakultet, Niš.
- Djordjevic, D., Cubrilo, D., Macura, M., Barudzic, N., Djuric, D., & Jakovljevic, V. (2011). The influence of training status on oxidative stress in young male handball players. *Molecular and cellular biochemistry*, 351(1-2), 251-259.
- Đukić M. Oksidativni stres - Kliničko dijagnostički značaj. Beograd: Mono i Manjana; 2008.
- Echtay, K. S., Murphy, M. P., Smith, R. A., Talbot, D. A., Brand, M. D. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side Studies using targeted antioxidants. *Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 47129-47135.
- El Abed, K., Rebai, H., Bloomer, R. J., Trabelsi, K., Masmoudi, L., Zbidi, A. Tabka, Z. (2011). Antioxidant status and oxidative stress at rest and in response to acute exercise in judokas and sedentary men. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, 25(9), 2400-2409.
- Ellman, G.L., (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82 (1), 70-77.
- Ferrari, C.K.B. (2001). Oxidative stress pathophysiology: searching for an effective antioxidant protection. *International Medical Journal*, 8(3), 175-185.
- Finaud, J., Lac, G., Filaire, E. (2006). Oxidative Stress: Relationship with Exercise and Training. *Sports Medicine*, 36(4), 327-358.
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in cell biology*, 15(2), 247-254.
- Fisher-Wellman, K., Bloomer, R. J. (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine*, 8(1), 1.
- Fleury, C., Mignotte, B., Vayssière, J. L. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, 84(2), 131-141.
- Forman, H.J., Azzi, A. (1997). On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology. *FASEB Journal* 11, 374-375.

Franchini, E., Del Vecchio, F.B., Sterkowicz, S. (2009). A special judo fitness test classificatory table. *Archives of Budo*, 5, 127-129.

Fridovich, S. E., Porter, N. A. (1981). Oxidation of arachidonic acid in micelles by superoxide and hydrogen peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 256(1), 260-265.

Fujita, K., Seike, T., Yutsudo, N., Ohno, M., Yamada, H., Yamaguchi, H., Sakumi, K., Yamakawa, Y., Kido, M.A., Takaki, A., Katafuchi, T., Tanaka, Y., Nakabeppu, Y., Noda, M. (2009). Hydrogen in Drinking Water Reduces Dopaminergic Neuronal Loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine Mouse Model of Parkinson's Disease. *PLoS One*, 4(9), e7247.

Fukuda, K. I., Asoh, S., Ishikawa, M., Yamamoto, Y., Ohsawa, I., Ohta, S. (2007). Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 361(3), 670-674.

García-López, D., Häkkinen, K., Cuevas, M. J., Lima, E., Kauhanen, A., Mattila, M., González-Gallego, J. (2007). Effects of strength and endurance training on antioxidant enzyme gene expression and activity in middle-aged men. *Scandinavian journal of medicine science in sports*, 17(5), 595-604.

Gharib, B., Hanna, S., Abdallahi, O. M., Lepidi, H., Gardette, B., De Reggi, M. (2001). Anti-inflammatory properties of molecular hydrogen: investigation on parasite-induced liver inflammation. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, 324(8), 719-724.

Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Vincent, S., Sergent, O., Cillard, J., Gratas-Delamarche, A. (2003). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *European journal of applied physiology*, 89(1), 14-20.

Guzel, N. A., Hazar, S., Erbas, D. (2007). Effects of different resistance exercise protocols on nitric oxide, lipid peroxidation and creatine kinase activity in sedentary males. *Journal of Sports Science and Medicine*, 6(4), 417-422.

Halliwell, B. (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. *The FASEB Journal*, 1(5), 358-364.

Halliwell, B., Gutteridge, J. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*, 219(1), 1.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molecular aspects of medicine*, 8(2), 189-193.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine* (Third edition). Oxford: Clarendon Press.

Halliwell, B., Rafter, J., Jenner, A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 268S-276S.

