

Univerzitet u Beogradu
Farmaceutski fakultet

Ivana R. Baralić

UTICAJ SUPLEMENTACIJE
ASTAKSANTINOM NA NIVO MARKERA
OKSIDATIVNOG STRESA I NIVO
SEKRETORNOG IgA U SALIVI KOD
MLADIH FUDBALERA

Doktorska disertacija

Beograd, 2012.

University of Belgrade
Faculty of Pharmacy

Ivana R. Baralić

**EFFECT OF ASTAXANTHIN
SUPPLEMENTATION ON OXIDATIVE
STRESS STATUS AND SECRETORY IgA IN
SALIVA IN YOUNG SOCCER PLAYERS**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2012.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Dr sc. Brižita Đorđević, vanredni profesor - mentor

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Jelena Kotur-Stevuljević, docent

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Ljiljana Dimitrijević, naučni savetnik

Institut za virusologiju, vakcine i serume "Torlak"

Datum odbrane:

Zahvalnice

Zahvaljujem se svom učitelju i mentoru, prof. dr Brižiti Đorđević, bez čije dragocene pomoći ovaj rad ne bi bio moguć, koja je svojim nesebičnim zalaganjem učinila da zavolim bromatologiju i pružila mi mogućnost da uđem u krug sjajnih ljudi i naučnika, za punu slobodu koju mi pruža tokom zajedničkog rada, kao i tokom ovog istraživanja. Neizmerno sam zahvalna prof. emeritus Ivanki Miletić što mi je otvorila vrata predivnog sveta nauke, na ukazanom poverenju, strpljenju, savetima i pomoći koju mi je davala u toku mog celokupnog rada.

Zahvaljujem se doc. dr Jeleni Kotur-Stevuljević za sav uloženi trud, znanje i energiju u toku realizacije ovog rada, od ulaska u biohemijску laboratoriju do završne obrade doktorske disertacije. Njen analitički duh i korisne sugestije su pomogli da se studija uradi što bolje i temeljnije.

Zahvaljujem se dr sc. Ljiljani Dimitrijević na ukazanom poverenju, ostvarenoj saradnji i razumevanju u toku pisanja doktorske disertacije.

Dr Nenadu Dikiću se zahvaljujem na velikoj i nesebičnoj pomoći u planiranju i organizaciji ovog istraživanja i stalnom podsticaju da ono bude privedeno kraju.

Zahvalna sam dr Mariji Anđelković i dr Nenadu Radivojeviću na izvanrednom trudu tokom sportsko-medicinskih pregleda i pomoći u sakupljanju uzoraka.

Zahvaljujem se dr Aleksandri Stefanović i mr ph. Jasmini Ivanišević na velikoj pomoći i strpljenju u toku eksperimentalnog rada u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Zahvaljujem se Vesni Stanković i Marini Baranin na pomoći u toku obrade biološkog materijala.

Svojoj sestri, doc. dr Sanji Radojević Škodrić, se zahvaljujem na strpljenju, podršci i ljubavi u svim fazama izrade ove doktorske disertacije. Zahvaljujem joj se što je uvek imala snage da me pokrene kada sam posustajala i što je uvek bila puna entuzijazma i novih ideja.

Zahvaljujem se svim zaposlenima na Katedri za bromatologiju, Katedri za medicinsku biohemiju i kolegama iz kompanije „Velefarm” AD Holding na velikom razumevanju, pomoći i širenju pozitivne energije.

Zahvaljujem se mladim fudbalerima fudbalskog kluba “Partizan” i “Teleoptik” i karatistima karate kluba “CIS Centar” na učešću u studiji.

Svojoj porodici zahvaljujem na strpljenju i razumevanju.

Uticaj suplementacije astaksantinom na nivo markera oksidativnog stresa i nivo sekretornog IgA u salivi kod mladih fudbalera

Sažetak

Intenzivni treninzi dovode do povećanja produkcije slobodnih radikala i mogu doprineti nastanku oksidativnog stresa kod sportista. Pored toga, poremećaj ćelijske homeostaze u mišićima uzrokovan slobodnim radikalima rezultira oštećenjem mišića, bolom, zamorom i smanjenjem sportskih performansi. Do sada je sproveden veliki broj istraživanja sa ciljem da se odredi efekat antioksidanasa na smanjenje oksidativnog stresa i oštećenja mišića, koje nastaju kao posledice intenzivne fizičke aktivnosti. Astaksantin (Asx) je liposolubilna supstanca koja pripada grupi ksantofila, oksidovanih derivata karotenoida, široko rasprostranjen u prirodi. Rezultati do sada sprovedenih istraživanja pokazuju da astaksantin, zbog izvanredne antioksidativne aktivnosti, može imati značajnu ulogu u ishrani ljudi u cilju očuvanja zdravlja i prevenciji hroničnih bolesti. Fiziološki stres uzrokovan dugim i intenzivnim treninzima se ogleda i u prolaznim, ali značajnim promenama u imunom sistemu što se dovodi u vezu sa povećanom incidencijom infekcija, naročito infekcija gornjih respiratornih puteva kod sportista. Do sada je ispitivan uticaj nekoliko nutritivnih mera na promene u imunom sistemu uzrokovanih intenzivnim treninzima: ugljeno-hidratni napici, omega-3 masne kiseline, razni antioksidansi, cink, glutamin, ehinacea i kolostrum, međutim čvrstih dokaza za efikasnost ovih suplemenata još uvek nema.

Stoga je cilj istraživanja bio ispitivanje uticaja suplementacije Asx na oksidativni stres i oštećenje mišića kod mladih fudbalera u toku sezone. Pored toga, ispitivan je i uticaj suplementacije Asx i senzorne stimulacije aromatizovanim napitkom na bazi surutke na mukozni imunitet sportista.

U istraživanju je učestvovalo 40 fudbalera, 28 ispitanika koji nisu imali redovnu intenzivnu fizičku aktivnosti i 20 ispitanika koji su se rekreativno bavili karateom. Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškijskoj deklaraciji i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Udruženja za medicinu sporta Srbije.

Dugogodišnje treniranje fudbala uslovljava povećanje aktivnosti antioksidativnih mehanizama zaštite, ali su i pored toga mladi fudbaleri izloženi većem nivou oksidativnog stresa i oksidativnog oštećenja u odnosu na fizički neaktivne osobe.

Intenzivni fudbalski trening je povezan sa povećanom produkcijom slobodnih radikala, što može smanjiti totalni antioksidativni status. Suplementacija astaksantinom može delimično sprečiti povećanu produkciju slobodnih radikala i trošenje neenzimske antioksidativne zaštite kod mladih fudbalera. Naporan program treniranja u toku sezone dovodi do povećanja produkcije superoksidnog anjona i smanjenja aktivnosti enzima superoksid dizmutaze. Ipak, uočeno smanjenje totalnog oksidativnog statusa i prooksidativno-antioksidativnog balansa, ukazuje na smanjenje nivoa oksidativnog stresa, što je verovatno posledica adaptivnog odgovora na intenzivne treninge. Suplementacija astaksantinom ima povoljan efekat na unapređenje aktivnosti enzima paraoksonaze 1 i ukupan sadržaj sulfhidrilnih grupa kod mladih fudbalera. Primena astaksantina u toku sezone može stabilisati mišićnu membranu i na taj način smanjiti oštećenje mišićnih ćelija do određenog stepena. Intenzivan trening kod fudbalera, ali i rekreativni karate trening dovode do pada nivoa sekretornog IgA u salivi. Primena aromatizovanog napitka na bazi surutke nakon treninga može biti od koristi u cilju održavanja salivarnog protoka, a na taj način i količine sIgA u salivi. Rezultati pokazuju da suplementacija astaksantinom može imati povoljan efekat na produkciju sIgA u salivi kod mladih fudbalera u periodu intenzivnih treninga tokom sezone.

Ključne reči: oksidativni stres, paraoksonaza 1, mukozni imunitet, astaksantin, fudbal

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Hemija hrane i dijetetskih suplemenata

UDK: 612.395 : [616-008.9 : 796.2]

615.279 : 577.161.1

Effect of astaxanthin supplementation on oxidative stress status and secretory IgA in saliva in young soccer players

Abstract

Exhaustive physical activity is associated with increased production of reactive oxygen species and oxidative stress. Enhanced free radical production leads to cellular loss of redox homeostasis and might result in muscular injury, soreness, and fatigue, and, consequently, decrements in physical performance. Methods to reduce free radical production and subsequent oxidative stress and muscle damage during and following physical exercise have been a priority of much research activity. Various antioxidants and their combinations were investigated. Astaxanthin is one of the main pigments belonging to the family of the xanthophylls, which is generally distributed in seafood. Recent studies continue to evidence the multiple possibilities of astaxanthin application in providing benefits to human health. The physiologic stress induced by prolonged and intensive exertion is reflected in transient yet significant immune system perturbations in multiple body compartments. The influence of several nutritional countermeasures to exercise-induced alterations of mucosal immunity have been investigated including carbo-hydrate, zinc, glutamine, bovine colostrum, caffeine, as well as several antioxidants.

The purpose of the present investigation was to determine the effects of astaxanthin supplementation on oxidative stress and muscle damage in young soccer players while following their habitual dietary pattern and training program during competitive season. In addition, the effect of couple nutritional measures (sensory stimulation and astaxanthin supplementation) on mucosal immunity were investigated

The study was performed in a group of 40 soccer players, 28 high school pupils, who did not practice intensive physical exercise regularly and 20 subjects who practiced karate recreationally. The study was conducted according to the guidelines laid down in Declaration of Helsinki. Experimental procedures were approved by the Ethical Committee of Sports Medicine Association of Serbia.

Long-term soccer training is accompanied by an increased capacity of antioxidant systems. However, soccer players are exposed to higher level of oxidative stress in comparison to sedentary people. Soccer exercise is associated with excessive production of free radicals and oxidative stress which might diminish total antioxidant

status. Supplementation with astaxanthin could prevent exercise induced free radical production and depletion of non enzymatic antioxidant defense in young soccer players. Regular soccer training over the period of 90 days provokes increased production of superoxide anion and decreased activity of superoxide dismutase. On the other hand, soccer training may result in decreased total oxidant status and prooxidant-antioxidant balance, probably due to an up regulation in the body's antioxidant defense system. Astaxanthin supplementation had beneficial effect on improving paraoxonase 1 activity toward paraoxon and diazoxon, as well as total sulphydryl groups content in young soccer players. Supplementation with astaxanthin might stabilize sarcolemma leading to less muscle damage. Intensive soccer exercise, as well as recreational karate exercise induced decrease in sIgA absolute concentration and sIgA secretion rate and the magnitude of these alterations reflects the intensity, duration and chronicity of the exercise. Application of flavored whey-based drink elevated salivary flow and might be helpful in maintenance of total sIgA amount covering mucosal surface. Astaxanthin might have beneficial effect on sIgA production in saliva in young soccer player during training season.

Ključne reči: oxidative stress, paraoxonase 1, mucosal immunity, astaxanthin, soccer,

Scientific field: Pharmacy

Major in: Chemistry of food and dietary products

UDK: 612.395 : [616-008.9 : 796.2]
615.279 : 577.161.1

SADRŽAJ

1.UVOD	1
1.1. Oksidativni stres	2
1.2. Antioksidativna zaštita	4
1.2.1. Antioksidativni enzimi	4
1.2.2. Neenzimski antioksidansi	7
1.3. Merenje oksidativnog stresa	10
1.4. Oksidativni stres u sportu	12
1.4.1. Produkcija slobodnih radikala tokom fizičke aktivnosti	12
1.4.2. Oksidativni stres i aerobni trening	14
1.4.3. Oksidativni stres i anaerobni trening	16
1.4.4. Oksidativni stres i redovno treniranje – fenomen hormeze	17
1.4.5. Uticaj slobodnih radikala na oštećenje mišića	18
1.4.6. Oksidativni stres i oštećenje mišića u fudbalu	18
1.5. Primena antioksidanasa u sportu	19
1.5.1. Primena antioksidanasa u cilju smanjenja oksidativnog stresa	19
1.5.2. Primena antioksidanasa u cilju smanjenja oštećenja mišića	20
1.5.3. Primena antioksidanasa u cilju smanjenja oksidativnog stresa i oštećenja mišića u fudbalu	21
1.6. Imuni sistem sportista	22
1.6.1. Uticaj fizičke aktivnosti na mukozni imunitet	22
1.6.2. Uloga ishrane u optimalnoj funkciji imunog sistema	23
1.6.3. Primena antioksidanasa u prevenciji supresije mukoznog imuniteta	23
1.7. Astaksantin	24
1.7.1. Hemijska struktura astaksantina	25
1.7.2. Bioraspoloživost i metabolizam astaksantina	26
1.7.3. Izvori astaksantina	27
1.7.4. Astaksantin kao antioksidans	28
1.7.5. Anti-inflamatorne osobine astaksantina	29
1.7.6. Primena astaksantina u promociji zdravlja	31
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	35

3. ISPITANICI I METODE	36
3.1. Ispitanici	36
3.2. Dizajn eksperimenta	37
3.3. Metode	39
3.3.1. Antropometrijska merenja i određivanje VO_{2max}	40
3.3.2. Određivanje biohemijskih i hematoloških parametara	41
3.3.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa	41
3.3.3.1. <i>Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBKRS)</i>	41
3.3.3.2. <i>Određivanje uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP)</i>	42
3.3.3.3. <i>Određivanje nivoa superoksid anjon radikala (O_2^-) u plazmi</i>	43
3.3.4. Određivanje parametara antioksidativne zaštite	44
3.3.4.1. <i>Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaza (SOD) u plazmi</i>	44
3.3.4.2. <i>Određivanje ukupnog sadržaja sulfhidrilnih (-SH) grupa</i>	46
3.3.4.3. <i>Određivanje aktivnosti enzima paraoksonaza 1 (PON 1)</i>	47
3.3.5. Određivanje parametara oksidativnog statusa	50
3.3.5.1. <i>Određivanje totalnog oksidativnog statusa u serumu (TOS)</i>	50
3.3.5.2. <i>Određivanje totalnog antioksidativnog statusa u serumu (TAS)</i>	51
3.3.5.3. <i>Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB)</i>	53
3.3.6. Određivanje sekretornog IgA u salivi	55
3.3.7. Hemijska analiza tečne surutke i aromatizovanog napitka na bazi surutke	56
3.4. Statistička obrada podataka	57
4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	58

4.1. Uticaj dugotrajnog redovnog treniranja na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite	58
4.2. Uticaj treniranja i suplementacije astaksantinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite	61
4.2.1. Opšti podaci o sportistima	61
4.2.2. Osnovni biohemijski i hematološki parametri	63
4.2.3. Parametri oksidativnostresnog statusa	68
4.2.3.1. Parametri oksidativnog stresa	68
4.2.3.2. Parametri antioksidativne zaštite	71
4.2.3.3. Parametri oksidativnog statusa	74
4.3. Uticaj intenzivnog treninga i suplementacije astaksantinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite	76
4.3.1. Parametri oksidativnog stresa	76
4.3.2. Parametri antioksidativne zaštite	78
4.3.3. Parametri oksidativnog statusa	82
4.4. Uticaj suplementacije astaksantinom na oštećenje mišića kod mladih fudbalera	84
4.5. Uticaj različitih preventivnih mera na nivo sekretornog IgA u salivi	88
4.5.1. Uticaj senzorne stimulacije na nivo sekretornog IgA u salivi kod karatista rekreativaca	88
4.5.2. Uticaj suplementacije astaksantinom na nivo sekretornog IgA u salivi kod mladih fudbalera	93
5. DISKUSIJA	98
5.1. Uticaj dugotrajnog treniranja na oksidativnostresni status mladih fudbalera	99
5.2. Uticaj treniranja i suplementacije astaksantinom na aktivnost paraoksonaze 1 i nivo oksidativnog stresa kod mladih fudbalera	102

5.3. Uticaj intenzivnog treninga i suplementacije astaksantinom na oksidativnostresni status mladih fudbalera	108
5.4. Uticaj suplementacije astaksantinom na oštećenje mišića kod mladih fudbalera	111
5.5. Uticaj različitih nutritivnih mera na nivo sekretornog IgA u salivi	112
5.5.1. Uticaj senzorne stimulacije na nivo sekretornog IgA u salivi kod karatista rekreativaca	113
5.5.2. Uticaj suplementacije astaksantinom na mukozni imunitet mladih fudbalera	115
6.ZAKLJUČCI	119
7.LITERATURA	121
BIOGRAFIJA	150
PRILOZI 1-3	151

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

8-OhdG- 8-hidroksi 2-deoksiguanozin

ABTS- azinobis-etilbenzotiazolin sulfonska kiselina

ADP- adenzin-di-fosfat

ALT- alanin aminotransferaza

AMD- adultna makularna degeneracija

ANCOVA- analiza kovarijance

ANOVA- analiza varijanse

AOPP- advanced oxidation protein products, produkti uznapredovale oksidacije proteina

PK- proteinski karbonili (PK)

AP 1- aktivator proteina 1

AST- aspartat aminotransferaza

ASX- astaksantin

ATP- adenzin-mono-fosfat

ATP- adenzin-tri-fosfat

CAT- katalaza

CK- kreatin kinaza

CRP- C reaktivni protein

DMSO- dimetilsulfoksida

DNK- dezoksiribonukleinska kiselina

DOMS- delayed onset of muscle soreness, odložena upala mišića

DTNB- dinitro-ditio-benzojeva kiselina

DZOazna- diazoksonazna

EDTA- etilendiaminotetrasirćetna kiselina

ELISA- enzyme-linked immunosorbent assay

ESRS- electron spin resonance spectroscopy, elektronska spinalna rezonantna spektroskopija

FRAP- ferric reducing ability of plasma, test sposobnosti redukcije feri jona

GPX- glutation peroksidaza

GR- glutation reduktaza

GSH- redukovani glutation

GSSG- oksidovani glutation
H₂O₂- vodonik peroksid
Hb- hemoglobin
Hct-hematokrit
HDL- high density lipoprotein, lipoprotein velike gustine
HDL-H- HDL holesterol
HKU- hidrogen-peroksid komplementarne jedinice
HOLuk- ukupni holesterol (HOLuk),
IL-6- interleukin 6
IMHP- izopropil-metil-hidroksipirimidin
ITM- indeks telesne mase
LDH (laktat dehidrogenaza
LDL- low density lipoprotein, lipoprotein male gustine
LDL-H- LDL holesterol
LPO- lipidnih hidroperoksida
MAPK- mitogen aktivisane protein kinaze
MDA- malondialdehid
NAC- N-acetil cistein
NADH- redukovani nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH- redukovani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
NBT- nitrobluetetrazolijuma
NF-κB- nuklearni faktor-κB
O₂^{·-}- superoksidani anjon radikal
ORAC- oxygen radical absorbance capacity, kapacitet apsorpcije reaktivnih
kiseonikovih jedinjenja
PAB- prooksidativno-antioksidativni balans
PAB- prooksidativno-antioksidativni balans
PLA₂- fosfolipaza A₂
POazna- paraoksonazna
PON1- paraokonaza 1
RDA- recommended dietary allowances
RNS- reactive nitrogen species

ROS- reactive oxygen species
RPE- ratings of perceived exertion, subjektivna procena zamora
RSS- reactive sulfur species
SH - sulfhidrilne grupe
SOD- superoksid dismutaza
SR- sarkoplazmatski retikulum
TAC- totalni antioksidativni kapacitet
TAS- totalni antioksidativni status
TBA- tiobarbiturna kiselina
TBKRS- tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance
TEAC- trolox equivalent antioxidant capacity, troloks ekvivalentni antioksidativni kapacitet
TG- trigliceridi
TMB- tetrametilbenzidin
TNF- α - tumor necrosis factor- α
TOS- totalni oksidativni status
TP- ukupni proteini
URTI- upper respiratory tract infection, infekcija gornjih respiratornih puteva
UV/VIS- ultraviolet/vidljiva svetlost
VLDL- very low density lipoprotein, lipoprotein male gustine
VO_{2max} – maksimalna potrošnja kiseonika ili aerobni kapacitet
XDH- ksantin dehidrogenaza

1. UVOD

Redovna i umerena fizička aktivnost ima brojne povoljne fiziološke efekte koji unapređuju fizičko stanje organizma i doprinose smanjenju rizika od razvoja brojnih hroničnih bolesti. Rizik od razvoja bolesti se smanjuje kao funkcija fizičke aktivnosti do jednog određenog nivoa, dok sa daljim povećanjem intenziteta i trajanja vežbanja, raste i rizik nastanka hroničnih bolesti. Smatra se je upravo oksidativni stres veza između intenzivne fizičke aktivnosti i bolesti. Određeni, optimalni nivo produkcije slobodnih radikala omogućava poboljšanje zdravstvenog stanja, dok produkcija prooksidanasa koja prevazilazi optimalni nivo, može prekoračiti kapacitet antioksidativne zaštite i tako izazvati nepopravljiva oksidativna oštećenja i potencijalno dovesti do razvoja bolesti.

Tokom poslednje 3 decenije znanje o biološkim posledicama oksidativnog stresa, uzrokovanog intenzivnom i dugotrajnom fizičkom aktivnošću, značajno se proširilo. Ranije se smatralo da povećana produkcija slobodnih radikala u toku intenzivnih treninga predstavlja veliku opasnost za fiziološke funkcije sportista i da je treba smanjiti ili eliminisati. Ipak, novija otkrića su pokazala da povećana produkcija slobodnih radikala može predstavljati stimulus za ushodnu regulaciju antioksidativnih enzima i povećanje aktivnosti zaštitinih mehanizama. Sa druge strane, ovaj adaptivni odgovor ponekad ne može da kompenzuje poremećenu redoks ravnotežu u organizmu, pa su potrebe sportista za antioksidansima povećane, naročito u periodu intenzivnih treninga i takmičenja. Pored toga, unos antioksidanasa putem hrane kod sportista je vrlo često niži od preporučenog. Stoga, suplementacija antioksidansima može pružiti značajnu potporu endogenim antioksidansima u cilju smanjenja povećane produkcije slobodnih radikala i oksidativnog stresa.

Potrebna su dodatna ispitivanja veze između fizičke aktivnosti i oksidativnog stresa i posledica koje može imati, kao i istraživanja o efektima suplementacije antioksidansima.

1.1. Oksidativni stres

Oksidativni stres je stanje u kome je delikatna ravnoteža između produkcije proksidansa-slobodnih radikala i njihovog uklanjanja putem antioksidativnih zaštitnih mehanizama pomerena u smeru stvaranja slobodnih radikala (Fisher-Welman K, 2009). Slobodni radikali su molekuli ili delovi molekula koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u poslednjoj orbitali (Finaud J, 2006). Određena stanja ubrzavaju, odnosno uslovljavaju hroničnu produkciju slobodnih radikala, što može dovesti do preopterećenja kapaciteta antioksidativnih mehanizama zaštite, stalnog poremećaja redoks ravnoteže i promena u redoks senzitivnim signalnim putevima. Ovaj poremećaj uslovljava oksidativna oštećenja nukleinskih kiselina, lipida i proteina, a preko promena u ekspresiji gena, može dovesti do apoptoze zdravih ćelija i sistemske inflamacije (Droge W, 2002). Umerene, kao i izrazite promene u redoks potencijalu, kao posledica hroničnog oksidativnog stresa najverovatnije imaju ulogu u nastanku i razvoju velikog broja akutnih i hroničnih bolesti.

Kada govorimo o slobodnim radikalima uglavnom se misli na reaktivna kiseonikova jedinjenja (eng. reactive oxygen species-ROS), zato što su ona uključena u esencijalne fiziološke fenomene, kao što je imuni odgovor i oksidativni stres. Pored toga slobodni radikali mogu da sadrže atom azota (eng. Reactive nitrogen species-RNS) ili sumpora (eng. reactive sulfur species-RSS) (Tabela 1) (Finaud J, 2006).

Bazalni nivo ROS se konstantno produkuje i eliminiše iz organizma. U živim organizmima ova delikatna ravnoteža je odgovorna za uspostavljanje intracelularnog redoks stanja, koji ima ulogu u optimizaciji ćelijskih funkcija. U ćelijama sisara postoji veliki broj signalnih puteva koji su osetljivi na intracelularno redoks okruženje i mogu biti aktivirani posredstvom oksidativnog stresa. Prolazne promene u redoks ravnoteži, koje nastaju usled povećane produkcije reaktivnih kiseonikovih jedinjenja ili smanjene antioksidativne zaštite, dovode do pomeranja ravnoteže ka sredini koja ima oksidativne karakteristike, što predstavlja signal za aktivaciju određenih mehanizama od značaja za optimalne fiziološke funkcije (Droge W, 2002). Neke primeri specifičnih redoks osetljivih funkcija i njihovih signalnih mehanizama su:

1. Regulacija vaskularnog tonusa preko guanilat ciklaze ili transkripciona/post-transkripciona regulacija azot oksid sintaze preko aktivacije nuklearnog faktora- κ B (NF- κ B) i mitogen aktivisane protein kinaze (MAPK).
 2. Amplifikacija imunog odgovora i apoptoze preko aktivacije aktivator proteina 1 (AP1) i NF- κ B transkripcionog faktora u humanim T ćelijama.
 3. Regulacija insulin receptor kinazne aktivnosti preko povećane aktivnosti protein tirozin fosfataze.
 4. Povećanje ekspresije antioksidativnih enzima i glutaciona kao odgovor na MAPK i NF- κ B aktivaciju u cilju ponovnog uspostavljanja redoks ravnoteže.
- Ovaj poslednji primer je naročito karakterističan za sport, jer se smatra da povećana produkcija ROS tokom i posle treninga predstavlja signal za povećanje aktivnosti antioksidativnih zaštitnih mehanizama (Fisher-Welman K, 2009).

Tabela 1. Klasifikacija i osnovna delovanja slobodnih radikala

Slobodni radikal	Oznaka	Poluživot	Delovanje
Reaktivna kiseonikova jedinjenja			
ROS			
Superoksidani anjon	$O_2^{\bullet -}$	10^{-5} sek	
Singletni kiseonik	1O_2	1 μ sek	
Ozon	O_3	Stabilan	Oksidacija i
Hidroksil radikal	HO^{\bullet}	10^{-9} sek	Peroksidacija
Vodonik peroksid	H_2O_2	Stabilan	Lipida
Hipohlona kiselina	$HOCl$	Stabilna	Oksidacija protein
Alkoksi radikal	RO^{\bullet}	10^{-6} sek	Oštećenje DNK
Peroksi radikal	ROO^{\bullet}	7 sek	
Hidroperoksi radikal	$ROOH^{\bullet}$	-	
Slobodni radikali azota			
RNS			
Azotmonoksid radikal	NO^{\bullet}	-	Peroksidacija lipida
Azotdioksid radikal	NO_2^{\bullet}	1-10 sek	Oštećenje DNK
Peroksinitrit	$ONOO^{\bullet -}$	0,005 sek	Oksidacija protein
Slobodni radikali sumpora			
RSS			
Tili radikal	RS		Oksidacija proteina Oštećenje DNK

1.2. Antioksidativna zaštita

Antioksidansi su jedinjenja koja umanjuju oksidativna oštećenja u biološkim sistemima tako što sprečavaju formiranje slobodnih radikala ili reaguju sa njima pre nego stupe u reakciju sa važnim biomolekulama. Čelije su zaštićene od oksidativnih oštećenja kompleksnom mrežom antioksidanasa, koja uključuje enzimske i neenzimske antioksidanse (Close DC, 2006). Neenzimski antioksidansi su jedinjenja male molekulske težine, koja se sintetisu u organizmu ili se unose putem hrane. Da bi obezbedili efikasnu zaštitu, ovi antioksidansi su strateški raspoređeni u intra i ekstracelularnom prostoru. Slika 1. ilustruje ćelijske lokacije najvažnijih antioksidanasa (Powers SK, 2004). Efikasnost antioksidativnog sistema zavisi od unosa vitamina i mikronutrijenata putem hrane i sinteze antioksidativnih enzima, koja se može menjati pod uticajem redovnih i jednokratnog treninga, ishrane ili starenja (Finaud J, 2006).

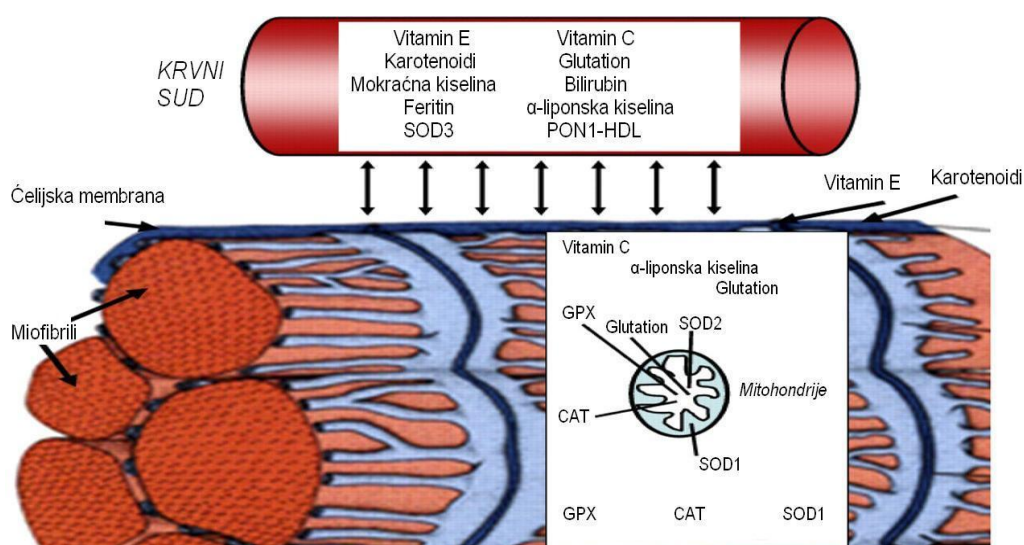
1.2.1. Antioksidativni enzimi

Antioksidativni enzimi katalizuju reakcije uklanjanja ROS iz sistema ili reakcije regeneracije, odnosno redukcije oksidovanih antioksidanasa (Deaton CM, 2003). Najvažniji enzimski antioksidansi su:

SUPEROKSID DIZMUTAZA (SOD) je enzim koji neutrališe superoksidni anjon i predstavlja prvi enzim u liniji odbrane od oksidativnog stresa. Ovaj enzim je primarno lokalizovan u mitohondrijama i u citosolu ćelija. U skeletnim mišićima postoje dve izoforme: CuZnSOD (SOD1), koja je prvenstveno lokalizovana u citosolu i MnSOD (SOD2) koja se nalazi u mitohondrijama (Powers SK, 2008). U mirovanju, u svim ćelijama, najveći deo formiranog superoksidnog anjona neutrališe SOD u mitohondrijama, a samo mali deo SOD u citosolu. Međutim, u mišićnim ćelijama, 65 % - 85 % aktivnosti SOD se odvija u citosolu (Finaud J, 2006). Postoji i ekstracelularna forma SOD (SOD3), koja zahteva prisustvo Cu i Zn za svoju aktivnost, a nalazi se i u plazmi i tkivima. Ovaj protein se sekretuje u ekstracelularni prostor i formira glikozilirani homotetramer koji se vezuje za ekstracelularni matriks (ECM) i površinu ćelija. Jedan deo sintetisanog enzima se cepa blizu C terminalnog kraja pre oslobađanja u ekstracelularni prostor i formira cirkulišuće tetramere koji se ne vezuju za ECM (Zelko IN, 2003).

GLUTATION PEROKSIDAZA (GPX) se nalazi u mitohondrijama, citosolu i membranama ćelija i katalizuje redukciju vodonik peroksida (H_2O_2) i organskih hidroperoksida u prisustvu redukovanog glutaciona (GSH) kao donora elektrona, pri čemu se formira oksidovani glutation (GSSG). Aktivnost GPX zavisi od prisustva selena. Postoji pet vrsta ovog enzima koji se razlikuju prema specifičnosti supstrata i lokalizaciji u ćeliji (Powers SK, 2008).

GLUTATION REDUKTAZA (GR) je esencijalna za konverziju oksidovanog glutaciona (GSSG) u redukovani oblik (GSH) uz prisustvo NADPH (redukovani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat) kao redukcionog faktora (Deaton CM, 2003). Odnos oksidovanog i redukovanog glutaciona je važan indikator oksidativnog stresa. Usled povećane produkcije ROS, dolazi do uznapredovale oksidacije GSH u GSSG, a recikliranje GSH je limitirano aktivnošću GR i sadržajem NADPH (Ji LL, 1995). Smanjenje GSH/GSSG se uočava sa starenjem ili nakon fizičke aktivnosti, a može imati ulogu i u etiologiji nekih neurodegenerativnih bolesti (Finaud J, 2006). Održavanje optimalnog odnosa GSH/GSSG je vrlo važno, s obzirom na višestruku ulogu koju glutation ima u antioksidativnom sistemu zaštite. Pored toga, akumulacija GSSG je toksična jer može uticati na formiranje disulfidnih veza u proteinima enzimima i DNK. Ipak nema dokaza da se ovi procesi dešavaju tokom fizičke aktivnosti (Ziegler DM, 1985).



Slika 1. Lokalizacija najvažnijih antioksidativnih enzima i neenzimskih antioksidanasa u ćeliji. PON1-paraoksonaza 1; GPX-glutation peroksidaza; SOD-superoksid dizmutaza; CAT-katalaza (preuzeto iz Powers SK i sar./ *Physiological Reviews* 2008).

KATALAZA (CAT) ima nekoliko važnih bioloških funkcija od kojih je najvažnija eliminacija H_2O_2 iz sistema razlaganjem na vodu i kiseonik. Široko je rasprostranjena u ćelijama, prvenstveno u peroksizomima i mitohondrijama (Finaud J, 2006). Gvožđe je neophodni kofaktor, vezan za aktivno mesto enzima. I GPX i CAT imaju istu funkciju-neutralizacija H_2O_2 , s tim što je prvi enzim efikasniji u prisustvu većih koncentracija H_2O_2 , dok katalaza ima funkciju u eliminaciji H_2O_2 u manjim koncentracijama (Powers S, 2008).

HUMANA SERUMSKA PARAOKSONAZA 1 (EC 3.1.8.1, arildialkilfosfataza, PON1) je kalcijum zavisna esteraza koji se sintetise u jetri, a zatim sekretuje u krv gde se vezuje za lipoproteine velike gustine (eng. high density lipoprotein – HDL) (Draganov DI, 2004). PON1 ima važnu ulogu u prevenciji ateroskleroze, jer je pokazano da PON1 sprečava oksidativne modifikacije lipoproteina male gustine (eng. low density lipoprotein – LDL) i HDL čestica uzrokovane slobodnim radikalima (Costa LG, 2011). Antiaterogene osobine PON1 se karakterišu sposobnošću ovog enzima da hidrolizuje lipidne perokside u humanoj aterosklerotskoj leziji (La Du BN, 1999). Humani PON1 enzim je polimorfan i različite osobe imaju kako različite koncentracije ovog enzima tako i značajne varijacije u aktivnosti prema istom supstratu. Enzim PON1 ima dva uobičajena kodirajuća polimorfizma: supstitucija metionina (M) leucinom (L) na poziciji 55 i supstitucija glutamina (Q) argininom (R) na poziciji 192 (Humbert R, 1993). Proučavanjem katalitičkih aktivnosti odgovarajućih genotipova prema različitim supstratima uočene su varijacije u afinitetima prema različitim nefiziološkim supstratima. Dokazane su supstrat-zavisne razlike između $PON1_{Q192R}$ izoformi: $PON1_{R192}$ varijanta ima jače izražen afinitet prema paraoksonu kao sustratu u odnosu na $PON1_{Q192}$, dok prema dizaoksonu, ne postoji razlika u afinitetima između $PON1_{Q192}$ i $PON1_{R192}$ izoformi, ali su reakcioni uslovi podešeni tako da smanjuju afinitet R varijante prema ovom supstratu (Mackness B, 2008). Pored toga, $PON1_{Q192}$ fenotip je efikasniji u metabolizmu oksidovanih HDL i LDL čestica u odnosu na $PON1_{R192}$ (Costa LG, 2011). Ipak, faktori sredine kao što su ishrana, fizička aktivnost, pušenje, kao i lekovi mogu menjati aktivnost ovog enzima (Ferre N, 2003). S obzirom na ulogu PON1 u zaštiti od kardiovaskularnih bolesti, kao i na činjenicu da je njena aktivnost smanjena u nekim patološkim stanjima (Rajković MG, 2010; Kotur-Stevuljevic J, 2006), posebna pažnja se poklanja faktorima koji mogu menjati aktivnosti PON1.

1.2.2. Neenzimski antioksidansi

TIOLI su grupa molekula koje imaju sulfhidrilne ostatke na aktivnim mestima. Sintetišu se iz aminokiselina koje sadrže sumpor (cisteina ili metionina). Imaju brojne funkcije u biološkim sistemima - uloga u sintezi proteina, redoks sistemima, imunitetu. Zauzimaju važno mesto u kompleksnoj mreži endogenih antioksidansa (Finaud J, 2006).

Glutation (GSH) je najzastupljeniji neproteinski tiol u ćelijama. On se primarno sintetisuje u jetri i transportuje se putem krvi do tkiva. Tkiva koja su intenzivno izložena prooksidansima imaju visok nivo GSH - sočivo u oku, jetra. GSH reaguje direktno sa velikim brojem slobodnih radikala, doniranjem jednog vodonikovog atoma. On je supstrat za GPX u reakciji eliminacije H_2O_2 i organskih hidroperoksida. Pored toga, GSH omogućava održavanje drugih antioksidansa, kao što su vitamin E i C, u redukovanom stanju (Powers SK, 2008). Smatra se da je odnos GSH/GSSG *in vivo* preko 100:1, ali eksperimentalni podaci pokazuju da je taj odnos 10 do 50:1, zbog neizbežne oksidacije GSH tokom testa (Ji LL, 1995). U stanju oksidativnog stresa, moguće je smanjenje odnosa redukovanog i oksidovanog GSH (GSH/GSSG), kao i smanjenja ukupnog sadržaja tiola (Finaud J, 2006).

α -Liponska kiselina je tiol koji inhibira peroksidaciju lipida i pomaže redukciju oksidovanih formi vitamina E i C. Takođe, redukuje cistin do cisteina u procesu sinteze tiola (Finaud J, 2006). α -liponska kiselina je kofaktor za α dehidrogenaza komplekse i učestvuje u reakcijama S-O transfera. Nalazi se u malim količinama u tkivu životinja i vezana je za enzimski kompleks što ograničava njenu funkciju kao antioksidansa (Powers SK, 2008).

MOKRAĆNA KISELINA je krajnji ekskretorni produkt metabolizma purina i važan antioksidans male molekulske težine u biološkim tečnostima kod ljudi. Mokraćna kiselina može da neutrališe peroksil, hidroksil radikale i singletni kiseonik (Finaud J, 2006).

BILIRUBIN je krajnji proizvod metabolizma hemoproteina. Ima snažni antioksidativni potencijal protiv peroksil radikala i štiti ćelije od toksičnih nivoa vodonik peroksida (Powers SK, 2008).

FERITIN- Gvožđe je neophodan mikronutrijent za normalan rast i proliferaciju ćelija, a ima antioksidativni efekat kao kofaktor enzima katalaza. Ipak, joni gvožđa mogu delovati i prooksidativno, jer oksiduju vitamin C i katalizuju reakciju konverzije

vodonik peroksida do hidroksil radikala (Powers SK, 2008). Stoga je gvožđe potencijalni prooksidans, a feritin, jedan od proteina uključenih u metabolizam gvožđa, ima važnu ulogu u održavanju optimalne ravnoteže gvožđa. (Finaud J, 2006). Povećana sinteza feritina je uočena kao odgovor na treniranje, oštećenje ćelija ili inflamaciju, odnosno na stanja koja promoviraju oksidativni stres (Orino K, 2001; Arosio P, 2002).

TRANSFERIN i CERULOPLAZMIN su helatni agensi koji vezuju metale i sprečavaju metalne jone da učestvuju u formiranju peroksil radikala. Pored toga, albumin i drugi proteini krvi doprinose ukupnom antioksidativnom kapacitetu krvi nespecifičnim vezivanjem slobodnih radikala (Close DC, 2006).

VITAMIN E- Pod vitaminom E se podrazumeva 8 strukturnih izomera tokoferola i tokotrienola, od kojih je α -tokoferol najpoznatiji i ima najveću antioksidativnu aktivnost. (Lukaski CH, 2004). Vitamin E prvenstveno štiti polinezasićene masne kiseline ćelijskih membrana i subćelijskih struktura od oksidativnih oštećenja. Kao antioksidans, vitamin E je naročito važan, jer ima sposobnost da konvertuje superoksid, hidroksil i peroksil radikale u manje reaktivne forme. Iako je vitamin E efikasan antioksidans, interakcija sa slobodnim radikalima dovodi do smanjenja funkcionalnog vitamina E i formiranja vitamin E radikala (Powers SK, 2004). Deficit vitamina E je povezan sa neurološkim oštećenjima i hemolizom eritrocita, negativno utiče na funkciju skeletnih mišića - povećava oksidativni stres u mišićima, menja tip mišićnih vlakana, uzrokuje degradaciju i inflamatorne procese koji mogu dovesti do distrofičnih stanja (Pette D, 1986). Rezultati analize 22 studije koje su obuhvatile i sportiste koji se bave sportovima izdržljivosti i snage, pokazali su da oni konzumiraju dovoljne količine vitamina E. Ipak, većina sportista je uzimala dijetetske suplemente (Economos CD, 1993). Ostale studije su pokazale da 53% sportista na koledžu, 50% gimnastičara u adolescentskom dobu i 38% balerina uzima vitamin E u količini koja je manja od 70% preporučenog dnevnog unosa (eng. recommended dietary allowances-RDA) (Lukaski CH, 2004).

VITAMIN C - Za razliku od vitamina E, vitamin C je hidrosolubiln i svoju antioksidativnu aktivnost ispoljava u vodenoj sredini. Vitamin C direktno vezuje superoksid, hidroksil i hidroperoksil radikale. Druga važna uloga vitamina C je regeneracija oksidovanog vitamina E. Ipak, visoke koncentracije vitamina C mogu ispoljiti prooksidativni efekat u prisustvu metalnih jona kao što su Fe^{3+} ili Cu^{2+} (Powers

SK, 2004). Pored toga što je antioksidans, vitamin C ima određene biološke funkcije koje mogu da utiču na performanse sportiste: neophodan je za sintezu karnitina i kateholamina, za resorpciju nehemskog gvožđa, redukciju folne kiseline i sintezu kortizola. Deficit vitamina C može negativno uticati na različite aspekte sportske sposobnosti. Posledice nedovoljnog unosa vitamina C mogu biti zamor i mišićna slabost, a u nekim slučajevima i anemija. Određeni faktori, infekcija, pušenje, veća nadmorska visina, ekstremne temperature, ali intenzivna fizička aktivnost mogu povećati dnevne potrebe za vitaminom C. Većina fizički aktivnih odraslih osoba unosi dovoljne količine vitamina C. Ipak, pokazano je da 23% rvača, 20% fudbalera, 13% košarkašica, 22% gimnastičarki i 25% biciklistkinja dnevno konzumira manje od 70% RDA vrednosti za vitamin C (Lukaski CH, 2004).

KAROTENOIDI su liposolubilni antioksidansi, primarno lokalizovani u biološkim membranama. Antioksidativne osobine karotenoida su posledica njihove strukture - niz konjugovanih dvostrukih veza omogućava vezivanje slobodnih radikala, uključujući singletni kiseonik, superoksid i peroksil radikal. U uslovima fiziološkog parcijalnog pritiska kiseonika, β -karoten ima antioksidativne karakteristike. Ipak, povećani parcijalni pritisak kiseonika uslovljava gubitak antioksidativnog kapaciteta β -karotena i ispoljavanje prooksidativnih osobina (Powers SK, 2004). Epidemioške studije su pokazale da trkači na duge staze, žene i muškarci atletičari na koledžu, žene veslači unose adekvatne količine vitamina A (Guilland JC, 1989; Welch PK, 1987; Nelson Steen S, 1995). Adolescenti i mladi koji se takmiče u rvanju, baletu, gimnastici uzimaju manje od 70% preporučenih dnevnih vrednosti za vitamin A (Steen SN, 1986; Benson J, 1985; Loosli AR, 1986).