Hammer, H.F. (1993). Colonic hydrogen absorption: quantification of its effect on hydrogen accumulation caused by bacterial fermentation of carbohydrates. *Gut*, 34, 818-822.

Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S., Floyd, R. A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10), 1456-1462.

Hoffman, J.R., Im, J., Kang, J., Maresh, C.M., Kraemer, W.J., French, D., Nioka, S., Kime, R., Rundell, K.W., Ratamess, N.A., Faigenbaum, A.D., Chance, B. (2007). Comparison of low- and high-intensity resistance exercise on lipid peroxidation: role of muscle oxygenation. *The Journal of Strength Conditioning Research*, 21(1), 118-122.

Hong, Y., Chen, S, Zhang, J.M. (2010). Hydrogen as a selective antioxidant: a review of clinical and experimental studies, *Journal of International Medical Research*, 38(6), 1893-1903.

Huang, C. S., Kawamura, T., Toyoda, Y., Nakao, A. (2010). Recent advances in hydrogen research as a therapeutic medical gas. *Free radical research*, 44(9), 971-982.

Hubner-Wozniak, E., Panczenko-Kresowka, B., Lerczak, K., Posnik, J. (1994). Effects of graded treadmill exercise on the activity of blood antioxidant enzymes, lipid peroxides and nonenzymatic anti-oxidants in long-distance skiers. *Biology of Sport*, 11(4), 217-226.

Ishibashi, T., Sato, B., Rikitake, M., Seo, T., Kurokawa, R., Hara, Y., Naritomi, Y., Hara, H and Nagao, T. (2012). Consumption of water containing a high concentration of molecular hydrogen reduces oxidative stress and disease activity in patients with rheumatoid arthritis: an open-label pilot study. *Medical gas research*, 2, 27.

Ishikawa, I., Hunaiti, A.R., Piechot, G., Wolf, B. (1987). Isolation and characterization of basic superoxide dismutase consisting of Mr-25,000 subunits in rat liver. *European Journal of Biochemistry*, 170(1-2), 317-323.

Ito, M., Ibi, T., Sahashi, K., Ichihara, M., Ito, M., Ohno, K. (2011). Open-label trial and randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of hydrogen-enriched water for mitochondrial and inflammatory myopathies. *Medical gas research*, 1, 24.

Itoh, T., Hamada, N., Terazawa, R., Ito, M., Ohno, K., Ichihara, M and Ito, M. (2011). Molecular hydrogen inhibits lipopolysaccharide/interferon γ -induced nitric oxide production through modulation of signal transduction in macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 411(1), 143-149.

James, A.M., Murphy, M. P. (2002). How mitochondrial damage affects cell function. *Journal of biomedical science*, 9(6), 475-487.

- Jin, F., Cheng, D., Tao, J. Y., Zhang, S. L., Pang, R., Guo, Y. J. Zhao, L. (2013). Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of corilagin in a rat model of acute cholestasis. *BMC gastroenterology*, 13(1), 79.
- Jones, D.P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(4), 849-868.
- Jucker, M and Walker, L.C. (2011). "Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Annals of Neurology*, 70, 532–540.
- Kajiyama, S., Hasegawa, G., Asano, M., Hosoda, H., Fukui, M., Nakamura, N., Kitawaki, J., Imai, S., Nakano, K., Ohta, M. (2008). Supplementation of hydrogen-rich water improves lipid and glucose metabolism in patients with type 2 diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutrition Research*, 28(3), 137-143
- Kang, K.M., Kang, Y.N., Choi, I.B., Gu, Y., Kawamura, T., Toyoda, Y., Nakao, A. (2011). Effects of drinking hydrogen-rich water on the quality of life of patients treated with radiotherapy for liver tumors. *Medical gas research*, 1(1), 11.
- Kellmann, M. (2010). Preventing overtraining in athletes in high-intensity sports and stress/recovery monitoring. *Scandinavian journal of medicine and science in sports*, 20(s2), 95-102.
- Kentta, G., Hassinen, P. (1998). Overtraining and recovery – A conceptual model. *Sports Medicine*, 26, 1-16.
- Kidd, P.M. (2001). Glutathione (Monograph). *Alternative Medicine Review*, 6, 601-607.
- Kitamura, A., Kobayashi, S., Matsushita, T., Fujinawa, H., Murase, K. (2010). Experimental verification of protective effect of hydrogen-rich water against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats using dynamic contrast-enhanced CT. *The British journal of radiology*, 83, 509-514.
- Kiyici, F., Kishali, N.F. (2012). Acute effect of intense exercises on serum superoxide dismutase, catalase and malondialdehyde levels in soccer players. *The Journal of sports medicine and physical fitness*, 52(1), 107-111.
- Knez, W. L., Jenkins, D. G., & Coombes, J. S. (2007). Oxidative stress in half and full Ironman triathletes. *Medicine and science in sports and exercise*, 39(2), 283.
- Kürkçü, R., Tekin, A., Özdag, S., Akcakoyun, F. (2010). The effects of regular exercise on oxidative and antioxidative parameters in young wrestlers. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4(5), 244-251.
- Lech, G., Sterkowicz, S. (2004). The commencement age of training and its effects on technical preferences and achievements attained by judo contestants. *Human Movement*, 5(1), 42-47.