FLAVONOIDI su velika familija difenilpropana, koji su široko rasprostranjeni u biljkama zastupljenim u ljudskoj ishrani. Pokazano je da flavonoidi imaju različite biološka dejstva - od inhibicije inflamatornih enzima (lipooksigenaze, ciklooksigenaze, ksantin oksidaze, NADH-oksidaze, fosfolipaze A2) do antialergijskog, antivirusnog, antiinflamatornog i antitumorskog efekta. Mnogi od ovih bioloških efekata su posledica antioksidativnih karakteristika flavonoida. Sposobnost vezivanja slobodnih radikala podrazumeva neutralizaciju peroksil, hidroksil i superoksid anjon radikala, kao i vodonik-peroksida (Powers SK, 2004).

Adekvatni unos antioksidansa putem hrane je od ključnog značaja u borbi protiv oksidativnog stresa. Deficit dijetarnih antioksidanasa može biti uzrok povećane osetljivosti na oksidativna oštećenja tokom fizičke aktivnosti, ali i uticati na slabljenje performansi sportiste. S obzirom da sportisti koji imaju redovne, naporene treninge mogu imati potrebu za unosom antioksidanasa većim od preporučenih da bi imali odgovarajuću zaštitu tokom treninga, dijetarni antioksidansi predstavljaju važnu dodatnu zaštitu protiv oksidativnog stresa.

1.3. Merenje oksidativnog stresa

Slobodni radikali su veoma reaktivni i imaju izuzetno kratak poluživot (Tabela 1). Direktna procena produkcije slobodnih radikala je moguća primenom elektronske spinske rezonantne spektroskopije (eng. electron spin resonance spectroscopy –ESRS), zatim radiolize i laserske fotolize. S obzirom da je svaka od ove tri direktne metode jako skupa i zahteva puno rada i vremena, većina istraživanja koja se odnosi na oksidativni stres u sportu, upotrebljava indirektne metode (Fisher-Wellman K, 2009).

Indirektno merenje oksidativnog stresa podrazumeva merenje stabilnijih molekularskih produkata koji nastaju reakcijom oksidacije između slobodnih radikala i određenih biomolekula - lipida, proteina i DNK. Malondialdehid (MDA) je produkt degradacije oksidovanih lipida, koji se može odrediti putem jednostavne kolorimetrijske metode-tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance (TBKRS) testa ili selektivnije HPLC metode. Nešto preciznije metode su spektrofotometrijsko određivanje lipidnih peroksida ili specifičnih oksidovanih lipida, kao što su izoprostani (Close DC, 2006). Proteini su meta delovanja ROS zbog toga što ih ima u izobilju u biološkim sistemima i zato što se proteini mogu da reaguju i neutrališu značajan deo ROS koji nastaje u organizmu. Najčešće korišćeni postupci za merenje oksidativnog oštećenja proteina su određivanje proteinskih karbonila (PK), merenje produkata uznapredovale oksidacije proteina (eng. advanced oxidation protein products-AOPP) i određenih oksidovanih aminokiselina (Fisher-Wellman K, 2009). Delovanje slobodnih radikala na DNK dovodi do formiranja različitih modifikovanih produkata nukleinskih baza i šećera. Oni nisu produkti normalnog metabolizma nukleotida, pa se smatraju indikatorima oksidativnog stresa.

Najčešće se određuju 8-hidroksi 2-deoksiguanozin (8-OHdG) ili oksidovane DNK baze putem komet testa (Deaton CM, 2003).

Oksidativni stres se može odrediti preko promena u antioksidativnom sistemu zaštite. Često se prate promene koncentracije glutaciona, kao i nivo vitamina C i E. Aktivnost određenih enzima –SOD, GPX, CAT i GR, može poslužiti kao indikator oksidativnog stresa kome je tkivo izloženo.

S obzirom na veliki broj antioksidanasa, merenje njihove koncentracije i aktivnosti može biti teško i komplikovano. Stoga je razvijeno nekoliko metoda za merenje ukupna antioksidativne aktivnosti, kao što su troloks ekvivalentni antioksidativni kapacitet (eng. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity-TEAC), totalni antioksidativni status (eng. Total Antioxidant Status-TAS), test sposobnosti redukcije feri jona (eng. Ferric Reducing Ability of Plasma-FRAP), kapacitet apsorpcije reaktivnih kiseonikovih jedinjenja (eng. Oxygen Radical Absorbance Capacity-ORAC) (Finaud J, 2006).

Još jedna kategorija biomarkera oksidativnog stresa podrazumeva merenje ćelijske redoks ravnoteže. Jedan od najčešće korišćenih markera je odnos redukovanog i oksidovanog glutaciona (GSH/GSSH). Ovaj test može biti koristan zbog toga što povećana produkcija slobodnih radikala dovodi do smanjenja odnosa GSH/GSSH, ukazujući na povećanje oksidovanog glutaciona GSSG na račun redukovanog GSH (Powers SK, 2008). Određivanjem vrednosti prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB) omogućava se istovremeno određivanje prooksidanasa i antioksidanasa u datom uzorku, a time i merenje ravnoteže između njih (Alamdari DH, 2007).

Svaka kategorija biomarkera ima svoja ograničenja. Izbor adekvatnog biomarkera predstavlja veliki izazov, jer oksidovani produkti mogu biti nestabilni i teško merljivi ili je njihova količina jako mala. Biološki specifični markeri za određena tkiva nisu još identifikovani (Close DC, 2006). Iz tih razloga, potrebno je izmeriti nekoliko biomarkera da bi se potvrdilo prisustvo oksidativnog stresa (Powers SK, 2008)

1.4. Oksidativni stres u sportu

Područje ispitivanja oksidativnog stresa u sportu se značajno proširilo od prvog otkrića, 1978. godine kada je pokazano da se nivo lipidnih peroksida povećava nakon akutnog aerobnog vežbanja. Povećano interesovanje za ovu temu je posledica spoznavanja uloge ROS u etiopatogenezi brojnih hroničnih bolesti, kao i zbog konstantog promovisanja vežbanja i fizičke aktivnosti u cilju održavanja i unapređenja zdravlja, ali i zbog razvoja i dostupnosti sve većeg broja različitih antioksidanasa.

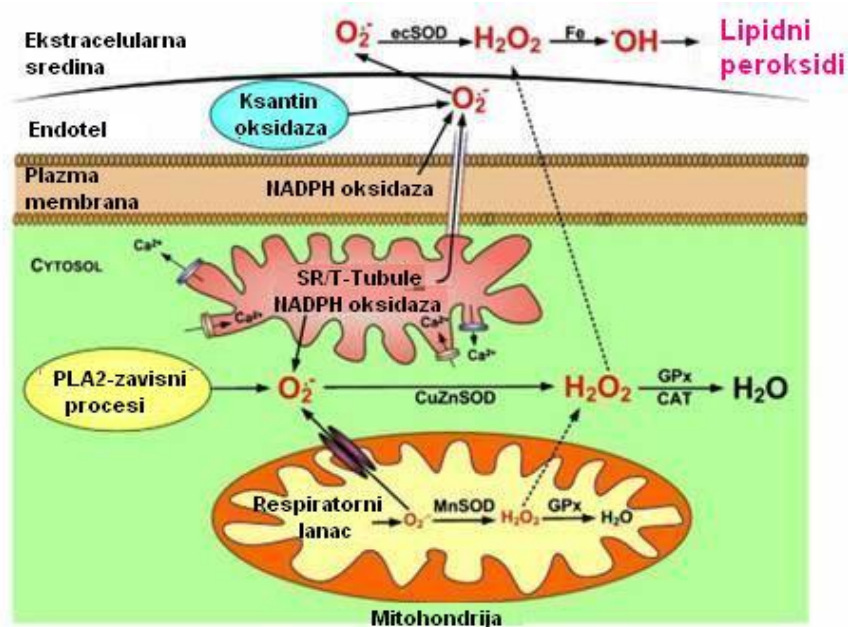
1.4.1. Produkcija slobodnih radikala tokom fizičke aktivnosti

Postoji veliki broj potencijalnih izvora slobodnih radikala tokom fizičke aktivnosti. Na slici 2. prikazana su mesta na kojima se formira superoksidni anjon u skeletnim mišićima.

MITOHONDRIJE - U respiratornom lancu mitohondrija 95 % - 99 % kiseonika se redukuje do vode u prisustvu koenzima Q. Ipak, jedan deo, 1 % - 5 % udahnutog kiseonika, usled curenja elektrona u respiratornom lancu formira superoksidni anjon (Jenkins RR, 1993). S obzirom da se potrošnja kiseonika u toku fizičke aktivnosti povećeva 100-200 puta, dolazi i do značajnog povećanja produkcije superoksidnog anjona. Produkcija slobodnih radikala izmerena ESRS snažno korelira sa maksimalnom potrošnjom kiseonika (Deaton CM, 2003). Druga studija je pokazala da se u mitohondrijama ~0,15 % udahnutog kiseonika transformiše do superoksidnog anjona, što je značajno manje od prvobitne pretpostavke. Manji stepen produkcije superoksidanog anjona u mitohondrijama se obrađuje prisustvom dekupljujućih proteina, za koje se smatra da imaju važnu ulogu regulatora produkcije ROS u cilju zaštite mitohondrija od oksidativnog oštećenja (Brand MD, 2004). S obzirom da novije studije pokazuju da mitohondrije nisu dominantni izvor slobodnih radikala, dalja istraživanja su neohodna da bi se u potpunosti utvrdila uloga koju mitohondrije imaju u produkciji ROS (Powers SK, 2008).

KSANTIN DEHIDROGENAZA (XDH) katalizuje poslednju fazu degradacije purinskih baza (ATP, ADP i AMP), odnosno prevođenje hipoksantina u ksantin i ksantina u mokraćnu kiselinu uz prisustvo NAD⁺ kao akceptora elektrona. Tokom intenzivnog vežbanja, mišićna vlakna zbog kontrakcija mogu biti u hipoksiji. U

uslovima hipoksije koja dovodi do ishemije, ksantin se formira iz ATP-a anaerobnim metabolizmom, a XDH se proteolitičkom degradacijom konvertuje u ksantin oksidazu (XO). Kada se uspostavi normalni protok krvi (reperfuzija), povećava se i dotok kiseonika, a XO i dalje konvertuje purinske baze u mokraćnu kiselinu, ali koristi kiseonik kao akceptor elektrona, pri čemu nastaje superoksidni anjon. Ipak, uloga XO u generisanju ROS kod ljudi je diskutabilna zbog malih količina XDH odnosno XO (Deaton CM, 2003).



Slika 2. Ilustracija odabranih mesta koja su odgovorna za produkciju slobodnih radikala u skeletnim mišićima (Preuzeto iz Powers SK i sar./ *Free Radical Biology & Medicine* 2011).

NIKOTINAMID ADENIN DINUKLEOTID FOSFAT (NADPH) OKSIDAZA generiše superoksidni anjon transferom elektrona sa NADPH na molekularni kiseonik (Powers SK, 2011). Fagocitna NADPH oksidaza je odgovorna za produkciju superoksidnog anjona u aktiviranim makrofagama i neutrofilima. Kombinovana aktivnost NADPH oksidaze i mijeloperksidaze u fagocitima pored superoksidnog anjona dovodi do produkcije i hipohlorne kiseline, koja je jedan od najjačih fizioloških oksidanasa i moćan antimikrobni agens. Masivna produkcija ROS koji ima antimikrobne i tumorocidne karakteristike predstavljaju prvu liniju odbrane od patogena (Droge W, 2002). Kao posledica intenzivnog vežbanja nastaje mehaničko oštećenje mišića, koje dovodi do aktivacije makrofaga i neutrofila i formiranja slobodnih radikala posredstvom NADPH oksidaze (Deaton CM, 2003).

Pored toga, postoji nefagocitna NADPH oksidaza koja se nalazi u sarkoplazmatskom retikulumu (SR), sarkolemi i u transverznim tubulama (T tubule) i čija aktivnost takođe doprinosi produkciji ROS tokom fizičke aktivnosti (Powers SK, 2011).

FOSFOLIPAZA A₂ (PLA₂) katalizuje razgradnju fosfolipida ćelijskih membrana i oslobađa arahidonsku kiselinu. Delovanjem enzima kao što su lipooksigenaza i ciklooksigenaza dolazi do formiranja prostanoida, ali i superoksidnog anjona. Pored toga, PLA₂ aktivira i NADPH oksidazu, a može da stimuliše i produkciju ROS u mitohondrijama i citosolu mišića i njihovo oslobađanje u ekstracelularni prostor (Powers S, 2011).

Koncentracija kateholamina se povećava tokom vežbanja i ROS nastaju kao posledica njihove autooksidacije. Autoksidacija oksihemoglobina do methemoglobina dovodi do nastanka superoksidnog anjona, a stepen formiranja methemoglobina se povećava sa fizičkim naporom. Hipertermija uzrokovana treningom može takođe da prouzrokuje oksidativni stres. Povećanje temperature i relativne vlažnosti od 20°C i 40%, na 30°C i 80 %, je povezano sa povećanjem oksidacije glutationa u eritrocitima u hemolizatu i lipidne peroksidacije u plazmi nakon submaksimalnog treninga kod konja. (Deaton CM, 2003).

Nakon inicijalnog povećanja produkcije ROS tokom vežbanja, dolazi i do sekundarnog generisanje prooksidanasa od strane aktiviranih makrofaga i neutrofila (fagocita), zatim gubitka homeostaze kalcijuma i destrukcije proteina koji sadrže gvožđe. Formiranje ROS zavisi od načina treninga –aerobni ili anaerobni, intenziteta kao i trajanja vežbanja, jer se različiti tipovi fizičke aktivnosti međusobno razlikuju po energetskim potrebama, po nivou potrošnje kiseonika, kao i po mehaničkom oštećenju tkiva tokom treninga (Fisher-Wellman K, 2009).

1.4.2. Oksidativni stres i aerobni trening

Postoje neslaganja izmedju studija koje su ispitivale oksidativni stres u toku i nakon aerobnog treninga. Brojna istraživanja su pokazale povećanje peroksidacije lipida i nivoa produkata oksidacije proteina (Nikolaidis MG i Kyparos A, 2007; Alessio HM, 1997; Steinberg JG, 2006; Bryant RJ, 2003; Goldfarb AH, 2007; Goto C,

2007; Waring WS, 2003; Bloomer RJ, 2006) nakon maksimalnog i submaksimalnog aerobnog treninga u trajanju do dva sata. Ipak, pojedine studije nisu uočile značajno povećanje parametara oksidativnog stresa (Jamurtas AZ, 2006; Gaeini AA, 2006; Bloomer RJ and Goldfarb AH, 2005; Cholewa J, 2008; Orhan H, 2004; Rush JW, 2003; Watson TA, 2005) kod sličnih protokola. Studije koje su uočile značajno povećanje ovih parametara oksidativnog stresa uglavnom su primenjivale protokole maksimalnog napora ($\sim 75\% \text{VO}_{2\text{max}}$), što ukazuje na značaj intenziteta vežbanja na oksidativna oštećenja lipida. Primena kometa testa pokazala je prisustvo oksidativnih oštećenja DNK nakon aerobnog vežbanja (Niess AM, 1996; Hartman A, 1995). Većina studija nije uočila promene nivoa 8-OHdG nakon vežbanja u trajanju do dva sata (Bloomer RJ, 2006; Bloomer RJ and Goldfarb AH, 2005).

Ekstremne aerobne fizičke aktivnosti, kao što su polumaraton, maraton, ultramaraton ili triatlon, dovode do povećanja nivoa produkata peroksidacije lipida, povećane koncentracije proteinskih karbonila, oksidativnog oštećenja DNK, kao i promena u odnosu oksidovanog i redukovano GSH (Tian Y, 2010; Knez WL, 2007; Tauler P, 2006, Child RB, 2000; McAnulty SR, 2005; Nieman DC, 2002; Palmer FM, 2003; Mastaloudis A i Morrow JD, 2004; Turner JE, 2011; Radak Z, 2000; Mastaloudis A i Yu TW, 2004; Aguilo A, 2005). Ovo stanje oksidativnog stresa, u zavisnosti od ispitivanih parametara, može biti izraženo i do nekoliko sati, pa čak do 30 dana nakon sportskog događaja (Neubauer O, 2008; Turner JE, 2011). Ipak, u literaturi postoji manji broj studija u kojima nisu detektovane promene u parametrima oksidativnog stresa nakon aerobne fizičke aktivnosti koje traju duže od dva sata (Rokitzki L, 1994; Child RB, 2000; McAnulty SR, 2007; Ginsburg GS, 1996; Hartman A, 1998).

Kapacitet antioksidativne zaštite može biti smanjen tokom i nakon intenzivnih treninga koji traju do dva sata usled korišćenja njegovih komponenti na neutralizaciju slobodnih radikala (Watson TA, 2005; Steinberg JG, 2006), dok se u periodu oporavka uočava njegov rast (Nikolaidis MG i Kyparos A, 2007; Michailidis Y, 2007; Watson TA, 2005). Nasuprot tome, zapažen je i porast antioksidativnog kapaciteta nakon intenzivnih treninga, verovatno zbog povećane produkcije mokraćne kiseline i povlačenja antioksidativnih vitamina iz depoa (McAnulty SR, 2003; Waring WS, 2003). Nedosledni rezultati su dobijeni za svaki od 4 glavna antioksidativna enzima, gde su studije pokazale povećanje (Buczynski A, 1991; Elosua R, 2003; Nikolaidis MG i

Kyparos A, 2007), ali i smanjenje aktivnosti ovih enzima (Akova B, 2001). Neki istraživači nisu uočili promene u aktivnosti ovih enzima (Cholewa J, 2008; Rush JW, 2003; Tauler P i Aguilo A, 2006), nakon vežbanja submaksimalnog do maksimalnog intenziteta u trajanju do dva sata. Dobijeni različiti rezultati su verovatno posledica delovanja nekoliko faktora, kao što su vreme uzimanja uzoraka, dužina i intenzitet vežbanja, koji su varirali između studija.

U većini studija koja je ispitivala uticaj aerobne aktivnosti duže od 2 sata uočeno je povećanje antioksidativnog kapaciteta (Child RB, 2000; McAnulty SR, 2007; McAnulty SR, 2005). Različiti rezultati su dobijeni kada su u pitanju specifični antioksidativni enzimi. Uočeno je prolazno povećanje aktivnosti enzima (Tauler P, 2003; Tauler P i Sureda A, 2006; Aguilo, A, 2005; Tian Y, 2010), smanjenje (Rokitzki L, 1994; Aguilo, A, 2005; Knez WL, 2007; Mastaloudis A i Morrow JD, 2004), dok neke studije nisu uočene promene aktivnosti antioksidativnih enzima (Marzatico 1997; Tauler P, 2003; Aguilo A, 2005; Tian Y, 2010). Smatra se da je razlog izostajanja značajnih promena u parametrima oksidativnog stresa povezana sa činjenicom da su ispitanici visoko trenirani sportisti, kod kojih je povećan kapacitet antioksidativne zaštite. Iako je dužina ovih protokola dovoljna za indukciju proizvodnje ROS, intenzitet je manji, tako da ovi sportisti imaju dovoljan nivo antioksidativne zaštite da se izbore sa ROS, tako maskirajući akumulaciju biomarkera oksidativnog stresa (Margaritis I, 1997). Ispitivani biomarkeri, vreme uzorkovanja, nekontrolisani unos ugljenih hidrata, su još neki od razloga što oksidativni stres u nekim studijama nije bio detektovan (Mastaloudis A, 2001; McAnulty S, 2003) .

1.4.3. Oksidativni stres i anaerobni trening

Većina studija je pokazala da i anaerobni trening dovodi do stanja oksidativnog stresa, što je zaključeno na osnovu povećanja peroksidacije lipida, oksidacije proteina, promenama u glutathion redoks statusu (Liu JF, 2005; Goldfarb AH i Bloomer RJ, 2005; Viitala PA, 2004; Nikolaidis MG i Paschalis V, 2007; Childs A, 2001; Paschalis V, 2007; Bloomer RJ, 2007; Panza VS, 2008). Vrednosti parametara oksidativnog stresa su dostizale maksimum između 48h i 72h nakon treninga, ukazujući da je verovatno glavna determinanta oksidativnog stresa kao odgovor na vežbanje inflamacija kao posledica oštećenja mišića i produkcija slobodnih radikala posredstvom NADPH oksidaze u

aktiviranim makrofagama i neutrofilima (Goldfarb AH i Bloomer RJ, 2005; Paschalis V, 2007). Ipak, manji broj studija nije pokazao promene u nivou oksidativno modifikovanih lipida, proteina i glutaciona (Bloomer RJ, 2007; Panza V, 2008; Child R, 1999; Liu JF, 2005). Nijedna studija nije pokazala značajno povećanje oštećenja DNK nakon anaerobnog treninga sa opterećenjem (Bloomer RJ i Fry AC, 2007; Bloomer RJ, 2005). Rezultati ispitivanja kapaciteta antioksidativne zaštite su različiti, s obzirom da su neke studije pokazale povećanje (Childs A, 2001; Paschalis V, 2007) ili smanjenje (Liu JF, 2005), dok neke studije nisu detektovale značajne promene različitih markera antioksidativne zaštite (Child R, 1999). Nedostatak oksidativnog stresa je verovatno povezan sa specifičnim markerima koji su mereni, vremenom uzorkovanja, intenzitetom vežbanja, dijetarnim unosom, kao i sa trenažnim statusom ispitanika.

1.4.4. Oksidativni stres i redovno treniranje - fenomen hormeze

S obzirom da najveći broj studija potvrđuje povećanje biomarkera oksidativnog stresa nakon aerobnih i anaerobnih treninga, jasno je da jednokratna fizička aktivnost predstavlja fiziološki stres za organizam. Intenzivni treninzi kroz duži vremenski period uslovljavaju viši nivo različitih parametara oksidativnog stresa kod ispitanika koji se aktivno bave sportom u odnosu na fizički neaktivne osobe (Kürkçü R, 2010; Bonina FP, 2005). Ipak, rezultati nekih studija ukazuju na smanjenje oksidativnog stresa u miru kod sportista (Metin G, 2003). Pored toga što je određeni nivo ROS neophodan za optimalne fiziološke funkcije organizma, ove studije pokazuju da povećana produkcija slobodnih radikala kod sportista ne mora uzrokovati dugotrajne negativne posledice na fiziološke funkcije, već naprotiv, dovodi do adaptacije, odnosno ushodne regulacije antioksidativnih mehanizama zaštite (Djordjevic D, 2011; Kürkçü R, 2010; Metin G, 2003; Zembron-Lacny A, 2009), što za cilj nema potpunu eliminaciju ROS iz sistema, već smanjenje potencijalnih oksidativnih oštećenja u toku budućih treninga. Sa druge strane, povećana produkcija ROS koja prevazilazi kapacitet antioksidativne zaštite dovodi do izrazitih oksidativnih oštećenja, smanjenja performansi i bolesti, što je potvrđeno povećanjem rizika od bolesti u slučaju dugotrajnih, vrlo intenzivnih treninga u toku dužeg vremenskog perioda. Posledica je i smanjenje efikasnosti antioksidativnih mehanizama zaštite i ciljnim tkivima i krvi profesionalnih sportista koji imaju naporne treninge i česta takmičenja (Bonina FP, 2005; Schroder H, 2000).

1.4.5. Uticaj slobodnih radikala na oštećenje mišića

Intenzivan trening, naročito ekcentrični trening u kome se mišići aktivno istežu, uzrokuje oštećenje mišićnih vlakana. Inicijalna mehanička povreda počinje vrlo brzo, u roku od 15 minuta od početka treninga i prenosi se sporadično kroz vlakno (Bloomer RJ, 2007). Peroksidacija lipida sarkoleme uzrokovana ROS tokom vežbanja može imati ulogu u etiologiji oštećenja mišića uzrokovanog fizičkom aktivnošću. Uočena je korelacija između efluksa enzima kreatin kinaza (CK), kao indikatora oštećenja mišića i TBKRS, biomarkera lipidne peroksidacije (Teixeira VH, 2009). Mehaničko oštećenje mišića i/ili povećan nivo ROS stimulišu akutni lokalni inflamatorni odgovor koji podrazumeva oslobađanje inflamatornih citokina u cilju mobilizacije neutrofila i monocita na mesto inflamacije da bi se oporavilo oštećeno tkivo. Iz infiltriranih fagocita oslobađaju se slobodni radikali, koji dodatno mogu oštetiti mišićno tkivo i učestvovati u razvoju odložene upale mišića (eng. delayed onset of muscle soreness-DOMS). Poremećaji u oslobađanju i preuzimanju kalcijuma mogu dovesti do smanjenja kontraktilnosti mišića i produkcije snage. ROS može uzrokovati i oksidaciju proteina, što doprinosi zamoru mišića. Poremećaj ćelijske homeostaze u mišićima uzrokovan ROS rezultira oštećenjem mišića, bolom, zamorom i smanjenjem sportskih performansi (Powers SK, 2004).

1.4.6. Oksidativni stres i oštećenje mišića u fudbalu

Visok apsolutni nivo potrošnje kiseonika, visok nivo cirkulišućih kateholamina, oštećenje mišića usled ekcentričnih kontrakcija i posledična inflamacija, intermitentni ponavljajući sprintovi, koji prouzrokuju privremenu ishemiju, a potom reperfuziju u skeletnim mišićima, mogući su faktori koji utiču na produkciju ROS tokom i posle treninga kod fudbalera (Ascensão A, 2008).

Redovni treninzi kod profesionalnih fudbalera se povezuju sa povećanom produkcijom slobodnih radikala i sa većim stepenom oksidativnog stresa u odnosu na odgovarajuću grupu ispitanika koja se ne bavi fizičkom aktivnošću (Cazzola R, 2003). Oksidativni stres kod fudbalera može biti komponezovan povećanjem ukupnog antioksidativnog kapaciteta i nivoa solubilnih antioksidansa male molekulske težine (vitamina E i C), ali i povećanjem aktivnosti antioksidativnih enzima (Cazzola R, 2003; Brites F 1999; Tauler P, 2008; Metin G, 2003).

Pokazano je da fudbalske utakmice dovode do povećanja parametara oksidativnog stresa, verovatno delom usled inflamatornog odgovora koji nastaje nakon utakmice. Povećani oksidativni stres se može videti kroz povećanje nivoa MDA, TBKRS, proteinskih karbonila (PK) i kroz značajno smanjenje sulfhidrilnih ostataka, odnosno smanjenje odnosa GSH/GSSG (Fatouros IG, 2010; Asensao A, 2008; Andersson H, 2010). Nakon treninga uočeno je i povećanje TAS i mokraćne kiseline u plazmi, što ukazuje na kompenzatorni odgovor na intenzivni trening. Malo je objavljenih podataka o uticaju oksidativnog stresa na sportske sposobnosti kod fudbalera. Postoji mogućnost da predhodna oksidativna oštećenja uzrokovana periodima intenzivnih treninga mogu kompromitovati zdravstveni status sportiste, kao i njegove performanse. Povećanje oksidativnog stresa je praćeno smanjenjem anaerobnih performansi u periodu do 72h nakon utakmice, dok su CK i DOMS su povećani nakon utakmice i ostaju povišeni tokom 48h (Fatouros IG, 2010). Pokazano je da je DOMS povišen, a snaga donjih ekstremiteta i sposobnost sprinta smanjena do 72h posle utakmice u odnosu na pre utakmice (Ascensão A, 2008)

1.5. Primena antioksidanasa u sportu

1.5.1. Primena antioksidanasa u cilju smanjenja oksidativnog stresa

Do sada je sproveden veliki broj istraživanja sa ciljem da se odredi efekat antioksidanasa na smanjenje ili eliminaciju oksidativnih oštećenja kao posledice intenzivne fizičke aktivnosti. Najčešće ispitivani antioksidansi su vitamin E i vitamin C, posebno ili u kombinaciji sa drugim antioksidansima, primenjivani u različitim periodima - hronično od 1-8 nedelja, ili akutno 1-2 dana pre sportskog događaja. Pored ovih, ispitivani su i koenzim Q10 (Braun B, 1991), N-acetil cistein (Childs A, 2001), kvercetin (Pelletier DM, 2012), borovnica (McAnulty SR, 2004), ekstrakt zelenog čaja (Panza VS, 2008), ekstrakt crvene pomorandže (Bonina FP, 2005), α -liponska kiselina (Zembron-Lacny A, 2009).

Nekoliko studija je zabeležilo smanjenje oksidativnog stresa izazvanog aerobnim treningom nakon hronične primene vitamina C (Alessio HM, 1997; Goldfarb, 2005) i vitamina E (Hartmann A, 1995; Itoh H, 2000; Mastaloudis A, 2004), kao i

kombinacije antioksidanasa (Bloomer RJ, 2006; Goldfarb AH, 2007; Tauler P, 2006). Ipak, nije uočeno smanjenje nivoa svih parametara oksidativnog stresa. Pored toga, neke studije nisu zabeležile povoljne efekte pojedinačne primene vitamina C (Bryant RJ, 2003; Nieman DC, 2002; Cholewa J, 2008; Palmer FM, 2003) ili vitamina E (Gaeini AA, 2006; Bryant RJ, 2003). Čak je i pokazan prooksidativni efekat vitamina E kada se primenjuje u visokim dozama kod aerobne aktivnosti visokog intenziteta (McAnulty SR, 2005; Nieman DC, 2004). Povoljni efekti nisu uočeni posle primene koenzima Q10 (Braun B, 1991). Neslaganje u literaturi je posledica nekoliko faktora uključujući trenažni status ispitivane populacije, unos antioksidanasa preko hrane, kao i trajanje suplementacionog perioda.

Ispitivanje efekta antioksidanasa na oksidativni stres uzrokovan anaerobnim treningom je takođe imalo mešovite rezultate. Smanjenje oksidativnog stresa je uočeno nakon primene vitamina E (McBride JM, 1998), kombinacije vitamina C, vitamina E i selena (Goldfarb AH, 2005) i zelenog čaja (Panza VS, 2008). Poboljšanje nije uočeno nakon nakon vitamin E (Viitala PA, 2004), kombinacije vitamina C i vitamina E (Bloomer RJ i Falvo MJ, 2007), nakon mešavine antioksidantnih vitamina i minerala (Teixeira V, 2009), kao ni nakon kombinacije vitamina C i NAC (Childs A, 2001).

1.5.2. Primena antioksidanasa u cilju smanjenja oštećenja mišića

S obzirom da ROS učestvuju u inicijaciji i progresiji oštećenja mišića tokom vežbanja, veruje se da primena antioksidanasa može ublažiti znake i simptome oštećenja mišića, umanjujući negativan uticaj ROS. Ipak, na osnovu rezultata studija koje su ispitivale uticaj antioksidanasa, pojedninačnih ili u kombinaciji, na oštećenje mišića ne može se doneti konačan zaključak.

Nekoliko studija je pokazalo smanjenje aktivnosti CK i laktat dehidrogenaze (LDH) nakon intenzivnih treninga kod ispitanika suplementiranih sa vitaminom E (Rokitzki L, 1994; McBride JM, 1998; Tsakiris S, 2009), ali bez uticaja na druge parametre oštećenja mišića, kao što su DOMS, oštećenje citoskeleta, mišićna snaga. Jedna studija je čak pokazala povećanje CK nakon 3 nedelje stuplementacije sa 1200 IU vitamina E, bez uticaja na ostale parametre (Avery NG, 2003). Kratkotrajna suplementacija visokim dozama vitamina C, dovela do smanjenje DOMS nakon anaerobnog treninga (Kaminsky M, 1992). Kombinacija vitamina C i NAC u periodu

od 7 dana nije izazvala nikakve promene u DOMS nakon ekcentričnog trenažnog protokola, ali je uzrokovala veći nivo CK i LDH (Childs A, 2001). Kombinacija vitamina C, E i selena u periodu od 14 dana smanjila je CK i DOMS, bez uticaja na maksimalnu izometrijsku snagu i opseg pokreta (eng. range of motion –ROM) (Bloomer RJ, 2004). Ipak, kombinacija vitamina E i C u nekim studijama nije pokazala efikasnost u smanjenju oštećenja mišića (Bloomer RJ i Falvo MJ, 2007; Shafat A, 2004). Kombinacija vitamina i minerala sa antioksidativnim delovanjem takođe ne sprečava oštećenje mišića (Texeira VH, 2009). Mešavina tokoferola i flavonoida, 7 dana nakon ekcentričnog treninga, je dovela do smanjenje inflamatornih markera CRP i IL-6, ali nije bilo razlike u CK, LDH i DOMS između suplementirane i kontrolne grupe (Philips TAC, 2003).

1.5.3. Primena antioksidanasa u cilju smanjenja oksidativnog stresa i oštećenja mišića u fudbalu

Ispitivanja uticaja antioksidanasa na oksidativni stres kod fudbalera su retka. Suplementacija sa antioksidativnim koktelom sa koenzimom Q10 nije uticala na bazalne vrednosti parametara oksidativnog stresa – MDA i PK. Ipak, vrednosti MDA i PK su bile manje u suplementiranoj u odnosu na placebo grupu nakon fudbalskog meča (Tauler P, 2008). Nije bilo uticaja suplementacije na markere oksidativnog stresa u neutrofilima. Suplementacija sa 1000 mg vitamina C i 800 mg α -tokoferola u periodu od 3 meseca, smanjila je peroksidaciju lipida (izmereno preko MDA) i oštećenje mišića (mereno preko CK) tokom perioda intenzivnih treninga, ali nije imalo uticaja na poboljšanje sportskih performansi. Nije uočen značajan efekat suplementacije ni redovnih treninga na aktivnost enzima GR i CAT u eritrocitima. (Zoppi, 2006). Suplementacija mešavinom antioksidanasa je pokazala povoljan efekat na smanjenje porasta nivoa lipidnih hidroperoksida (LPO), 8-izo prostaglandina F₂ α i CK, nakon maksimalnog testa na traci kod fudbalera, nakon 20 dana suplementacije. Značajan efekat suplementacije na sportske performanse fudbalera nije uočen (Arent SM, 2010).

1.6. Imuni sistem sportista

Oksidativni stres, inflamacija, mikrotraume mišića, suprimirana odbrana protiv patogena iz spoljašnje sredine su negativni uticaji kojima je istovremeno izložen organizam sportiste. Fiziološki stres uzrokovan dugim i intenzivnim treninzima se ogleda i u prolaznim, ali značajnim promenama u imunom sistemu što se dovodi u vezu sa povećanom incidencom infekcija, naročito infekcija gornjih respiratornih puteva kod sportista (Nieman DC, 2007). Produženi trening visokog intenziteta dovodi do mobilizacije imunokompetentnih ćelija u krv. Broj cirkulišućih neutrofila raste tokom, ali i nakon završetka treninga. Koncentracija limfocita raste tokom treninga, ali u periodu oporavka opada ispod bazalnog nivoa (McCarthy DA, 1988). Povećan broj limfocita tokom treninga je posledica mobilizacije svih subpopulacija u krv. I broj NK ćelija prvo raste, ali u periodu oporavka značajno opada (McCarthy DA, 1988). Pored toga, aktivnost NK ćelija, funkcija T i B limfocita i funkcija neutrofila je suprimirana najmanje nekoliko sati tokom perioda oporavka (Gabriel H, 1997; Nieman DC, 2001, 2003b, 2002a, Davidson G, 2010). Poremećaj funkcije imunog sistema je najverovatnije posledica imunosupresivnog efekta hormona kao što su adrenalin, noradrenalin i kortizol. Intenzitet kao i trajanje treninga i utreniranost sportiste, ali i njegov nutritivni status su važni faktori koji utiču na promene u imunom sistemu (Gleeson M, 2006).

1.6.1. Uticaj fizičke aktivnosti na mukozni imunitet

Efekat treninga na humoralni imuni odgovor se procenjuje merenjem nivoa serumskih i sekretornih imunoglobulina (sIgA) in vivo i in vitro sinteze imunoglobulina nakon mitogen stimulacije limfocita. Nivo imunoglobulina u serumu u toku i nakon fizičke aktivnosti uglavnom ostaje isti ili se uočava blagi rast. Aktivnost mukoznog imuniteta se uglavnom procenjuje merenjem sIgA u salivi. Većina ispitivanja pokazuju smanjenje nivoa sIgA u salivi nakon fizičke aktivnosti visokog intenziteta kod elitnih sportista, dok umerena fizička aktivnost kod sportista rekreativaca ne dovodi do značajnih promena u nivou sIgA u salivi (Gleeson M, 2000). Istraživanje uticaja redovne fizičke aktivnosti na mukozni imunitet je manjeg obima. Rezultati većine istraživanja pokazuju kontinuirano smanjenje nivoa sIgA tokom dužeg perioda intenzivnih treninga (Fahlman MM, 2005; Gleeson M, 1999; Levando VA, 1988). Viši

nivo sIgA kod osoba koje se redovno bave sportom u odnosu na fizički neaktivne osobe je uočeno i malom broju studija (Gleeson M, 1995; Nehlsen-Cannarella SL, 2000).

1.6.2. Uloga ishrane u optimalnoj funkciji imunog sistema

Deficit proteina i ugljenih hidrata, ali i specifičnih mikronutrijenata dovodi se u vezu sa depresijom imunog odgovora i povećanjem osetljivosti na infekcije. Da bi se omogućilo pravilno funkcionisanje imunog sistema sportisti moraju imati optimalno izbalansiranu dijetu sa dovoljnim energetske i unosom proteina, jer imuni odgovor zavisi od brze replikacije ćelija i produkcije proteina sa važnim biološkim funkcijama, kao što su imunoglobulini, proteini akutne faze i citokini. Dovoljan unos ugljenih hidrata je takodje neophodan, jer smanjeni unos dovodi do povećanja nivoa hormona stresa koji negativno utiču na nekoliko funkcija imunog sistema (Gleeson M, 2006). Nekoliko minerala ima uticaj na imunitet, uključujući cink, gvožđe, magnezijum, selen, bakar. Deficiti minerala su retki kod sportista, sa izuzetkom cinka i gvožđa. Potrebe sportista za ovim mineralima su veće u poređenju sa neaktivnim osobama, ali prekomerni unos minerala, naročito gvožđa i cinka takodje može negativno da utiče na funkciju imunog sistema. Suplemente treba uzimati samo ako je to neophodno i pratiti status gvožđa (preko feritina i hemoglobina) i cinka (sadržaj cinka u eritrocitima ili leukocitima). Nekoliko vitamina imaju važnu ulogu u imunom odgovoru. Deficit vitamin A i E i folne kiseline, vitamina B6, B12 i vitamina C negativno utiče na funkciju imunog sistema i smanjuje otpornost organizma na infekcije. Ispravljanje eventualnog deficita sa specifičnim vitaminskim suplementima može biti efikasno u vraćanju imune funkcije na normalan nivo, a umereno povećanje unosa nekih vitamina, prvenstveno vitamina A i E iznad RDA može poboljšati imunu funkciju prvenstveno kod veoma mladih ili starih osoba. Uzimanje visokih doza pojedinih vitamina može narušiti imunitet i ispoljiti druge toksične efekte (Calder PC, 2002).

1.6.3. Nutritivne mere u prevenciji supresije mukoznog imuniteta

. Do sada je ispitivan efekat nekoliko nutritivnih mera u cilju smanjenja negativnog uticaja intenzivnih treninga na mukozni imunitet: ugljenohidratni napici (Gleeson M i Li TL, 2005), omega-3 masne kiseline, cink, glutamin (Krzywkowski K, 2001), kolostrum (Mero A, 2002), kofein (Bishop NC, 2006), kvercetin (Nieman DC,

2007), ekstrakt alge *Chlorella vulgaris* (Otsuki T, 2011), senzorna stimulacija (Schiffman SS, 1999). Povoljan efekat na nivo sIgA je pokazan nakon primene kofeina, hlorele i senzorne stimulacije.

S obzirom da oksidativni stres kao posledica intenzivne fizičke aktivnosti potencijalno može inhibirati imuni odgovor, uključujući ćelijsku adheziju, inflamaciju i proliferaciju limfocita, ispitivan je i uticaj nekoliko antioksidanasa na mukozni imunitet sportista. Suplementacija sa 1500 mg vitamin C dnevno tokom 7 dana pre ultramaratona nije uticala na nivo oksidativnog stresa, citokina i sIgA nakon trke (Nieman DC, 2002). Nivo parametara oksidativnog stresa- F2-izoprostana i lipidnih hidroperoksida značajno raste, dok je nivo sIgA značajno smanjen nakon ultramaratona, pri čemu suplementacija sa 1500 mg vitamina C u periodu od 7 dana nije imala uticaj na izmerene parametre (Palmer FM, 2003). Suplementacija sa 1500 mg vitamina C u toku 12 dana sprečava porast koncentracije kortizola, ali ne utiče na nivo sIgA i simptome infekcija gornjih respiratornih puteva (eng. upper respiratory tract infection-URTI) nakon produženog treninga u uslovima povišene temperature (Carrillo AE, 2008). Suplementacije kvercetinom u periodu od 2 nedelje nije uticala na promene nivoa sIgA, aktivnosti NK ćelija i stimulisanu proliferaciju limfocita nakon produženog intenzivnog treninga kod biciklista, ali je značajno smanjila incidencu URTI u periodu oporavka nakon treninga (Nieman DC, 2007).

1.7. Astaksantin

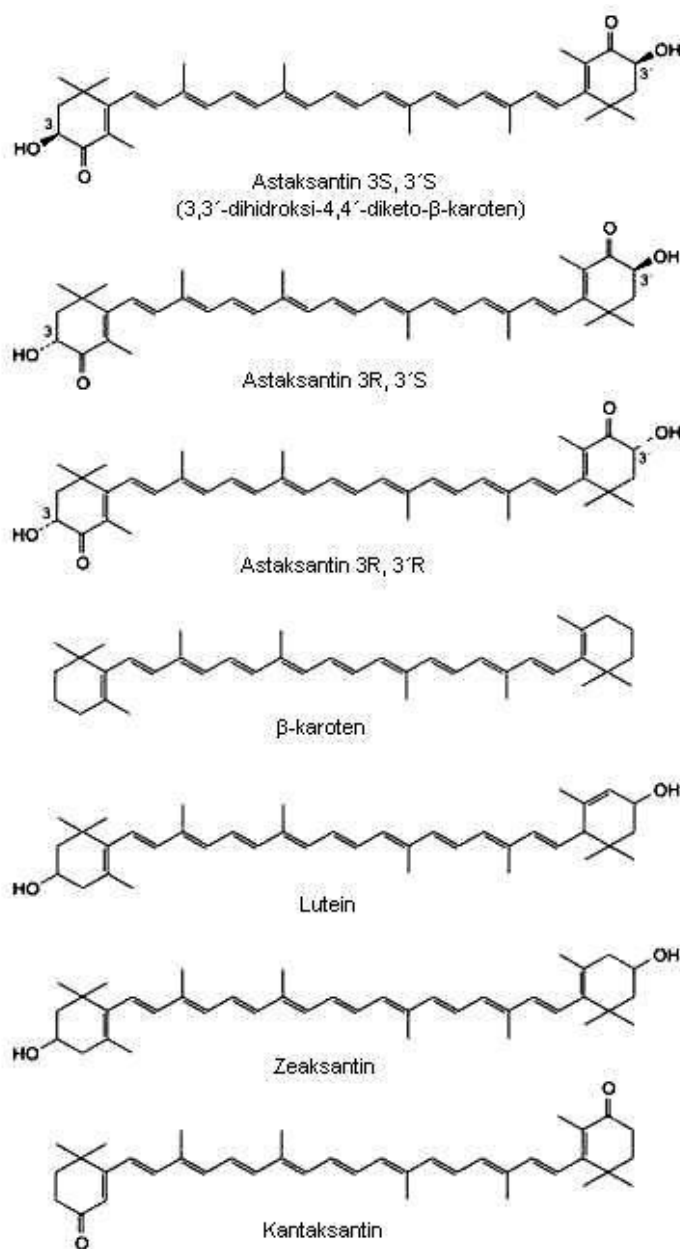
Astaksantin (Asx) je liposolubilna supstanca koja pripada grupi ksantofila, oksidovanih derivata karotenoida. Široko je rasprostranjen u prirodi: u mikroorganizmima (bakterije, alge, kvasac), rakovima (škampi, jastog), ribama (losos, pastrmka) i nekim pticama (flamingo, prepelica). Asx ima važne biološke funkcije u organizmu ovih životinja: zaštita esencijalnih polinezasićenih masnih kiselina od oksidacije, zaštita od UV zračenja, uloga u imunom odgovoru i reprodukciji (Guerin M, 2003). Zbog izvanredne antioksidativne aktivnosti, smatra se da Asx može imati značajnu ulogu u ishrani ljudi u cilju očuvanja zdravlja i prevenciji hroničnih bolesti (Yuan JP, 2011). Zato je sproveden veliki broj studija koje su ispitivale potencijalne pozitivne efekte na zdravlje ljudi. Urađene su neophodne studije za ispitivanje

potencijalnih toksičnih efekata Asx na životinje i ljude. Cilj brojnih studija bio i ispitivanje metoda za identifikaciju, bolje načine proizvodnje i iskorišćenja prirodnih izvora Asx (Higuera-Ciapara I, 2006).

1.7.1. Hemijska struktura astaksantina

Karotenoidi su grupa jedinjenja koja se sastoji od oko 600 pigmenata koja se sintetise *de novo* u višim biljkama, algama, bakterijama i gljivama. Većina karotenoida su ugljovodnici koji sadrže dva terminalna prstena spojena preko lanca konjugovanih dvostrukih veza, odnosno polienskog niza. Dve grupe jedinjenja su izdvojene kao najvažnije: karoteni, koji se sastoje samo iz ugljenika i vodonika i ksantofili koji su oksidovani derivati karotena. Kiseonik je prisutan u obliku hidroksilne grupe kao što je kod zeaksantina ili kao keto grupe kod kantaksantina ili u kombinaciji obe kod astaksantina (Higuera-Ciapara I, 2006). Asx ima dve karbonilne grupe, dve hidroksilne grupe i 11 konjugovanih dvostrukih veza. Prisustvo hidroksilne i karbonilne grupe na svakom jononskom prstenu objašnjava jedinstvene karakteristike Asx, mogućnost esterifikacije i polarniju strukturu u odnosu na druge karotenoide (Hussein G, 2006). Hemijska struktura nekih karotenoida je prikazana na Slici 1.

Svaka dvostruka veza u polienskom nizu može biti u dve konfiguracije-cis i trans. Cis izomeri astaksantina su termodinamički manje stabilni od trans izomera. Utvrđeno je da mikroalga *H. pluvialis* sadrži 36,7 mg/g trans-astaksantina (73,1 %) i 13,5 mg/g cis-astaksantina (26,9 %) (Yuan JP, 2011). S obzirom da svaki molekul ima 2 hiralna centra (C-3 i C-3'), astaksantin ima tri konfiguraciona izomera – dva enantiomera (3R,3'R i 3S,3'S) i mezo formu (3R,3'S). Od svih izomera, 3S,3'S je najrasprostranjeniji oblik u prirodi (Higuera-Ciapara I, 2006). U slobodnom obliku Asx je jako nestabilan i podložan oksidaciji, pa se u prirodi uglavnom nalazi u obliku mono i diestara sa različitim masnim kiselinama (Hussein G, 2006). Masne kiseline koje grade Asx estere su oleinska, palmitinska i linolenska kiselina, a oleinska kiselina čini 51% masnih kiselina Asx estera (Yuan, JP, 2011). Takođe se može naći i u hemijskom kompleksu sa proteinima ili lipoproteinima (mišići lososa, egzoskelet jastoga) (Hussein G, 2006).



Slika 3. Hemijska struktura karotenoida

1.7.2. Bioraspoloživost i metabolizam astaksantina

Karotenoidi su vrlo lipofilne supstance i imaju nisku oralnu bioraspoloživost. Polarni karotenoidi, kao što je Asx, imaju veću bioraspoloživost od apolarnih vrsta, na primer β karotena i likopena (Yuan JP, 2011). Inkorporiranje Asx u formulacije na bazi ulja povećavaju bioraspoloživost kod ljudi (Odeberg JM, 2003). Neke predkliničke studije su pokazale povećanu rastvorljivost upotrebom emulgatora kao što su polioksietilen sorbitan monopalmitat i monooleat, kao i sulfobutil etar β-ciklodekstrin (Hussein G, 2006).

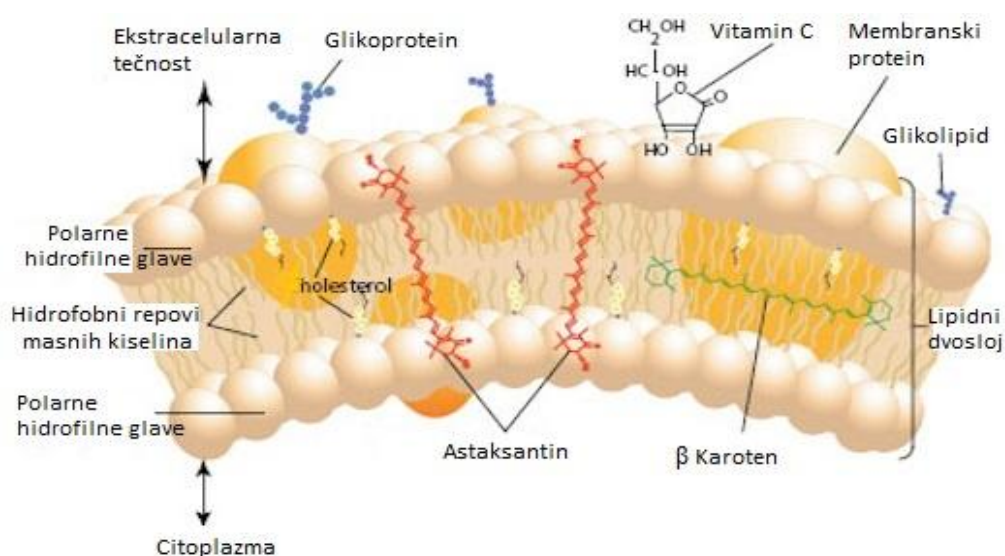
Mnogi ksantofili, uključujući i Asx su uglavnom prisutni u obliku mono i diestara i moraju biti hidrolizovani pre apsorpcije. Apsorpcija iz intestinalnog trakta je uglavnom pasivni proces koji ne uključuje specijalne transportere. Rastvaranje u matriksu i inkorporiranje u mešovite micide su dva važna koraka koja predhode apsorpciji. U enterocitima ksantofili se inkorporiraju u hilomikrone i prelaze u limfni sistem pre ulaska u sistemsku cirkulaciju, a zatim se transportuju do jetre. Ksantofili koji nisu inkorporirani u hilomikrone verovatno se vraćaju u lumen (Zaripheh, 2002). Dok se nepolarni karotenoidi, kao što su β -karoten i likopen uglavnom transportuju preko VLDL i LDL čestica, polarniji karotenoidi kao što su Asx nalaze u plazmi u sastavu LDL i HDL čestica (Guerin M, 2003). Maksimalna koncentracija u krvi se dostiže za ~8h i ne zavisi od tehnološke formulacije preparata (Odeberg JM, 2003). Pokazano je da se Asx akumulira u mišićima, jetri i bubrezima (Aoi W, 2003). Postoji vrlo malo podataka o metabolizmu Asx. Studije izvođene na hepatocitima pacova pokazale su konverziju Asx do dva metabolita: 3-hidroksi-4-okso- β -jonon i njegovog redukovano oblika 3-hidroksi-4-okso-7,8-dihidro- β -jonon (Wolz E, 1999). Druga studija je utvrdila da postoje 4 metabolita, pomenuti jononi i odgovarajući jonoli (Kistler A, 2002). Farmakokinetika Asx se može opisati kao model od jednog prostora. Eliminacije je linearna sa poluživotom $15,9 \pm 5,3$ h (Odeberg JM, 2003)

1.7.3. Izvori astaksantina

Postoje dva prirodna izvora koja mogu da zadovolje ekonomske kriterijume proizvodnje: zelena alga *Haematococcus pluvialis* i crveni kvasac *Phaffia rhodozyma*. U ovom ispitivanju korišćen je Asx dobijen iz alge *Haematococcus pluvialis*. Proizvodni proces se sastoji od uzgoja algi u velikim sudovima pod kontrolisanim uslovima, nakon čega se cepaju ćelijski zidovi da bi se povećala bioiskoristljivost karotenoida. Dobijena biomasa se suši da bi se dobio fini prašak crvenkaste boje. Trenutno se na tržištu nalazi nekoliko proizvoda na bazi Asx koji su dobijeni iz ove mikroalge. Oni sadrže 1,5 % - 2 % Asx i koriste se kao pigmenti i nutrijenti. Postoji i sintetski oblik koji je identične hemijske strukture kao prirodni i sastoji se od mešavine izomera u odnosu 1:2:1 (Higuera-Ciapara I, 2006).

1.7.4. Astaksantin kao antioksidans

Karotenoidi brzo reaguju sa slobodnim radikalima, a njihova reaktivnost zavisi od dužine polienskog niza i terminalnih prstenova. Karotenoidi vezuju ekscitiranu energiju singletnog kiseonika na polienski niz, što dovodi do degradacije molekule karotenoida, ali štiti ostale molekule od oksidativnog oštećenja (Higuiera-Ciapara I, 2006). Različito antioksidativno i prooksidativno ponašanje karotenoida zavisi od specifičnih grupa, zatim broja i rasporeda metil grupa na terminalnim prstenovima. Prisustvo hidroksilne i keto grupe na svakom jononskom prstenu je razlog visoke antioksidativne aktivnosti i hidrofilnih karakteristika Asx (Guerin M, 2003).



Slika 4. Transmembranska orijentacija astaksantina u ćeliji (preuzeto iz Pashkow FJ./ *The American Journal of Cardiology* 2008)

Asx se pozicionira duž ćelijske membrane i neutrališe slobodne radikale sa unutrašnje i spoljašnje strane membrane, ali i unutar fosfolipidnog dvosloja (Slika 4). Pokazano je da Asx ima oko 10 puta veću antioksidativnu aktivnost od ostalih karotenoida i oko 100 puta veću od α -tokoferola. Prisustvo hidroksilne i keto grupe na svakom jononskom prstenu je razlog visoke antioksidativne aktivnosti i hidrofilnih karakteristika Asx (Guerin M, 2003).

Naguib i sar. su merili antioksidativnu aktivnost različitih karotenoida fluorimetrijskom metodom. Pokazano je da Asx ima veću antioksidativnu aktivnost od luteina, likopena, α - i β -karotena i α - tokoferola (Naguib YMA, 2000). Ispitivanje

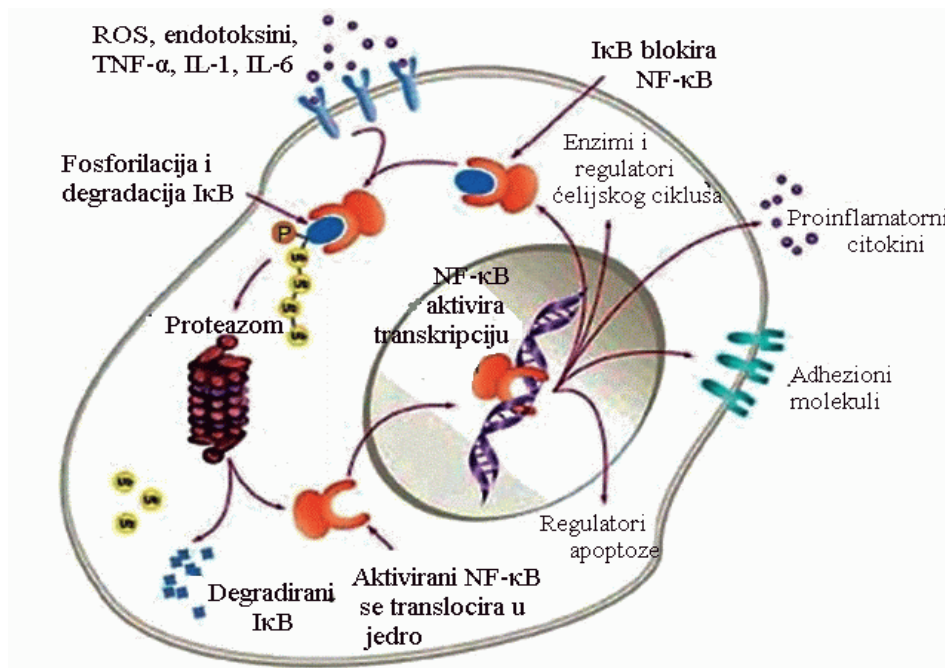
sposobnosti hvatanja-neutralizacije singletnog kiseonika različitih antioksidanasa pomoću hemiluminescencije (uz endoperoksid 1,4 dimetilnaftalena kao generatora singletnog kiseonika) pokazalo je da α -tokoferol i α -liponska kiselina imaju značajnu antioksidativnu aktivnost, dok je aktivnost askorbinske kiseline, koenzima Q10 i polifenola bila zanemarljiva. Karotenoidi su imali veću sposobnost neutralizacije slobodnih radikala u odnosu na ostale antioksidanse, a Asx je pokazivao najveću aktivnost od svih karotenoida (Nishida Y, 2007).

1.7.5. Anti-inflamatone osobine astaksantina

In vitro i *ex vivo* studije su pokazale da Asx može sprečiti inflamatorne procese blokadom ekspresije pro-inflamatornih gena i to preko supresije aktivacije nuklearnog faktora κ B (Nf- κ B) (Lee SJ, 2003). Naime, Nf- κ B je lokalizovan u citoplazmi vezan za inhibitorni protein I κ B, što ga čini neaktivnim. Veliki broj ekstracelularnih imunih stimulanasa indukuje aktivaciju I κ B kinaze (IKK), koja ovaj inhibitorni protein fosforiliše i oslobađa Nf- κ B iz neaktivnog kompleksa. Aktivirani NF- κ B ulazi u jedro, gde započinje transkripciju gena koji su važni za imunitet, inflamaciju, ćelijski rast, diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu (Vaughan S, 2011). Postoji veliki broj različitih puteva koji dovode do aktivacije i translokacije NF- κ B. ROS interaguju sa NF- κ B signalnim putem na više načina. Transkripcija NF- κ B-zavisnih gena utiče na nivo ROS u ćeliji, a takođe i aktivnost NF- κ B je regulisana ćelijskim redoks balansom.

Direktna oksidacija NF- κ B preko ROS inhibira njegovu sposobnost vezivanja za DNK. Modifikacija I κ B proteina ili IKK pod uticajem ROS, može dovesti do inhibicije aktivacije NF- κ B. Sa druge strane, ROS mogu preko različitih puteva i stimulisati aktivaciju NF- κ B. ROS mogu usloviti aktivaciju NF- κ B, koji će dovesti do transkripcije ciljnih gena i sinteze proteina koji mogu smanjiti produkciju ROS, sprečiti dalja oksidativnog oštećenja i omogućiti preživljavanje ćelije, kao što su SOD, glutation peroksidaza, glutation S transferaza, feritin. Ipak, ako u oštećenja prevelika, može doći i do stimulacije ekspresije gena koji su odgovorni za apoptozu ćelije. S obzirom da je NF- κ B važan za process inflamacije, njegova aktivacija može dovesti do produkcije enzima koji stimulišu formiranje ROS (iNOS, COX2), odnosno proinflamatornih citokina koji dovode do inflamacije i daljeg povećanja produkcije ROS (Morgan MJ, 2011).

Kakav će uticaj ROS imati na aktivnost NF- κ B zavisi od puta aktivacije ali od vrste ćelije. Iako se mnogo zna o načinima na koji ROS utiču na ovaj signalni put, ipak postoji još mnogo pitanja koja nemaju odgovor.



Slika 5. Aktivacija NF- κ B i regulacija transkripcije ciljnih gena (Preuzeto iz Montagut C. I sar./ *Drugs Today* 2005)

Pokazano je da tretiranje ćelija Asx smanjuje sekreciju proinflammatoryh citokina IL-1 β , IL-6 and TNF- α , koja je indikovana primenom H₂O₂. Smatra se da je ovaj efekat Asx posledica smanjene nuklearne ekspresije NF- κ B. Naime, nuklearna translokacija fosforilisane subjedinice NF- κ B p65, indukovana tretiranjem ćelija sa H₂O₂, blokirana je primenom Asx (Speranza L, 2012). Asx inhibira lipopolisaharid stimulanu sintezu IL-6 proteina i mRNA u mikroglialnim ćelijama. Pored toga, povećan nivo fosforilisanih IKK α , I κ B α i subjedinice p65 su suprimirani pod uticajem Asx. Nuklearna translokacija p65 subjedinice je takođe inhibirana primenom Asx. (Kim YH, 2010). Asx može značajno da smanji produkciju proinflammatoryh citokina TNF- α (eng. tumor necrosis factor- α) i IL-6 u stimulisanim neutrofilima. Rezultat je da Asx popravlja fagocitnu i mikrocidnu funkciju neutrofila, tako što smanjuje produkciju superoksidnog anjona i vodonik peroksida (Macedo RC, 2010). Primena Asx, zahvaljujući anti-inflamatornom delovanju, može imati povoljan efekat kod hroničnih inflamatornih bolesti kao što su reumatoidni artritis, inflamatorna bolest creva, ateroskleroza (Yuan JP, 2011).

1.7.6. Primena astaksantina u promociji zdravlja

Astaksantin i kardiovaskularne bolesti

Mnoge studije su pokazale da je visok nivo LDL u korelaciji sa prevalencom kardiovaskularnih bolesti kao što je angina pektorisa, infarkt miokarda, tromboza. Rizik od razvoja ateroskleroze kod ljudi korelira sa nivoom LDL holesterola. Inhibicija oksidacije LDL je predloženi mehanizam preko koga antioksidansi mogu sprečiti razvoj ateroskleroze. Rezultati *in vivo* i *ex vivo* studija Iwamoto i sar. (2000) pokazuju da Asx značajno smanjuje oksidaciju LDL-a, a samim tim i aterosklerozu krvnih sudova. Suplementacija Asx dva puta po 4 mg dnevno u periodu od tri meseca je smanjila *in vivo* oksidaciju masnih kiselina (Karppi J, 2007). Pokazano je da suplementacije Asx u periodu od 12 nedelje sigurna i efikasna u prevenciji poremećaja lipidnog statusa i oksidativnog stresa kod zdravih ispitanika sa prekomernom telesnom težinom (Choi HD, 2011). Značajan kardioprotektivni efekat primene Asx zabeležen je u većem broju eksperimentalnih modela (na pacovima, zečevima i psima) ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja (Lauver DA, 2005; Gross GJ, 2004; Gross GJ, 2005). Hussein G i Goto H (2006) su pokazali da primena Asx kod miševa sa hipertenzijom u periodu od 7 nedelja smanjuje krvni pritisak, zatim smanjuje broj elastičnih vlakana u aorti i smanjuje odnos zid/lumen u koronarnim arterijama i arteriolama. Primena Asx u dozi od 6 mg u periodu od 10 dana značajno poboljšava reološke karakteristike krvi kod 20 odraslih muškaraca, pri čemu nisu uočeni nikakvi neželjeni efekti (Miyawaki H, 2008).

Astaksantin i tumori

Karotenoidi su postali predmet interesovanja, kada je utvrđeno da postoji veza između niskog nivoa ovih supstanci u organizmu i prevalence tumora. Chew and Park su ukazali da iako Asx, kantaksantin, β -karoten pokazuju inhibitorni efekat na rast tumora, najveću antitumorsku aktivnost ima Asx, pri čemu je inhibicija tumorskog rasta zavisna od doze (Chew BP i Park JS, 1999). Inhibitorni efekat na rast Asx je uočen u nekoliko kultura tumorskih ćelija - kolona, oralnog fibrosarkoma, dojke, prostate i embrionskih fibroblasta. Istraživanja na laboratorijskim životinjama su pokazala primena Asx smanjuje kancerogenezu u bešici kod miševa, kolona, usta i jezika kod pacova. Smatra se da Asx ima ovakav efekat zbog supresije ćelijske proliferacije. Kod miševa, koji su inokulisani ćelijama fibrosarkoma, predhodna primena Asx suprimirala

je rast tumora i stimulisala imuni odgovor protiv antigena koje tumor eksprimira (Higuera-Ciapara I, 2006). Tripathi DN i sar. (2009) su utvrdili da Asx može da smanji oksidativni stres, oštećenje DNK i ćelijsku smrt, kao i indukciju rane hepatokarcinogeneze kod miševa, indukovanu ciklofosfamidom.

Astaksantin i neurodegenerativne bolesti

Postoje dokazi da je oksidativni stres uzrok ili barem jedan od ključnih faktora u patogenezi neurodegenerativnih bolesti (Alchajmerove, Hantingtonove, Parkinsonove, amiotrofične lateralne skleroze). Tso MOM i Lam TT (1996) su detektovali Asx u mozgu pacova koji su hranjeni sa prirodnim Asx, ukazujući da Asx može proći hemoencefalnu barijeru. Pored toga, pokazan je i neuroprotektivan efekat Asx, što ukazuje da Asx može biti efikasan nutrijent koji štiti nervi sistem od oksidativnog stresa, apoptoze neurona, pa čak i od starenje nervnog sistema. Tretiranje dopaminergičke ćelijske linije SH-SY5Y sa Asx u koncentraciji od 100nM, je smanjilo DHA-OOH- i 6-OHDA-indukovanu apoptozu, poremećaj funkcije mitohondrija i smanjilo intracelularno generisanje ROS (Liu X, 2009). Studija na P12 ćelijama, diferentovanim pod uticajem nervnog faktora rasta, je pokazala da primena Asx ima značajan antioksidativni i antiinflamatorni efekat. Izloženost P12 ćelija prooksidativnim faktorima značajno povećava nivo MDA i ROS i smanjuje sadržaj GSH i aktivnost enzima GPX i CAT. Predhodno tretiranje ćelija sa Asx je sprečio negativan efekat prooksidanasa na antioksidativnu zaštitu i smanjilo produkciju slobodnih radikala, ali i nivo proinflamatornih citokina IL-1, IL-6 i TNF- α (Chan K, 2009).

Astaksantin i oči

Dva vodeća uzroka slepila su adultna makularna degeneracija (AMD) i katarakta. Niz nalaza potvrđuje ulogu oksidativnog stresa u etiopatogenezi ovih bolesti. Normalni metabolički procesi i UV svetlost dovode po generisanja slobodnih radikala koji uzrokuju oksidativna oštećenje fotoreceptora u retini i proteina sočiva. Rezultati epidemioloških studija povezuju visok unos karotenoida, posebno luteina i zeaksantina sa smanjenjem rizika od nastanka ovih bolesti. Zahvaljujući antioksidativnim karakteristikama i sposobnosti da prođe kroz barijere krv-mozak i krv-mrežnjača, astaksantin je idealnan suplement u borbi protiv ovih bolesti. *In vitro* studija na epitelnim ćelijama humanog sočiva je pokazala da tretiranje kompleksom ksantofila koji sadrži i Asx značajno smanjuje lipidnu peroksidaciju pod uticajem UVB zraka i da je

Asx efikasniji od vitamina E u zaštiti ćelija sočiva od UVB oštećenja (Hussein G, 2006).

Primena Asx može smanjiti simptome zamora oka, povećati oštrinu vida, a ima i pozitivan uticaj na parametre akomodacije oka, kao što je povećanje amplitude akomodacije i poboljšanje akomodacionog refleksa. (Nagaki Y, 2002; Nakamura A, 2004; Nitta T, 2005; Shiratori K, 2005). Suplementacija sa 6 mg Asx tokom 4 nedelje je značajno poboljšalo cirkulaciju krvi u kapilarima mrežnjače, dok taj efekat nije uočen kod placebo grupe. (Yasunori N, 2005). Asx ima dozno zavisni anti-inflamatorni efekat na indukovanu inflamaciju u uvei, sa značajno smanjenom produkcijom inflamatornih jedinjenja - azot oksida, prostanglandina 2 i TNF- α (Ohgami K, 2003; Suzuki Y, 2006).

Astaksantin i imunitet

Jyonouchi i sar. su izveli većinu studija koja se odnosi na potencijalnu aktivnost Asx kao modulatora imunog sistema. Asx povećava produkciju T-pomoćnih limfocita i povećava broj sekretornih ćelija u kulturi ćelija slezine (Jyonouchi H, 1996). Ovi autori su takodje ispitivali efekat Asx na produkciju imunoglobulina *in vitro* u humanim ćelijama krvi i ustanovili povećanje produkcije IgA, IgG, i IgM kao odgovor na T-zavisni stimulus (Jyonouchi H, 1995). Druge *in vivo* studije na miševima su pokazale imunomodulatorno dejstvo Asx i ostalih karotenoida na humoralni odgovor na T-zavisne antigene, što ukazuju da suplementacija sa karotenoidima može biti korisna za poboljšanje oslabljenog imunog odgovora (Jyonouchi H, 1994). Park JS i sar. (2010) su ispitivali potencijalne imunomodulatorne, antioksidativne i antiinflamatorne osobine Asx u populaciji mladih, zdravih žena i pokazali da suplementacije Asx može smanjiti oštećenje DNK, nivo biomarkera oksidativnog stresa i inflamacije i poboljšati imuni odgovor. Asx je povećao mitogen indukovanu proliferaciju limfocita, citotoksičnu aktivnost NK ćelija, povećao ukupan broj T i B limfocita, ali bez uticaja na populaciju T-pomoćničkih, T citotoksičnih i NK ćelije.

Astaksantin i sport

Primena Asx može smanjiti oštećenje skeletnih i srčanih mišićnih ćelija, sprečiti oksidativna oštećenja DNK i peroksidaciju lipida nakon produženog vežbanja (Aoi W, 2003). Ista grupa istraživača je pokazala da Asx favorizuje korišćenje masti u odnosu na glukozu tokom fizičke aktivnosti, i na taj način povećava izdržljivost i efikasnost

zmanjenja telesne masti sa treniranjem (Aoi W, 2008). Još jedna studija je pokazala sa Asx može smanjiti korišćenje glukoze na račun masnih kiselina. Sačuvan glikogen je dostupan izvor energije za kasnije stadijume treniranja, pa sporije iskorišćavanje glukogena povećava izdržljivost i odlaže zamor (Ikeuchi M, 2006). Pored toga Asx može smanjiti DOMS kod utreniranih sportista (Fry A, 2004). Ipak, primena Asx u toku 3 nedelje nije uticala na nivo CK, LDH i DOMS nakon anaerobnog treninga (Bloomer RJ, 2005). Šestomesečna suplementacija sa 4 mg Asx, značajno povećava broj čučnjeva pod kontrolisanim uslovima, ukazujući da je Asx efikasan u povećanju snage i izdržljivosti kod sportista (Malmstain CL, 2008). Kod profesionalnih biciklista pokazano je značajno smanjenje vremena završetka trke na 20 km nakon suplementacije sa 4 mg Asx u periodu od 28 dana u odnosu na placebo grupu. Promene u metabolizmu ugljenih hidrata i masti nisu uočene (Earnest CP, 2011). Primena Asx iz alge *H. Pluvialis* značajno smanjuje nivo laktata kod odraslih muških dobrovoljaca 2 minuta nakon trke na 1200m (Sawaki, 2002).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Utvrditi da li postoji razlika u koncentraciji parametara oksidativnog stresa i aktivnosti antioksidativne zaštite, kao i u aktivnosti enzima PON1 kod mladih fudbalera i zdravih ispitanika koji nemaju redovnu intenzivnu fizičku aktivnost
- Ispitati uticaj redovnih treninga i suplementacije astaksantinom u periodu od 3 meseca na bazalne vrednosti parametara oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite, kao i na aktivnosti enzima PON1 kod fudbalera.
- Ispitati uticaj intenzivnog treninga i suplementacije astaksantinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.
- Ispitati uticaj suplementacije astaksantinom na parametre oštećenja mišića.
- Ispitati efekat različitih preventivnih mera na nivo sekretornog IgA u salivi:
 - Ispitati efekat senzorne stimulacije na nivo sekretornog IgA u salivi kod karatista rekreativaca.
 - Ispitati uticaj suplementacije astaksantinom na nivo sekretornog IgA u salivi kod mladih elitnih fudbalera.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Ispitivanje uticaja suplementacije astaksantinom na oksidativnostresni status i mukozni imunitet obuhvatilo je 40 fudbalera. U cilju ispitivanja nivoa oksidativnog stresa kod fudbalera u odnosu na osobe koje se ne bave sportom, uvrstili smo i kontrolnu grupu koja se sastojala od 28 ispitanika. Uticaj senzorne stimulacije na mukozni imunitet ispitivan je grupi od 20 osoba koje se rekreativno bave karateom.

Sportisti, uključeni u studiju, su bili igrači fudbalskog kluba „Teleoptik“ i mlade selekcije fudbalskog kluba „Partizan“, Beograd, Srbija, uzrasta od 17 do 21 godine. Svi ispitanici su bili nepušači, bez hroničnih oboljenja, bez povreda u toku studije ili u predhodnih godinu dana, koji nisu koristili lekove koji utiču na redoks status organizma, najmanje tri meseca pre početka i tokom trajanja studije. Tokom trajanja studije vođen je dnevnik sportskih aktivnosti, koji obuhvata i treninge i utakmice. Igrači su imali 5 treninga na terenu (~525 min) i jednu utakmicu nedeljno, tokom prvih 8 nedelja posmatranog perioda. Tokom narednih 5 nedelja, imali su 6 treninga (~670 min) i jednu utakmicu nedeljno. Trening se sastojao od serija trčanja niskog do umerenog intenziteta, intervalnog trčanja umerenog do visokog intenziteta, fizičko-tehničkih ciklusa i simulacije utakmice u malim grupama na velikoj površini. Pored toga, ispitanici su imali 2 treninga u teretani nedeljno (~115 min).

Kontrolnu grupu su činili ispitanici koji nisu imali redovnu intenzivnu fizičku aktivnost. Ova grupa se sastojala od 15 dečaka i 13 devojčica uzrasta od 14 do 15 godina.

Grupa ispitanika koja se rekreativno bavila karateom obuhvatila je 8 muškaraca i 12 žena, starosti između 20 i 25 godina. Ispitanici su bili nepušači, bez hroničnih bolesti, bez bolesti zuba, simptoma respiratornih infekcija. Nisu koristili lekove ni suplemente mesec dana pre studije. Imali su treninge u trajanju od 1 h, tri puta nedeljno.

3.2. Dizajn eksperimenta

Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Udruženja za medicinu sporta Srbije. Ispitanici i roditelji su detaljno obavešteni o samoj proceduri studije, potencijalnim rizicima učešća u studiji, kao i o obavezama učešća i mogućnosti povlačenja iz studije u svakom trenutku. Učesnici su dali pristanak za dobrovoljno učešće u studiji.

Uticaj aktivnog bavljenja sportom na nivo oksidativnog stresa ispitan je poređenjem parametara oksidativnog stresa i anitoksidativne zaštite između grupe fudbalera i ispitanika koji nemaju redovnu intenzivnu fizičku aktivnost.

Na homogenoj grupi od 40 fudbalera ispitan je uticaj treninga i suplementacije astaksantinom na parametre oksidativnog stresa i anitoksidativne zaštite u toku 90 dana posmatranog perioda. Istraživanje je sprovedeno kao randomizirana, dvostruko slepa i placebo kontrolisana studija. Ispitanici su podeljeni u dve grupe. Jedna grupa je suplementirana sa 4 mg astaksantina jednom dnevno tokom 12 nedelja, dok je druga dobijala placebo kapsule, koje su identičnog ukusa i izgleda kao kapsule sa astaksantinom. Tokom studije, treneri su na svakom jutarnjem treningu davali sportistima kapsulu da popiju. U danima kada nemaju trening, sportistima je dan ranije data kapsula uz podsećanje narednog dana da obaveznu popiju kapsulu. Četiri dana na početku studije sportisti su vodili detaljan dnevnik ishrane. Energetski unos, unos makronutrijenata i mikronutrijenata je izračunat upotrebom CRON-O-Meter v0.9.6 softvera. Tokom trajanja studije sportisti su zadržali ustaljeni režim ishrane.

Uzimanje uzoraka krvi i salive je sprovedeno na sledeći način: pre suplementacije, prvi uzorak krvi i salive je uzet ujutru između 8 i 9 sati, 10 sati od poslednjeg obroka, i posle 24 – časovnog odmora. Posle prvog uzimanja uzoraka, a pre treninga, ispitanici su imali standardizovani doručak, približne energetske vrednosti od 650 kcal. Ovaj obrok je imao sledeći sadržaj makronutrijenata i mikronutrijenata: 16 g - 17 g proteina, 131 g - 135 g ugljenih hidrata, 4 g - 5 g masti, oko 190 IU vitamina A, 30 mg vitamina C, 0,5 mg vitamina E, 0,4 mg bakra, 2,1 mg mangana, 44,5 µg selena i 2,1 mg cinka. Drugi uzorak je uzet, istog dana, posle intenzivnog treninga koji je trajao dva sata. Isti raspored uzimanja uzorka je ponovljen posle 45 i 90 dana suplementacije.

Ovo istraživanje je obuhvatilo i određivanje uticaja nutritivnih mera na mukozni imunitet sportista. Na grupi od 40 fudbalera je ispitivan efekat suplementacije Asx na mukozni imunitet. Pre ovog eksperimenta sprovedena je pilot studija na grupi od 20 osoba koje se rekreativno bave karateom, u kojoj je ispitivan uticaj senzorne stimulacije na produkciju salive i nivo sIgA. Ispitanici su imali tri treninga nedeljno u trajanju od 60 min. Ispitanicima je savetovano da ne uzimaju vodu i hranu 1 sat pre treninga, a kozumiranje vode tokom treninga nije bilo dozvoljeno. Srčana frekvenca i subjektivna procena zamora (eng. ratings of perceived exertion - RPE) su mereni u intervalima od 15 minuta. Ispitanici su podeljeni u dve grupe. Senzorna stimulacija je u grupi 1 urađena sa tečnom surutkom 15 i 30 minuta nakon treninga, a u grupi 2 sa napitkom na bazi surutke sa aromom pomorandže u isto vreme. Ispitanici su držali tečnost u ustima 20 s a zatim progutali. Uzorci salive su uzeti pre treninga, neposredno posle treninga, zatim nakon svake aplikacije napitka, odnosno surutke, tj. 15 i 30 minuta nakon treninga. Uzimanje uzoraka je sprovedeno tri puta u toku jedne nedelje, kada su sportisti imali trening, i to uvek u isto vreme da bi se izbegao uticaj cirkadijalnog ritma na sIgA.

Uzorci krvi su uzeti iz prednje kubitalne vene. Krv je sakupljena vakutejner sistemima sa etilendiaminotetrasirćetnom kiselinom i sa litijum-heparinom za izdvajanje plazme i vakutejnerima sa serum separator gelom za dobijanje seruma (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austrija). Uzorci su nakon uzimanja čuvani na +4°C, a zatim u što je moguće kraćem roku centrifugirani na 1500xg u toku 10 minuta. Plazma i serum su odvojeni, podeljeni u alikvote i čuvani na -80°C do analize. Za higijensko i efikasno sakupljanje salive korišćene su salivete (Salivete-Sarstedt, Germany). Vaterolna iz saliveta je postavljena ispod jezika i uzorak mešovite salive sakupljan je u toku 2 minuta. Uzorci salive su centrifugovani na 3000 obrtaja u toku 10 minuta. Supernatant je odvojen, podeljen u alikvote i čuvan na -80 °C do analize. Pre i posle uzimanja uzorka salive, salivete su izmerene na analitičkoj vagi. Količina salive u gramima je prevedena u mililitre, pod pretpostavkom da je specifična težina salive 1 g/ml, a zatim podeljena sa 2 da bi se izračunao salivarni protok (ml/min).

Laboratorijske analize su urađene na Katedri za bromatologiju i Katedri za medicinsku biohemiju, Farmaceutskog fakulteta u Beogradu i laboratoriji „Beolab“ u Beogradu. Antropometrijska merenja i određivanje aerobnog kapaciteta je urađeno u ordinaciji „Vita Maxima“, Beograd, Srbija.

3.3. Metode

Kod ispitanika su određivani su sledeći parametri:

Antropometrijski podaci

- Uzrast
- Visina
- Težina
- Indeks telesne mase (ITM)
- Dužina trenaznog staža

Aerobni kapacitet - VO₂max

Osnovni bihemijski i hematološki parametri

- Alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST), bilirubin, kreatinin, kreatin kinaza (CK), laktat dehidrogenaza (LDH), glukoza, urea, ukupni proteini, mokraćna kiselina, gvožđe, feritin i transferin
- Lipidni status - ukupni holesterol (HOLuk), HDL holesterol (HDL-H), LDL holesterol (LDL-H) i trigliceridi (TG)
- Kompletna krvna slika: broj leukocita, eritrocita, tromocita, hemoglobin (Hb), hematokrit (Hct), zapremina eritrocita (eng. mean cell volume-MCV), prosečna količina hemoglobina u eritrocitu (eng. mean cell hemoglobin-MCH), prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (eng. mean cell hemoglobin concentration-MCHC).

Parametri oksidativnog stresa

- Tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance (TBKRS)
- Produkti uznapredovale oksidacije proteina (AOPP)
- Superoksidani anjon radikal (O₂·⁻)
- Aktivnost enzima plazmatske superoksid dismutaze (SOD)
- Sadržaj sulfhidrilnih grupa (SH)
- Aktivnost enzima paraoksonaze prema paraoksonu kao supstratu (POazna)

- Aktivnosti enzima paraoksonaze prema diazoksonu kao supstratu (DZOazna)
- Totalni oksidativni status (TOS)
- Totalni anitoksidativni status (TAS)
- Prooksidativno-antioksidativni balans (PAB)

Mukozni imunitet

- Salivarni protok
- Apsolutna koncentracija sIgA
- Brzina izlučivanja sIgA

3.3.1. Antropometrijska merenja i određivanje VO₂max

Na početku studije, a pre suplementacije urađeno je antropometrijsko merenje na vagi BC-418, na bazi bioimpedance (Tanita, Tokyo, Japan) i određeni telesna masa i procenat telesne masti. Visina je izmerena na prenosivom stadiometru sa tačnošću od 0,1 cm. ITM je izračunat kao odnos telesne mase u kilogramima i visine u metrima stepenovane sa 2 (kg/m²). Pored toga, sprovedeno je i ergospirometrijsko ispitivanje na pokretnoj traci (Quark b2-Cosmed). Urađen je maksimalni test opterećenja gde se otpor, a time i intezitet vežbanja postepeno povećavaju, dok se meri odnos koncentracije udahnutog kiseonika i izdahnutog ugljen dioksida. Inspirijum i ekspirijum se mere posebnom aparaturom, a da bi se to postiglo sportista u toku testa nosi masku koja je stavljena na lice. Maksimalni VO₂ (VO_{2max}) se dostiže kada se potrošnja kiseonika ustali na nekom nivou i pored povećavanja opterećenja. VO_{2max} je maksimalna potrošnja kiseonika ili aerobni kapacitet koji organizam može da transportuje i iskoristi u toku vežbanja sa postepenim pojačavanjem inteziteta.

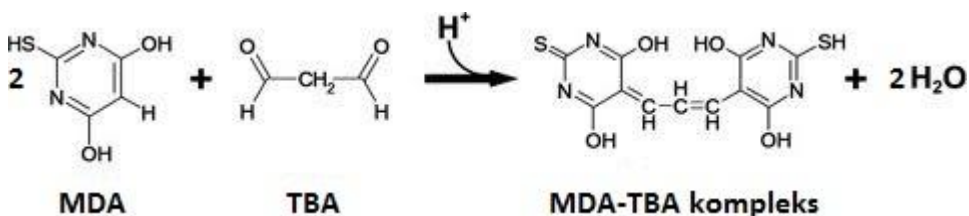
3.3.2. Određivanje biohemijskih i hematoloških parametara

Biohemijski parametri su određeni rutinski, primenom automatizovanih metoda na automatskom analizatoru Ilab 300+ reagensima proizvođača Biosystems S.A. (Barcelona, Spain) i Byoanalitica (Belgrade, Serbia). Kompletna krvna slika određivana je na hematološkom brojaču Cell-Dyn 3700 (Abbott Diagnostics, Illinois, USA).

3.3.3. Određivanje parametara oksidativnog stresa

3.3.3.1. Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBKRS)

Princip metode za određivanje koncentracije TBKRS zasniva se na činjenici da krajnji proizvodi peroksidacije lipida imaju sposobnost reagovanja sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) i građenja obojenog kompleksa čiji je maksimum apsorbanca na 535 nm (Girroti MJ, 1991).



Slika 6. Mehanizam reakcije TBKRS sa tiobarbiturnom kiselinom

Reagensi

TBA reagens: 0,917 mmol/L trihlorsirćetne kiseline (TCA, 15% rastvor), 2,6 mol/L (0,375%) TBA-tiobarbiturne kiselin, 0,25 mol/L HCl. Ove komponente se rastvaraju u destilovanoj vodi a reagens se čuva u frižideru na +4°C.

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

Tabela 2. Postupak za određivanje TBKRS

	Slepa proba	Analiza
Plazma	-	0,3 mL
TRIS-Cl puffer	0,3 mL	-
Standard	-	-
TBA reagens	0,6 mL	0,6 mL

Promešati i inkubirati na 100°C, u vodenom kupatilu 5 minuta. Ohladiti, centrifugirati na 10.000 g, deset minuta na +4°C i očitati apsorbance na 535 nm.

Koncentracija TBKRS se izračunava metodom molarog apsorpcionog koeficijenta koji iznosi $1,56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ za nastali obojeni kompleks.

3.3.3.2. *Određivanje uznapredovalih produkata oksidacije proteina (AOPP)*

Spektralnom analizom razblaženog uzorka plazme ili seruma fosfatnim puferom pH 7,4 u opsegu talasnih dužina 200-400 nm uočava se karakterističan pik oko 340 nm. Dodavanjem sirćetne kiseline u razblažen serum i rastvora kalijum-jodida 1,16 M dolazi do promene apsorbance koja se meri na 340nm. Koncentracija AOPP se izražava preko ekvivalenta hloramina T koji se koristi za izradu standardne krive u koncentracijama 10-100 $\mu\text{mol/L}$, pri čemu njegoa apsorbanca linearno raste sa porastom koncentracije (Selmeći L, 2005).

Reagensi (sastav i priprema)

Standardni rastvor Hloramina T (N-hloro-p-toluensulfonamid natrijum), 100 $\mu\text{mol/L}$. Odmeriti 0,028 g Hloramin T-trihidrata i rastvoriti destilovanom vodom do 1000 mL.

Glacijalna sirćetna kiselina

Rastvor kalijum jodida 1,16 M. Odmeriti 19,257 g KJ i rastvoriti destilovanom vodom do 1000 mL. Regens čuvati u tamnoj boci.

Fosfatni pufer 20 mM, pH 7,4. Rastvoriti 3,4 g KH_2PO_4 u 250 mL vode, a zatim 4,45 g Na_2HPO_4 rastvoriti u 250 mL vode. U rastvor Na_2HPO_4 dodavati KH_2PO_4 sve dok pH ne bude 7,4.

Postupak za određivanje AOPP

Nivo AOPP je određivan na automatskom analizatoru ILab 300+, nakon optimizacije originalne metode u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Tip reakcije je metoda završne tačke sa slepom probom reagensa. Za određivanje standardne krive mogu se koristiti koncentracije Hloramina-T: 12,5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ pripremljene od Hloramin-T stock rastvora (100 $\mu\text{mol/L}$). Glacijalna sirćetna kiselina izmešana sa PBS u odnosu 1:8 čine reagens 1(R1), dok reagens 2 (R2) sadrži kalijum jodid pripremljen takođe u PBS. Uzorku plazme, odnosno standardu (60 μL) se dodaje 300 μL R1 i nakon inkubacije od 60s očitava se prva apsorbancija uzorka. Posle dodavanja kalijum jodida reakcionoj smeši i inkubacionog intervala od 180s, očitava se apsorbancija ponovo na talasnoj dužini 340 nm. Koncentracija AOPP se izračunava iz standardne krive ili pomoću jednačine prave, a izražava se u jedinicama $\mu\text{mol/L}$ ekvivalenta Hloramina T.

3.3.3.3. Određivanje nivoa superoksid anjon radikala (O_2^-) u plazmi

Metoda za određivanje nivoa O_2^- zasniva se na činjenici da O_2^- redukuje nitro grupu aromatičnog jedinjenja nitrobluetetrazolijuma [NBT, 2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difenilen)-ditetrazolijum hlorid]. Metodu su prvi opisali Auclair i Voisin (Auclair C, 1985). Redukcija NBT-a se odvija u dva stupnja, nepotpuna redukcija do monoformazana i potpuna redukcija do diformazana. NBT je jedinjenje koje je rastvorljivo u vodi, međutim redukcijom do diformazana on postaje nerastvorljiv. Zbog toga se u reakcionu smešu dodaje želatin čije je uloga da održava diformazan u rastvorenom obliku. U vodenim rastvorima, u reakcijama u kojima se stvara O_2^- , NBT se nepotpuno redukuje do monoformazana. Pojačana redukcija NBT-a pri višim pH vrednostima u stvari predstavlja posledicu inhibicije reakcije spontane dismutacije kiseonika, koje je kompetentna reakciji redukcije NBT-a. Uvođenje azota pod pritiskom 1 h pre određivanja u NBT reagens smanjuje pritisak kiseonika i povećava redukciju NBT-a. Promena boje žutog NBT-a u plavi monoformazan, meri se spektrofotometrijski i predstavlja nivo stvaranja O_2^- . Nivo O_2^- je određivan na automatskom analizatoru ILab 300+, nakon optimizacije originalne metode u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Reagensi

Fosfatni pufer: 0,05 mol/L, pH 8,6 uz dodavanje EDTA u koncentraciji 0,1 mmol/L

Radni reagens : 1 mmol/L NBT-a rastvoriti u sveže napravljenom fosfatnom puferu uz dodatak 0,1 mg/mL želatina. U pripremljeni reagens uvoditi 1 h azot pod pritiskom, neposredno pre analize.