- Lee, D. H., Blomhoff, R., Jacobs, D. R. (2004). Review is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress?. *Free radical research*, 38(6), 535-539.
- Lekhi, C., Gupta, P. H., Singh, B. (2007). Influence of exercise on oxidant stress products in elite Indian cyclists. *British journal of sports medicine*, 41(10), 691-693.
- Lenaz, G., Cavazzoni, M., Genova, M.L., Aurelio, M., Pich, M.M., Pallotti, F., Formiggini, G., Marchetti, M., Castelli, G.P., Bovina, C. (1998). Oxidative stress, antioxidant defences and aging. *Biofactors*, 8,(4), 195-204.
- Levitt, M. D. (1969). Production and excretion of hydrogen gas in man. *New England Journal of Medicine*, 281(3), 122-127.
- Liu, W., Khatibi, N., Sridharan, A., Zhang, J.H. (2011). Application of medical gases in the field of neurobiology. *Medical gas research*, 1(1),13.
- Liu, Y., Fiskum, G., Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry*, 80(5), 780-787.
- Macip, S., Kosoy, A., Lee, S.W., O'Connell, M.J., Aaronson, S.A. (2006). Oxidative stress induces a prolonged but reversible arrest in p53-null cancer cells, involving a Chk-1-dependent G2 checkpoint. *Oncogene*. 25, 6037-47.
- Maguire, J.J., Wilson, D.S., Packer, L. (1989). Mitochondrial electron transport-linked tocoperoxyl radical reduction. *Journal of Biological Chemistry*, 264(36), 21462-21465.
- Mao, Y.F., Zheng, X.F., Cai, J.M., You, X.M., Deng, X.M., Zhang, J.H., & Sun, X.J. (2009). Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(4), 602-605.
- Marin, D.P., Bolin, A.P., Campoio, T.R., Guerra, B.A., Otton, R. (2013). Oxidative stress and antioxidant status response of handball athletes: Implications for sport training monitoring. *International Immunopharmacology* ,17(2), 462-470.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(10), 577-586.
- Mastaloudis, A., Morrow, J.D., Hopkins, D.W., Devaraj, S., Traber, M.G. (2004). Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(10), 1329-1341.
- Matés J.M., Sánchez-Jiménez F.(1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Bioscience*. 15(4),339-345.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C., De Castro, I.N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 32(8), 595-603

Maughan, R. J., Shirreffs, S. M. (2010). Development of hydration strategies to optimize performance for athletes in high-intensity sports and in sports with repeated intense efforts. *Scandinavian journal of medicine and science in sports*, 20(s2), 59-69.

Maughan, R.J and Burke, L.M. (2002). "Handbook of Sports Medicine and Science: Sports Nutrition.