Tabela 3. Postupak za određivanje koncentracije superoksidnog anjona

Radni reagens	0,2 mL
Plazma	0,02 mL

Pomešati i pratiti povećanje apsorbance na 550 nm. Meriti promenu apsorbance na svakih 15 s u toku jednog minuta. Očitati $\Delta A/\Delta t$. Brzina generisanja superoksidnog anjona se izražava preko brzine stvaranja redukovano NBT-a. Brzina redukovanja NBT-a se određuje kinetičkim postupkom, a izračunava se metodom molarnog apsorpcionog koeficijenta.

Krajnji izraz za izračunavanje glasi: **Red NBT, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L} = \Delta A / \text{min} \times 1466$**

3.3.4. Određivanje parametara antioksidativne zaštite

3.3.4.1. *Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaza (SOD) u plazmi*

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

automatskom analizatoru ILab 300+, nakon optimizacije originalne metode u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Reagensi

Karbonatni pufer, 0,05 mmol/L, pH 10,2 , kome je dodat 1 mmol/L EDTA

Hlorovodonična kiselina, 15 mmol/L

Osnovni rastvor adrenalina, 10 mmol/L, rastvoren u 15 mmol/L HCl.

Tabela 4. Postupak za određivanje aktivnosti enzima SOD

	Kontrola	Analiza
Plazma	-	0,010mL
Pufer	0,700mL	0,690mL
Adrenalin	0,050mL	0,050mL

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

Izračunavanje:

Relativna jedinica aktivnosti SOD definisana je kao ona aktivnost koja dovodi do 50 % inhibicije autooksidacije adrenalina pod određenim uslovima. Izabrana je ona koncentracija adrenalina koja će u kontroli dati promenu apsorbance u minuti od 0,025. Pri tome se polazi od koncentracije adrenalina od 10 mmol/L, a zatim se on razblažuje sve dok se ne postigne $\Delta A/\text{min}$ od 0,025. Izabrana je promena apsorbance od 0,025 u minuti, jer je utvrđeno da SOD tada postiže najviši procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Pod uslovima u kojima je bila izvođena reakcija bila je potrebna koncentracija adrenalina od 5 mmol/L da bi se postigla odgovarajuća promena apsorbance. Obzirom na definiciju relativne jedinice aktivnosti enzima SOD, jedinična aktivnost bi dovela do 50%-nog smanjenja apsorbance odnosno $\Delta A/\text{min}$ bi u takvom uzorku bila 0,0125.

Aktivnost SOD-e u relativnim jedinicama se izračunava preko sledeće proporcije:

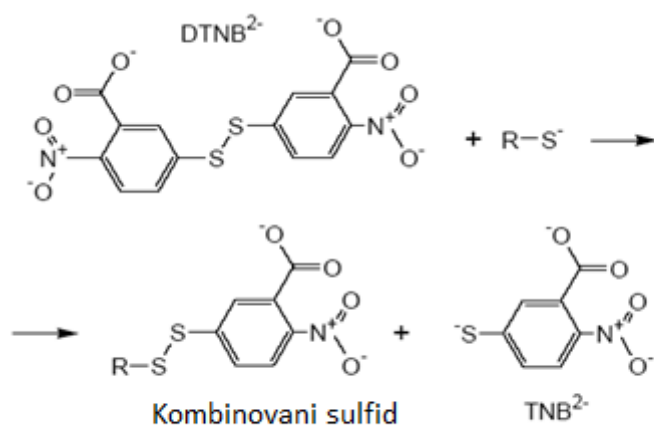
$$0,0125 : 1U = [0,025 - (\Delta A_{\text{analize/min}})] : X$$

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

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

3.3.4.2. Određivanje ukupnog sadržaja sulfhidrilnih (-SH) grupa

Ukupni sadržaj sulfhidrilnih grupa u plazmi određivan je Ellman-ovom metodom (Ellman E, 1959). Princip metode zasniva se na činjenici da 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojeva kiselina (DTNB) u baznoj sredini reaguje sa alifatičnim tiolima i daje obojeni p-nitrofenol. Jedan mol p-nitrofenola se stvara u reakciji jednog mola tiola. Nastali anjon je u baznoj sredini (pH 9) žuto obojen i boja nastalog jedinjenja meri se spektrofotometrijski na 412 nm. Ukupni sadržaj SH grupa je određivan na automatskom analizatoru ILab 300+, nakon optimizacije originalne metode u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.



Slika 7. Redukcija Ellman-ovog reagensa slobodnim sulfhidrilnim grupama.

Reagensi

Fosfatni pufer: 0,2 mol/L K_2HPO_4 , 2 mmol/L EDTA, pH 9,0

DTNB reagens, 10 mmol/L, rastvoren u 50 mmol/L fosfatnog pufera, pH 7,0

Tabela 5. Postupak za određivanje koncentracije sulfhidrilnih grupa

	Slepa proba	Analiza
Pufer	0,95mL	0,90mL
Plazma	-	0,05mL
DTNB reagens	0,02mL	0,02mL

Smeša se inkubira 25 minuta na 25°C, u mraku, a očitava apsorbancu na 412 nm, prema slepoj probi. Koncentracija ukupnog sadržaja SH grupa u plazmi izračunava se preko molarog apsorpcionog koeficijenta p-nitrofenola na 412 nm, koji za date uslove iznosi $13600 L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$.

$$SH \text{ grupe, mmol/L} = \frac{A_A}{\varepsilon} \times \frac{V_{uk}}{V_{uz}} \times 1000$$

$$\varepsilon = 13\,600 L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$$

Vuk - ukupna zapremina (0,97 mL)

Vuz - zapremina uzorka (0,05 mL)

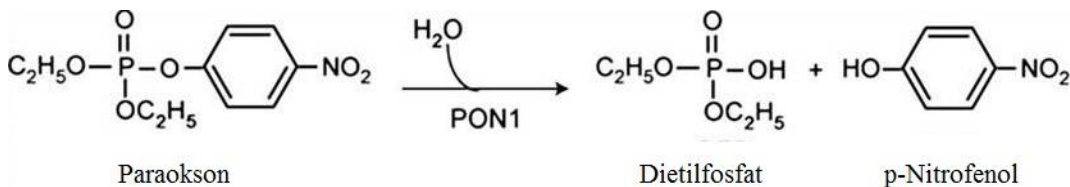
3.3.4.3. *Određivanje aktivnosti enzima paraoksonaza 1 (PON 1)*

Aktivnost enzima paraoksonaza je određivana po metodi Richter-a i Furlong-a (Richter R, 1999). S obzirom da priznat biološki supstrat enzima PON1 još uvek nije utvrđen, njegova aktivnost se određuje preko brzine razgradnje veštačkih supstrata: paraoksone (paraoksonazna, POazna aktivnost) i diazoksone (diazoksonazna, DZOazna aktivnost).

Određivanje aktivnosti paraoksonaze prema paraoksonu

Određivanje aktivnosti PON 1 prema paraoksonu zasniva se na delovanju enzima iz seruma na supstrat paraokson, pri čemu dolazi do konverzije paraoksone do p-nitrofenola. Brzina reakcije se prati kinetički na 405 nm, što je maksimum apsorbance

p-nitrofenoksidnog anjona u koji prelazi p-nitrofenol u baznoj reakcionoj sredini. POazna aktivnost je određivana na automatskom analizatoru ILab 300+, nakon optimizacije originalne metode u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.



Slika 8. Reakcija koju katalizuje paraoksonaza sa paraoksonom kao supstratom

Reagensi

Radni pufer – 116 g NaCl-a se rastvori u 800 mL destilovane vode koja već sadrži 100 mL 1 mol/L TRIS-HCl pufera, pH 8,5 i 2 mL 1mol/L rastvora CaCl₂. Rastvor se dopuni destilovanom vodom do 1000 mL. Čuva se na sobnoj temperaturi.

Diluent pufer – U 800 mL destilovane vode, doda se 10 mL 1 mol/L TRIS-HCl pufera, pH 8,5 i 2 mL 1 mol/L rastvora CaCl₂ i dopuni se vodom do 1000 mL. Čuva se na sobnoj temperaturi.

Zasićen rastvor NaOH – rastvor NaOH, minimalne koncentracije 2 mol/L. Koristi se za dekontaminaciju korišćenog posuđa i razgradnju preostalog paraoksona i diazoksona pre bacanja u slivnik.

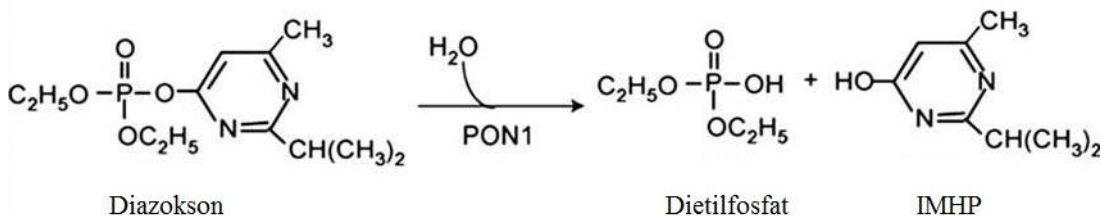
Paraokson supstrat, 1,2 mmol/L – 12,9 μL paraoksona se rastvori u 50 mL radnog pufera u normalnom sudu i dobro promeša.

Postupak za određivanje paraoksonazne aktivnosti

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

Određivanje aktivnosti paraoksonaze prema diazoksonu

Određivanje diazoksonazne aktivnosti zasniva se na delovanju PON1 enzima iz seruma na supstrat diazokson (diazinon-O-analog), pri čemu se diazokson konvertuje do 2-izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidina (IMHP). Brzina ove promene se prati kinetički na maksimalnoj talasnoj dužini apsorbanace IMHP-a, 270 nm. Promena aktivnosti se prati u toku tri minuta i računa se promena apsorbanace po minuti. Spektrofotometar je povezan sa kompjuterskim softverom koji selektuje samo linearni deo reakcije i samo njega koristi za računanje $\Delta A/\text{min}$.



Slika 9. Reakcija koju katalizuje enzim paraoksonaza sa diazoksonom kao supstratom

Reagensi

Radni pufer – 116 g NaCl-a se rastvori u 800 mL destilovane vode koja već sadrži 100 mL 1 mol/L TRIS-HCl pufera, pH 8,5 i 2 mL 1 mol/L rastvora CaCl₂. Rastvor se dopuni destilovanom vodom do 1000 mL. Čuva se na sobnoj temperaturi.

Diluent pufer – U 800 mL destilovane vode, doda se 10 mL 1 mol/L TRIS-HCl pufera, pH 8,5 i 2 mL 1 mol/L rastvora CaCl₂ i dopuni se vodom do 1000 mL. Čuva se na sobnoj temperaturi.

Zasićen rastvor NaOH – rastvor NaOH, minimalne koncentracije 2 mol/L. Koristi se za dekontaminaciju korišćenog posuđa i razgradnju preostalog paraoksona i diazoksona pre bacanja u slivnik.

Diazokson supstrat, 1,0 mmol/L – 2,8 μL diazoksona se rastvori u 10 mL radnog pufera i dobro promeša.

Postupak za određivanje diazoksonazne aktivnosti

Za određivanje DZOazne aktivnosti serum se razblažuje diluent puferom u odnosu 1:20. U epruvetu se odmeri 50 μ L razblaženog seruma i doda se 500 μ L rastvora diazoksona, meša se na vorteks mešalici, sipa u kivetu ili aspirira u slučaju protočne kivete i aktivira početak merenja na spektrofotometru. U ovoj studiji je korišćen UV/VIS spektrofotometar (Jasco, Jasco Corporation, Japan) koji je povezan sa kompjuterom, tako da je promena apsorbance očitavana softverski. Diazoksonazna aktivnost se određuje na 23°C, na pH 8,5 uz upotrebu 1 mmol/L TRIS-HCL pufera i u prisustvu rastvora NaCl-a. DZOazna aktivnost se izražava kao μ mol stvorenog IMHP/min/L ili kao IU/L.

Krajnja formula za izračunavanje aktivnosti PON1 prema paraoksonu glasi:

$$\Delta A/\text{min} \times 73\,333 = \mu\text{mol IMHP po minuti u litru rastvora} = \text{IU/L PON1 aktivnosti}$$

Upoređivanjem enzimske aktivnosti PON1 prema ova dva supstrata, može se odrediti fenotip PON1 na položaju 192. Naime, u koordinatni sistem se za svaku osobu unesu na x-osu paraoksonazne aktivnosti a na y-osu diazoksonazne aktivnosti. PON1_{Q192R} fenotip se određuje pregledanjem položaja tačaka na grafiku koji predstavlja presek ove dve aktivnosti (Jarvik GP, 2000, Richter RJ, 2004) i određivanjem odnosa DZOazne/POazne aktivnosti. Na osnovu izračunatog odnosa enzimskih aktivnosti osobe se mogu podeliti u tri fenotipa: PON1_{Q192}, PON1_{Q192R} i PON1_{R192} fenotip.

3.3.5. Određivanje parametara oksidativnog statusa

3.3.5.1. Određivanje totalnog oksidativnog statusa u serumu (TOS)

Kao glavne komponente TOS u serumu su prisutni H₂O₂ i lipidni hidroperoksidi. Ukupni oksidansi prisutni u uzorku oksiduju fero jon-orto-dianizidni kompleks u feri jon. Reakcija oksidacije olakšana je molekulom glicerola koji je prisutan u reakcionom medijumu. Nastali feri jon zatim gradi obojeni kompleks sa ksilenol-oranžom u kiseloj sredini. Intezitet boje se meri spektrofotometrijski ($\lambda=560$ nm) i proporcionalan je ukupnom sadržaju oksidacionih molekula u uzorku. Kao standard se koristi vodeni rastvor vodonik-peroksida opsega koncentracije 10-200 μ mol/L, što odgovara

linearnosti metode i očekivanim koncentracijama u biološkom materijalu (Erel O, 2005). TOS je određivan na automatskom analizatoru ILab 300+, nakon optimizacije originalne metode u laboratoriji Instituta za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Reagensi

Reagens 1-TOS 1: Pripremljen je rastvaranjem ksilenol- oranža (114mg) i NaCl (8,18g) u 900mL rastvora H₂SO₄ (c=25mM). U tako dobijeni rastvor dodato je 100 mL glicerola. pH vrednost ovog reagensa treba podesiti na 1.75.

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

Tabela 6. Postupak određivanja TOS

	Analiza	Standard	Slepa proba
TOS 1	450μL	450μL	450μL
TOS 2	22μL	22μL	-
Serum	70μL	-	-
Dejonizovana Voda	-	-	70μL
Standard	-	70μL	-

Sadržaj se promeša i inkubira 3 minuta, nakon čega se apsorbance čitaju pri talasnoj dužini od 560 nm.

3.3.5.2. *Određivanje totalnog antioksidativnog statusa u serumu (TAS)*

Za određivanje totalnog antioksidativnog statusa korišćena je metoda koju je formulisao Erel, uz određene modifikacije (Erel O, 2004). Totalni antioksidativni status određen je kolorimetrijskim testom uz upotrebu stabilnog of 2,2'-azinobis-(3-etilbenziazolin)-6- sulfonska kiselina katjona (ABTS⁺) kao hromogena. Sam rastvor ABTS-a je bezbojan. Oksidacijom do ABTS⁺ katjona, pomoću vodonik-peroksida u kiselom medijumu (acetatni pufer; pH=3,6) rastvor dobija karakterističnu smaragdnu boju. Kada se obojeni ABTS⁺ jon pomeša sa nekom supstancom koja može da se

oksiduje (antioksidans), redukuje se do bezbojnog ABTS-a što se manifestuje promenom boje odnosno obezbojavanjem ispitivanog rastvora. Intenzitet obezbojavanja srazmeran je koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidanasa u uzorku. Koncentracija prisutnih antioksidanasa u uzorku određuje se upotrebom standardne krive. Najčešće upotrebljavani standard za određivanje TAS je Trolox, hidrosolubilni ekvivalent vitamina E. Dobijeni rezultati izražavaju se u *mmol Trolox ekvivalenta po L*. Pri konstruisanju standardne krive korišćeni su rastvori Troloksa rastućih koncentracija i to: 0,125 mmol/L; 0,25 mmol/L; 0,5 mmol/L; 0,75 mmol/L; 1 mmol/L; 1,5 mmol/L; 2 mmol/L, što je ujedno i gornja granica linearnosti metode.

TAS je određivan na automatskom analizatoru ILab 300+, nakon optimizacije originalne metode u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Reagensi

Reagens 1: Acetatni pufer (pH = 5,8; 0,4 mol/L). Priprema se mešanjem 940 mL CH_3COONa (0,4mol/L) i 60 mL CH_3COOH (0,4mol/L) za 1000 mL rastvora (prvo se dodaje bazna komponenta, a potom kisela dok se ne postigne potrebna pH vrednost). Rastvor pufera je stabilan šest meseci na temperaturi od +4°C.

Reagens 2: Rastvor ABTS-a [2,2-azobis (3-etilbenzotiazolidin-6-sulfonat)]. Priprema se mešanjem 30 mL acetatnog pufera (pH=3,6; 30 mmol/L), 70 mL rastvora H_2O_2 (2 mmol/L). Potom se 0,549 g čvrstog ABTS-a rastvori u 100 mL prethodno pripremljenog rastvora (finalna koncentracija rastvora ABTS-a je 10 mmol/L). Inkubira se 1h na sobnoj temperaturi, dok rastvor ne poprimi karakterističnu intenzivnu plavo-zelenu boju ABTS^+ jona. Ovako pripremljen reagens je stabilan šest meseci na +4°C.

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

Tabela 7. Postupak određivanja TAS

	Analiza	Standardi	Slepa proba
Serum	12,5µL	-	-
Reagens 1	200µL	200µL	200µL
Reagens 2	37,5µL	37,5µL	37,5µL
Rastvor standarda	-	12,5µL	-
Dejonizovana voda	-	-	12,5µL

Apsorbance ispitivanih rastvora očitavane na talasnoj dužini od 660 nm nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi.

3.3.5.3. *Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB)*

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

Reagensi

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

TMB katjon: Za pripremu TMB katjona 1 mL TMB/DMSO (TMB I) se dodaje u 50 mL acetatnog pufera (0,05M, pH 4,5), zatim se dodaje 175 µL sveže

pripremljenog hloramina T (100 mmolxL^{-1}), dobro se promeša i inkubira 1 sat na $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, na tamnom mestu uz stalno mešanje. Nakon inkubacije u 50 mL TMB katjona doda se 25 U enzima peroksidaze. Dobijeni rastvor se pažljivo promeša, podeli u zapremine od 1,1 mL i čuva na $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

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

Standardni rastvor: Standardni rastvori se pripremaju mešanjem različitih odnosa (0-100%) $1 \text{ mmolxL}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ sa 6 mmolxL^{-1} mokraćnom kiselinom (rastvorenom u 10 mM NaOH). Priprema standardnih rastvora prikazana je u tabeli 1.

Tabela 8. Priprema standardnih rastvora za PAB test mešanjem mokraćne kiseline i H_2O_2 u različitim odnosima

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

Postupak određivanja PAB

10 μL svakog uzorka, standardnog rastvora i slepe probe (destilovana voda) se pomeša sa 180 μL radnog rastvora u svaki od 96 bazena ploče, koja se onda inkubira 12 minuta na $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, na tamnom mestu. Nakon inkubacije reakcija se prekida dodatkom 40 μL 2 mol/L hlorovodonične kiseline, pri čemu se dobijena plava boja prevodi u žutu. Apsorbanca se odmah očitava na ELISA čitaču na 450 nm. Na osnovu apsorbanca koje se dobijaju u standardnim rastvorima konstruiše se kalibraciona kriva iz koje se očitavaju koncentracije uzoraka. Vrednosti PAB-a se izražavaju u arbitrarnim

jedinicama-HKU (hidrogen-peroksid komplementarne jedinice), koje predstavljaju procenat H_2O_2 u standardnim rastvorima pomnožen sa 6. Zahvaljujući ovoj multiplikaciji, moguće je očitavanje većeg raspona dobijenih vrednosti.

3.3.6. Određivanje sekretornog IgA u salivi

Koncentracija sIgA je određena enzimsko imunološkom metodom-ELISA (eng. enzyme-linked immunosorbent assay) testom (Miletić, 1997).

Reagensi

0,1 mol/L bikarbonatnog pufera, pH9,5

Kozje anti-humano IgA Antitelo (Sigma Chemical, St. Louis, MO)

TTBS pufer

3% rastvor želatina u TTBS-u

Ig-G anti – IgA antitelo obeleženo peroksidazom (Sigma Chemical, St. Louis, MO)

σ -fenilen diamin

3M HCl

Standard sekretornog IgA

Kozje anti-humano antitelo (Sigma Chemical, St. Louis, MO) je rastvoreno u 0,1M bikarbonatnom puferu, pH 9,5 i adsorbovano na polistrensku ploču sa 96 bazena (NUNC, Denmark) i ostavljeno preko noći na $4^{\circ}C$. Nakon ispiranja sa TTBS puferom, u bazene se dodaje po 200 μ L 3% želatina u TTBS koji blokira višak slobodnih mesta za vezivanje na ploči. Ploča se potom inkubira 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon ispiranja, po 100 μ L standardnih rastvora sIgA i uzoraka se dodaju u bazene ploče. Kao standard je korišćen sekretorni IgA izolovan iz humanog kolostruma (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Ploča se zatim inkubira na sobnoj temperaturi u toku jednog sata. Nakon ispiranja sa TTBS puferom bazeni se ispune sa 100 μ L anti-IgA antitela obeleženog enzimom peroksidaza (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Nakon inkubacije od jednog sata, bazeni se dobro isperu, i ispune sa 100 μ L rastvora supstrata σ -fenilen diamin u 0.05 M fosfo-citratnom puferu uz dodatak 0,03% H_2O_2 Nakon inkubacije od

pola sata, na tamnom mestu, reakcija se prekida dodatkom 50 μ L 2 mol/L hlorovodonične kiseline, pri čemu se dobijena plava boja prevodi u žutu. Apsorbanca se odmah očitava na ELISA čitaču na 490 nm (Victor² Multilabel Counter, Wallac).

Svi uzorci su uneti u triplikatu i prosečna vrednost je uzeta kako reprezentativna. Na osnovu apsorbanca koje se dobijaju u standardnim rastvorima regresionom analizom se izračunava jednačina prave na osnovu koje se izračunava koncentracija uzorka. Brzina izlučivanja sIgA u salivi se dobija množenjem apsolutne koncentracije sIgA(mg/mL) i salivarnog protoka (mL/min).

Koncentracija proteina u salivi određena je BCA testom uz albumin (Sigma Chemical, St. Louis, MO) kao standard (Miletic, 1997).

3.3.7. Hemijska analiza tečne surutke i aromatizovanog napitka na bazi surutke

Količina suve materija je određena gravimetrijski, sušenjem na 105°C do konstantne mase. Za određivanje šećera korišćena je metoda po Luff-Schoorl-u. Sadržaj proteina u uzorcima određen je metodom po Kjeldahl-u. Određivanje sadržaja lipida u uzorcima izvršeno je standardnom metodom po Soxhlet-u (AOAC). Procenat pepela se dobija žarenjem uzorka do konstantne mase na 850°C i merenjem mase zaostalog pepela. Energetska vrednost 100g uzorka je dobijena računskim putem na osnovu određenog sadržaja šećera, proteina i masti i energije koja se dobija sagorevanjem 1g određenog nutrijenta. Sadržaj mineralnih materija - kalcijuma (Ca), natrijuma (Na), kalijuma (K), magnezijuma (Mg) i cinka (Zn) određen je plamenom atomskom apsorpcionom spektrofotometrijom na aparatu Varian SpectrAA-10. Predhodno su uzroci mineralizovani suvim spaljivanjem.

3.4. Statistička obrada podataka

Normalnost distribucije podataka je proveravana upotrebom Kolmogorov-Smirnov testa. Kontinuirani podaci su prikazani kao srednja vrednost i standardna greška, ukoliko je raspodela ispitivanih podataka sledila normalni tok. Kod parametara čija distribucija nije sledila normalni tok, proveravana je distribucija logaritmovanih vrednosti i rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i 95 % interval pouzdanosti.

Kontinuirane varijable koje slede normalnu raspodelu, kao i kontinuirane varijable koje posle logaritmovanja slede normalnu raspodelu, poređene su Studentovim t-testom. Varijable koje ne prate normalnu raspodelu poređene su Wilkison neparametarskim testom

Analiza kovarijanse (ANCOVA) je primenjena za utvrđivanje statistički značajne razlike između grupa u cilju eliminacije uticaja promenljive kovarijanse na ispitivane zavisne parametre.

Za analiziranje više grupa parametarskih podataka korišćena je jednofaktorska i dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa ponavljanjem, sa „Bonferoni“ post hoc testom".

Razlike između kategoričkih podataka su testirane su upotrebom χ^2 testa.

Za ispitivanje korelacije između različitih parametara koji su određivani u studiji, korišćena je Spearmanova neparametarska korelaciona analiza.

Minimalni uslov za postojanje statistički značajne razlike je p (nivo značajnosti) manji ili jednak 0,05.

Statistička obrada podataka izvedena je korišćenjem računarskih programa PASW Statistics ver. 18.0 i Medcalc (MedCalc ver. 11.4 Software, Belgium).

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. Uticaj dugotrajnog redovnog treniranja na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

U ovom delu istraživanju učestvovalo je 40 fudbalera i 28 zdravih ispitanika koji nemaju redovnu fizičku aktivnost visokog intenziteta. Uzeti su podaci o starosti, godinama treniranja, izmerena im je visina, težina, procent masti, izračunat indeks telesne mase. Antropometrijske karakteristike fudbalera i kontrolne grupe su prikazane u tabeli 9.

Table 9. Antropometrijske karakteristike ispitanika

	Fudbaleri	Kontrolna grupa	P
Starost (godine)	17,7±0,67	14,8±0,25	<0,001
Visina (cm)	179±6,4	166±6,7	<0,001
Telesna masa (kg)	71,6±7,61	60,2±9,73	<0,001
Masti (%)	9,6±3,24	15,0±1,51	<0,001
ITM (kg/m ²)	22,3±1,62	21,8±3,17	0,327
Godine treniranja	10,1±1,21	–	

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.D.

S obzirom na razliku u godinama, fudbaleri su bili viši i teži u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, procenat masti je bio značajno manji kod sportista. Ipak, nije bilo statistički značajne razlike u ITM između sportista i kontrolne grupe.

Lipidni profil i hematološki parametri fudbalera i kontrolne grupe su prikazani u tabelama 10 i 11. Analiza kovarijanse, uz korekciju parametara u odnosu na godine, je pokazala da nema statistički značajne razlike u koncentraciji triglicerida, ukupnog, LDL i HDL holesterola između fudbalera i kontrolne grupe. Pored toga, nije uočena značajna razlika u hematološkim parametrima između fudbalera i kontrolne grupe.

Tabela 10. Lipidni profil fudbalera i kontrolne grupe

	Fudbaleri	Kontrolna grupa	P
HOLuk, (mmol/L)	4,52±0,32	4,21±0,26	0,567
HDL-H (mmol/L)	1,24±0,12	1,38±0,09	0,481
LDL-H (mmol/L)	2,51±0,29	2,72±0,21	0,667
TG (mmol/L)	0,86±0,14	0,73±0,12	0,596

Rezultati su prikazani kao korigovane srednje vrednosti±SEM. Nije uočena razlika između grupa (Analiza kovarijanse).

Tabela 11. Osnovni hematološki parametri fudbalera i kontrolne grupe

	Fudbaleri	Kontrolna grupa	P
Leukociti (x 10 ⁹ /L)	6,1±0,44	6,0±0,22	0,564
Eritrociti (x10 ¹² /L)	5,4±0,17	5,1±0,13	0,217
Hb (g/L)	148±7,1	143±5,7	0,687
Hct (L/L)	0,471±0,023	0,422±0,018	0,166
MCV (fL)	84±1,3	86±1,1	0,352
MCH (pg)	27±0,5	29±0,4	0,101
MCHC (g/L)	335±14,5	318±11,4	0,496
Trombociti (x 10 ⁹ /L)	269±20,6	211±16,5	0,106

Rezultati su prikazani kao korigovane srednje vrednosti±SEM. Nije uočena razlika između grupa (Analiza kovarijanse)

Zbog razlike u godinama, parametre oksidativnostresnog statusa smo poredili primenom analize kovarijanse, nakon korekcije u odnosu na godine. Rezultati su prikazani kao korigovane srednje vrednosti \pm SEM.

Fudbaleri su imali značajno više vrednosti TBKRS u odnosu na kontrolnu grupu. Nije bilo statistički značajne razlike u nivou AOPP, mada su vrednosti ovog parametra bile više u grupi fudbalera. Aktivnost SOD u plazmi i ukupan sadržaj SH grupa je značajno viši kod sportista u odnosu na kontrolnu grupu, dok razlika u aktivnosti PON1 prema paraoksonu i diazoksonu nije bila statistički značajna. Eksperimentalno dobijeni podaci i statistički značajne razlike su prikazani u tabeli 12.

Tabela 12. Parametri oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite i aktivnost enzima PON1 fudbalera i kontrolne grupe

	Fudbaleri	Kontrolna grupa	p
TBKRS ($\mu\text{mol/L}$)	1,2 \pm 0,05	0,8 \pm 0,11	<0,05
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	24,8 \pm 5,65	16,9 \pm 4,88	0,438
SH groupe (mmol/L)	0,605 \pm 0,027	0,440 \pm 0,023	<0,01
SOD (U/L)	129 \pm 9,6	56 \pm 19,3	<0,05
POazna aktivnost (U/L)	403 \pm 123,3	372 \pm 96,4	0,881
DZOazna aktivnost (U/L)	9095 \pm 1557,8	8730 \pm 1190,1	0,890

Rezultati su prikazani kao korigovane srednje vrednosti \pm SEM. Parametri su poređeni testom Analiza kovarijanse.

4.2. Uticaj treniranja i suplementacije astaksantinom na parametre oksidativnog stresa i antoksidativne zaštite

U okviru ovog dela istraživanja, ispitivan je uticaj redovnih treninga i suplementacije Asx na bazalne vrednosti pojedinačnih parametara oksidativnog stresa i antoksidativne zaštite, kao i parametara oksidativnog statusa mladih elitnih fudbalera. Pored toga, urađena je i kompletna biohemijska analiza i krvna slika na početku, posle 45 i posle 90 dana redovnih treninga i suplementacije.

4.2.1. Opšti podaci o sportistima

Kao što je napred navedeno, ovim istraživanjem je obuhvaćeno 40 fudbalera. Uzeti su podaci o starosti, godinama treniranja, izmerena im je visina, težina, procent masti, izračunat indeks telesne mase i određena maksimalna potrošnja kiseonika (VO_{2max}). Antropometrijske karakteristike fudbalera su prikazane u tabeli 13.

Tabela 13. Antropometrijske karakteristike fudbalera

	Astaksantin	Placebo	P
Starost (godine)	17.9±0.16	17.6±0.14	0,289
Visina (cm)	178±1.4	180±1.4	0,255
Telesna masa (kg)	70.9±1.72	72.3±1.79	0,582
ITM (kg/m ²)	22.4±0.33	22.2±0.41	0,812
Masti (%)	9.4±0.74	9.7±0.81	0,773
VO _{2 max} (ml/min/kg)	55.5±1.21	52.9±0.74	0,780
Godine treniranja	10.2±0.32	9.9±0.21	0,443

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti±SEM. Nije uočena razlika između grupa (Studentov t test)

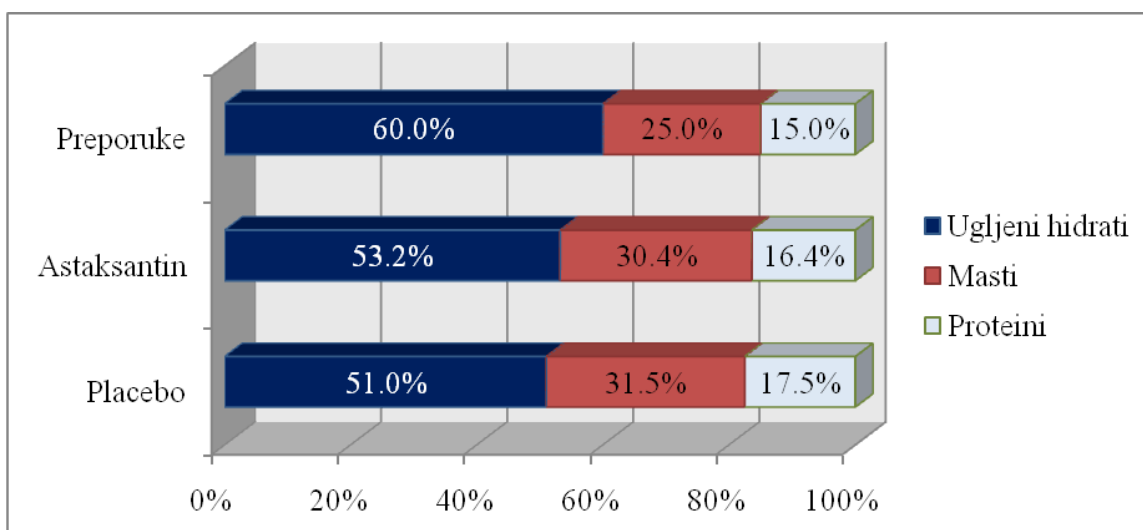
Ispitivana grupa mladih fudbalera je bila homogena, s obzirom da nije pokazana značajna razlika između suplementirane i placebo grupe u pogledu antropometrijskih karakteristika primenom Studentovog t-testa.

Rezultati analize dnevnika ishrane koji su fudbaleri vodili u periodu od 4 dana na početku studije, prikazani su u tabelama 14 i 15 i slici 12.

Tabela 14. Prosečan dnevni unos makro i mikronutrijenata kod fudbalera

	Astaksantin	Placebo	P
Energija (kcal)	3154±247	2932±147	0,445
Proteini (g)	124±8.7	125±6.3	0,916
Ugljeni hidrati (g)	412±33	366±23	0,258
Monosaharidi (g)	109±12	123±18	0,525
Vlakna (g)	13.2±1.4	12.6±1.5	0,776
Masti (g)	104±9	101±7	0,791
Zasićene masti (g)	33.2±3.5	29.9±3.2	0,485
Holesterol (mg)	328±23	344±38	0,712

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti±SEM. Nije uočena razlika između grupa (Student t test)



Slika 10. Zastupljenost makronutrijenata u ishrani fudbalera

Tabela 15. Prosečan unos dijetarnih antioksidanasa kod fudbalera

	Astaksantin	Placebo	P
Vitamin A (IU)	2312± 442	2120 ± 389	0,775
Vitamin C(mg)	149 ±25	135 ±30	0,438
Vitamin E(mg)	5.4±0.7	6.1±1.5	0,738
Bakar(mg)	2.3 ±0.4	1.92±0.5	0,410
Gvožđe (mg)	14.4 ±0.9	15.1 ±1.6	0,435
Mangan(mg)	4.9 ±0.3	4.0 ±0.9	0,247
Selen(µg)	187±15	164 ±8	0,353
Zink(mg)	13.0± 1.4	13.5±1.8	0,386

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti±SEM. Nije uočena razlika između grupa (Student T test)

Nije bilo statistički značajne razlike u unosu makronutrijenata i mikronutrijenata između suplementirane i placebo grupe. Prosečan unos ugljenih hidrata je nedovoljan, jer su oni zastupljeni sa manje od 55 % - 60 % energetske unosa, dok je unos masti na gornjoj granici unosa koji po preporukama treba da bude manji od 30 %. Takođe, unos zasićenih masnih kiselina i holesterola je veći od preporučenog. Nutritivna analiza je pokazala da je unos vitamin A i E značajno niži od preporučenog dnevnog unosa (DRI za vitamin A-3000 IU; DRI za vitamin E-15 mg).

4.2.2. Osnovni biohemijski i hematološki parametri

Osnovni biohemijski hematološki parametri fudbalera na početku studije, posle 45 dana i posle 90 dana redovnih treninga i suplementacije prikazani su u tabelama 16 i 17.

Tabela 16. Krvna slika na pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi

	0 dan	45 dan	90 dan	T S TxS
Leukociti (x 10*9/L)				
Astaksantin	6.3±0.34	5.9±0.3	6.0±0.32	<0.05
Placebo	6.0±0.28	5.7±0.22	6.7±0.44 [#]	<0.05 0,942
Eritrociti (x10*12/L)				
Astaksantin	5.5±0.11	5.3±0.08*	5.4±0.11	<0.05
Placebo	5.4±0.10	5.2±0.07*	5.3±0.05	0,626 0,910
Hb (g/L)				
Astaksantin	156±2.6	151±2.0*	153±3.4	<0.01
Placebo	157±3.9	151±2.0*	152±2.1	0,937 0,891
Hct (L/L)				
Astaksantin	0.486±0.007	0.461±0.006**	0.463±0.005*	<0.01
Placebo	0.482±0.010	0.457±0.006**	0.462±0.005	0,763 0,959
MCV (fL)				
Astaksantin	88.74±1.17	86.88±0.75**	86.25±0.89**	<0.001
Placebo	88.64±0.89	87.58±0.40	86.81±0.73*	0,745 0,729
MCH (pg)				
Astaksantin	28.6±0.38	28.5±0.39	28.4±0.39	0,110
Placebo	28.9±0.31	28.9±0.33	28.5±0.31	0,665 0,331
MCHC (g/L)				
Astaksantin	322±2.2	328±2.1	330±1.6**	<0.01
Placebo	326±2.3	330±3.0	329±2.4	0,621 0,361
Trombociti (x 10*9/L)				
Astaksantin	235±8.0	227±6.8	234±9.0	0,369
Placebo	253±12.7	247±10.6	249±9.5	0,095 0,992

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti \pm SEM. ANOVA: T-glavni uticaj treninga; S-glavni uticaj suplementacije; TxS-uticaj interakcije treninga i suplementacije. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na 0 dan. $p < 0,05$ (#): značajna razlika u odnosu na 45 dan.

Pokazan je značajan uticaj interakcije suplementacije i redovnih treninga ($p < 0,05$) i značajan uticaj redovnih treninga ($p < 0,05$) na broj leukocita. Uočeno je značajno povećanje broja leukocita u placebo grupi, ali ne i u Asx nakon 90 dana redovnih treninga i suplementacije. Broj eritrocita, Hb, Hct i MCV se značajno smanjuje, dok se MCH i broj trombocita nije menjao u toku posmatranog perioda. Nije bio razlike u posmatranim parametrima između suplementirane i placebo grupe.

Tabela 17. Osnovni biohemijski parametri pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi

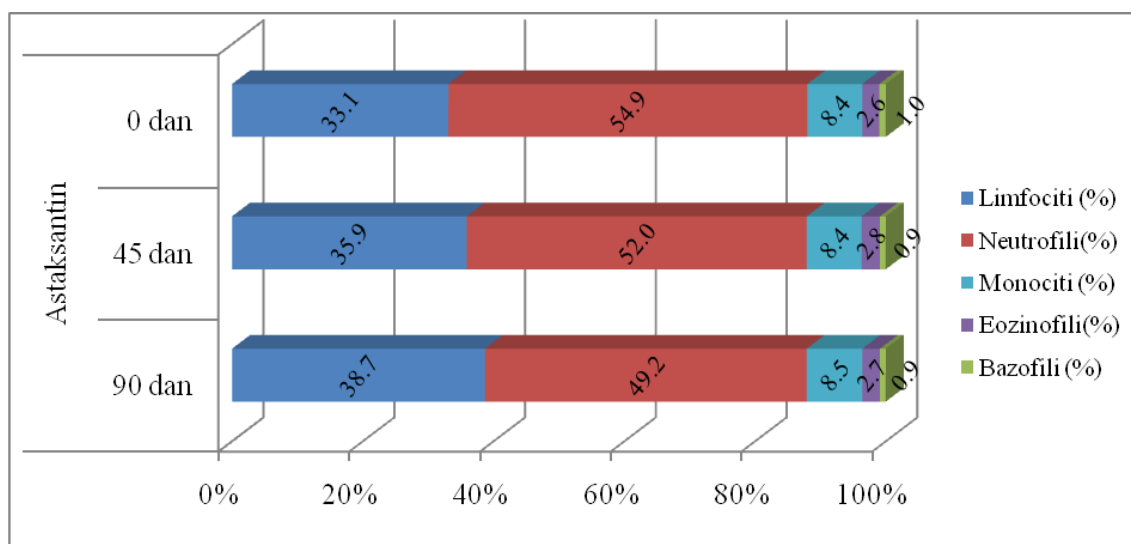
	0 dan	45 dan	90 dan	T S TxS
ALT (U/L) #				
Astaksantin	21(16,8-25,6)	18(15,1-22,6)	18(15,6-21,6)	0,125
Placebo	20(18,6-22,5)	18(16,7-20,1)	19(16,1-22,6)	0,974
				0,844
Bilirubin (μmol/L)				
Astaksantin	10,5 \pm 1,75	16,4 \pm 1,71**	15,7 \pm 2,03**	<0,01
Placebo	12,6 \pm 1,80	16,8 \pm 1,89*	19,6 \pm 2,18*	0,080
				0,546
Kreatinin (μmol/L)				
Astaksantin	130 \pm 2	131 \pm 2	126 \pm 2 [#]	<0,01
Placebo	133 \pm 3	135 \pm 3	131 \pm 3 ^{##}	0,364
				0,898
Glukoza (mmol/L)				
Astaksantin	5,9 \pm 0,12	6,1 \pm 0,13	5,7 \pm 0,09* [#]	<0,01
Placebo	6,1 \pm 0,17	6,0 \pm 1,9	5,6 \pm 0,13 [#]	0,766
				0,438
Ukupni proteini (g/L)				
Astaksantin	75 \pm 0,8	76 \pm 1,4	73 \pm 1,1 [#]	<0,01
Placebo	77 \pm 0,9	75 \pm 1,6	73 \pm 1,2* [#]	0,793
				0,259

Urea (mmol/L)				
Astaksantin	6,4±0,31	6,4±0,33	6,2±0,35	0,715
Placebo	6,6±0,36	6,5±0,38	7,0±0,41	0,396
				0,321
Mokraćna kiselina (µmol/L)				
Astaksantin	324±24,9	334±19,4	306±17,0	<0,05
Placebo	355±16,6	368±23,5	314±13,7* #	0,305
				0,648
Gvožđe (µmol/L)				
Astaksantin	9,8±0,60	10,8±0,79	10,4±0,98	0,970
Placebo	10,8±0,70	9,6±0,92	10,3±0,84	0,925
				0,186
Feritin (µg/L) #				
Astaksantin	50(24,4-102,5)	79(59,9-103,3)	84(63,7-111,8)	<0,05
Placebo	49(32,1-77,8)	63(49,6-80,7)	69(51,7-91,8)	0,572
				0,709
Transferin (g/L)				
Astaksantin	2,63±0,07	2,48±0,07***	2,56±0,06	<0,001
Placebo	2,87±0,09	2,66±0,08*	2,72±0,08	0,071
				0,448
HOLuk (mmol/L)				
Astaksantin	4,28±0,20	4,61±0,22*	4,39±0,24	<0,05
Placebo	4,54±0,23	4,67±0,26*	4,50±0,27	0,661
				0,517
HDL-H (mmol/L)				
Astaksantin	1,27±0,05	1,21±0,05*	1,30±0,05	<0,01
Placebo	1,29±0,07	1,19±0,06	1,31±0,06 [#]	0,952
				0,693
LDL-H (mmol/L)				
Astaksantin	2,63±0,19	2,98±0,20*	2,73±0,20	<0,05
Placebo	2,97±0,24	3,13±0,24	2,91±0,25 [#]	0,451
				0,588
TG (mmol/L)				
Astaksantin	0,84±0,12	0,91±0,08	0,80±0,08	0,111
Placebo	0,95±0,14	0,80±0,09	0,70±0,09	0,833
				0,130

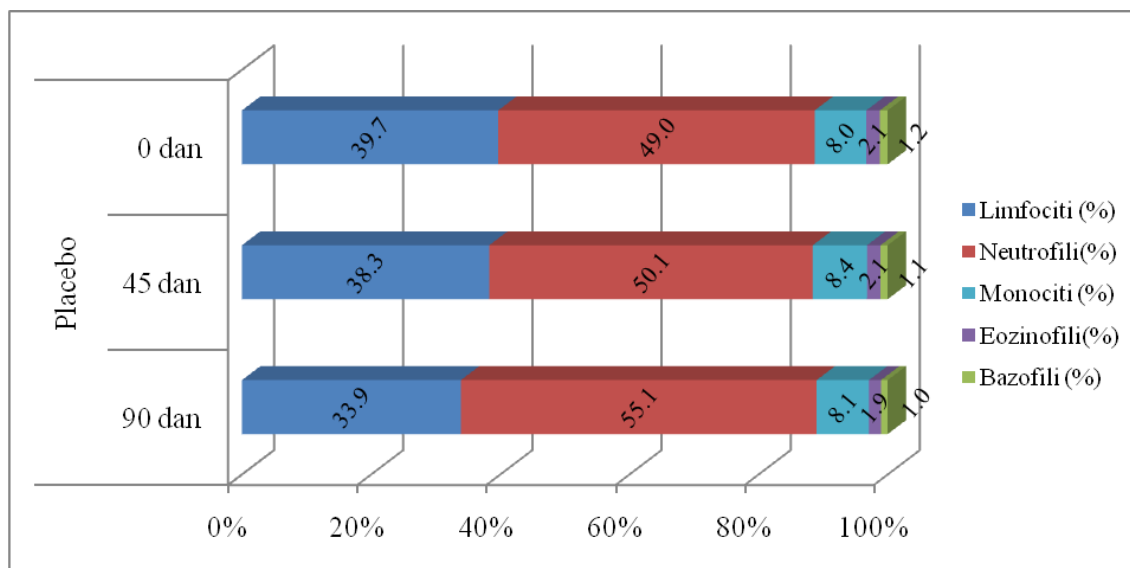
Rezultati su prikazani srednje vrednosti i SEM; geometrijske srednje vrednosti i interval pouzdanosti (#). ANOVA: T-glavni uticaj treninga; S-glavni uticaj suplementacije; TxS-uticaj interakcije treninga i suplementacije. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na 0 dan. $p < 0,05$ (#) i $p < 0,01$ (##) : značajna razlika u odnosu na 45 dan.