McAnulty, S.R., McAnulty, L.S., Nieman, D.C., Morrow, J.D., Shooter, L.A., Holmes, S., Heward, C., Henson, D.A. (2005). Effect of alpha-tocopherol supplementation on plasma 137 homocysteine and oxidative stress in highly trained athletes before and after exhaustive exercise. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(9), 530-537.

McCord, J.M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative Stress. *The American journal of medicine*, 108(8), 652-659.

McNaughton, L., Backx, K., Palmer, G., Strange, N. (1999). Effects of chronic bicarbonate ingestion on the performance of high-intensity work. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 80(4), 333-336.

Metin, G., Gumustas, M.K., Uslu, E., Belce, A., & Kayserilioglu, A. (2003). Effect of regular training on plasma thiols, malondialdehyde and carnitine concentrations in young soccer players. *Chinese Journal of Physiology*, 46(1), 35-39.

Melikoglu, M. A., Kaldirimci, M., Katkat, D., Sen, I., Kaplan, I., Senel, K. (2008). The effect of regular long term training on antioxidant enzymatic activities. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 48(3), 388-390.

Miyazaki, H., Oh-ishi, S., Ookawara, T., Kizaki, T., Toshinai, K., Ha, S., & Ohno, H. (2001). Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *European journal of applied physiology*, 84(1-2), 1-6.

Miljkovic, D. U.S. Patent No. WO2010147751. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. 2010.

Molinero, O i Márquez, S. (2009). Use of nutritional supplements in sports: risks, knowledge, and behavioural-re-lated factors. *Nutricion Hospitalaria*, 24(2), 128-134.

Morales, J., Álamo, J. M., García-Massó, X., López, J. L., Serra-Añó, P., González, L. M. (2014). Use of heart rate variability in monitoring stress and recovery in judo athletes. *The Journal of Strength Conditioning Research*, 28(7), 1896-1905.

Mueller, S.M., Gehrig, S.M., Frese, S., Wagner, C.A., Boutellier, U., Toigo, M. (2013). Multiday acute sodium bicarbonate intake improves endurance capacity and reduces acidosis in men. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 10(1), 1.

Murphy, M. P., Smith, R.A. (2000). Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 41(2), 235-250.

- Murphy, M.P. (1997). Targeting bioactive compounds to mitochondria. *Trends in biotechnology*, 15(8), 326-330.
- Murphy, M.P. (2001). Development of lipophilic cations as therapies for disorders due to mitochondrial dysfunction. *Expert opinion on biological therapy*, 1(5), 753-764.
- Nagata, K., Nakashima-Kamimura, N., Mikami, T., Ohsawa, I., Ohta, S. (2009). Consumption of molecular hydrogen prevents the stress-induced impairments in hippocampus-dependent learning tasks during chronic physical restraint in mice. *Neuropsychopharmacology*, 34(2), 501-508.
- Naghizadeh, H., Afzalpour, M. E., Zarban, A. (2009). The comparison of antioxidant status and lipid profile of karate athletes with non-athletes. *Journal of Birjand University of Medical Sciences*, 16(3), 54-61.
- Nakao, A., Toyoda, Y., Sharma, P., Evans, M., Guthrie, N. (2010). Effectiveness of hydrogen rich water on antioxidant status of subjects with potential metabolic syndrome- an open label pilot study. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 46(2), 140-149.
- Nakashima-Kamimura, N., Mori, T., Ohsawa, I., Asoh, S., Ohta, S. (2009). Molecular hydrogen alleviates nephrotoxicity induced by an anticancer drug cisplatin without compromising anti-tumor activity in mice. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 64(4), 753-761.
- Nakayama, M., Nakano, H., Hamada, H., Itami, N Nakazawa, R and Ito, S. (2010). "A novel bioactive haemodialysis system using dissolved dihydrogen (H₂) produced by water electrolysis: a clinical trial. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25(9), 3026-3033.
- Niki, E. (2014). Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(2), 809-817.
- Oharazawa, H., Igarashi, T., Yokota, T., Fujii, H., Suzuki, H., Machide, M., et al. (2010). Protection of the retina by rapid diffusion of hydrogen: administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Investigative ophthalmology visual science*, 51(1), 487-492.
- Ohno, K., Ito, M., Ichicara, M., Ito, M. (2012). Molecular hydrogen as an emerging therapeutic medical gas for neurodegenerative and othe diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 152.
- Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., Katsura, K., Katayama, Y., Asoh, S., Ohta, S. (2007). Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nature medicine*, 13(6), 688-694.