Uočeno je statistički značajno povećanje nivoa bilirubina u obe grupe fudbalera kao posledica redovnih treninga ($p < 0,05$). Nivo kreatinina i ukupnih proteina opada u periodu od 90 dana redovnih treninga u obe grupe fudbalera ($p < 0,01$). Koncentracija mokraćne kiseline opada u P grupi tokom 90 dana redovnih treninga. Nivo ALT i uree se ne menjaju u posmatranom periodu.

Iako redovni treninzi u toku 90 dana nisu značajno uticali na nivo gvožđa u obe grupe fudbalera, zabeležena srednja vrednosti nivoa gvožđa je na donjoj granici osega referentnih vrednosti. Uočeno je značajno povećanje nivoa feritina u obe grupe fudbalera tokom posmatranog perioda. Nivo transferina značajno opada posle 45 dana redovnih treninga u odnosu na početak posmatranog perioda. Srednje vrednosti nivoa feritina i transferina su bile u opsegu referentnih vrednosti tokom studije. ANOVA sa ponavljanjem je pokazala značajan uticaj treninga na ukupni, HDL i LDL holesterol ($p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,05$, redom). U obe grupe fudbalera nivo HDL holesterola opada, dok nivo ukupnog i LDL holesterola raste posle 45 dana. Vrednosti ovih parametara se vraćaju na početne vrednosti na kraju posmatranog perioda. Srednje vrednosti parametara lipidnog profila su bile u opsegu referentnih vrednosti.



A)



B)

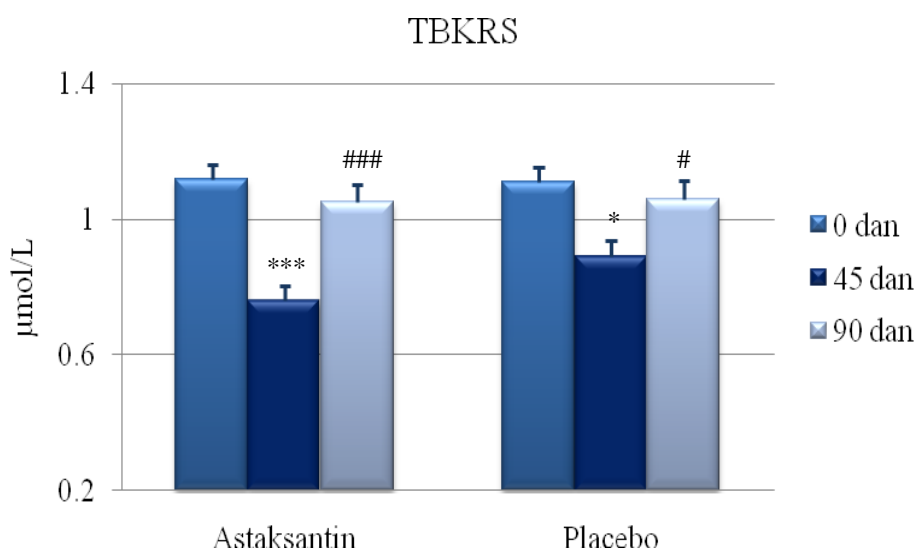
Slika 11. Leukocitarna formula pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx (A) i placebo (B) grupi.

Na slici 13 su prikazane promene u procentu pojedinih frakcija leukocita tokom 90 dana redovnih treninga i suplementacije. ANOVA sa ponavljanjem je pokazala statistički značajan efekat redovnih treninga na broj limfocita i neutrofila kod mladih fudbalera (glavni uticaj treninga, $p < 0,01$). Naime, intenzivni treninzi u toku posmatranog perioda uslovlili su značajno povećanje broja neutrofila ($p < 0,05$) i smanjenje procenta limfocita ($p < 0,01$) u P grupi. Nasuprot tome, promene u broju neutrofila i limfocita u Asx grupi nisu bile statistički značajne.

4.2.3. Parametri oksidativnostresnog statusa

4.2.3.1. Parametri oksidativnog stresa

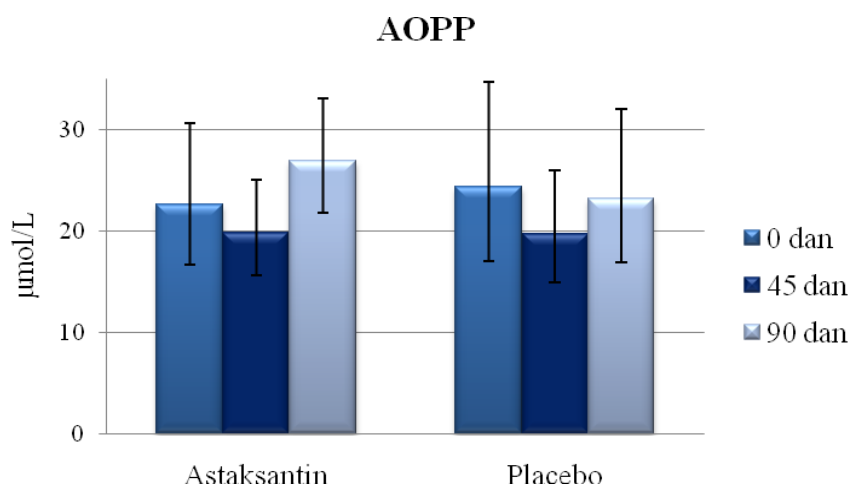
Da bismo procenili nivo oksidativnog stresa i dinamiku njegove promene pod uticajem redovnih treninga, kao i njegovu modulaciju pod uticajem Asx kao antioksidansa, određivali smo koncentraciju TBKRS, AOPP i nivo superoksid anjon radikala u plazmi. TBKRS je krajnji produkt razgranje lipidnih hidroperoksida, tako da predstavlja marker kasne faze oštećenja oksidansima.



Slika 12. Koncentracija TBKRS pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p<0,05$ (*) i $p<0,001$ (***) : značajna razlika u odnosu na 0 dan. $p<0,05$ (#) i $p<0,001$ (###): značajna razlika u odnosu na 45 dan.

ANOVA sa ponavljanjem je pokazala statistički značajan uticaj treninga (glavni uticaj treninga, $p<0,001$) na koncentraciju TBKRS kod mladih fudbalera. Uočen je značajan pad nivoa TBKRS nakon 45 dana redovnih treninga i suplementacije i u Asx i P grupi ($p<0,001$ i $p<0,05$, redom, Bonferoni test), koji je praćen povećanjem do kraja studije ($p<0,001$ i $p<0,05$, redom, Bonferoni test). Nivo TBKRS u Asx grupi je bio značajno niži posle 45 dana suplementacije u odnosu na P grupu ($p<0,05$).

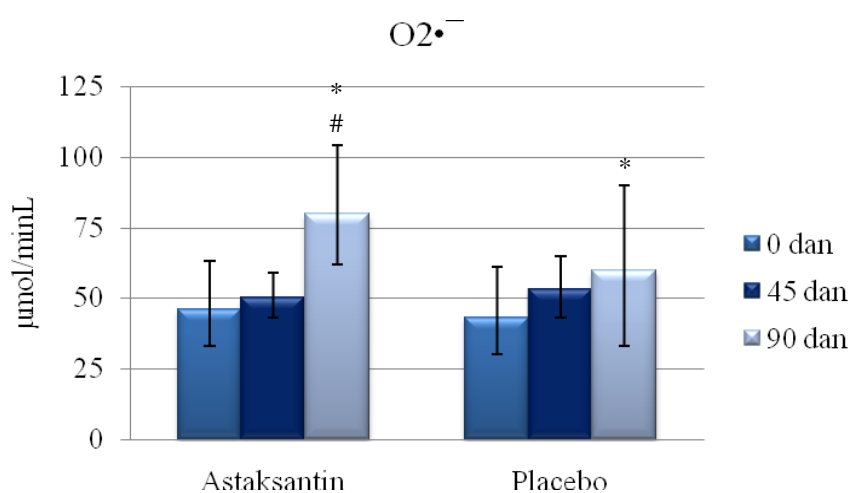
AOPP je pouzdan indirektni parametar oksidativnog oštećenja proteina, koji nastaje kao posledica dugotrajnog uticaja oksidativnog stresa, kao što je slučaj nakon dugotrajnih perioda intenzivnih treninga kod fudbalera.



Slika 13. Nivo AOPP pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i interval pouzdanosti.

Uočene promene u AOPP su pratile promene koncentracije TBKRS, sa smanjenjem posle 45 dana i povećanjem nakon 90 dana redovnih treninga. ANOVA sa ponavljanjem nije pokazala značajan uticaj ni treninga ni suplementacije na nivo AOPP.

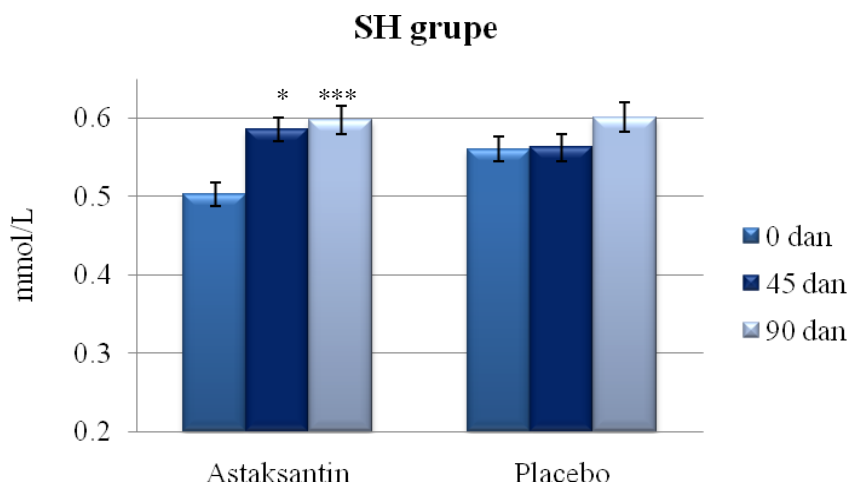
Superoksidni anjon je jedan od slobodnih radikala koji se normalno stvara u metaboličkim reakcijama. Rezultati naše studije pokazuju da redovni treninzi u periodu od 90 dana dovode do značajno povećanje nivoa $O_2^{\cdot-}$ u obe grupe mladih fudbalera (glavni uticaj treninga, $p < 0,001$).



Slika 14. Nivo $O_2^{\cdot-}$ pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i interval pouzdanosti. $p < 0,05$ (*): značajna razlika u odnosu 0 dan. $p < 0,05$ (#): značajna razlika u odnosu na 45 dan

4.2.3.2. Parametri antioksidativne zaštite

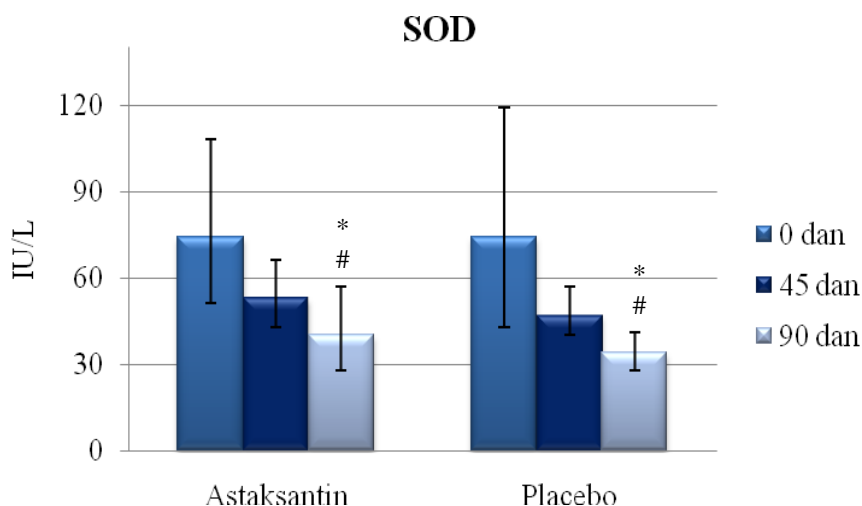
Endogeni sistem antioksidativne zaštite podrazumeva antioksidativne enzime i neenzimske antioksidanse. SH grupe proteina imaju vrlo važnu ulogu u kompleksnoj mreži endogenih neenzimskih antioksidansa.



Slika 15. Ukupni sadržaj SH grupa pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani srednja vrednost \pm SEM. $p<0,05$ (*) i $p<0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na 0 dan.

ANOVA sa ponavljanjem je pokazala značajan efekat interakcije suplementacije i treninga ($p<0,05$) i značajan glavni efekat treninga ($p<0,01$) na ukupan sadržaj SH grupa. Uočeno je povećanje nivoa SH grupa u Asx grupi nakon 45 i 90 dana suplementacije u odnosu na nivo pre suplementacije ($p<0,05$, $p<0,001$, redom, Bonferoni test), dok promene u P grupi nisu bile statistički značajne. Na početku studije postojala je razlika u ukupnom sadržaju SH grupa između suplementirane i placebo grupe ($p=0,060$, Student t-test).

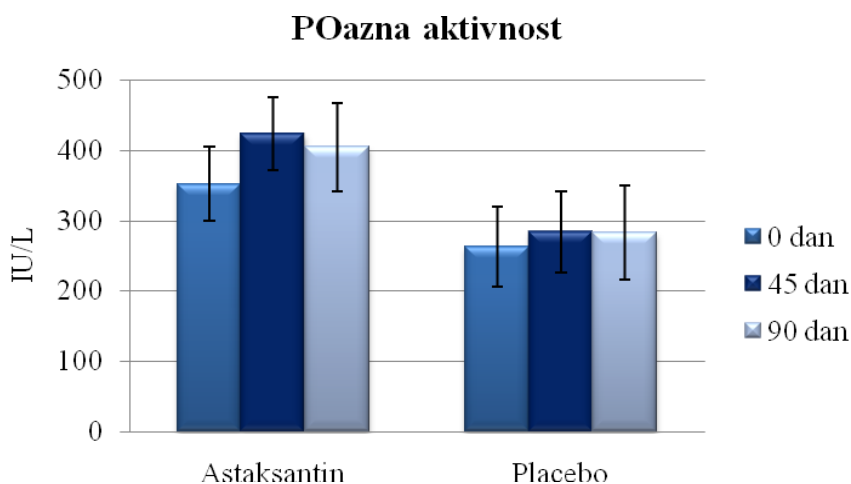
Superoksid dismutaza je glavni enzim koji neutrališe superoksidni anjon i predstavlja prvi enzim u liniji odbrane od oksidativnog stresa. Uticaj redovnih treninga i suplementacije na aktivnost SOD u periodu od 90 dana prikazan je na slici 18.



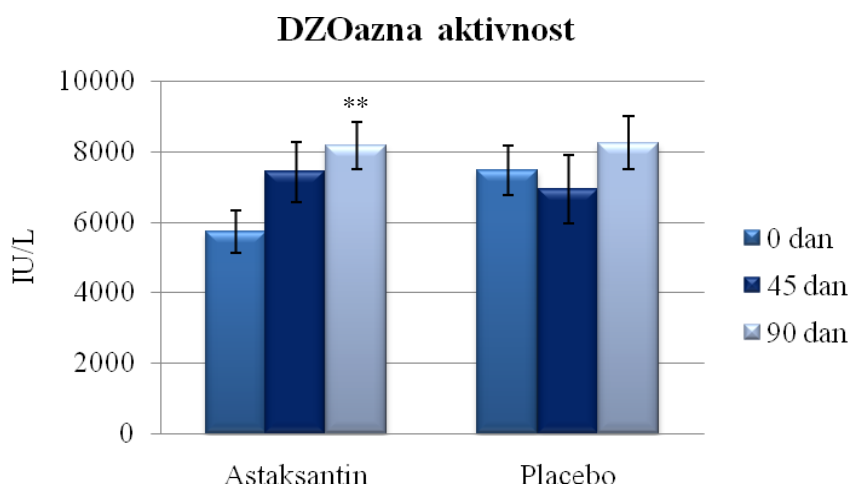
Slika 16. Aktivnost SOD pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i interval pouzdanosti. $p < 0,05$ (*): značajna razlika u odnosu na 0 dan. $p < 0,05$ (#): značajna razlika u odnosu na 45 dan

Primenom ANOVE sa ponavljanjem pokazano je značajno smanjenje aktivnosti SOD u periodu od 90 dana u obe grupe fudbalera (glavni uticaj treninga, $p < 0,001$).

Aktivnost enzima PON1 je određivana preko brzine razgradnje veštačkih supstrata - paraoksona i diazoksona. Aktivnost PON1 prema paraoksonu-POazna i diazoksonu-DZOazna aktivnost kod mladih fudbalera su prikazane na slikama 19 i 20. Na početku studije postojala je razlika u aktivnosti PON1 prema diazoksonu između suplementirane i placebo grupe ($p = 0,073$).

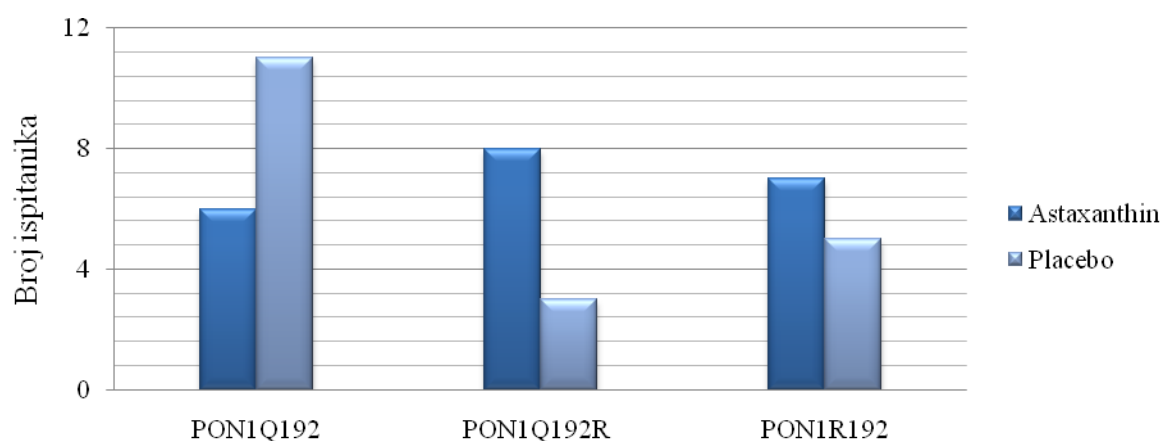


Slika 17. POazna aktivnost pre, posle 45 i 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani srednja vrednost \pm SEM.



Slika 18. DZOazna aktivnost pre, posle 45 i 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani srednja vrednost±SEM. $p < 0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na 0 dan.

Analiza podataka primenom ANOVA testa sa ponavljanjem je pokazala značajan efekat interakcije suplementacije i treninga na aktivnost PON1 prema paraoksonu ($p < 0,05$), dok je značajan efekat redovnih treninga zabeležen na PON1 aktivnost prema diazoksonu. Nakon 90 dana suplementacije, PON1 aktivnost prema diazoksonu je povećana za 42% ($p < 0,01$, Bonferroni test), dok u P grupi nije zabeležena statistički značajna promena.

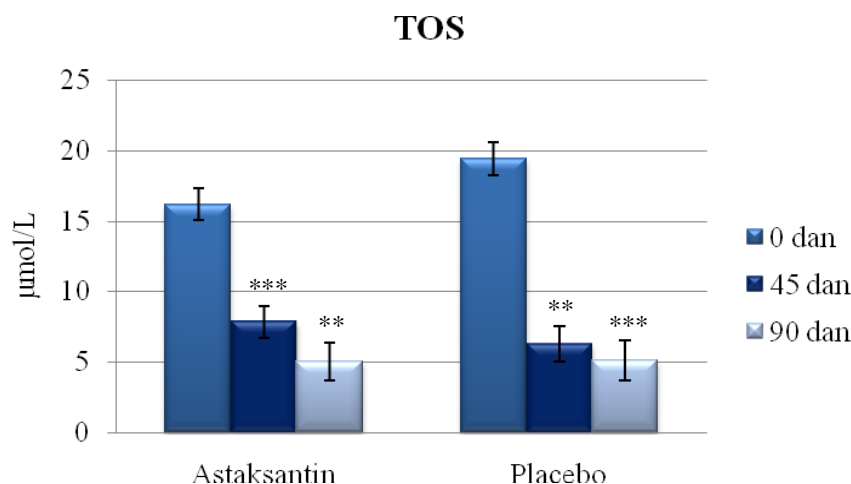


Slika 19. Raspodela PON1_{Q1192R} fenotipova u suplementiranoj i placebo grupi.

Fenotip PON1 za položaj 192 (PON1_{Q192}, PON1_{Q192R} i PON1_{R192}) kod mladih fudbalera određivan je upoređivanjem enzimske aktivnosti PON1 prema paraoksonu i diazoksonu. Ispitanici sa vrednošću odnosa dve PON1 aktivnosti ≥ 43 imaju PON1_{Q192} fenotip, sa vrednostima između 13 i 43 PON1_{Q192r}, fenotip i sa vrednostima ≤ 13 PON1_{R192} fenotip. Iz rezultata dobijenih χ^2 testom, može se zaključiti da je bilo razlike u raspodeli fenotipova PON1_{Q192R} između suplementirane i P grupe ($\chi^2=3.987$; $p=0.136$)

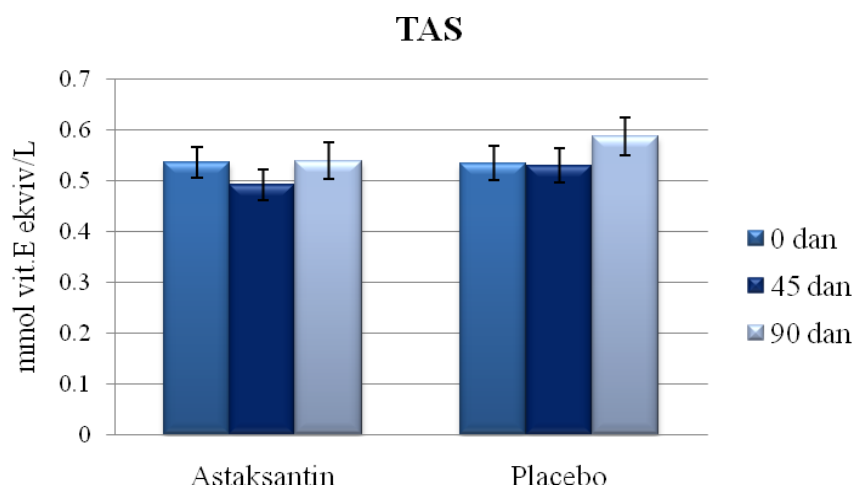
4.2.3.3. Parametri oksidativnog statusa

S obzirom da je broj jedinjenja sa prooksidativnim i antioksidativnim delovanjem veliki, pojedinačno merenje njihove koncentracije i aktivnosti ne samo da je teško i komplikovano, već i ne daje pravu sliku o oksidativnom statusu organizma. Zbog toga smo merili i tri sveobuhvatna parametra: TOS, kao marker prooksidativnih procesa, TAS, kao marker sveukupne antioksidativne zaštite u plazmi i PAB, kao meru ravnoteže između njih.



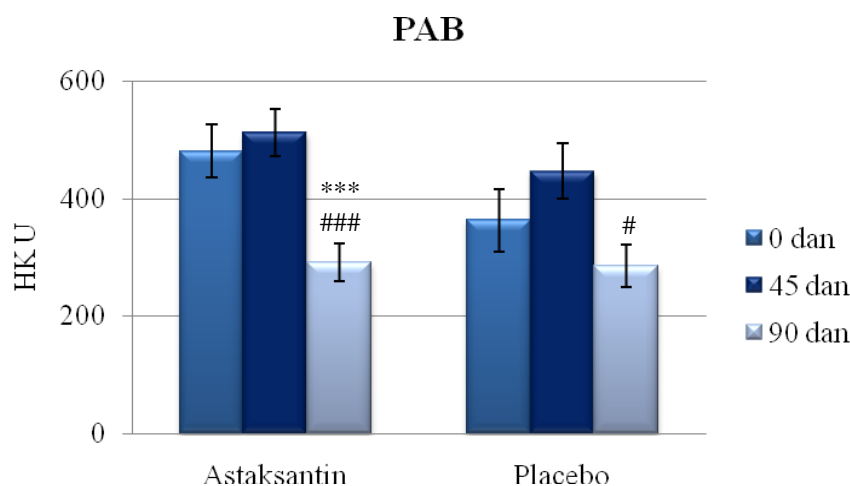
Slika 20. TOS pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p<0,01$ (**) i $p<0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na 0 dan.

ANOVA sa ponavljanjem je pokazala značajan uticaj redovnih treninga na TOS kod mladih fudbalera (glavni uticaj treninga, $p<0,001$). *Post hoc* analiza je pokazala značajno smanjenje TOS u Asx i P grupi nakon 45 dana ($p<0,001$, $p<0,01$, redom, Bonferoni test) i nakon 90 dana ($p<0,01$, $p<0,001$, redom, Bonferoni test) redovnih treninga i suplementacije u odnosu na početak studije.



Slika 21. TAS pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM.

Nije uočen statistički značajan uticaj redovnih treninga ni suplementacije Asx-om na bazalne vrednosti TAS u obe grupe fudbalera, na osnovu ANOVA testa sa ponavljanjem.



Slika 22. PAB pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,001$ (***) : značajna razlika u odnosu na 0 dan. $p < 0,05$ (#) i $p < 0,001$ (###): značajna razlika u odnosu na 45 dan.

Redovni treninzi u periodu od 90 dana su imali značajan uticaj na PAB u obe grupe fudbalera (glavni uticaj treninga, $p < 0,001$), što je pokazano ANOVA testom sa ponavljanjem. *Post hoc* analiza je pokazala značajno smanjenje PAB u Asx grupi nakon 90 dana u poređenju sa vrednostima pre i posle 45 dana suplementacije ($p < 0,001$,

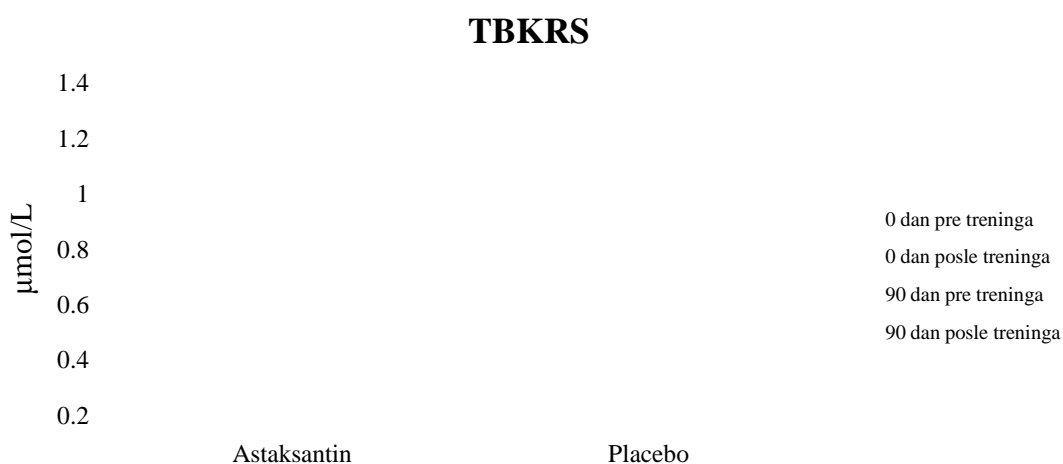
Bonferoni test). PAB je značajno smanjen posle 90 dana u odnosu na 45 dan posmatranog perioda u P grupi ($p < 0,05$, Bonferoni test). Na početku studije uočili smo marginalno značajnu razliku u PAB između suplementirane i placebo grupe ($p = 0,080$).

4.3. Uticaj intenzivnog treninga i suplementacije astaksantinom na parametre oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

U okviru ovog dela istraživanja ispitivan je uticaj intenzivnog jednokratnog treninga pre i posle 90 dana suplementacije Asx na vrednosti parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, kao i parametara oksidativnog statusa mladih elitnih fudbalera.

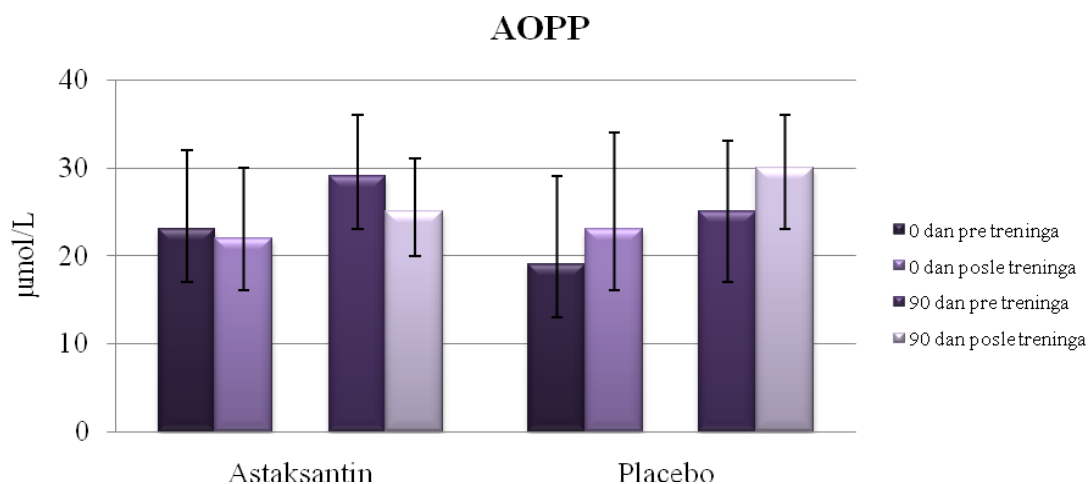
4.3.1. Parametri oksidativnog stresa

Da bismo procenili nivo oksidativnog stresa nakon intenzivnog treninga, kao i njegovu modulaciju pod uticajem Asx, određivali smo koncentraciju TBKRS, AOPP i nivo superoksid anjon radikala u plazmi pre i posle intenzivnog treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije. Dobijene vrednosti smo poredili primenom dvofaktorske ANOVE sa ponavljanjem.



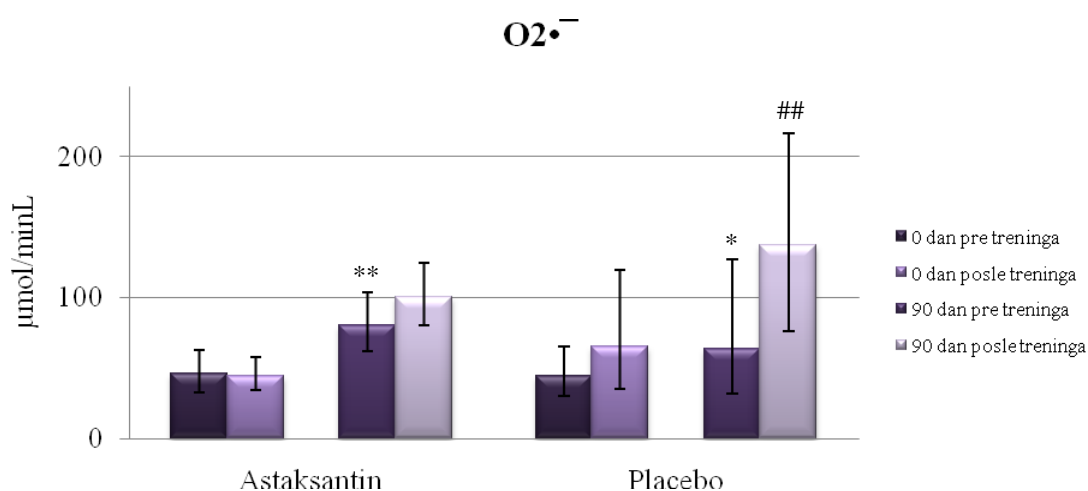
Slika 23. Koncentracija TBKRS pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM.

Nisu uočene značajne promene u nivou TBKRS nakon intenzivnog treninga ni u suplementiranoj ni u placebo grupi.



Slika 24. Nivo AOPP pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i interval pouzdanosti.

Intenzivni treninzi pre i posle 90 dana suplementacije nisu izazvali značajne promene u nivou AOPP ni u jednoj grupi fudbalera.

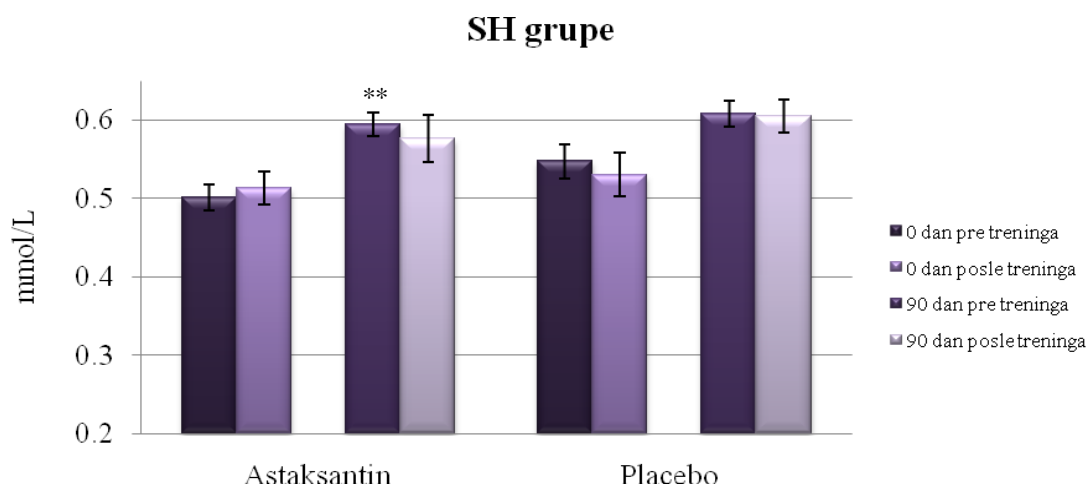


Slika 25. Koncentracija $O_2^{\bullet-}$ pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i interval pouzdanosti. $p < 0,05$ (*) i $p < 0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na 0 dan pre treninga. $p < 0,01$ (##): značajna razlika u odnosu na 90 dan pre treninga.

Redovni treninzi u periodu od 90 dana dovode do značajnog povećanja nivoa $O_2\bullet^-$ kod mladih fudbalera (glavni uticaj redovnih treninga, $p<0,001$). Intenzivan trening na početku posmatranog perioda nije izazvao značajne promene u nivou $O_2\bullet^-$. Intenzivan trening nakon 90 dana suplementacije izazvao je značajno povećanje koncentracije $O_2\bullet^-$ samo u placebo grupi (značajan uticaj interakcije akutnog treninga i suplementacije, $p<0,05$; uticaj akutnog treninga, $p<0,01$).

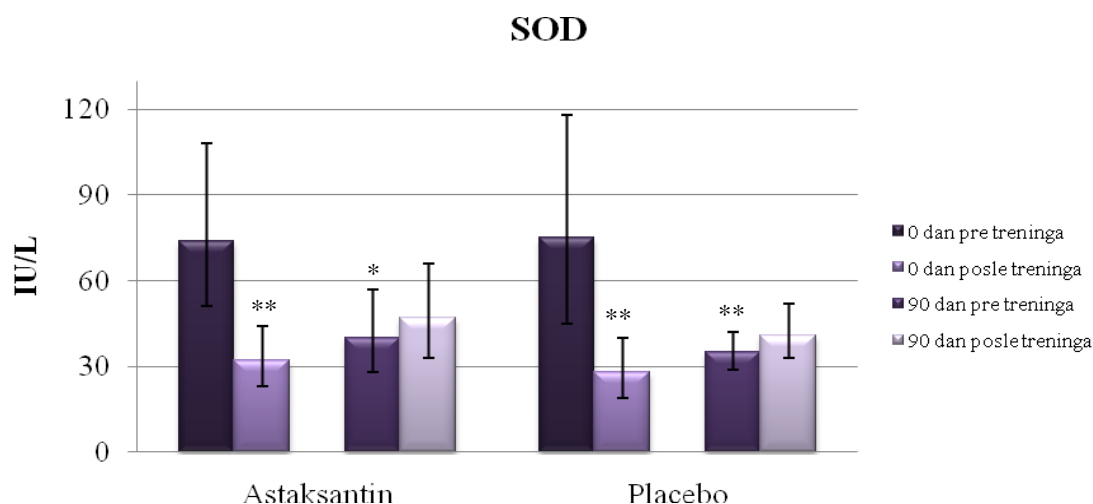
4.3.2. Parametri antioksidativne zaštite

Uticaj intenzivnog treninga i suplementacije Asx-om na neenzimske antioksidanse i enzimske antioksidanse je ispitivan određivanjem ukupnog sadržaja SH grupa i aktivnosti enzima SOD i PON1.



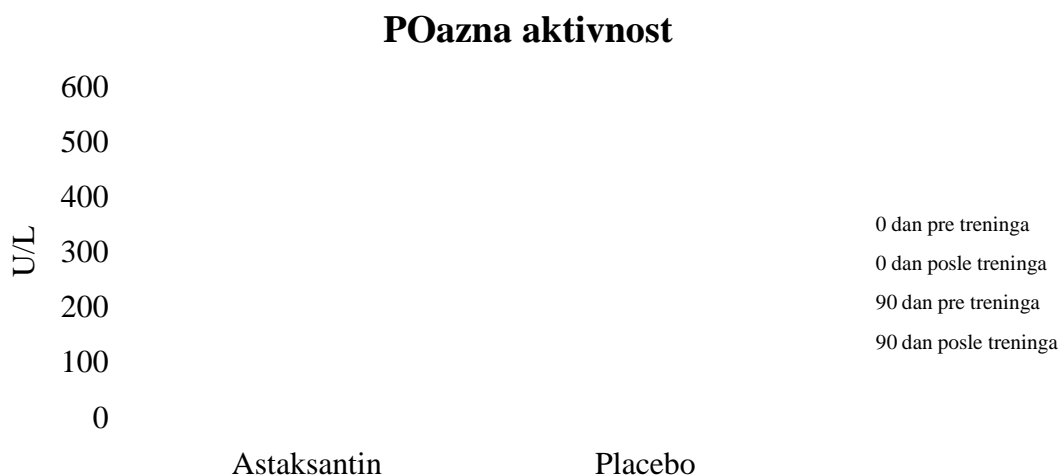
Slika 26. Ukupni sadržaj SH grupa pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p<0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na 0 dan pre treninga.

Intenzivan trening nije izazvao značajne promene u ukupnom sadržaju sulfhidrilnih grupa na početku ni na kraju perioda suplementacije kod mladih fudbalera.

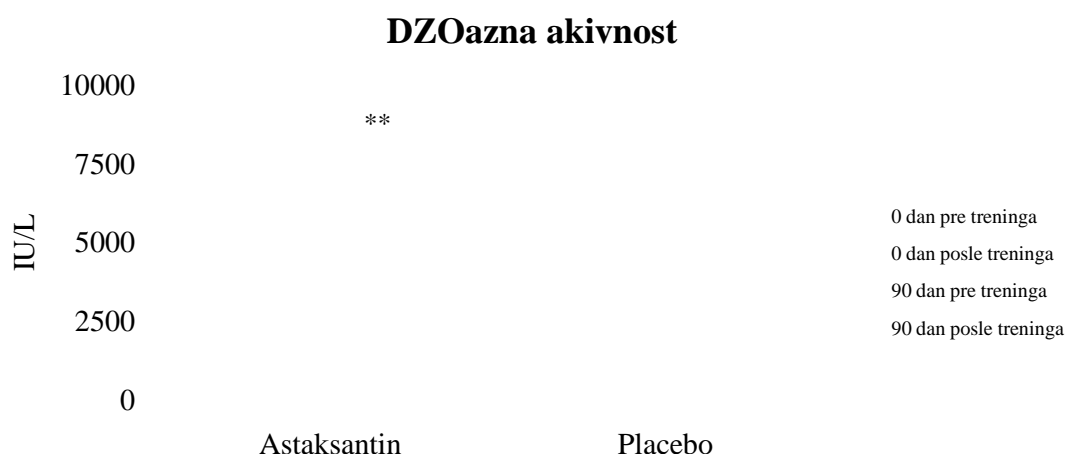


Slika 27. Aktivnost SOD pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i interval pouzdanosti. $p < 0.01 (**)$ i $p < 0.05 (*)$: značajna razlika u odnosu na 0 dan pre treninga.

Intenzivan trening na početku studije izazvao je značajan pad aktivnosti SOD u obe grupe fudbalera, dok na kraju posmatranog perioda nisu uočene značajne promene u SOD aktivnosti nakon akutnog treninga (značajan uticaj interakcije redovnih i akutnog treninga, $p < 0,05$; glavni uticaj akutnog treninga, $p < 0,001$).



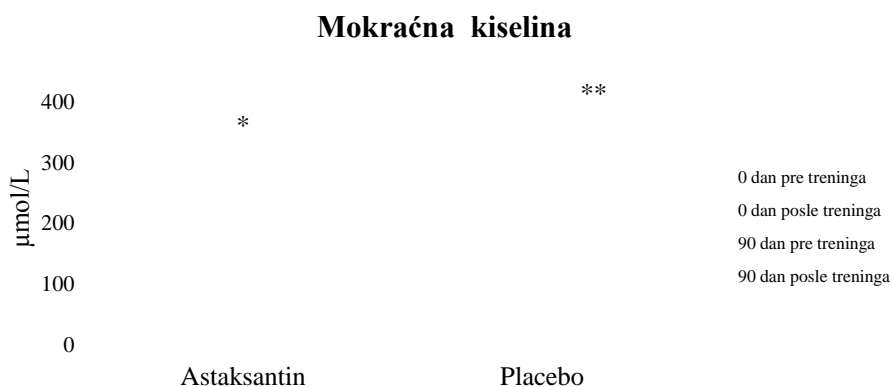
Slika 28. POazna aktivnost pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM.



Slika 29. DZOazna aktivnost pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p<0.01(**)$: značajna razlika u odnosu na 0 dan pre treninga.

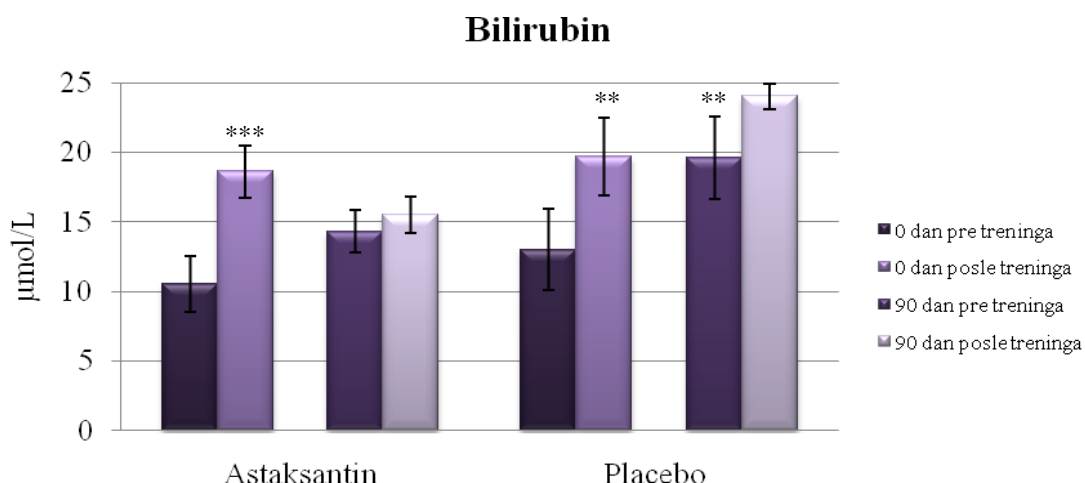
Pokazan je značajan uticaj interakcije redovnih i jednokratnog treninga ($p<0,01$), sa povećanjem POazne aktivnosti na početku i smanjenjem na kraju posmatranog perioda. Intenzivan trening nije uslovio značajne promene u DZOazne aktivnosti na početku ni na kraju perioda suplementacije kod mladih fudbalera.

Mokraćna kiselina i bilirubin su normalni produkti metaboličkih procesa u organizmu, ali kao jedinjenja sa antioksidativnim osobinama daju doprinos ukupnom antioksidativnom kapacitetu plazme. Promene u nivou mokraćne kiseline i bilirubina posle intenzivnog treninga na početku i na kraju posmatranog perioda su prikazane na slikama 30 i 31.



Slika 30. Koncentracija mokraćne kiseline pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*) i $p < 0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na 0 dan pre treninga.

Dvofaktorska ANOVA sa ponavljanjem je pokazala značajan efekat redovnih i jednokratnog treninga na koncentraciju mokraćne kiseline ($p < 0,001$, $p < 0,01$). Akutni trening izaziva značajno povećanje koncentracije mokraćne kiseline u obe grupe fudbalera na početku, ali ne i na kraju posmatranog perioda (značajan uticaj interakcije redovnih i akutnog treninga, $p < 0,05$).

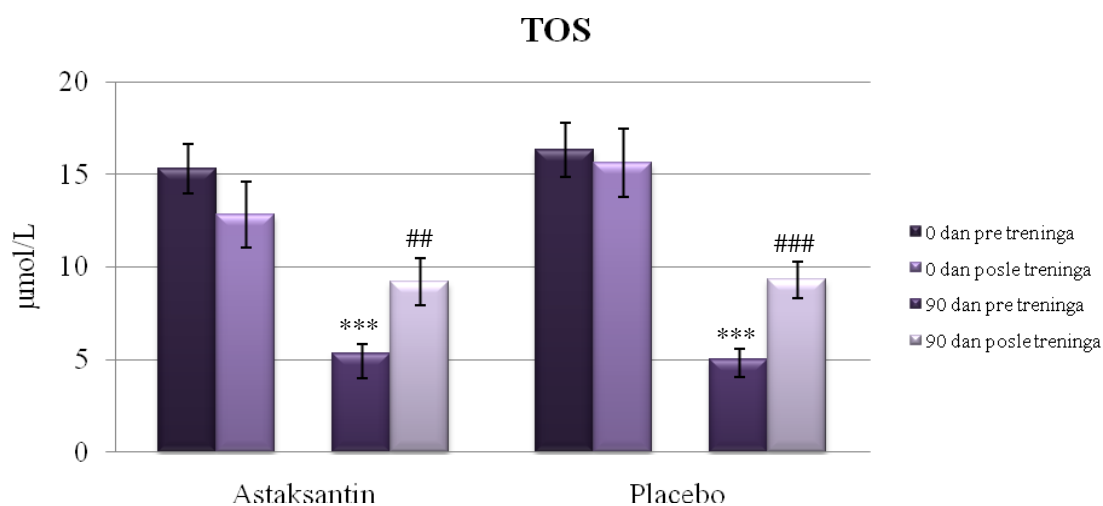


Slika 31. Koncentracija bilirubina pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na 0 dan pre treninga.

Uočen je značajan uticaj interakcije suplementacije i redovnih treninga ($p < 0,05$), sa nižim vrednostima bilirubina u Asx grupi u odnosu na placebo grupu posle 90 dana suplementacije. Koncentracija bilirubina raste kao posledica intenzivnog treninga u obe grupe fudbalera, ali su ove promene dostigle statističku značajnost samo na početku posmatranog perioda (značajan uticaj interakcije redovnih i akutnog treninga, $p < 0,05$; glavni uticaj akutnog treninga, $p < 0,001$).

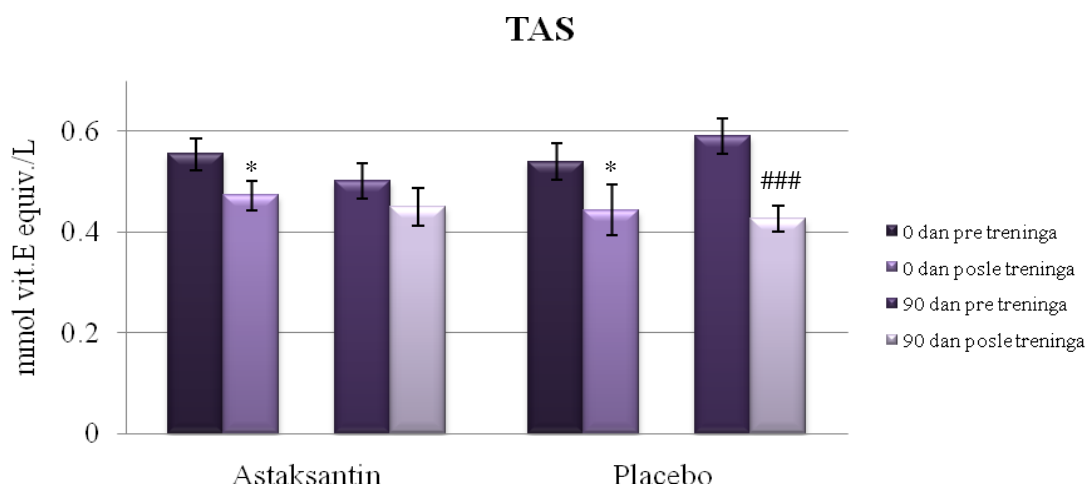
4.3.3. Parametri oksidativnog statusa

Uticaj intenzivnog treninga i suplementacije na tri sveobuhvatna parametra: TOS, TAS i PAB je prikazan na slikama 32, 33 i 34. Dobijene vrednosti smo poredili primenom dvofaktorske ANOVE sa ponavljanjem.



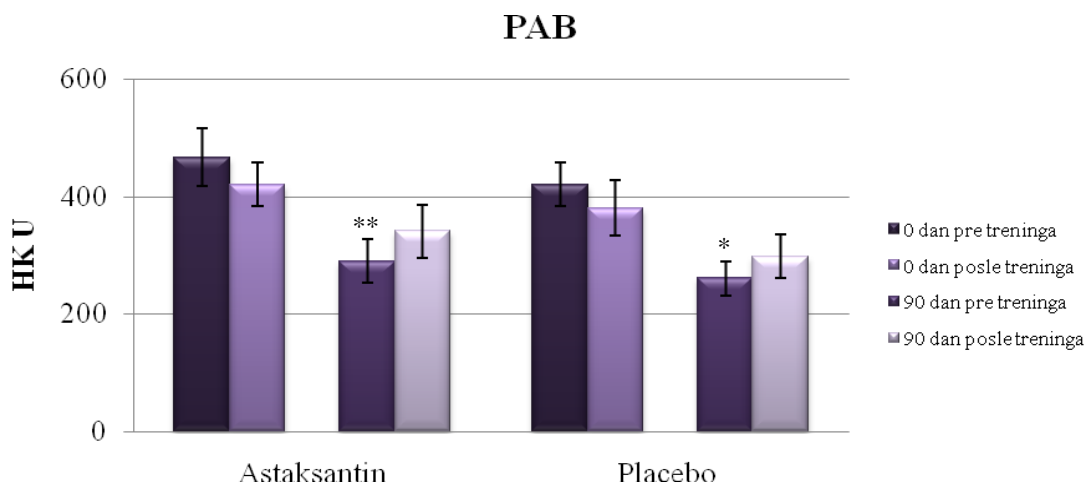
Slika 32. TOS pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,001$ (***) : značajna razlika u odnosu na 0 dan pre treninga. $p < 0,001$ (***) i $p < 0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na 90 dan pre treninga.

TOS je značajno snižen posle 90 dana redovnih treninga i suplementacije u odnosu na početak posmatranog perioda u obe grupe fudbalera (glavni uticaj redovnih treninga, $p < 0,001$). Na početku studije intenzivan trening nije izazvao statistički značajne promene u TOS, dok je posle 90 dana suplementacije došlo do značajnog povećanja TOS nakon intenzivnog treninga i u suplementiranoj i u placebo grupi (značajan uticaj interakcije redovnih i akutnog treninga, $p < 0,05$).



Slika 33. TAS pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*): značajna razlika u odnosu na 0 dan pre treninga. $p < 0,001$ (###): značajna razlika u odnosu na 90 dan pre treninga.

Uočen je značajan glavni efekat intenzivnog treninga ($p < 0,001$) i efekat interakcije suplementacije i treninga ($p < 0,005$). Naime, vrednosti TAS su značajno smanjene nakon intenzivnog treninga u obe grupe fudbalera pre suplementacije i u placebo grupi posle 90 dana suplementacije. Nisu uočene značajne promene u TAS posle intenzivnog treninga u Asx grupi posle 90 dana suplementacije.

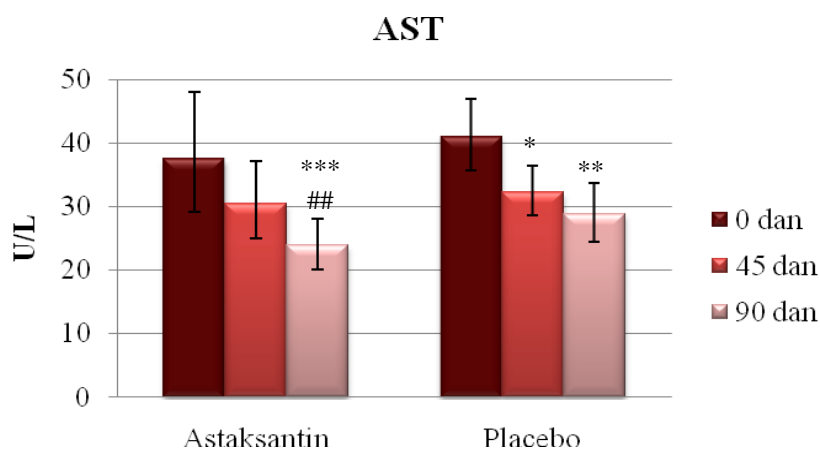


Slika 34. PAB pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*) i $p < 0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na 0 dan pre treninga.

Nije uočena značajna promena u PAB kao odgovor na intenzivan trening ni na početku ni na kraju posmatranog perioda.

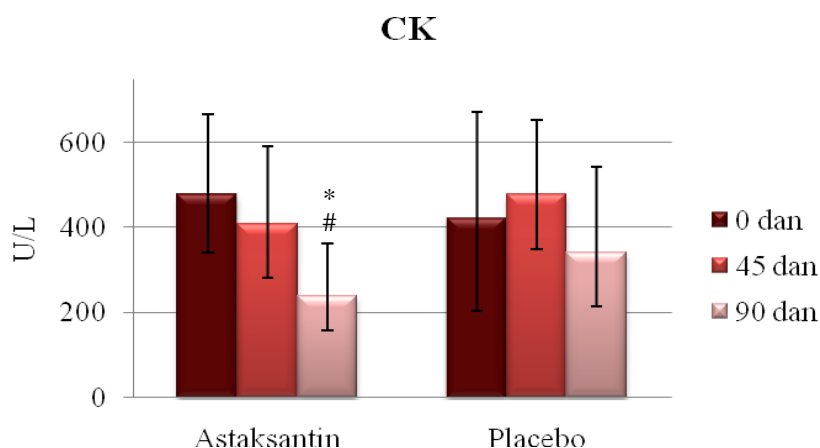
4.4. Uticaj suplementacije astaksantinom na oštećenje mišića kod mladih fudbalera

U cilju ispitivanja uticaja suplementacije Asx na oštećenje mišića izazvano redovnim treniranjem u toku 90 dana, poredili smo bazalne vrednosti aktivnosti enzima mišića - AST, CK i LDH između suplementirane i placebo grupe primenom ANOVA testa sa ponavljanjem.



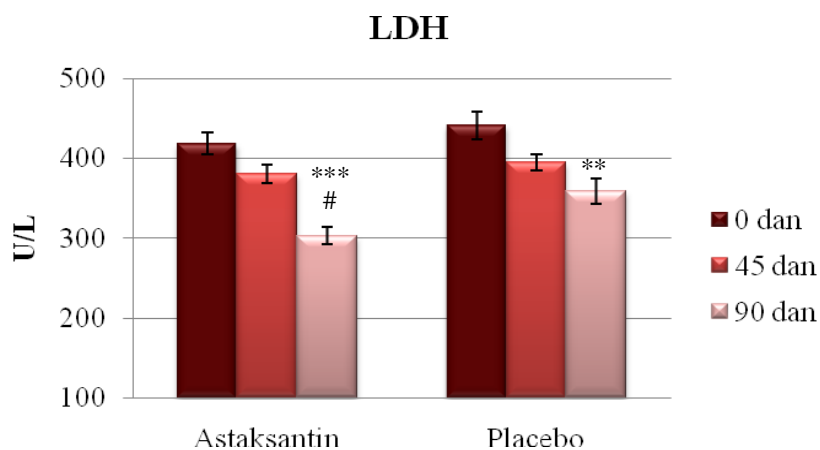
Slika 35. Aktivnost AST pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i interval pouzdanosti. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na 0 dan. $p < 0,01$ (##): značajna razlika u odnosu na 45 dan.

Aktivnost AST u plazmi se značajno smanjuje kao posledica redovnih treninga u periodu od 90 dana (glavni uticaj treninga, $p < 0,001$). Pored toga, uočen je i značajan uticaj suplementacije ($p < 0,05$). Aktivnost AST je značajno niža u suplementiranoj u odnosu na placebo grupu.



Slika 36. Aktivnost CK pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i interval pouzdanosti. $p < 0,05$ (*): značajna razlika u odnosu na 0 dan. $p < 0,05$ (#): značajna razlika u odnosu na 45 dan.

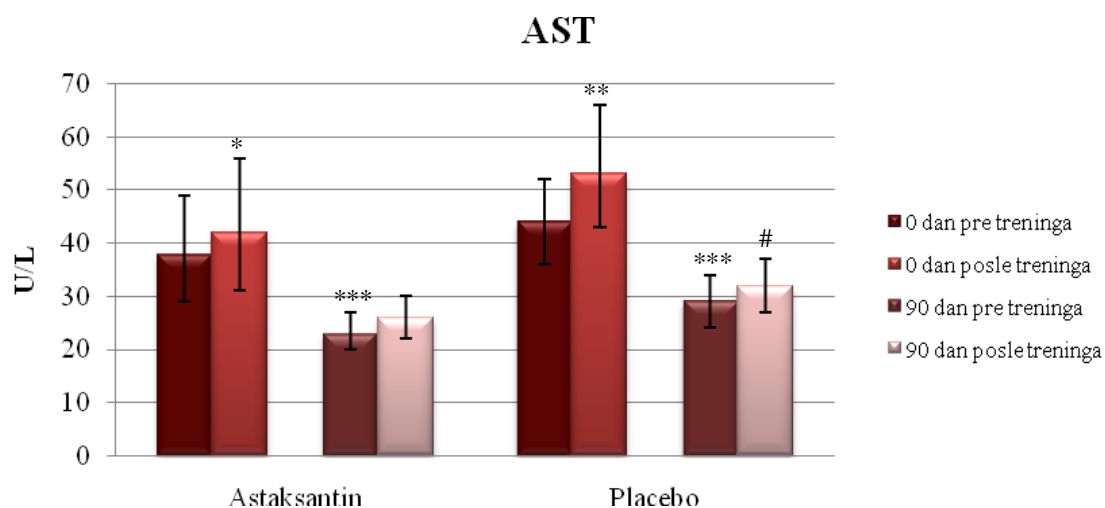
Redovni treninzi u periodu od 90 dana imaju značajan uticaj na aktivnost CK u plazmi kod mladih fudbalera (glavni uticaj treninga, $p < 0,01$). *Post hoc* analiza je pokazala značajno smanjenje aktivnosti CK u Asx grupi nakon 90 dana suplementacije u odnosu na vrednosti pre i posle 45 dana suplementacije. Promene aktivnosti CK u placebo grupi nisu dostigle statističku značajnost.



Slika 37. Aktivnost LDH pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na 0 dan. $p < 0,05$ (#): značajna razlika u odnosu na 45 dan.

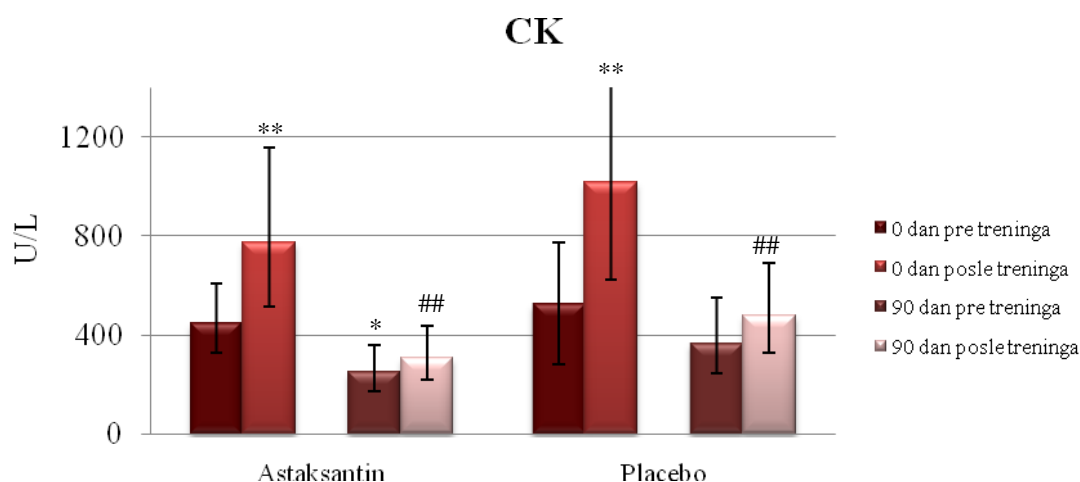
Redovni treninzi u periodu od 90 dana doveli su do značajnog smanjenja aktivnosti LDH u plazmi (glavni uticaj treninga, $p < 0,001$). Uočen je značajan uticaj suplementacije ($p < 0,05$), s obzirom na niže aktivnosti LDH u suplementiranoj u odnosu na placebo grupu.

U okviru ovog dela istraživanja ispitivan je i uticaj suplementacije Asx-om na oštećenje mišića izazvano intenzivnim jednokratnim treningom. Aktivnosti enzima mišića - AST, CK i LDH, izmerene pre i posle intenzivnog treninga na početku i na kraju perioda suplementacije, u Asx i placebo grupi smo poredili primenom dvofaktorske ANOVE sa ponavljanjem.



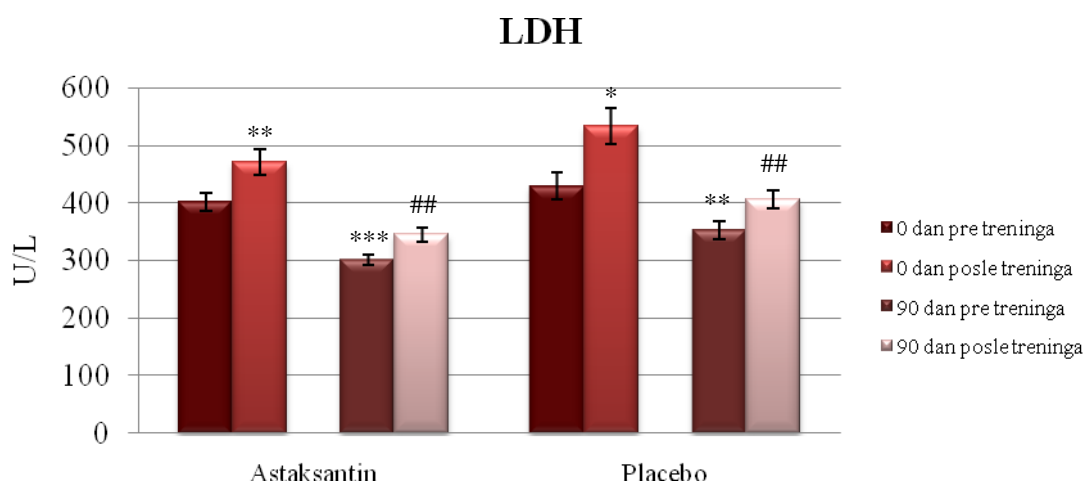
Slika 38. Aktivnost AST pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i interval pouzdanosti. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na 0 dan pre treninga. $p < 0,05$ (#): značajna razlika u odnosu na 90 dan pre treninga.

Intenzivan trening izaziva značajno povećanje aktivnosti AST u plazmi kod mladih fudbalera (glavni uticaj jednokratnog treninga, $p < 0,001$). Uočen je marginalno značajan uticaj suplementacije ($p = 0,060$) sa nižim vrednostima AST u suplementiranoj u odnosu na placebo grupu.



Slika 39. Aktivnost CK pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i interval pouzdanosti. $p < 0,05$ (*) i $p < 0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na 0 dan pre treninga. $p < 0,01$ (##): značajna razlika u odnosu na 90 dan pre treninga.

Intenzivni trening povećava aktivnost CK u plazmi kako na početku, tako i na kraju perioda suplementacije u obe grupe fudbalera (glavni uticaj intenzivnog treninga, $p < 0,001$).



Slika 40. Aktivnost LDH pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) i $p < 0,001$ (***): značajna razlika u odnosu na 0 dan pre treninga. $p < 0,01$ (##): značajna razlika u odnosu na 90 dan pre treninga.

Uočeno je značajno povećanje aktivnosti LDH kao posledica intenzivnog treninga u obe grupe fudbalera na početku i na kraju posmatranog perioda (glavni uticaj akutnog treninga, $p < 0,001$). Uočen je značajan uticaj suplementacije ($p < 0,05$) sa nižim vrednostima LDH u Asx u odnosu na placebo grupu nakon 90 dana suplementacije.

4.5. Uticaj različitih preventivnih mera na nivo sekretornog IgA u salivi

Fiziološki stres uzrokovan dugim i intenzivnim treninzima se ogleda i u prolaznim, ali značajnim promenama u mukoznom imunitetu i smanjenu nivoa sekretornog IgA, što se dovodi u vezu sa povećanom incidencijom infekcija gornjih respiratornih puteva kod sportista. U ovom delu istraživanja smo ispitivali uticaj dve vrste nutritivnih mera – senzorne stimulacije i suplementacije Asx, na nivo sIgA kod sportista.

4.5.1. Uticaj senzorne stimulacije na nivo sekretornog IgA u salivi kod karatista rekreativaca

Ispitivanje uticaja senzorne stimulacije na nivoa sIgA je sprovedeno na grupi od 20 ispitanika koji su rekreativno trenirali karate. Uzeti su podaci o starosti, izmerena im je visina, težina, izračunat indeks telesne mase i određena maksimalna potrošnja kiseonika (VO_{2max}). Antropometrijske karakteristike ispitanika su prikazane u tabeli 18.

Tabela 18. Antropometrijske karakteristike ispitanika

	Napitak	Surutka
Starost (godine)	22.9±0.9	22.2±0.7
Telesna masa (kg)	73.6±3.8	74.8±2.6
Visina (cm)	180±0.1	183±0.05
VO_{2max}	46±4.1	48.6±8.2
Srčana frekvenca u miru	63±5	61±4

Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ±SEM. Nije uočena razlika između grupa (Student t test).

Rezultati hemijske analize tečne surutke i aromatizovanog napitka od surutke prikazani su u Tabelama 19 i 20.

Tabela 19. Hemijski sastav, pH vrednosti i energetska vrednost aromatizovanog napitka i tečne surutke

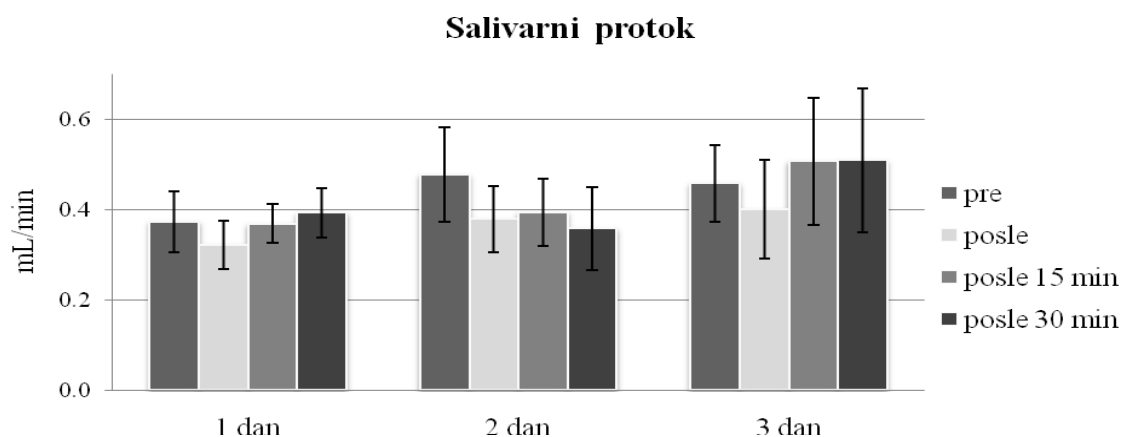
	Napitak	Surutka
Suva materija (g/100g)	14.48	12.25
Šećeri (g/100g)	13.27	6.85
Proteini (g/100g)	0.64	0.71
Mast (g/100g)	0.3	0.35
Pepeo (g/100g)	0.27	0.21
pH	4.0	4.3
Energetska vrednosti (kcal/100g)	60.01	54.20

Tabela 20. Mineralni sastav aromatizovanog napitka i surutke

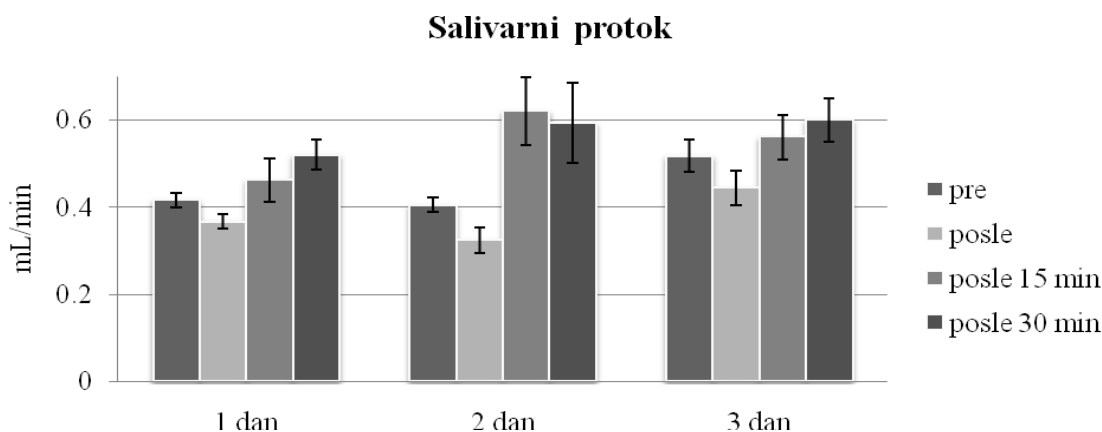
	Napitak	Surutka
Kalcijum (g/kg)	0.36	0.29
Natrijum (g/kg)	0.35	0.70
Kalijum (g/kg)	1.00	1.16
Magnezijum (g/kg)	0.10	0.05
Cink (mg/kg)	1.27	0.1
Gvožđe (mg/kg)	0.51	0.29
Bakar (mg/kg)	0.24	0.05

Srčana frekvenca i subjektivna procena zamora su mereni tokom svakog treninga u intervalima od 15 minuta. Srednja vrednost srčane frekvence tokom tri treninga je bila 143 ± 11 /min, 139 ± 11 /min and 144 ± 11 /min. Subjektivna procena zamora je beležena na svakih 15 minuta u toku svakog treninga i prosečne vrednosti su iznosile $12,6 \pm 1,2$, $11,8 \pm 1,0$ i $12,8 \pm 1,5$.

Uticaj senzorne stimulacije na mukozni imunitet je ispitivan merenjem salivarnog protoka, apsolutne koncentracije i brzine izlučivanja sIgA u uzorcima salive. Dobijene vrednosti su poređene primenom ANOVA testa sa ponavljanjem.



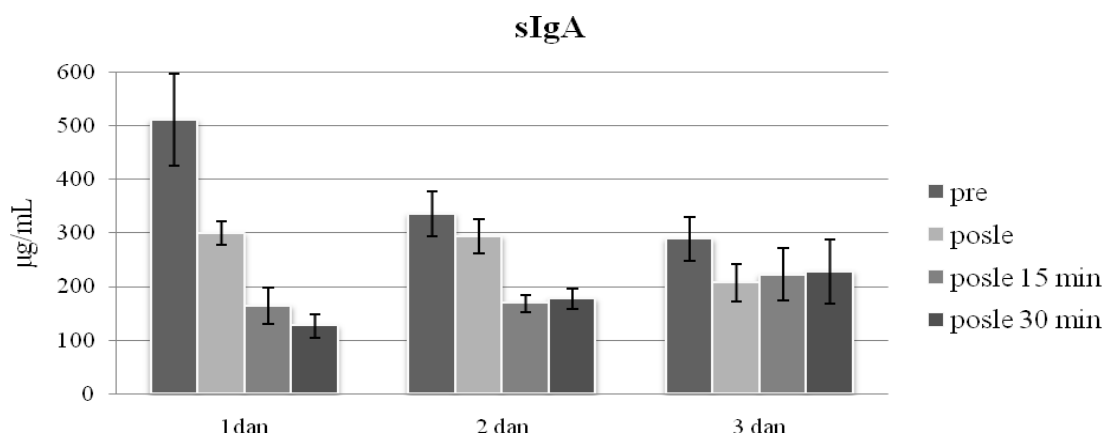
Slika 41. Salivarni protok (mL/min) kod karatista pre i posle treninga, 15 minuta posle i 30 minuta posle senzorne stimulacije surutkom tokom tri dana. Rezultati su prikazani srednja vrednost±SEM.



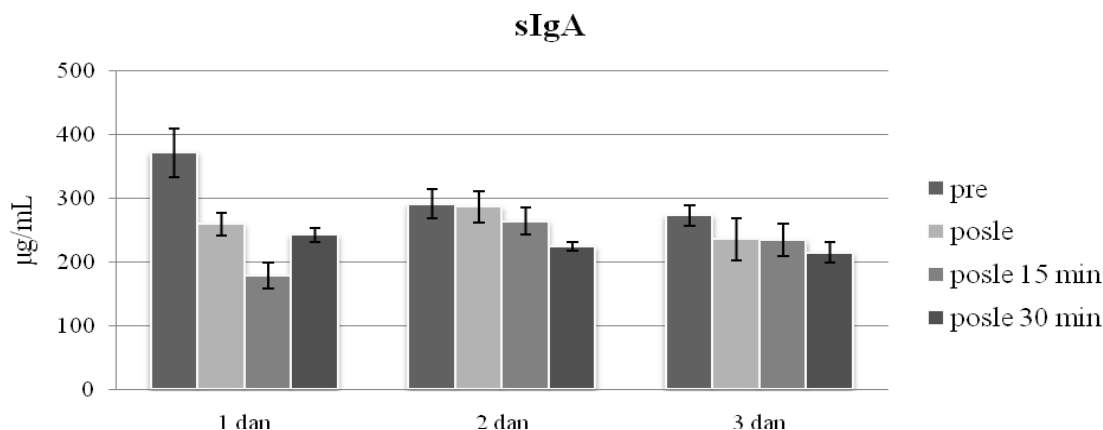
Slika 42. Salivarni protok (mL/min) kod karatista pre i posle treninga, 15 minuta posle i 30 minuta posle senzorne stimulacije aromatizovanim napitkom na bazi surutke tokom tri dana. Rezultati su prikazani srednja vrednost±SEM

Salivarni protok pre i posle treninga i posle senzorne stimulacije je prikazan na slici 41 i 42. Karate trening je izazvao značajno smanjenje salivarnog protoka u obe grupe ispitanika u toku sva tri dana (glavni uticaj treninga, $p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$, redom) Senzorna stimulacija aromatizovanim napitkom je dovela do značajnog povećanja salivarnog protoka nakon treninga prvog i drugog dana ($p < 0,05$), dok je

aplikacija surutke izazvala povećanje salivarnog protoka samo prvog dana posle treninga ($p < 0,05$). Prvog i drugog dana uočen je i značajan uticaj interakcije senzorne stimulacije i grupe ($p < 0,05$, $p < 0,01$, redom), jer je aplikacija aromatizovanog napitka uslovila značajno veće povećanje salivarnog protoka posle treninga u odnosu na surutku. Trećeg dana, senzorna stimulacija nakon treninga nije dovela do značajnog povećanja salivarnog protoka ni u jednoj grupi karatista rekreativaca.



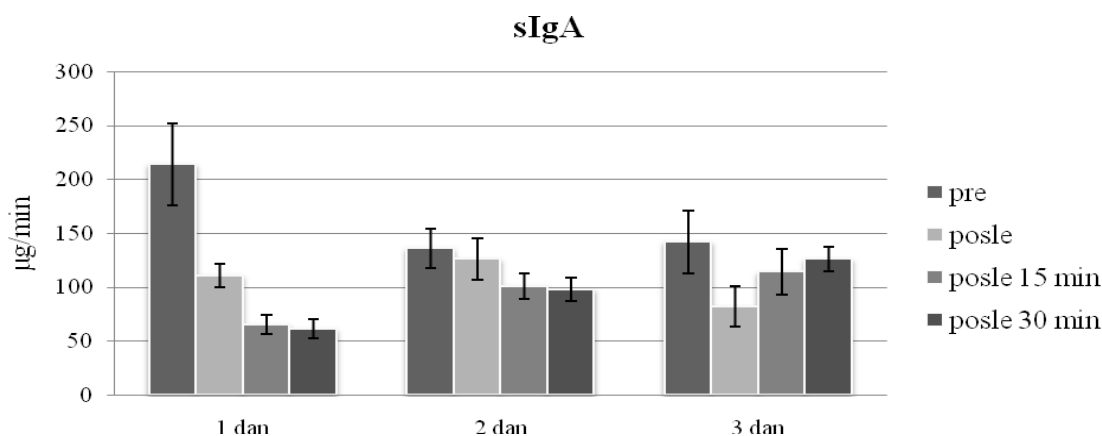
Slika 43. Apsolutna koncentracije sIgA ($\mu\text{g/mL}$) kod karatista pre i posle treninga, 15 minuta posle i 30 minuta posle senzorne stimulacije aromatizovanim napitkom na bazi surutke tokom tri dana. Rezultati su prikazani srednja vrednost \pm SEM.



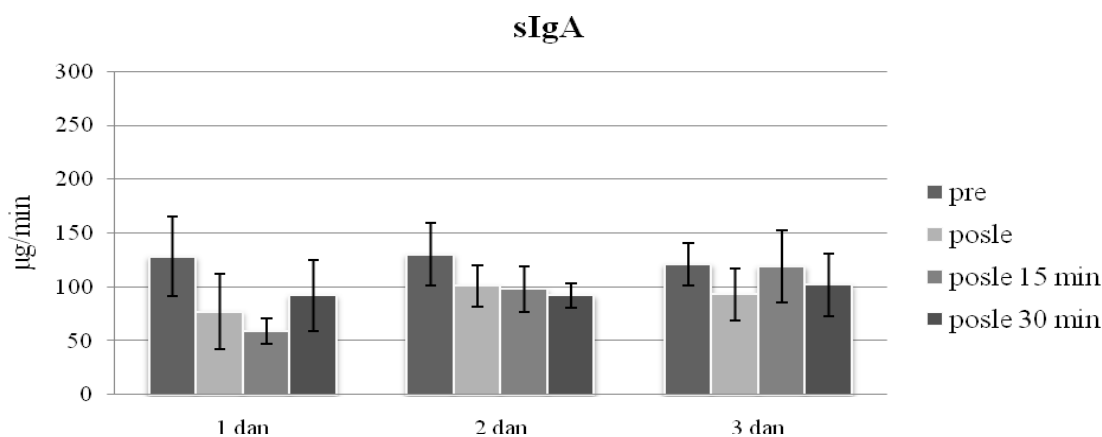
Slika 44. Apsolutna koncentracija sIgA ($\mu\text{g/mL}$) kod karatista pre treninga, posle treninga, 15 minuta posle i 30 minuta posle senzorne stimulacije surutkom tokom tri dana. Rezultati su prikazani srednja vrednost \pm SEM.

Uočen je značajan pad koncentracije sIgA u miru tokom nedelje u kojoj su karatisti imali treninge ($p < 0,05$). Karate trening izaziva smanjenje apsolutne koncentracija sIgA obe grupe karatista nakon treninga. Ovaj pad je dostigao statističku

značajnost u obe grupe prvog i trećeg dana ($p < 0,001$). Koncentracija sIgA je pala na 24 % bazalne vrednosti prvog dana u grupi 2, što je i najveći pad apsolutne koncentracije posle treninga. Uočen je značajan pad apsolutne koncentracije sIgA i posle aplikacije napitka i surutke, prvog i drugog dana ispitivanja ($p < 0,001$, $p < 0,01$, redom). Značajan uticaj interakcije senzorne stimulacije i grupe ukazuje da je pad apsolutne koncentracije bio izraženiji u grupi koja je stimulirana aromatizovanim napitkom prvog i drugog dana testiranja ($p < 0,01$, $p < 0,05$, redom). Trećeg dana, uočeno je blago povećanje koncentracije sIgA u grupi 2, nakon primene aromatizovanog napitka i blago smanjenje u grupi 1, nakon aplikacije surutke. Ove promene nisu dostigle statističku značajnost.



Slika 45. Brzina izlučivanja sIgA ($\mu\text{g}/\text{min}$) kod karatista pre treninga, posle treninga, 15 minuta posle i 30 minuta posle senzorne stimulacije aromatizovanim napitkom na bazi surutke tokom tri dana. Rezultati su prikazani srednja vrednost \pm SEM.



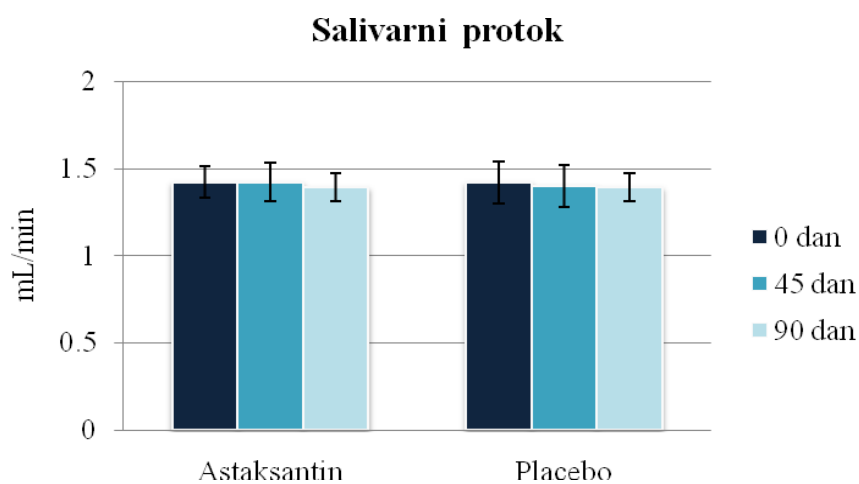
Slika 46. Brzina izlučivanja sIgA ($\mu\text{g}/\text{min}$) kod karatista pre treninga, posle treninga, 15 minuta posle i 30 minuta posle senzorne stimulacije surutkom tokom tri dana. Rezultati su prikazani srednja vrednost \pm SEM.

Brzina izlučivanja sIgA u miru se nije značajno menjala tokom tri merenja ni u jednoj grupi karatista. Pokazano je smanjenje u brzine izlučivanja sIgA (slika 45 i 46) posle rekreativnog karate treninga. Ove promene su dostigle statističku značajnost posle treninga prvog i trećeg dana ($p < 0,001$). Najizraženiji pad je uočen prvog dana nakon treninga u grupi 2, a primena aromatizovanog napitka u periodu od 30 minuta nakon treninga nije podigla brzinu izlučivanja do bazalnih vrednosti. Pokazan je i značajan uticaj interakcije senzorne stimulacije i grupe ($p < 0,01$), sa značajnim smanjenjem brzine izlučivanja sIgA u grupi 2, dok promene u grupi 1 nisu dostigle statističku značajnost. Drugog dana senzorna stimulacija posle treninga nije usloвила značajne promene brzine izlučivanja sIgA ni u jednoj grupi ispitanika. Trećeg dana senzorna stimulacija dovodi do povećanja brzine izlučivanja sIgA ($p < 0,05$), ali bez značajne razlike između grupa.

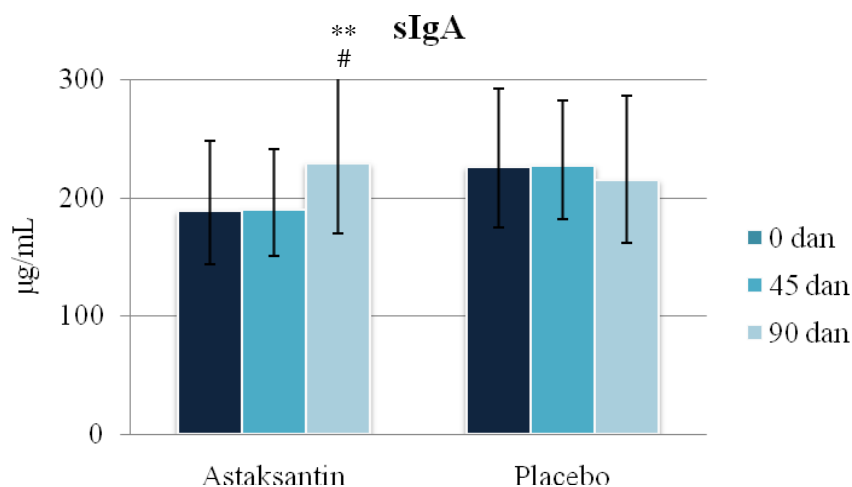
Pokazan je značajan uticaj treninga na nivo proteina u salivi. Koncentracije proteina izmerena pre i posle treninga se menjala od $0,73 \pm 0,25$ g/L do $1,54 \pm 0,44$ g/L prvog dana, od $0,74 \pm 0,4$ g/L do $1,45 \pm 0,50$ g/L drugog dana i od $0,75 \pm 0,2$ g/L do $1,60 \pm 0,4$ g/L trećeg dana.