Ohta, S. (2011). Recent progress toward hydrogen medicine: potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic applications. *Current pharmaceutical design*, 17(22), 2241-2252.

Ohta, S. (2015). Molecular hydrogen as a novel antioxidant: overview of the advantages of hydrogen for medical applications. *Methods in enzymology*, 555, 289-317.

Ohta, S., Nakao, A., Ohno, K. (2011). The 2011 Medical Molecular Hydrogen Symposium: An inaugural symposium of the journal Medical Gas Research. *Medical gas research*, 1(1), 10.

Ono, H., Nishijima, Y., N. Adachi, Tachibana, S., Chitoku, S., Mukaihara, S., Sakamoto, M., Kudo, Y., Nakazawa, J., Kaneko, K and Nawashiro, H. (2011). "Improved brain MRI indices in the acute brain stem infarct sites treated with hydroxyl radical scavengers, Edaravone and hydrogen, as compared to Edaravone alone. A non-controlled study," *Medical Gas Research*, 1, 12.

Ostojic, S. M. (2012, May). Serum alkalization and hydrogen-rich water in healthy men. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 87, No. 5, p. 501). Mayo Foundation.

Ostojic, S. M. (2015). Molecular hydrogen in sports medicine: new therapeutic perspectives. *International journal of sports medicine*, 36(04), 273-279.

Ostojic, S. M. (2015). Molecular hydrogen: An inert gas turns clinically effective. *Annals of medicine*, 47(4), 301-304.

Ostojic, S. M., Stojanovic, M. D. (2014). Hydrogen-rich water affected blood alkalinity in physically active men. *Research in Sports Medicine*, 22(1), 49-60.

Ostojic, S. M., Markovic, G., Calleja-Gonzalez, J., Jakovljevic, D. G., Vucetic, V., Stojanovic, M. D. (2010). Ultra short-term heart rate recovery after maximal exercise in continuous versus intermittent endurance athletes. *European journal of applied physiology*, 108(5), 1055-1059.

Ostojic, S. M., Vukomanovic, B., Calleja-Gonzalez, J., Hoffman, J. R. (2014). Effectiveness of oral and topical hydrogen for sports-related soft tissue injuries. *Postgraduate medicine*, 126(5), 188-196.

Ostojic, S.M. (2012). The Effects of Hydrogen-rich Formulation for Treatment of Sport related Soft Tissue Injuries. *Clinical Trials*. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01759498>

Ostojic, S.M., Stojanovic, M.D., Calleja-Gonzalez, J., Obrenovic, M.D., Veljovic, D., Medjedovic, B. (2011). Drink with alkaline NORP improve exercise performance in physically active men and women. *Serbian Journal of Sports Sciences*, 5(3). 83-89.