4.5.2. Uticaj suplementacije astaksantinom na nivo sekretornog IgA u salivi kod mladih fudbalera

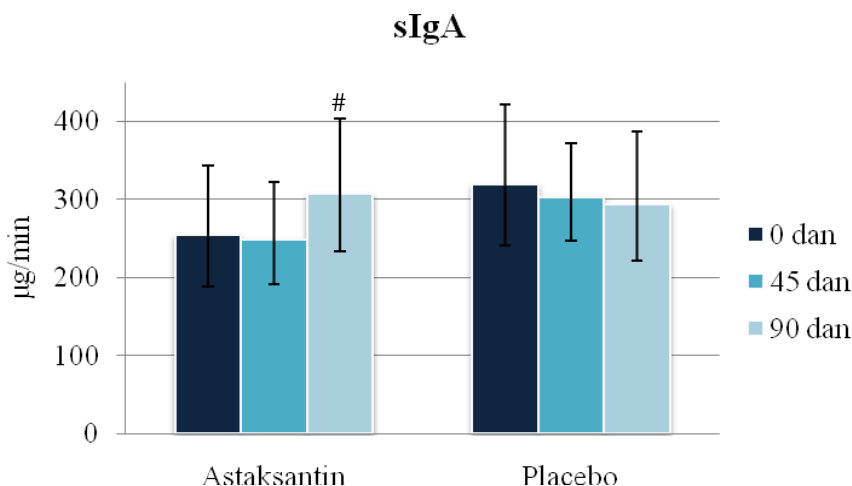
U cilju ispitivanja uticaja redovnih treninga i suplementacije astaksantinom na mukozni imunitet mladih fudbalera, poredili smo bazalne vrednosti salivarnog protoka, apsolutne koncentracije sIgA, kao i brzine izlučivanja sIgA u suplementiranoj i placebo grupi. Dobijene vrednosti su prikazane na slikama 47, 48 i 49.



Slika 47. Salivarni protok (mL/min) pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM.



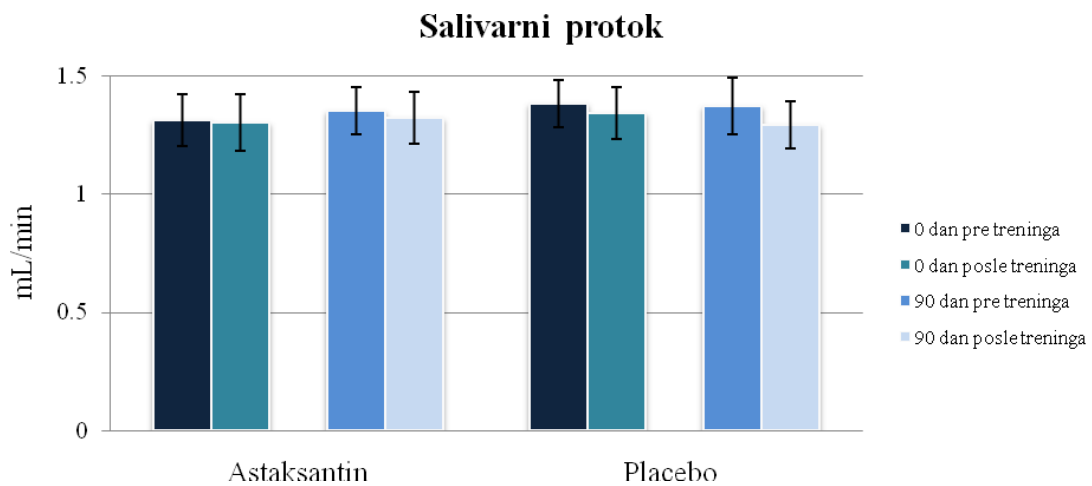
Slika 48. Apsolutna koncentracija sIgA ($\mu\text{g/mL}$) pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i interval poizdanosti. $p < 0,01$ (**): značajna razlika u odnosu na 0 dan. $p < 0,05$ (#): značajna razlika u odnosu na 45 dan.



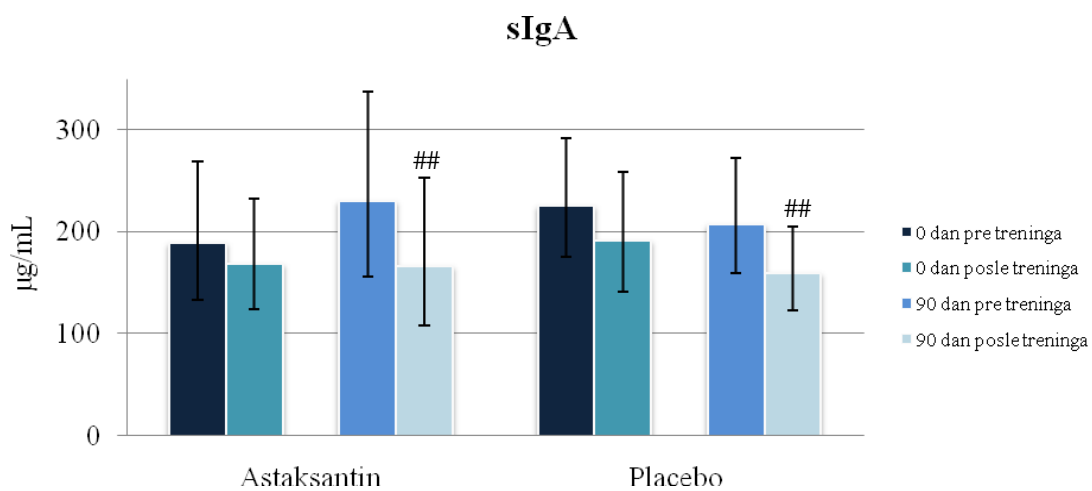
Slika 49. Brzina izlučivanja sIgA ($\mu\text{g}/\text{min}$) pre, posle 45 i posle 90 dana suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i interval pouzdanosti. $p < 0,05$ (#): značajna razlika u odnosu na 45 dan.

Izmerene vrednosti ispitivanih parametara su poređene primenom ANOVA testa sa ponavljanjem. Redovni treninzi i suplementacija nisu uticali na bazalni salivarni protok kod mladih fudbalera. Pokazan je značajan uticaj interakcije redovnih treninga i suplementacije na koncentraciju sIgA ($p < 0,05$). Naime, uočeno je značajno povećanje koncentracije i brzine izlučivanja sIgA u Asx grupi posle 90 dana suplementacije u odnosu na vrednosti posle 45 dana, dok promene nivoa sIgA u placebo grupi nisu dostigle statističku značajnost u istom posmatranom periodu.

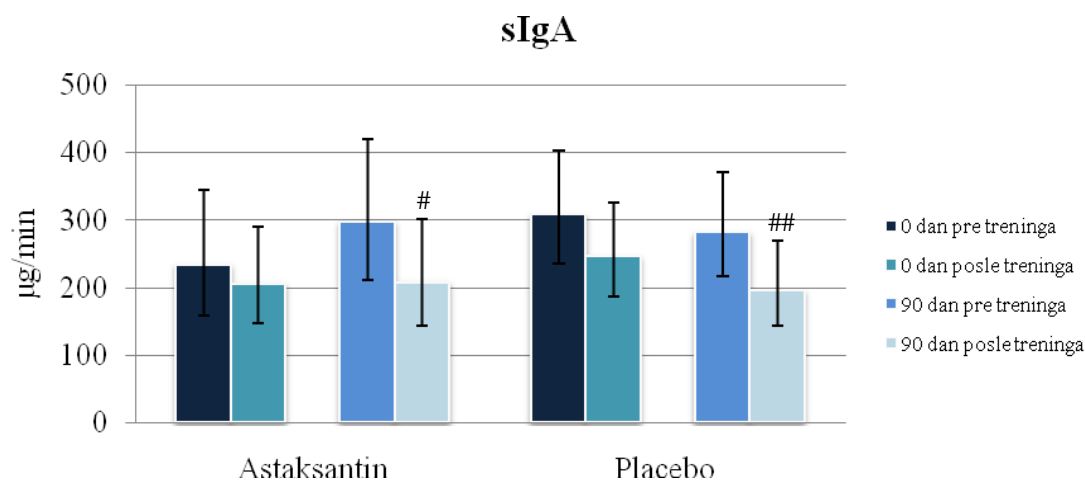
U okviru ovog istraživanja ispitivan je i uticaj intenzivnog jednokratnog treninga na početku i na kraju perioda suplementacije na mukozni imunitet. Ispitivani parametri: salivarni protok, apsolutna koncentracija i brzina izlučivanja sIgA su prikazani na slikama 50, 51 i 52.



Slika 50. Salivarni protok (mL/min) pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM.



Slika 51. Apsolutna koncentracija sIgA (μ g/mL) pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i interval pozdanosti. $p < 0,05$ (##): značajna razlika u odnosu na 90 dan pre treninga.



Slika 52. Brzina izlučivanja sIgA ($\mu\text{g}/\text{min}$) pre i posle treninga, na početku i na kraju perioda suplementacije u Asx i placebo grupi. Rezultati su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i interval pouzdanosti. $p < 0,05$ (#) i $p < 0,01$ (##):: značajna razlika u odnosu na 90 dan pre treninga.

Izmerene vrednosti ispitivanih parametara smo poredili primenom dvofakorske ANOVE sa ponavljanjem. Intenzivan trening i suplementacija nisu uticali na salivarni protok kod mladih fudbalera. Intenzivan trening u trajanju od 2 sata uslovljava pad apsolutne koncentracije sIgA u obe grupe mladih fudbalera (glavni uticaj akutnog treninga, $p < 0,001$). Ipak, ove promene su dostigle statističku značajnost na kraju, ali ne i na početku perioda suplementacije (uticaj interakcije redovnih i jednokratnog treninga, $p < 0,05$). Pokazan je i značajan uticaj interakcije suplementacije i redovnih treninga ($p < 0,05$), sa povećanjem koncentracije sIgA u suplementiranoj grupi i bez promena u placebo grupi. Brzina izlučivanja sIgA se smanjuje kao posledica intenzivnog treninga u obe grupe fudbalera, ali su ove promene dostigle statističku značajnost samo na kraju posmatranog perioda (glavni uticaj akutnog treninga, $p < 0,001$).

5. DISKUSIJA

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da intenzivni treninzi kod fudbalera uzrokuju povećanu produkciju slobodnih radikala, što dovodi do nastanka oksidativnog stresa i značajnog oštećenja mišićnih ćelija. Pored toga, pokazano je da treninzi i kod fudbalera, ali i kod rekreativaca uzrokuju smanjenje nivoa sekretornog IgA u salivi, čime je ugrožen mukozni imunitet sportista.

Suplementacija astaksantinom delimično smanjuje povećanu produkciju slobodnih radikala i pruža značajnu podršku u očuvanju antioksidativne zaštite kod mladih fudbalera. Primena astaksantina u toku takmičarske sezone je imala povoljan efekat unapređenja aktivnosti enzima paraoksonaze 1 i ukupan sadržaj sulfhidrilnih grupa. Pokazan je i povoljan efekat suplementacije astaksantina na smanjenje oštećenja mišićnih ćelija. Suplementacija astaksantinom je imala povoljan efekat na produkciju sIgA kod mladih fudbalera u periodu intenzivnih treninga tokom sezone. Uzimanje aromatizovanog napitka na bazi surutke može biti od koristi tokom dugotrajnih intenzivnih treninga u cilju održavanja salivarnog protoka, a na taj način i nivoa sIgA u salivi.

5.1. Uticaj dugotrajnog treniranja na oksidativnostresni status mladih fudbalera

Od prvog otkrića da se nivo lipidne peroksidacije povećava nakon akutnog aerobnog treninga, ispitivanje povezanosti oksidativnog stresa i fizičke aktivnosti je tema velikog broja studija. Na osnovu radova koji su objavljeni, aerobno i anaerobno vežbanje određenog intenziteta mogu dovesti do povećane produkcije slobodnih radikala, što za posledicu može imati oksidativna oštećenja važnih biomolekula: lipida, proteina i DNK (Powers SK, 2004). Ipak, povećana produkcija slobodnih radikala u toku treninga predstavlja i neophodan stimulus za indukciju optimalnog adaptivnog odgovora i povećanja aktivnosti antioksidativnih zaštitnih mehanizama. (Fisher-Wellman K, 2009).

Ispitivanja uticaja dugogodišnjeg (10 i više godina) treniranja fudbala na parametre oksidativnog stresa su retka. U jednoj studiji je pokazan niži nivo oksidativnog stresa kod fudbalera u odnosu na ispitanike koji se ne bave fizičkom aktivnošću, što je zaključeno na osnovu nižeg bazalnog nivoa MDA (Metin G, 2003). Sa druge strane, brojne studije su pokazale povećanje biomarkera oksidativnog stresa kao posledicu aerobnih i anaerobnih treninga. Mladi rvači imaju značajno viši nivo lipidnih peroksida i viši TOS u poređenju sa kontrolnom grupom (Kürkçü R, 2010), dok je kod džudista pokazan povećan nivo MDA (El Abed K, 2011). Nivo TBKRS je značajno veći kod kajakaša i kanuista u odnosu na pojedince bez fizičke aktivnosti (Teixeira VH, 2009). Pokazano je da se kod odbojkašica nivo reaktivnih kiseonikovih metabolita značajno povećava, dok nivo superoksidnog anjona značajno opada sa godinama treniranja (Martinovic J, 2009). U našoj studiji, fudbaleri su imali značajno viši nivo TBKRS u plazmi u odnosu na kontrolnu grupu. Pored toga, uočen i viši nivo AOPP, ali ta razlika nije dostigla statističku značajnost. Rezultati dobijeni u ovoj studiji ukazuju da su fudbaleri koji imaju redovne, intenzivne treninge i utakmice, izloženi većem oksidativnom stresu u odnosu na osobe koje nemaju fizičku aktivnost (Tabela 12).

SOD je glavni enzim koji neutrališe superoksidni anjon u organizmu. Ovaj enzim ima veoma važnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti tokom dugotrajnih i intenzivnih treninga (Finud J, 2006). Mladi fudbaleri, ispitivani u ovoj studiji, su imali značajno

veću aktivnost SOD u odnosu na kontrolnu grupu, što je u skladu sa predhodnim studijama na fudbalerima (Cazzola R, 2003; Brites FD, 1999). Veća aktivnost SOD je uočena i kod karatista (Naghizadeh H, 2009), rukometaša (Djordjevic D, 2011), ragbista (Evelson P, 2002), džudista (El Abed K, 2011), skakača (Ortenblad N, 1997), košarkaša (Melikoglu MA, 2008). Povećana aktivnost enzimske antioksidativne zaštite sprečava štetne efekte slobodnih radikala i oksidativnog stresa. Smatra se da promene u redoks statusu uzrokovane redovnim treninzima aktiviraju intracelularne signalne puteve i povećavaju ekspresiju antioksidativnih enzima (Harris DE, 1992).

Redovni treninzi povećavaju nivo i neenzimskih antioksidativnih mehanizma zaštite, kao što su ukupni antioksidativni kapacitet, zatim vitamin C, vitamin E ili mokraćna kiselina (Brites FD, 1999; Cazzola R, 2002; Evelson P, 2002). Tioli, čija se aktivnost zasniva na prisustvu sulfhidrilnih grupa, su integralni deo neenzimske antioksidativne zaštite i igraju važnu ulogu u regulaciji produkcije slobodnih radikala. U našoj studiji, uočili smo značajno povećanje ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa kod fudbalera, što je značajan doprinos ukupnom povećanju kapaciteta antioksidativnih mehanizama. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima studije Martinovic i sar. koji pokazuju značajno povećanje nivoa SH grupa kod odbojkašica sa godinama treniranja (Martinovic J, 2009). Za razliku od mešovitih i aerobnih sportova, anaerobni treninzi dovode do smanjenja ukupnog sadržaja SH grupa, što je pokazano sportista koji treniraju sa opterećenjem, koji su imali dvostruko niže vrednosti nivoa SH grupa u odnosu na fizički neaktivne pojedince. Smatra se da trening, naročito trening sa opterećenjem, smanjuje nivo ukupnih tiola u plazmi, verovatno zbog povlačenja tiola u aktivne mišiće (Zembron-Lacny A, 2009).

Uticaj redovne fizičke aktivnosti na aktivnost enzima PON1 još uvek nije precizno definisan. Pokazano je se aktivnost PON1 povećava kod pojedinaca koji imaju redovnu fizičku aktivnost u odnosu na osobe sa povremenom ili bez fizičke aktivnosti (Arslan C, 2005). Aktivnost PON1 prema supstratu paraoksonu je veća kod košarkaša u odnosu na sedentarne osobe (Yilmaz N, 2007). Kod odbojkašica dolazi do povećanja aktivnosti PON1 prema paraoksonu, ali ne i prema diazoksonu (Martinovic J, 2009). Jedno od objašnjenja je da redovni treninzi uzrokuju povećanu produkciju reaktivnih kiseonikovih jedinjenja, koji mogu indukovati transkripciju gena za endogene enzimske antioksidanse, naročito PON1 (Sun Y i Oberley LW, 1996). Pored toga, moguće je da je

povećana PON1 aktivnost kod fizički aktivnih osoba posledica smanjenja oksidativnog stresa zbog povećanog kapaciteta antioksidativne zaštite.

Ipak, neke studije nisu pokazale povećanje PON1 aktivnosti kod osoba koje se redovni bave sportom (Richter B, 2005; Brites F, 2006). U skladu sa tim, naši rezultati pokazuju da nema razlike u aktivnosti enzima PON 1 između sportista i osoba koje nemaju redovnu fizičku aktivnost (Tabela 12). Takođe je pokazano da se ekspresija PON1 kod pacova ne menja pod uticajem treniranja. Sa druge strane, nivo PON3 se značajno povećava pod uticajem redovnih treninga, što ukazuje da je fizička aktivnost utiče na PON3, ali ne i na PON1 (Romani R, 2009). Pored toga, poboljšana aktivnost antioksidativne zaštite nije bila dovoljna da smanji oksidativni stres kome su fudbaleri izloženi. S obzirom da prekomerna produkcija slobodnih radikala i peroksidacijalipida značajno smanjuju aktivnost PON1 (Aviram, 1999), moguće je da oksidativni status kod fudbalera sprečava povećanje aktivnosti PON1.

Uzimajući u obzir da je PON1 vezan za HDL-C, moguće je da je aktivnost PON1 u korelaciji sa HDL-C. Ipak u ovoj studiji nije pokazana veza između nivoa HDL-C i aktivnosti PON1. PON1 je vezan za malu populaciju HDL-C (10%) (James RW i Deakin SP, 2004), pa je malo verovatno da ukupni HDL-C predstavlja dobar biomarker za mali deo HDL-C koji nosi PON1 i za aktivnost PON1.

Redovna fizička aktivnost ima povoljan efekat na lipidni profil sportista. Pokazan je manji nivo triglicerida, HDL-C i LDL-C, a viši nivo HDL-C kod sportista u odnosu na osobe koje se ne bave sportom (Nikolaidis MG, 2003; Popovic M, 2010; Brites FD, 1999; Evelson P, 2002). Ipak, naša studija nije pokazala značajne razlike u parametrima lipidnog profila između sportista i sedentarnih osoba (Tabela 10), što je u skladu sa nekim ranije objavljenim rezultatima (Cazzola R, 2002; Ghloom K, 2011).

Postoji veliko interesovanje za nivo parametara krvne slike kod sportista, s obzirom na ulogu u transportu kiseonika, što je od ključnog značaja za sportske performanse. Vrednosti ovih parametara kod sportista se nisu razlikovale u odnosu na osobe koje nisu fizički aktivne. Iako je nekoliko autora pokazalo smanjenje Hb, Hct i broja crvenih krvnih zrnaca kod sportista, drugi smatraju da ove promene nisu uslovljene samo fizičkom aktivnošću, već da zavise i od specifičnosti sporta (Guglielmini C, 1989; Green HJ, 1991). Rezultati ovog istraživanja ne pružaju dokaz da redovno treniranje fudbala negativno utiče na parametre krvne slike (Tabela 11).

Na osnovu rezultata ovog istraživanja, možemo zaključiti da dugogodišnje treniranje fudbala uslovljava povećanje nivoa neenzimskih antioksidanasa i povećanje aktivnosti antioksidativnih enzima. Ipak, i pored toga mladi fudbaleri su, usled redovnih, intenzivnih treninga, izloženi većem nivou oksidativnog stresa i oksidativnog oštećenja u odnosu na fizički neaktivne osobe.

5.2. Uticaj treniranja i suplementacije astaksantinom na aktivnost paraoksonaze 1 i nivo oksidativnog stresa kod mladih fudbalera

Razumevanje promena u redoks ravnoteži koje nastaju kao posledica redovnih treninga u fudbalu u toku sezone može pružiti nova saznanja o efektima koje fudbal ima na organizam igrača i mogućnostima primene nutritivnih preventivnih mera koje se zasnivaju na suplementaciji antioksidansima.

Uticaj redovne fizičke aktivnosti na aktivnost enzima PON1 još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Neke studije su pokazale da je aktivnost PON1 prema različitim supstratima veća kod osoba koje se bave sportom u odnosu na fizički neaktivne osobe (Evelson P, 2002; Arslan C, 2005). Kontinuirana produkcija reaktivnih kiseonikovih jedinjenja koja nastaje u toku fizičke aktivnosti može hipotetički stimulisati transkripciju gena za antioksidativne enzime (Sun Y, 1996). Ipak, nisu sve studije pokazale povećanje aktivnosti PON1 kod fizički aktivnih pojedinaca (Richter B, 2005). Pored toga, aerobno treniranje visokog i umerenog intenziteta u periodu od 8 nedelja nije imalo značajan uticaj na aktivnost PON1 kod zdravih fizički neaktivnih muškaraca (Gharakhanlou R, 2007). Redovni treninzi u periodu od 6 nedelje nisu imali značajan uticaj na aktivnost PON1 kod profesionalnih obojkašica (Martinovic J, 2011). U skladu sa tim, naši rezultati pokazuju da redovni treninzi u periodu od 90 dana ne utiču na aktivnosti PON1 prema paraoksonu i diazoksonu. Moguće je da je aktivnost PON1 već dostigla svoj maksimum kao posledica adaptivnog odgovora na treniranje fudbala u periodu od 10 godina, kao što je pokazano kod elitnih odbojkašica (Martinovic J, 2009).

Suplementacija sa Asx ispitivana u ovoj studiji imala je pozitivan efekat na povećanje aktivnosti PON1 prema paraoksonu (Slika 17). Pored toga, u Asx grupi pokazano je povećanje aktivnosti PON1 prema diazoksonu (Slika 18). Naši rezultati su

u skladu sa predhodno objavljenim rezultatima koje pokazuju da ishrana i antioksidansi mogu imati modulatoreni efekat na aktivnost PON1. Jarvik GP i sar. (2002) su pokazali da je unos vitamina C u vezi sa povećanjem aktivnosti PON1. Aviram M i sar. (2004) su uočili značajno povećanje aktivnosti PON1 kod pacijenata sa stenozom karotide koji su redovno konzumirali sok od nara, koji je bogat polifenolima. Suplementacija α -tokoferolom je imala povoljan efekat na paraoksonaznu i arilesteraznu aktivnost ovog enzima kod mladih košarkaša (Tsakiris S, 2009). Uzimajući u obzir da aktivnost enzima PON1 može biti značajno smanjena pod uticajem slobodnih radikala (Nguyen SD, 2003), moguće je da antioksidativne karakteristike Asx mogu zaštititi PON1 od inaktivacije uzrokovane oksidativnim modifikacijama.

PON1 sadrži 3 ostatka aminokiseline cistein na položajima 42, 284 i 353 (Cys-42, Cys-353 i Cys-284). Cys-42 i Cys-353 su vezane disulfidnom vezom, koja je esencijalna za hidrolaznu aktivnost enzima. Ostatak Cys-284 ima slobodnu sulfhidrilnu grupu, koja je od značaja za esteraznu aktivnost enzima, što ukazuje da je Cys-284 blizu ili u aktivnom centru (Sorenson RC, 1995). Slobodan ostatak Cys-284 je takođe neophodan i za protektivnu ulogu enzima protiv oksidacije LDL-holesterola (Aviram M, 1998). Pokazano je da izloženost PON1 hidroksil radikalima i superoksidnom anjonu značajno smanjuje aktivnost, ali i broj slobodnih sulfhidrilnih grupa (Jaouad L, 2006). Stoga, određeni antioksidansi mogu imati povoljan efekat na aktivnost PON1 (Aviram M, 2004). Povećanje aktivnosti PON1 prema paraoksonu i diazoksonu kod mladih fudbalera uočeno nakon suplementacije Asx, može biti posledica zaštite sulfhidrilnih grupa od oksidativnih modifikacija u aktivnom centru enzima.

Pored toga, kod fudbalera koji su suplementirani Asx uočeno je i povećanje ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa u plazmi posle 90 dana redovnih treninga i suplementacije, što ukazuje da Asx može pružiti dodatnu zaštitu od oksidativnih modifikacija (Slika 15). Predhodne studije su pokazale da suplementacije antioksidansima može kompenzovati smanjenje koncentracije ukupnih tiola i GSH, koje nastaje kao posledica intenzivne fizičke aktivnosti (Bonina FP, 2005; Naziroglu M, 2010).

Veza između PON1 i HDL-C je važna za održavanje normalne aktivnosti enzima. Ipak, PON1 je vezan za malu subpopulaciju HDL čestica (10%), čime se može

objasniti nepostojanje korelacije između PON1 aktivnosti i nivoa HDL-C u ovom istraživanju (James RW, 2004).

PON1_{Q192R} fenotipovi su određivani metodom dva supstrata (paraoksonazna i diazoksonazna aktivnost). PON1_{Q192} fenotip karakterišu visoke DZOazne aktivnosti, a PON1_{R192} fenotip, usled reakcionih uslova niske DZOazne aktivnosti. Ovakav način analize, znači, merenje PON1 aktivnosti prema paraoksonu i diazoksonu a zatim određivanje PON1_{Q192R} fenotipa, Richter i Furlong (Jarvik GP, 2000) su definisali kao određivanje "PON1 statusa" i pokazali da ovakav pristup enzimu PON1 daje mnogo više informacija nego određivanje PON1 genotipa, a takođe je i korisno u epidemiološkim studijama koje istražuju vezu između PON1₁₉₂ polimorfizma i aktivnosti enzima PON1 u različitim bolesima. Dokazane su supstrat-zavisne razlike između PON1_{Q192R} izoformi. PON1_{R192} varijanta ima jače izražen afinitet prema paraoksonu kao supstratu, dok prema dizaoksonu, ne postoji razlika u afinitetima između PON1_{Q192} i PON1_{R192} izoformi, ali su reakcioni uslovi podešeni tako da smanjuju afinitet R varijante prema ovom supstratu (Mackness B, 2008). Ove razlike u katalitičkoj aktivnosti između PON1_{Q192} i PON1_{R192} izoformi omogućava razlikovanje u tri fenotipa PON1_{Q192}, PON1_{Q192R} i PON1_{R192}. Fenotipovi se razlikuju i prema nivou zaštite od oksidativnih oštećenja LDL i HDL čestica, jer PON1_{Q192} pruža bolju zaštitu u odnosu na PON1_{R192}.

Evaluacijom raspodele PON1_{Q192R} fenotipova kod mladih fudbalera ustanovljeno je da postoji razlika u raspodeli fenotipova između suplementirane i placebo grupe (rezultat je na granici značajnosti), što je prikazano na slici 19. U skladu sa tim, na početku studije DZOazna aktivnost i ukupni sadržaj SH grupa je bio niži, dok je PAB bio viši u Asx u odnosu na placebo grupu, ali sa marginalno značajnom razlikom. DZOazna aktivnost i sadržaj SH grupa mogu biti smanjene kao posledica povećanog PAB u Asx grupi. U jednoj novijoj studiji uočena je jaka povezanost između PAB i smanjene DZOazne aktivnosti u toku trudnoće koja je, kao i sport, model za proučavanje oksidativnog stresa (Stefanovic A, 2012). Sportisti su, kao i trudnice, zdravi mladi ljudi u fiziološki izmenjenim stanjima, koje karakteriše povećana produkcija slobodnih radikala i veća mogućnost nastanka oksidativnog stresa. Ipak, do kraja studije, nije bilo razlike u ovim parametrima između Asx i P grupe.

Suplementacija Asx može biti značajna u cilju smanjenja PAB i povećanja DZOazne aktivnosti i sadržaja SH grupa kod sportista koji su podložniji oksidativnom stresu.

Postoje dokazi da redovna fizička aktivnost smanjuje nivo triglicerida, ukupnog i LDL holesterola, dok povećava nivo HDL holesterola. Ove promene u lipidnom profilu sportista su posledica uticaja redovne fizičke aktivnosti na enzime koji učestvuju u metabolizmu lipoproteina, kao što su lipoproteinska lipaza i lecitin holesterol acil transferaza (Evelson P, 2002). Ipak, u grupi mladih fudbalera uočeno je prolazno smanjenje HDL holesterola i povećanje ukupnog i LDL holesterola tokom 90 dana redovnih treninga i suplementacije.

Iako je u predhodnim studijama pokazan povoljan efekat suplementacije Asx-om na lipidni status, rezultati našeg istraživanja ne ukazuju na to (Juan Y, 2011). Ispitanici u našoj studiji su bili mladi, zdravi, aktivni ljudi kod kojih su parametri lipidnog profila u granicama referentnih vrednosti, što može biti razlog nedostatka značajnog efekta Asx.

SOD je jedan od glavnih enzimskih antioksidanasa koji neutrališe superoksidni anjon radikal. Povećanje aktivnosti SOD odgovara poboljšanoj otpornosti na oksidativni stres (Urso ML, 2003). Do sada objavljene studije pokazuju da sportisti imaju veću aktivnosti SOD u krvi i u mišićima u odnosu na sedenterne osobe (Brites FD, 1999; Cazzola R, 2003; Metin G, 2003) i da se aktivnost SOD povećava kao odgovor na oksidativni stress usled redovnih treninga (Marzatico, 1997). Ipak, neke studije nisu uočile promene aktivnosti SOD (Tauler P, 1999; Tian Y, 2010), a neke su pokazale značajno smanjenje aktivnosti SOD neposredno nakon intenzivnog aerobnog treninga (Hubner-Wozniak E, 1994; Hessel E, 2000; Neubauer O, 2008).

Redovni treninzi u periodu od 90 dana su uzrokovali smanjenje aktivnosti SOD u miru u ispitivanoj grupi fudbalera. Kao što se može videti na slikama 14 i 16, značajno smanjenje aktivnosti SOD je praćeno značajnim povećanjem nivoa $O_2^{\bullet-}$, što ukazuje da kontinuirani, intenzivni treninzi i utakmice izlažu fudbalere povećanom oksidativnom stresu u toku sezone. Modifikacija aktivnosti enzima nakon intenzivnog treninga može ići u smeru adaptacije, odnosno povećanja aktivnosti ili smanjenja aktivnosti ako oksidativni stress prevazilazi kapacitete antioksidativne zaštite (Finaud J, 2006). Visoka produkcija slobodnih radikala dovodi do promene u intracelularnom redoks statusu statusu i/ili modifikaciji katalitičkih centara antioksidativnih enzima, što

zajedno dovodi do inhibicije aktivnosti (Knez WL, 2007). Povoljan efekat Asx na aktivnost enzima SOD je pokazan u nekoliko *in vitro* studija (Tripathi DN, 2009; Chan K, 2009; Bolin AP, 2010). Naša studija, prva humana studija koja ispituje uticaj suplementacije Asx na aktivnost SOD, nije pokazala značajan uticaj kod mladih fudbalera.

Redovni treninzi i utakmice uzrokuju povećanje bazalnog oksidativnog stresa kod fudbalera što je pokazano preko povećaja nivoa MDA (Zoppi CC, 2006; Tauler P, 2008). U našoj studiji, uočen je značajan uticaj redovnih treninga na nivo TBKRS u obe grupe fudbalera, što je prikazano na slici 12. Viši nivo TBKRS na početku studije ukazuje na visok fiziološki stres kome su fudbaleri izloženi. Povećanje nivoa TBKRS u drugoj polovini posmatranog perioda može biti posledica treninga većeg intenziteta u ovom periodu, kao i kumulativnog efekta fizičke aktivnosti tokom sezone.

Rezultati ranijih studija ukazuju da je Asx jedan od najefikasnijih antioksidanasa koji sprečava lipidnu peroksidaciju i oksidativni stress i u *in vitro* and *in vivo* sistemima (Tripathi DN, 2009; Chan K, 2009; Choi HD, 2011). U ovoj studiji uočen je značajno niži nivo TBKRS u suplementiranoj grupi u odnosu na placebo posle 45 dana redovnih treninga i suplementacije. Moguće je da Asx može smanjiti peroksidaciju lipida u toku treniranja manjeg intenziteta, u toku prvog dela sezone, ali ne i u periodima intenzivnijih treninga. Pored toga, uticaj Asx može biti i modifikovan niskim unosom dijetarnih antioksidanasa tokom studije. U većini do sada izvedenih humanih studija primenjena doza Asx je bila od 6 mg do 12 mg dnevno u periodu od 4 do 8 nedelje. Uzimajući u obzir da su ispitanici u ovoj studiji zdravi, mladi sportisti i da je period trajanja studije bio 12 nedelja, izabrana je doza od 4 mg.

Promene nivoa AOPP su sledile promene u nivou TBKRS tokom posmatranog perioda, ali bez statistički značajne razlike. I predhodne studije nisu pokazale značajne oksidativne promene na proteinima tokom tri meseca redovnih treninga (Zoppi CC, 2006; Tauler P, 2008). AOPP je pouzdan biomarker oksidativnih promena na proteinima nastalih usled dugotrajnog delovanja oksidativnog stresa, kao što je duži period intenzivnih treninga. (Neubauer O, 2008). Moguće je da primenjen program treninga nije dovoljno intenzivan i/ili dug da bi uzrokovao značajnu oksidaciju proteina. Pored toga, na nivo AOPP nije uticala ni suplementacija Asx-om. Grupa mladih fudbalera je imala niži nivo AOPP u poređenju sa vrednostima prijavljenim u

drugim studijama (Martinovic J, 2009; Pialoux V, 2009), pa je moguće da su endogeni antioksidativni mehanizmi dovoljni da spreče značajne promene u nivou AOPP tokom posmatranog perioda.

Visoke vrednosti TOS, čije su glavne komponente vodonik peroksid i lipidni peroksidi, i PAB, koji određuje prooksidativno opterećenje i antioksidativni kapacitet u jednom testu, na početku studije ukazuju da fudbal može značajno da poveća produkciju reaktivnih kiseonikovih jedinjenja i izazove oksidativni stres (Slika 20 i 22). Ipak, redovni treninzi dovode do smanjenja produkcije slobodnih radikala, što je verovatno posledica povećanja aktivnosti endogenih antioksidativnih mehanizama zaštite. Nije uočena značajna razlika između suplementirane i P grupe, što ukazuje da adaptacija endogenih zaštitinih mehanizama obezbeđuje značajniju zaštitu u odnosu na egzogene antioksidanse.

Ispitivanje promena u hematološkim parametrima privlači veliku pažnju zbog izuzetnog uticaja na fizičke performanse sportiste. Rezultati naše studije, prikazani u tabeli 16, pokazuju smanjenje broja eritrocita, nivo hemoglobina, hematokrita, MCV i ukupnih proteina seruma u posmatranom periodu, dok se nivo bilirubina povećava tokom 90 dana redovnih treninga. Rezultati ranijih studija takođe pokazuju smanjenje broja eritrocita, Hb i Hct kod sportista naročito sportova izdržljivosti, a posledica su povećanja zapremine plazme. Povećanje zapremine plazme je nastaje zbog zadržavanja tečnosti i može povećati kapacitet vežbanja usled povećanja udarnog volumena i smanjenja viskoziteta krvi (Schmidt W, 1989). Smanjenje Hb i Hct i povećanje koncentracije bilirubina može da bude i posledica hemolize eritrocita (Eichner ER, 1985). Iako su opisane promene dostigle statističku značajnost srednja vrednost ovih parametara se i dalje nalaze u opsegu referentnih vrednosti.

Nivo gvožđa i naročito nivo feritina mogu biti sniženi kod sportista zbog bržeg metabolizma gvožđa, povećane sinteze nosećih proteina gvožđa, zatim poremećaja u intestinalnoj apsorpciji i povećanog gubitka preko znoja, gastrointestinalnog trakta i bubrega (Schumacher YO, 2001). Ipak, u našoj grupi sportista nivo gvožđa je ostao nepromenjen tokom redovnih treninga, dok se nivo feritina povećava. Povećana sinteza feritina može biti odgovor na povećanje oksidativnog stresa usled intenzivnih treninga kod sportista (Orino K, 2001).

Naporan program treniranja u toku sezone povezan je sa povećanom produkcijom slobodnih radikala i oksidativnim stresom kod mladih fudbalera. Ipak, uočeno smanjenje oksidativnog statusa (prikazano kroz TOS i PAB) verovatno je posledica adaptivnog odgovora na intenzivne treninge. Suplementacija Asx ima povoljan efekat na unapređenje aktivnosti enzima PON1 i ukupan nivo SH grupa kod mladih fudbalera. Suplementacija može biti od posebnog interesa za sportiste koji su podložniji oksidativnom stresu kao dodatna podrška endogenim enzimskim i neenzimskim zaštitnim sistemima.

5.3. Uticaj intenzivnog treninga i suplementacije astaksantinom na oksidativnostresni status mladih fudbalera

Većina studija je pokazala značajno povećanje produkcije ROS i smanjenje efikasnosti antioksidativnih sistema u tkivima i krvi profesionalnih sportista nakon intenzivnog i dugotrajnog treninga (Alessio HM, 1993; Paker L, 1997). Iako, povećana produkcija ROS kao posledica intenzivne fizičke aktivnosti predstavlja neophodan stimulus za adaptivni odgovor i povećanje aktivnosti antioksidativne zaštite, svakako može da uzrokuje oksidativni stres i fiziološka oštećenja (Bloomer RJ, 2007). Iz tog razloga, suplementacija antioksidansima u periodima intenzivnih treninga i takmičenja, kao i u slučaju nedovoljnog unosa antioksidanasa putem hrane, može imati povoljan efekat na smanjenje oksidativnog stresa kod sportista.

Intenzivni trening utiče na nivo neenzimskih antioksidanasa. Vrlo često se uočava povećanje totalnog antioksidativnog kapaciteta (TAC) kao odgovor na oksidativni stress tokom treninga (Neubauer O, 2008; Ascensão A, 2008). Povećanje TAC je verovatno posledica mobilizacije vitamina E i C iz rezervi u cilju borbe protiv slobodnih radikala (Finaud J, 2006) ili zbog povećanja produkcije mokraćne kiseline zbog aktivacije ksantin oksidaze tokom treninga (Teixeira VH, 2009; Ascensão A, 2008). Ipak, antioksidativni kapacitet može biti privremeno smanjen tokom ili neposredno posle treninga (Watson TA, 2005), nakon čega se povećava tokom perioda oporavka (Tsakiris S, 2009). U ovoj studiji, trening je uzrokovao značajno smanjenje TAS kod fudbalera u placebo grupi i na početku i na kraju posmatranog perioda, uprkos povećanju koncentracije mokraćne kiseline u plazmi. Slične promene su uočene u Asx

grupi pre suplementacije, što ukazuje da se antioksidansi koji se nalaze u plazmi odmah koriste za neutralizaciju povećane produkcije slobodnih radikala (Slika 32). Watson i sar. (2005) su uočili da ishrana siromašna antioksidansima u periodu od 15 dana nije značajno uticala na TAC, iako je TAC bio niži kod ispitanika sa nižim unosom dijetarnih antioksidanasa u poređenju sa sportistima koji su imali ishranu bogatu antioksidansima. Nutritivna analiza je pokazala da fudbaleri u ovoj studiji imaju ishranu koja ne zadovoljava RDA vrednosti za vitamin A i E u periodu od najmanje 3 meseca. Moguće je da endogeni antioksidansi nisu dovoljni da kompenzuju nizak dijetarni unos antioksidanasa i spreče značajno smanjenje TAS tokom intenzivnog treninga. Iako Asx suplementacija nije uticala na TAS nivo u miru, kao i u drugim studijama (Margaritis I, 2003; Teixeira VH, 2009), moguće je svojim antioksidativnim delovanjem sprečava značajnu potrošnju rastvornih antioksidansa u plazmi tokom intenzivnog treninga.

Mokraćna kiselina je snažan antioksidans, jer kompleksira prooksidativne metale - gvožđe i bakar, ali može i direktno da reaguje sa ROS. Tokom vežbanja visokog intenziteta i uslovima ishemije, purinski nukleotidni sistem je vrlo aktivan i uslovljava povećanu sintezu hipoksantina u mišićima i plazmi. Hipoksantin se posredstvom XO konvertuje u mokraćnu kiselinu uz nastanak superoksidnog anjona. U našoj studiji, nivo mokraćne kiseline kod mladih fudbalera, raste posle intenzivnog treninga na početku studija, što je u skladu sa drugim studijama (Teixeira VH, 2009; Asensao A, 2008). Stoga je verovatno aktivacija ksantin oksidaze, barem delimično, odgovorna za oksidativni stres i oštećenja tokom intenzivnih treninga kod fudbalera. Ipak, nakon tri meseca redovnih treninga, nivo mokraćne kiseline ostaje nepromenjen posle intenzivnog treninga fudbalera. Moguće je da se aktivnost XO menja kao posledica adaptivnog odgovora na intenzivnu fizičku aktivnost u periodu od 3 meseca.

Već je dokazano da intenzivna fizička aktivnost dovodi do povećanja nivoa bilirubina (Kratz A, 2002; Wu HJ, 2004). Pored toga što bilirubin ima snažan antioksidativni potencijal, povećan nivo bilirubina je posledica hemolize. Intenzivan trening na početku posmatranog perioda kod fudbalera izaziva značajno oštećenje eritrocita i povećanje nivoa bilirubina u krvi, dok se na kraju nivo bilirubina se ne menja značajno nakon intenzivnog treninga ni u jednoj grupi fudbalera. Pored toga, niži nivo bilirubina u suplementiranoj grupi fudbalera posle 90 dana je verovatno posledica protektivnog dejstva Asx na membranu eritrocita i prevenciju hemolize.

Veliki broj studija je pokazao da fizička aktivnost submaksimalnog i maksimalnog intenziteta uzrokuju peroksidaciju lipida (Silva LA, 2009; Mastaloudis A Morrow JD, 2004; McAnulty SR, 2005). I fudbalska utakmica značajno povećava nivo TBKRS (Fatouros IG, 2010), nivo MDA (Tauler P, 2008) i nivo hidroperoksida u serumu (Kingsley MI, 2005). Pored toga, naši rezultati ukazuju da redovni treninzi uzrokuju povećanje bazalnog nivoa TBKRS u grupi fudbalera u odnosu na fizički neaktivne osobe. Ipak, nismo uočili značajan uticaj intenzivnog treninga ni suplementacije na nivo TBKRS ni na početku ni na kraju posmatranog perioda (Slika 23). Moguć razlog za nedostatak promene nivoa TBKRS kod fudbalera jeste uzimanje jednog uzroka krvi, nakon treninga. Promene nivoa različitih parametara oksidativnog stresa pokazuju specifičan vremenski tok. TBKRS nivo ostaje nepromenjen u ranom periodu oporavka, 2-4h nakon fizičke aktivnosti, dok se njegova koncentracija povećava u kasnijem periodu oporavka (Tian Y, 2010).

Nisu zapažene značajne promene u nivou AOPP u našoj grupi fudbalera nakon intenzivnog treninga, što je u skladu sa drugim studijama koje nisu detektovale povećanje oksidacije proteina nakon treninga ili fudbalskog meča (Zoppi CC, 2006; Tauler P, 2008).

Nakon 90 dana redovnih treninga i suplementacije, dve grupe fudbalera su različito reagovala na intenzivan trening. Naime, pokazano je značajno povećanje nivoa $O_2^{\bullet-}$ samo u placebo grupi, dok se produkcija $O_2^{\bullet-}$ tokom treninga u suplementiranoj grupi nije menjala, što ukazuje da Asx, može barem delom da smanji povećanu produkciju slobodnih radikala tokom i nakon intenzivnih treninga (Slika 25). Efekat smanjenja produkcije $O_2^{\bullet-}$ je do sada pokazan samo u *in vitro* studijama (Liu X, 2009; Bolin AP, 2010).

Rezultati ove studije ukazuju da je intenzivni fudbalski trening povezan sa povećanom produkcijom slobodnih radikala i oksidativnim stresom, koji mogu smanjiti kapacitet antioksidativne zaštite. Suplementacija Asx može delimično sprečiti povećanu produkciju slobodnih radikala i trošenje neenzimske antioksidativne zaštite kod mladih fudbalera. Uzimajući u obzir modifikaciju antioksidativnih zaštitinih mehanizama pod uticajem intenzivnih fudbalskih treninga i nedovoljan unos dijetarnih antioksidanasa, suplementacija Asx može povoljno uticati na antioksidativni odbrambeni sistem kod fudbalera u toku sezone.