- Paglia, D.E., Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70, 158-169.
- Papp, L.V., Lu, J., Holmagren, A., Khanna, K.K. (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9, 775-806.
- Peeters-Joris, C., Vandevoorde, A.M., Baudhuin, P. (1975). Subcellular localization of superoxide dismutase in rat liver. *Biochemical Journal*, 150(1), 31-39.
- Pelletier, D. M., Lacerte, G., Goulet, E. D. (2013). Effects of quercetin supplementation on endurance performance and maximal oxygen consumption: a meta-analysis. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 23(1), 73-82.
- Pešić, S., Jakovljević, V., Čubrilo, D., Živković, V., Jorga, V., Mujović, V., Stojimirović, B. (2009). Evaluacija oksidativnog statusa kod vrhunskih sportista-karatista u procesu treninga. *Vojnosanitetski Pregled*, 66, 551-555.
- Pierrel, F., Bestwick, M. L., Cobine, P. A., Khalimonchuk, O., Cricco, J. A., Winge, D. R. (2007). Coal links the Mss51 post-translational function to Cox1 cofactor insertion in cytochrome c oxidase assembly. *The EMBO Journal*, 26(20), 4335-4346.
- Podczasny, J.J., Wei, R. (1998). Reduction of iodonitrotetrazolium violet by superoxide radicals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 150(3), 1294-1301.
- Popović, M.L.J., Mitić, N.R., Mirić, M., Radić, I. (2008). Mehanizmi nastanka oksidativnog stresa izazvanog intenzivnom fizičkom aktivnošću. *Praxis Medica*. 36(2), 089-093.
- Powers, S. K., Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, 88(4), 1243-1276.
- Powers, S. K., Lennon, S. L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(04), 1025-1033.
- Powers, S. K., Deruisseau, K. C., Quindry, J., Hamilton, K. L. (2004). Dietary antioxidants and exercise. *Journal of sports sciences*, 22(1), 81-94.
- Qian, L., Cao, F., Cui, J., Huang, Y., Zhou, X., Liu, S., Cai, J. (2010). Radioprotective effect of hydrogen in cultured cells and mice. *Free radical research*, 44(3), 275-282.
- Qian, L., Shen, J., Chuai, Y., Cai, J. (2013). Hydrogen as a new class of radioprotective agent. *International Journal of Biological Sciences*, 9(9), 887-94.
- Raha, S., Robinson, B.H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends in biochemical sciences*, 25(10), 502-508.

- Randelović, J., Ćosić, V., Đurašković, R., Đorđević, V. (2006). Određivanje lipidnih peroksida plazme za vreme testa opterećenja kod sportista. *Glasnik antropološkog društva Jugoslavije*, 41, 333-339.
- Ren, J., Luo, Z., Tian, F., Wang, Q., Wang, K.L (2012). Hydrogen-rich saline reduces the oxidative stress and relieves the severity of trauma-induced acute pancreatitis in rats. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 72 (2012), 1555–1561.
- Rietjens, S.J., Beelen, M., Koopman, R., VAN Loon, L.J., Bast, A., Haenen, G.R. (2007). A single session of resistance exercise induces oxidative damage in untrained men. *Medicine and science in sports and exercise*, 39(12), 2145-2151.
- Robergs, R.A., Ghiasvand, F., Parker, D. (2004). Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287, 502-516.
- Rowiński, R., Kozakiewicz, M., Kędziora-Kornatowska, K., Hübner-Woźniak, E., Kędziora, J. (2013). Markers of oxidative stress and erythrocyte antioxidant enzyme activity in older men and women with differing physical activity. *Experimental gerontology*, 48(11), 1141-1146.
- Sacheck, J.M., Cannon, J.G., Hamada, K., Vannier, E., Blumberg, J.B., Roubenoff, R. (2006). Age-related loss of associations between acute exercise-induced IL-6 and oxidative stress. *The American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 291(2), 340-349.
- Sakai, T., Sato, B, Hara, K, Hara, Y, Naritomi, Y, Koyanagim S, Hara, H, Nagao, T, Ishibashi, T. (2014). Consumption of water containing over 3.5 mg of dissolved hydrogen could improve vascular endothelial function. *Vascular Health and Risk Management*, 10, 591-597.
- Salahudeen, A.K. (2004). Cold ischemic injury of transplanted kidneys: New insights from experimental studies. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 287, 181–187.
- Selley, M.L., Bartlett, M.R., Czeti, A.L., Ardlie, N.G. (1998). The role of (E)-4-hydroxy-2-nonenal in platelet activation by low density lipoprotein and iron. *Atherosclerosis*, 140(1), 105-12.
- Sies, H. (1991). *Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants*, New York, Academic Press.
- Steinberg, J.G., Ba, A., Bregeon, F., Dellioux, S., Jammes, Y. (2007). Cytokine and oxidative responses to maximal cycling exercise in sedentary subjects. *Medicine and science in sports and exercise*, 39(6), 964-968.

- Sterkowich, S. (1995). Special Judo Fitness Test in Judo Players. *Anthropomotoryka*, 12, 29-44.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., Brand, M.D. (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 44784–44790.
- Sun, Q., Kang, Z., Cai, J., Liu, W., Liu, Y., Zhang, J.H., Denoble, P.J., Tao, H., Sun, X. (2009). Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 234, 1212-1219.
- Svischev, I. (2001). Interaction of Contestants at a Judo Competitive Contest. *2nd IJF World Judo Conference in Munich, Germany*.
- Štefan, L., Tepšić, T., Zavidović, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007). Lipid peroxidation – causes and consequences. *Medicina*, 43, 84-93.
- Tauler, P., Sureda, A., Cases, N., Aguilo, A., Rodriguez-Marroyo, J.A., Villa, G., Tur, J.A., Pons, A. (2006). Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 665-671.
- Tian, H.H., Ong, W.S., Tan, C.L. (2009). Nutritional supplement use among university athletes in Singapore. *Singapore Medical Journal*, 50, 165-172.
- Urso, M. L., & Clarkson, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1), 41-54.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44–84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1–40.
- Varamenti, E.I., Kyparos, A., Veskokis, A.S., et al. (2012). Oxidative stress, inflammation and angiogenesis markers in elite female water polo athletes throughout a season. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 3-8.
- Vasquez-Vivar, J., Kalyanaraman, B., Kennedy, M.C. (2000). Mitochondrial aconitase is a source of hydroxyl radical: an electron spin resonance investigation *Journal of Biological Chemistry*, 275, 14064–14069.

Vina, J., Gimeno, A., Sastre, J., Desco, C., Asensi, M., Pallardo, F.V., Cuesta, A., Ferrero, J.A., Terada, L.S., Repine, J.E. (2000). Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life.*, 49(6), 539-544.

Vincent, A.M., Brownlee, M., Russell, J.W. (2002). Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, 368–383.

Watson, T.A., Callister, R., Taylor, R.D., Sibbritt, D.W., MacDonald-Wicks, L.K., Garg, M.L. (2005). Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, 37(1), 63-71.

World Anti-Doping Agency. The World Anti-Doping Code. The 2013 Prohibited List International Standard. Available at: http://www.wada-ama.org/documents/world_anti-doping_program/wadp-prohibited-list/2013/wada-prohibited-list-2013-en.pdf. Accessed July 15, 2013.

Yoritaka, A., Takanashi, M., Hirayama, M., Nakahara, T., Ohta, S., Hattori, N. (2013). Pilot study of H2 therapy in Parkinson's disease: A randomized double-blind placebo-controlled trial. *Movement Disorders*, 28, 836-839.

Yu, P., Wang, Z., Sun, X., Chen, X., Zeng, S., Chen, L., Li, S. (2011). Hydrogen-rich medium protects human skin fibroblasts from high glucose or mannitol induced oxidative damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409, 350-355.

Zadik, Z., Nemet, D., Eliakim, A. (2009). Hormonal and metabolic effects of nutrition in athletes. *Journal of Pediatric Endocrinology Metabolism*, 22, 769-777.

Zembron-Lacny, A., Slowinska-Lisowska, M., Szygula, Z. (2009). Assessment of the antioxidant effectiveness of alpha-lipoic acid in healthy men exposed to muscle damaging exercise. *Journal of physiology and pharmacology*, 60, 139-143.

Zhang, J., Wu, Q., Song, S., Wan, Y., Zhang, R., Tai, M., & Liu, C. (2014). Effect of hydrogen-rich water on acute peritonitis of rat models. *International immunopharmacology*, 21(1), 94-101.

Zhang, J.Y., Song, S.D., Pang, Q., Zhang, R.Y., Wan, Y., Yuan, D.W., & Liu, C. (2015). Hydrogen-rich water protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(14), 4195.