5.4. Uticaj suplementacije astaksantinom na oštećenje mišića kod mladih fudbalera

U ovom delu istraživanja ispitivali smo da li primena Asx može sprečiti ili smanjiti oštećenja mišića u toku sezone kod mladih fudbalera u realnom okruženju, dok prate svoj uobičajeni način ishrane, program treniranja i takmičenja

Smatra se da aktivnost mišićnih enzima CK i LDH u serumu odražava promene u normalnoj strukturi membrane mišićnih ćelija, koje nastaju kao posledica oštećenja mišića i čine je permeabilnom za ove molekule. U tom smislu, povećane aktivnosti enzima CK i LDH u serumu smatraju se indirektnim markerom oštećenja mišićnih vlakana (Bloomer RJ, 2007). Pokazano je da je aktivnost AST je značajno povećana odmah nakon intenzivnog vežbanja i ostaje povišena i posle 24 h. Iz tog razloga, kod sportista povećane vrednosti AST treba razmatrati zajedno sa CK i LDH (Lippi G, 2008).

U našoj studiji aktivnost mišićnih enzima AST, CK i LDH su značajno povišene iznad referentnih vrednosti tokom posmatranog perioda, što se može videti na slikama 35,36 i 37. Intenzivan trening dovodi do značajnog povećanja aktivnost enzima u serumu i na početku i na kraju trajanja studije, što ukazuje na izuzetno visoke fiziološke zahteve fudbala i na značajno oštećenje mišića nakon svakog treninga.

Ipak, tokom 90 dana redovnih treninga uočeno je značajno smanjenje bazalnih aktivnosti mišićnih enzima AST, CK i LDH u serumu u obe grupe fudbalera. Smanjenje vrednosti ovih indirektnih parametara je deo adaptivnog odgovora na intenzivnu fizičku aktivnost tokom 90 dana. Mišićno tkivo sportista postaje jače i izdržljivije nakon redovnih treninga, i mišići postaju otporniji na oštećenja. Ovakav adaptivni odgovor na dugotrajni trening je pokazan i u drugim studijama (Razmjou S, 2010; Miura M, 2005).

Upotreba antioksidanasa u cilju smanjenja oštećenja mišića nije imala potpun uspeh. Neke studije nisu pokazale povoljan efekat primene antioksidativnih vitamina i cilju smanjenja oštećenja mišića (Bloomer RJ i Falvo MJ, 2007; Texeira VH, 2009). Ipak, rezultati nekih istraživanja pokazuju da suplementacija antioksidansima može smanjiti nivo lipidne peroksidacije membrane mišićnih ćelija i na taj način sprečiti oštećenja (Schroder H, 2001; Rokitski 1994; Tsakiris S, 2009; Silva LA, 2009).

Ako uzmemo u obzir sve procese koji su povezani sa znacima i simptomima povrede mišića tokom treninga, neki određeni antioksidansi ili njihova kombinacija verovatno ne može potpuno eliminisati oštećenje mišića (Bloomer RJ, 2007). To i nije cilj, jer oštećenje mišića posredovano slobodnim radikalima može uzrokovati smanjenje kontraktilne funkcije mišića što može biti jedan od protektivnih mehanizama da se ograniči i spreči dalje oštećenje mišića (Teixeira VH, 2009).

Nivo aktivnosti mišićnih enzima je niži u suplementiranoj grupi posle 90 dana redovnih treninga i suplementacije, što ukazuje da primena Asx može smanjiti oštećenje mišića do određenog stepena. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima do sada objavljenih studija koje se odnose na Asx suplementaciju i oštećenje mišića kod . Aoi i sar. su pokazali da Asx smanjuje oštećenje skeletnih i srčanog mišića uzrokovano intenzivnim vežbanjem kod miševa, ali i infiltraciju neutrofila koji uzrokuju dodatna oštećenja (Aoi W, 2003). U eksperimentu Ikeuchi i sar. povećanje CK nakon treninga je inhibirano suplementacijom sa Asx (Ikeuchi M, 2006). Niže aktivnosti enzima mišića AST, CK i LDH u serumu fudbalera koji su suplementirani Asx ukazuju da Asx može stabilisati mišićnu membranu i na taj način smanjiti oštećenje mišićnih ćelija

Ipak, procena povrede mišića samo na osnovu merenja aktivnosti enzima u serumu nije dovoljna. Pored ovih, postoje i drugi parametri oštećenja mišića koje bi trebalo ispitati zajedno sa enzimima, kao što su mišićna snaga, mišićne performanse i oštećenje citoskeleta (Bloomer RJ, 2007).

5.5. Uticaj različitih nutritivnih mera na nivo sekretornog IgA u salivi

Mukozni imunitet gornjih respiratornih puteva predstavlja prvu liniju odbrane od patogena, sa glavnim efektorom sekretornim IgA (Brandtzaeg P, 1985). Regulacija sinteze i izlučivanja sIgA ne zavisi samo od predhodne stimulacije antigenima, već je pod snažnim uticajem neuroendokrinog sistema. Tako da promene u neuroendokrinom sistemu koje izazivaju stres, fizička aktivnost, trudnoća, menstrualni ciklus, lekovi, mogu uticati na nivo sekretornog IgA (Teeuw W, 2004).

Većina ispitivanja pokazuju smanjenje nivoa sIgA u salivi nakon fizičke aktivnosti visokog intenziteta kod elitnih sportista, dok umerena fizička aktivnost kod sportista rekreativaca ne dovodi do značajnih promena u nivou sIgA u salivi (Gleeson

M, 2000). Iz tog razloga, u okviru ovog istraživanja, određivali smo uticaj dve vrste nutritivnih mera - senzorne stimulacije i suplementacije Asx mukozni imunitet sportista.

5.5.1. Uticaj senzorne stimulacije na nivo sekretornog IgA u salivi kod karatista rekreativaca

Rezultati naše studije pokazuju značajno smanjenje salivarnog protoka odmah posle rekreativnog treninga u trajanju od 1 sata, što je u skladu sa rezultatima predhodno objavljenih studija (Dimitriou L, 2002; Laing SJ, 2005; Palmer FM, 2003). Najveće smanjenje salivarnog protoka uočava se posle najintenzivnijeg treninga (Mackinnon LT i Ginn E, 1993). Povećanje aktivnosti simpatičkog nervnog sistema (SNS) može objasniti smanjenje salivarnog protoka nakon treninga usled vazokonstrikcije krvnih sudova pljuvačnih žlezda što ograničava dostupnost vode za proizvodnju salive (Chicharro JL, 1998). Laing SJ i sar. su pokazali da produženo vežbanje sa unosom dovoljne količine tečnosti sprečava smanjenje salivarnog protoka. S obzirom da ispitanici nisu uzimali vodu tokom i 30 minuta posle treninga, gubitak tečnosti objašnjava smanjenje nestimulisanog salivarnog protoka nakon treninga.

Smanjenje apsolutne koncentracije i brzine izlučivanja sIgA posle karate treninga pokazano u ovoj studiji je u skladu sa rezultatima drugih istraživanja (Gleeson M, 2005; Krzywkowski K, 2001; Laing SJ, 2005). Nivo sIgA se smanjuje tokom i posle ultramaratona (Palmer FM, 2003). Krzywkowski K i sar. su uočili smanjenje nivoa sIgA posle 2 h vežbanja na 75% VO_{2max} (Krywkowski K, 2001). Igranje tenisa u periodu od 1 sata takođe značajno smanjuje brzinu izlučivanja sIgA (Novas AM, 2003). Ipak, nisu sve studije pokazale smanjenje koncentracije sIgA (Dimitriou L, 2002; Laing SJ, 2005; Tiollier E, 2005). Sakupljanje salive se razlikuje između studija (nestimulisana, stimulisana, stimulisana parotidna saliva, mešovita saliva), što otežava poređenje rezultata. Promene u nivou sIgA zavisi i od dužine i intenziteta treninga (Palmer FM, 2003). Pored toga, koncentracija sIgA u miru direktno je povezana sa treningom od predhodnog dana odnosno nedelje (Novas AM, 2003). To je posledica činjenice da uticaj intenzivnog treninga na koncentraciju sIgA traje određeno vreme (Mackinnon LT, 1987). Smanjenje apsolutne koncentracije (Slike 43 i 44) i brzine izlučivanja sIgA (Slike 45 i 46) u našoj studiji je dostiglo statističku značajnost prvog-D1 i trećeg dana-

D3, ali ne i drugog dana-D2. Tada je zabeležena najniža ocena subjektivne procene zamora, što ukazuje da intenzitet treninga direktno utiče na sekreciju sIgA. Neke studije us pokazale da treninzi umerenog intenziteta i u trajanja ne utiču na nivo sIgA (Tomasi TB, 1992). Rezultati ove studije pokazuju da rekreativni karate trening izaziva smanjenje brzine izlučivanja sIgA, koje traje najmanje pola sata nakon treninga. Stoga, nakon treninga sportisti mogu biti podložniji infekcijama gronjih respiratornih puteva.

Koncentracija ukupnih proteina u salivi karatista je značajno povećana nakon svakog treninga. S obzirom da fizička aktivnosti povećava aktivnost SNS, povećanja koncentracije proteina može biti posledica aktivnosti beta simpatičkog sistema u pljuvačnom žlezdama (Sari-Sarraf V, 2007). Sa druge strane, koncentracija sIgA je smanjena nakon treninga, što ukazuje na specifično smanjenje sinteze i/ili sekrecije sIgA u toku i posle fizičke aktivnosti. Ispitivanje uloge α i β -adrenergičkih puteva na mukozni imunitet pod uticajem različitih induktora stresa (submaksimalna fizička aktivnost, aritmetički zadaci), su pokazala da je smanjenje koncentracije sIgA posredovano α -adrenergičkim putevima (Tiollier E, 2005).

Arome su mešavine isparljivih molekula koje mogu da se eksprahuju iz hrane ili mogu biti sintetisane. Pored isparljivih, arome sadrže i neisparljive komponente, kao što su aminokiseline i soli koje izazivaju somatosenzornu stimulaciju (Schiffman SS, 2000). Schiffman SS i Warwick ZS su pokazali da dodavanja aroma u hranu kod starijih osoba dovodi do poboljšanja u imunom sistemu, povećanja nivoa B i T limfocita, a da su ova povećanja najverovatnije posledica senzorne stimulacije, a ne unosa hrane (Schiffman SS, 1993). Schiffman SS i Miletić IĐ su pokazali da senzorna stimulacija može da poveća brzinu izlučivanja sIgA i tako poveća aktivnost mukoznog imuniteta (Schiffman SS i Miletić IĐ, 1999).

Aplikacije tečne surutke i aromatizovanog napitka na bazi surutke uzrokovalo je refleksnu sekreciju salive. Nakon senzorne stimulacije u obe grupe je povećan salivarni protok (Slike 41 i 42). Pored toga, aplikacija aromatizovanog napitka uslovlila je značajno veće povećanje salivarnog protoka posle treninga u odnosu na surutku. Refleksna sekrecija salive na senzornu stimulaciju čula mirisa i ukusa je deo neuroanatomske povezanosti između salivarnog jedra i tractus solitarius-a u produženoj moždini (Schiffman SS, 1999). Kao posledica povećanog salivarnog protoka, smanjena je apsolutna koncentracija sIgA nakon senzorne stimulacije napitkom i surutkom. Pored

toga, aplikacija surutke i aromatizovanog napitka nije imala značajan uticaj brzinu izlučivanja sIgA.

Treninzi dovode do smanjenja salivarnog protoka, apsolutne koncentracije i brzine izlučivanja sIgA, pri čemu stepen ovih promena reflektuje intenzitet, trajanje u učestalost treninga (Tiollier E, 2005). Uzimanje aromatizovanog napitka na bazi surutke može biti od koristi tokom dugotrajnih intenzivnih treninga u cilju održavanja salivarnog protoka, a na taj način i količine sIgA. S obzirom na smanjenje efikasnosti mukoznog imuniteta odmah nakon treninga trebalo bi maksimalno smanjiti kontakt sa velikim brojem ljudi da bi se sprečio kontakt sa patogenima koji izazivaju infekcije gornjih respiratornih puteva.

5.5.2. Uticaj suplementacije astaksantinom na mukozni imunitet mladih fudbalera

U ovom delu istraživanja je, po prvi put, ispitivan uticaj suplementacije sa Asx na nivo sIgA u salivi u miru, kao i posle treninga kod mladih fudbalera. Prednost ove studije je postojanje kontrolne placebo grupe i izvođenje studije u toku sezone, dok su sportisti imali uobičajeni način ishrane i program treninga.

Treninzi umerenog i visokog intenziteta mogu da utiču na nivo sIgA u mukozni površinama. Većina studija je pokazala značajno smanjenje sIgA nakon treniranja različitog intenziteta i to kod plivanja (Gleeson M, 1999), intervalnog vežbanja (Mackinnon LT i Jenkins DG, 1993), kajaka (Mackinnon LT i Ginn E, 1993), trčanja (Nieman DC, 2002a), nakon „Wingate” testa (test za merenje maksimalne snage i anaerobnog kapaciteta) (Fahlman MM, 2001). Povećanje do nivoa pre treninga se obično dešava u toku 24 h, ali nakon treninga ekstremnog intenziteta nivo sIgA može ostati snižen i duži period. Sa druge strane, neke studije nisu pokazale promene (Koch, AJ, 2007), a neke čak i povećanje nivoa sIgA u salivi nakon akutnog treninga (Tharp, GD, 1991). Postoji relativno malo podataka o mukoznom imunitetu koji su dobijeni od fudbalera u njihovom realnom okruženju, naročito kada su u pitanju profesionalci, uprkos činjenici da je uticaj treninga na promene u sIgA u salivi od velikog značaja za sportsku medicinu. Jedna studija je pokazala da učešće u fudbalskoj utakmici koja traje 70 minuta ne utiče značajno na nivo sIgA kod profesionalnih fudbalera (Moreira A, 2009). U našoj studiji, uočili smo smanjenje apsolutne koncentracije i brzine izlučivanja

sIgA posle intenzivnog treninga kod obe grupe mladih fudbalera. Ipak, ove promene su dostigle statističku značajnost samo na kraju posmatranog perioda, ali ne i na početku. Ovi rezultati pokazuju da redovni treninzi kod fudbalera mogu imati kumulativan supresivni efekat na mukozni imunitet, uzrokujući značajan pad nivoa sIgA nakon treninga na kraju posmatranog perioda.

Produkcija slobodnih radikala i antioksidativni status može biti u vezi sa promenama u imunom sistemu nakon treninga, kao što su ćelijska adhezija, inflamacija i proliferacija limfocita. Povećana produkcija ROS tokom i nakon fizičke aktivnosti može inhibirati imuni odgovor. ROS suprimira lokomotornu i baktericidnu aktivnost neutrofila, citotoksičnu aktivnost NK ćelija, smanjuje proliferaciju T i B limfocita i stimuliše apoptozu limfocita (Gleeson M, 2006).

Nekoliko antioksidansa je ispitivano kao preventivna mera protiv promena u mukoznom imunitetu uzrokovanim fizičkom aktivnošću. Suplementacija sa 1500 mg/d vitamin C u periodu od 7 dana pre ultramaratona nije sprečila promene u koncentraciji sekretornim nivoa sIgA maratonaca nakon trke (Palmer FM, 2003). Koncentracija sIgA triatlonaca je značajno smanjena odmah nakon trke u poređenju sa vrednostima pre trke, uprkos suplementaciji sa vitaminom E (Nieman DC, 2004). Suplementacija kvercetinom u periodu od 3 nedelje nije uticala na promene u nekoliko parametara funkcije imunog sistema, uključujući nivo sIgA nakon trke od 160 km (Nieman DC, 2007). Promene koncentracije sIgA zdravih Finaca nisu uočene posle suplementacije β -karotenom u periodu od 60 dana (Lumikara M, 1988).

U našoj studiji, suplementacija Asx nije sprečila smanjenje koncentracije i brzine izlučivanja sIgA uzrokovane intenzivnim treningom (Slike 50 i 51). Ipak, suplementacija je uticala na značajno povećanje ovih parametara u miru, kao što je prikazano na slikama 48 i 49. Opisan povoljan efekat Asx može biti posledica antioksidativne aktivnosti. Okai i sar. (1996) su pokazali da Asx ima najveći imunomodulatorni efekat u poređenju sa drugim karotenoidima, β karotenom i kantaksantinom. Ovakav imunomodulatorni uticaj karotenoida odgovara njihovoj antioksidativnoj aktivnosti. I zaista, pokazano je da Asx najefikasnije sprečava peroksidaciju lipida i oksidativni stres *in vitro* i *in vivo* sistemima. Rezultati našeg ispitivanja su pokazali da suplementacija astaksantinom delimično sprečava povećanu produkciju slobodnih radikala i smanjenje kapaciteta neenzimske antioksidativne zaštite

kod mladih fudbalera. Smanjenje oksidativnih oštećenja može biti posredovano antioksidativnim delovanjem Asx, što ima povoljan uticaj na mukozni imunitet.

Predhodne studije su pokazale modulatorni efekat Asx na određene aspekte imunog odgovora, koji podržavaju rezultate ovog istraživanja i povoljan efekat Asx na nivu sIgA u salivi. Primena Asx je dovela do poboljšanja reakcije preosteljivosti odloženog tipa kod mačaka, pasa i ljudi (Chew BP, 2011; Park JS, 2011; Park JS, 2010). Uočeno je i povećanje citotoksične aktivnosti NK ćelija (Chew BP, 2011; Park JS, 2010). U jednoj humanoj studiji pokazano je povećanje broja T i B limfocita i povećanje mitogen indukovane proliferacije limfocita nakon suplementacije Asx u preiodu od 8 nedelja kod zdravih žena (Park JS, 2010).

Pored uticaja Asx na ćelijski imunitet, predhodne studije pokazuju stimulaciju humoralnog imuniteta pod uticajem suplementacije Asx: povećanje produkcije antitela u slezini miševa (Jyonouchi H, 1993), delimično poboljšan humoralni imuni odgovor kod starih miševa (Jyonouchi H, 1994), povećanje *in vitro* produkcije imunoglobulina na T-zavisni stimulus (Jyonouchi H, 1995) i povećavanje *in vitro* produkcije poliklonskih IgG i IgM antitela u ćelijama slezine (Okai Y, 1996). Primena Asx povećava produkciju IL-1 α u adherentnim ćelijama. Adherentne ćelije imaju važnu ulogu u povećanju produkcije antitela posredstvom citokina kao što je IL-1 α , koji je najvažniji regulator diferencijacije B limfocita (Giri, 1984). Moguće je da povećano oslobađanje IL-1 α pod uticajem Asx doprinelo povećanoj produkciji antitela.

Intenzivan trening dovodi do brzog i izrazitog povećanja broja neutrofila u krvi. Nekoliko sati kasnije broj neutrofila u krvi se dalje povećava, a stepen povećanja zavisi od intenziteta i trajanja treninga (Peake JM, 2002). Povećanje limfocita se takođe uočava u toku i neposredno nakon treninga. Ipak tokom nekoliko sati nakon treninga broj limfocita značajno opada ispod bazalnih vrednosti (Shek PN, 1995). Redovni treninzi u dužem vremenskom periodu ne dovode do značajnih promena u broju leukocita, uključujući i neutrofile i limfocite (Nieman DC, 2000). Ipak, i jednokratni i hronični treninzi mogu uzrokovati supresiju i urođenog i stečenog imuniteta kod sportista. U našem istraživanju, redovni treninzi u periodu od 90 dana uzrokuju značajno povećanje broja neutrofila i smanjenje broja limfocita kod mladih fudbalera. Ove promene nisu detektovane u suplementiranoj grupi (Slika 11).

Rezultati istraživanja ukazuju da primena Asx može imati povoljan efekat na produkciju sIgA kod mladih fudbalera u periodu intenzivnih treninga tokom sezone. Takođe, primena Asx je sprečila povećanje broja neutrofila i smanjenje broja limfocita, izazvano napornim programom treniranja tokom sezone. Iako Asx pokazuje povoljan efekat na unapređenje imunog odgovora, neophodne su detaljnije analize koje bi utvrdile mehanizam delovanja Asx na mukozni imunitet u budućim studijama.

6.ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima studije, na osnovu rezultati ispitivanja možemo zaključiti sledeće:

1. Dugogodišnje treniranje fudbala uslovljava povećanje nivoa neenzimskih antioksidanasa i aktivnosti antioksidativnih enzima. Ipak, i pored toga mladi fudbaleri su, usled redovnih, intenzivnih treninga, izloženi većem nivou oksidativnog stresa i oksidativnog oštećenja u odnosu na fizički neaktivne osobe.
2. Intenzivni fudbalski trening je povezan sa povećanom produkcijom slobodnih radikala i oksidativnim stresom, što može smanjiti kapacitet antioksidativne zaštite. Suplementacija astaksantinom delimično sprečava povećanu produkciju slobodnih radikala i smanjenje kapaciteta neenzimske antioksidativne zaštite kod mladih fudbalera. Uzimajući u obzir modifikaciju antioksidativnih zaštitnih mehanizama pod uticajem intenzivnih fudbalskih treninga i nedovoljan unos dijetarnih antioksidanasa, suplementacija astaksantinom ima povoljan uticaj na antioksidativni odbrambeni sistem kod fudbalera u toku sezone.
3. Naporan program treniranja u toku sezone dovodi do povećanja produkcije slobodnih radikala. Ipak, uočeno smanjenje oksidativnog statusa (prikazano kroz TOS i PAB) verovatno je posledica adaptivnog odgovora na intenzivne treninge. Suplementacija astaksantinom ima povoljan efekat na unapređenje aktivnosti enzima paraoksonaze 1 i ukupan sadržaj sulfhidrilnih grupa kod mladih fudbalera. Suplementacija može biti od posebnog interesa za sportiste koji su

podložniji oksidativnom stresu kao dodatna podrška endogenim enzimskim i neenzimskim zaštitnim sistemima.

4. Intenzivan trening dovodi do značajnog povećanja aktivnosti enzima mišića u serumu i na početku i na kraju suplementacionog perioda, što ukazuje na izuzetno visoke fiziološke zahteve fudbala i na značajno oštećenje mišića nakon svakog treninga. Smanjenje oštećenja mišićnih ćelija je deo adaptivnog odgovora na intenzivnu fizičku aktivnost tokom 90 dana. Primena astaksantina u toku sezone smanjuje oštećenje mišićnih ćelija do određenog stepena.
5. Redovni treninzi kod fudbalera imaju kumulativan supresivni efekat na mukozni imunitet, uzrokujući značajan pad nivoa sIgA nakon treninga na kraju posmatranog perioda. Suplementacija astaksantinom ima povoljan efekat na produkciju sIgA kod mladih fudbalera u periodu intenzivnih treninga tokom sezone. Ipak, novija istraživanja koja uključuju ispitivanje distribucije limfocita, proliferacije i aktivacije limfocita, kao i produkciju citokina, su neophodna da bi se preciznije utvrdio imunomodulatorni efekat astaksantina.
6. Rekreativni treninzi takođe dovode do smanjenja salivarnog protoka, apsolutne koncentracije i brzine izlučivanja sIgA, pri čemu stepen ovih promena reflektuje intenzitet, trajanje u učestalost treninga. Aromatizovani napitak na bazi surutke pomaže u održavanju salivarnog protoka, a na taj način i količine sIgA u toku i nakon intenzivnih treninga. S obzirom na smanjenje efikasnosti mukoznog imuniteta odmah nakon treninga trebalo bi maksimalno smanjiti kontakt sa velikim brojem ljudi da bi se sprečio kontakt sa patogenima koji izazivaju infekcije gornjih respiratornih puteva.

7. LITERATURA

1. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA, Cordova A, Pons A. Anti-oxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 2005; 84: 1-7.
2. Akova B, Surmen-Gur E, Gur H, Dirican M, Sarandol E, Kucukoglu S. Exercise-induced oxidative stress and muscle performance in healthy women: role of vitamin E supplementation and endogenous oestradiol. *Eur J Appl Physiol* 2001; 84: 141-147.
3. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Saraigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant–antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin Biochem* 2007; 40: 248–254.
4. Alessio HM, Goldfarb AH, Cao G. Exercise-induced oxidative stress before and after vitamin C supplementation. *Int J Sport Nutr* 1997; 7: 1-9.
5. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25: 218-224.
6. Andersson H, Karlsen A, Blomhoff R, Raastad T, Kadi F. Plasma antioxidant responses and oxidative stress following a soccer game in elite female players. *Scand J Med Sci Sports* 2010; 20: 600–608.
7. AOAC, 1975. Official methods of analysis (12th edition). Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
8. Aoi W, Naito Y, Sakuma K, Kuchide M, Tokuda H, Maoka T, Toyokuni S, Oka S, Yasuhara M, Yoshikawa T. Astaxanthin limits exercise-induced skeletal and cardiac muscle damage in mice. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5: 139–144.
9. Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Ishii T, Kawai Y, Akagiri S, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T. Astaxanthin improves muscle lipid metabolism in exercise via inhibitory

effect of oxidative CPT I modification. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366: 892–897.

10. Arent SM, Pellegrino JK, Williams CA, Difabio DA, Greenwood JC. Nutritional supplementation, performance, and oxidative stress in college soccer players. *J Strength Cond Res* 2010; 24: 1117-1124.

11. Arosio P, Levi S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 457-463.

12. Arslan C, Gulcu F, Gursu MF. Effects of oxidative stress caused by acute and regular exercise on levels of some serum metabolites and the activities of paraoxonase and arylesterase. *Biol Sport* 2005; 22: 375-383.

13. Ascensão A, Rebelo A, Oliveira E, Marques F, Pereira L, Magalhães J. Biochemical impact of a soccer match - analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. *Clin Biochem* 2008; 41: 841-851.

14. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton FL: CRC Press; 1985. p. 123 – 132

15. Avery NG, Kaiser JL, Sharman MJ, Scheett TP, Barnes DM, Gómez AL, Kraemer WJ, Volek JS. Effects of vitamin E supplementation on recovery from repeated bouts of resistance exercise. *J Strength Cond Res* 2003; 17: 801-809.

16. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, Rosenblat M, Erogul J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involved its free sulfhydryl group and is different than that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1617–1624.

17. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S, Hoffman A, Dornfeld L, Volkova N, Presser D, Attias J, Liker H, Hayek T. Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clin Nutr* 2004; 23: 423-433.

18. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CI, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidised low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 892–904.
19. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20.
20. Benson J, Gillien DM, Bourdet K, Loosli AR. Inadequate nutrition and chronic calorie restriction in adolescent ballerinas. *Phys Sports Med* 1985; 13: 79-90.
21. Bishop NC, Walker GJ, Scanlon GA, Richards S, Rogers E. Salivary IgA responses to prolonged intensive exercise following caffeine ingestion. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 38: 513-519.
22. Bloomer RJ, Goldfarb AH, McKenzie MJ. Oxidative stress response to aerobic exercise: comparison of antioxidant supplements. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 38: 1098-1105.
23. Bloomer RJ, Falvo MJ, Schilling BK, Smith WA. Prior exercise and antioxidant supplementation: effect on oxidative stress and muscle injury. *J Int Soc Sports Nutr* 2007; 4: 9.
24. Bloomer RJ, Fry A, Schilling B, Chiu L, Hori N, Weiss L. Astaxanthin supplementation does not attenuate muscle injury following eccentric exercise in resistance-trained men. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2005; 15: 401-412.
25. Bloomer RJ, Fry AC, Falvo MJ, Moore CA. Protein carbonyls are acutely elevated following single set anaerobic exercise in resistance trained men. *J Sci Med Sport* 2007; 10: 411-417.
26. Bloomer RJ, Goldfarb AH, McKenzie MJ, You T, Nguyen L. Effects of antioxidant therapy in women exposed to eccentric exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2004 ; 14: 377-388.
27. Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, Consitt LA. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res* 2005; 19: 276-285.

28. Bloomer RJ. The role of nutritional supplements in the prevention and treatment of resistance exercise-induced skeletal muscle injury. *Sports Med* 2007; 37: 519-532.
29. Bolin AP, Macedo RC, Marin DP, Barros MP, Otton R. Astaxanthin prevents in vitro auto-oxidative injury in human lymphocytes. *Cell Biol Toxicol* 2010; 26: 457-467.
30. Bonina FP, Puglia C, Cimino F. Oxidative stress in handball players: effect of supplementation with a red orange extract. *Nutr Res* 2005; 25: 917-924.
31. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 755-767.
32. Brandtzaeg P. The human secretory immune system: General review. In: Revillard JP, Voisin C, Wierzbicki N, editors. *Mucosal immunity: IgA and polymorphonuclear neutrophils*. Asnieres (France): Foundation Franco Allemande; 1985. p.11-43.
33. Braun B, Clarkson PM, Freedson PS, Kohl RL. Effects of coenzyme Q10 supplementation on exercise performance, VO₂max, and lipid peroxidation in trained cyclists. *Int J Sport Nutr* 1991; 1: 353-365.
34. Brites F, Zago V, Verona J, Muzzio M, Wikinski R, Schreier L. HDL capacity to inhibit LDL oxidation in well-trained triathletes. *Life Sci* 2006; 78: 3074- 3081.
35. Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG, Nicol MF, Basilico MJ, Wikinski RW, Llesuy SF. Soccer players under regular training show oxidative stress but improved plasma antioxidant status. *Clin Sci* 1999; 96: 381-385.
36. Bryant RJ, Ryder J, Martino P, Kim J, Craig BW. Effects of vitamin E and C supplementation either alone or in combination on exercise-induced lipid peroxidation in trained cyclists. *J Strength Cond Res* 2003; 17: 792-800.
37. Buczynski A, Kedziora J, Tkaczewski W, Wachowicz B: Effect of submaximal physical exercise on antioxidative protection of human blood platelets. *Int J Sports Med* 1991; 12: 52-54.

38. Calder PC, Field CJ, Gill HS, editors. Nutrition and Immune Function. Oxford: CABI Publishing; 2002.
39. Carrillo AE, Murphy RJ, Cheung SS. Vitamin C supplementation and salivary immune function following exercise-heat stress. *Int J Sports Physiol Perform* 2008; 3: 516-530.
40. Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G, Cestaro B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur J Clin Invest* 2003; 33: 924-930.
41. Chan K, Mong M, Yin M. Antioxidative and anti-inflammatory neuroprotective effects of astaxanthin and canthaxanthin in nerve growth factor differentiated PC12 cells. *J Food Sci* 2009; 74: H225-231.
42. Chew BP, Mathison BD, Hayek MG, Massimino S, Reinhart GA, Park JS. Dietary astaxanthin enhances immune response in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 140: 199-206.
43. Chew BP, Park JS, Wong MW, Wong TS. A comparison of the anticancer activities of dietary beta-carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice in vivo. *Anticancer Res* 1999; 19: 1849-1853.
44. Chicharro JL, Lucia A, Perez M, Vaquero AF, Urena R. Saliva composition and exercise. *Sports Med* 1998 ; 26: 17-27.
45. Child R, Brown S, Day S, Donnelly A, Roper H, Saxton J. Changes in indices of antioxidant status, lipid peroxidation and inflammation in human skeletal muscle after eccentric muscle actions. *Clin Sci* 1999; 96: 105–115.
46. Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL. Effects of a training taper on tissue damage indices, serum antioxidant capacity and half-marathon running performance. *Int J Sports Med* 2000; 21: 325-331.
47. Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 745-753.

48. Choi HD, Youn YK, Shin WG. Positive effects of astaxanthin on lipid profiles and oxidative stress in overweight subjects. *Plant Foods Hum Nutr* 2011; 66: 363–369.
49. Cholewa J, Poprzecki S, Zajac A, Waskiewicz Z. The influence of vitamin C on blood oxidative stress parameters in basketball players in response to maximal exercise. *Sci Sport* 2008; 23: 176–182.
50. Close DC, Hagerman AE. Chemistry of reactive oxygen species and antioxidants . In: Alessio HM, Hagerman AE, editors. *Oxidative stress, exercise and aging*. London: Imperial College Press; 2006. p. 1-8.
51. Costa LG, Giordano G, Furlong CE. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: The hunt goes on. *Biochem Pharmacol* 2011; 81: 337–344.
52. Davison G, Gleeson M, Phillips S. Antioxidant supplementation and immunoendocrine responses to prolonged exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39: 645-652.
53. Deaton CM, Marlin DJ. Exercise-Associated Oxidative Stress. *Clin Tech Equine Pract* 2003; 2: 278-291.
54. Dimitriou L, Sharp NCC, Doherty M. Circadian effects on the acute responses of salivary cortisol and IgA in well trained swimmers. *Br J Sports Med* 2002; 36: 260-264.
55. Djordjevic D, Cubrilo D, Macura M, Barudzic N, Djuric D, Jakovljevic V. The influence of training status on oxidative stress in young male handball players. *Mol Cell Biochem* 2011; 351: 251–259.
56. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369: 78–88.
57. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
58. Earnest CP, Lupo M, White KM, Church TS. Effect of astaxanthin on cycling time trial performance. *Int J Sports Med* 2011; 32: 882-888.

59. Economos CD, Bortz SS, Nelson ME. Nutritional practices of elite athletes: recommendations. *Sports Med* 1993; 16: 381.
60. Eichner ER. Runner's macrocytosis: a clue to footstrike hemolysis: runner's anemia as a benefit versus runner's hemolysis as a detriment. *Am J Med* 1985; 78: 321–325.
61. El Abed K, Rebai H, Bloomer RJ, Trabelsi K, Masmoudi L, Zbidi A, Sahnoun Z, Hakim A, Tabka Z. Antioxidant status and oxidative stress at rest and in response to acute exercise in judokas and sedentary men. *J Strength Cond Res* 2011; 25: 2400-2409.
62. Ellman E. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70 – 77.
63. Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, Ordonez-Llanos J, Marrugat J. Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis* 2003; 167: 327-334.
64. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38: 1103–1111.
65. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37: 12– 119.
66. Evelson P, Gambino G, Travacio M, Jaita G, Verona J, Maroncelli C, Wikinski R, Llesuy S, Brites F. Higher antioxidant defences in plasma and low density lipoproteins from rugby players. *Eur J Clin Invest* 2002; 32: 818-825.
67. Fahlman MM, Engels HJ. Mucosal IgA and URTI in American college football players: a year longitudinal study. *Med Sci Sports Exerc* 2005; 37: 374-380.
68. Fahlman MM, Engels HJ, Morgan AL, Kolokouri I. Mucosal IgA response to repeated Wingate tests in females. *Int J Sports Med* 2001; 22: 127-131.
69. Fatouros IG, Chatzinikolaou A, Douroudos II, Nikolaidis MG, Kyparos A, Margonis K, Michailidis Y, Vantarakis A, Taxildaris K, Katrabasas I, Mandalidis D, Kouretas D, Jamurtas AZ. Time-course of changes in oxidative stress and antioxidant status responses following a soccer game. *J Strength Cond Res* 2010; 24: 3278-3286.

70. Ferre N, Camps J, Fernandez-Ballart J, Arija V, Murphy MM, Ceruelo S, Biarnés E, Vilella E, Tous M, Joven J. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem* 2003; 49: 1491-1497.
71. Finaud J, Lac G, Filaire L. Oxidative stress - relationship with exercise and training. *Sports Med* 2006; 36: 327-358.
72. Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Med* 2009; 8:1.
73. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Assessment. Washington (DC): National Academic Press; 2000. p. 71–144.
74. Fry A, Schilling B, Chiu L, Hori N, Weiss L. Fiber type-specific responses to perceptions of delayed onset muscle soreness with astaxanthin supplementation. *Med Sci Sports Exerc* 2004; 36: S175.
75. Furlong CE. Paraoxonases: an historical perspective. In: Mackness B, Mackness M, Aviram M, Paragh G, editors. *The Paraoxonases: Their Role in Disease Development and Xenobiotic Metabolism*. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2008. p. 3–31.
76. Gabriel H, Kindermann W. The acute immune response to exercise: what does it mean? *Int J Sports Med* 1997; 18: S28-45.
77. Gaeini AA, Rahnama N, Hamedinia MR. Effects of vitamin E supplementation oxidative on stress at rest and after exercise to exhaustion in athletic students. *J Sports Med Phys Fitness* 2006; 46: 458-461.
78. Ghloum K, Hajji S. Comparison of diet consumption, body composition and lipoprotein lipid values of Kuwaiti fencing players with international norms. *J Int Soc Sports Nutr* 2011; 8: 13.
79. Ginsburg GS, Agil A, O'Toole M, Rimm E, Douglas PS, Rifai N. Effects of a single bout of ultraendurance exercise on lipid levels and susceptibility of lipids to peroxidation in triathletes. *JAMA* 1996; 276: 221-225.

80. Giri JG, Kincade PW, Mizel SB. Interleukin 1-mediated induction of K-light chain synthesis and surface immunoglobulin expression on pre-B cells. *J Immunol* 1984; 118: 1213-1218.
81. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991; 31: 32-36.
82. Gleeson M, Li TL. The effects of carbohydrate supplementation during repeated bouts of prolonged exercise on saliva flow rate and immunoglobulin A. *J Sports Sci* 2005; 23: 713-722.
83. Gleeson M, McDonald WA, Cripps AW, Pyne DB, Clancy RL, Fricker PA. The effect on immunity of long-term intensive training in elite swimmers. *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 210–216.
84. Gleeson M, McDonald WA, Pyne DB, Cripps AW, Francis JL, Fricker PA, Clancy RL. Salivary IgA levels and infection risk in elite swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 1999; 31: 67-73.
85. Gleeson M. Can nutrition limit exercise-induced immunodepression? *Nutr Rev* 2006; 64: 119-131.
86. Gleeson M. Mucosal immunity and respiratory illness in elite athletes. *Int J Sports Med* 2000; 21: S33-43
87. Goldfarb AH, Bloomer RJ, McKenzie MJ. Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2005; 37: 234-239.
88. Goldfarb AH, McKenzie MJ, Bloomer RJ. Gender comparisons of exercise-induced oxidative stress: influence of antioxidant supplementation. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; 32: 1124-1131.
89. Goldfarb AH, Patrick SW, Bryer S, You T. Vitamin C supplementation affects oxidative-stress blood markers in response to a 30-minute run at 75% VO₂max. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2005; 15: 279-290.

90. Goto C, Nishioka K, Umemura T, Jitsuiki D, Sakaguchi A, Kawamura M, Chayama K, Yoshizumi M, Higashi Y. Acute moderate-intensity exercise induces vasodilation through an increase in nitric oxide bioavailability in humans. *Am J Hypertens* 2007; 20: 825-830.
91. Green HJ, Sutton JR, Coates G, Ali M, Jones S. Response of red cell and plasma volume to prolonged training in humans. *J Appl Physiol* 1991; 70: 1810–1815.
92. Gross G, Lockwood S. Cardioprotection and myocardial salvage by a disodium disuccinate astaxanthin derivative (Cardax™). *Life Sci* 2004; 75: 215-224.
93. Gross G, Lockwood S. Acute and chronic administration of disodium disuccinate astaxanthin (Cardax) produces marked cardioprotection in dog hearts. *Mol Cell Biochem* 2005; 272: 221-227.
94. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol* 2003; 21: 210-216.
95. Guglielmini C, Casoni I, Patracchini M, Manfredini F, Grazi G, Ferrari M, Conconi F. Reduction of hemoglobin levels during the racing season in nonsideropenic professional cyclists. *Int J Sports Med* 1989; 10: 352–356.
96. Guillard JC, Penarand T, Gallet C, Boggio V, Fuchs F, Klepping J. Vitamin status of young athletes including the effects of supplementation. *Med Sci Sports Exerc* 1989; 21: 441-449.
97. Harris DE. Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J* 1992; 6: 2675–2683.
98. Hartmann A, Niess AM, Grunert-Fuchs M, Poch B, Speit G. Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutat Res* 1995; 346: 195-202.
99. Hartmann A, Pfuhler S, Dennog C, Germadnik D, Pilger A, Speit G. Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or induction of micronuclei. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 245-251.

- 100.Hessel E, Haberland A, Muller M, Lerche D, Schimke I. Oxygen radical generation of neutrophils: a reason for oxidative stress during marathon running? *Clin Chim Acta* 2000; 298: 145–156.
- 101.Higuera-Ciapara I, Felix-Valenzuela L, Goycoolea FM. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2006; 46: 185-196.
- 102.Hubner-Wozniak E, Panczenko-Kresowka B, Lerczak K, Posnik J. Effects of graded treadmill exercise on the activity of blood antioxidant enzymes, lipid peroxides and nonenzymatic anti-oxidants in long-distance skiers. *Biol Sport* 1994; 11: 217-226.
- 103.Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993; 3: 73-76.
- 104.Hussein G, Goto H, Oda S, Sankawa U, Matsumoto K, Watanabe H. Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: III. Antioxidant and histopathological effects in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 684-688.
- 105.Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. Astaxanthin, a Carotenoid with Potential in Human Health and Nutrition. *J Nat Prod* 2006; 69: 443-449.
- 106.Ikeuchi M, Koyama T, Takahashi J, Yazawa K. Effects of astaxanthin supplementation on exercise-induced fatigue in mice. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 2106–2110.
- 107.Itoh H, Ohkuwa T, Yamazaki Y, Shimoda T, Wakayama A, Tamura S, Yamamoto T, Sato Y, Miyamura M. Vitamin E supplementation attenuates leakage of enzymes following 6 successive days of running training. *Int J Sports Med* 2000; 21: 369-374.
- 108.Iwamoto T, Hosoda K, Hirano R, Kurata H, Matsumoto A, Miki W, Kamiyama M, Itakura H, Yamamoto S, Kondo K. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin. *J Atheroscler Thromb* 2000; 7: 216–222.

109. James RW, Deakin SP. The importance of high-density lipoproteins for paraoxonase-1 secretion, stability and activity. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1986–1994.
110. Jamurtas AZ, Fatouros IG, Koukousias N, Manthou E, Tofas T, Yfanti C, Nikolaidis MG, Koutedakis Y. Effect of exercise on oxidative stress in individuals with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *In Vivo* 2006; 20: 875-880.
111. Jaouad L, de Guise C, Berrougui H, Clotier M, Isabelle M, Fulop T, Payette H, Khalil A. Age-related decrease in high-density lipoproteins antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. *Atherosclerosis* 2006; 185: 191–200.
112. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VH, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, Furlong CE. Paraoxonase (PON1) Phenotype Is a Better Predictor of Vascular Disease Than Is PON1192 or PON155 Genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2441 - 2447.
113. Jarvik GP, Tsai NT, McKinstry LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Hatsukami TS, Furlong CE. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1329–1333.
114. Jenkins RR, Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med Sci Sport Exerc* 1993; 25: 210-212.
115. Ji LL. Oxidative stress during exercise implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med*. 1995; 18: 1079-1086.
116. Jyonouchi H, Sun S, Mizokami M, Gross MD. Effects of various carotenoids on cloned, effector-stage T-helper cell activity. *Nutr Cancer* 1996; 26: 313-324.
117. Jyonouchi H, Sun S, Tomita Y, Gross MD. Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. *J Nutr* 1995, 125: 2483-2492.
118. Jyonouchi H, Zhang L, Gross M, Tomita Y. Immunomodulating actions of carotenoids: enhancement of in vivo and in vitro antibody production to T-dependent antigens. *Nutr Cancer* 1994; 21: 47-58.

119. Jyonouchi H, Zhang L, Tomita Y. Studies of immunomodulating actions of carotenoids II. Astaxanthin enhances in vitro antibody production to T-dependent antigens without facilitating polyclonal B-cell activation. *Nutr Cancer* 1993; 19: 269-280.
120. Kaminsky M, Boal R. An effect of ascorbic acid on delayed-onset muscle soreness. *Pain* 1992; 50: 317-321.
121. Karppi J, Rissanen TH, Nyssönen K, Kaikkonen J, Olsson AG, Voutilainen S, Salonen JT. Effects of astaxanthin supplementation on lipid peroxidation. *Int J Vitam Nutr Res* 2007; 77: 3-11.
122. Kim YH, Koh HK, Kim DS. Down-regulation of IL-6 production by astaxanthin via ERK-, MSK-, and NF- κ B-mediated signals in activated microglia. *Int Immunopharmacol* 2010; 10: 1560-1572.
123. Kingsley MI, Wadsworth D, Kilduff LP, McEneny J, Benton D. Effects of phosphatidylserine on oxidative stress following intermittent running. *Med Sci Sports Exerc* 2005; 37: 1300-1306.
124. Kistler A, Liechti H, Pichard L, Wolz E, Oesterhelt G, Hayes A, Maurel P. Metabolism and CYP-inducer properties of astaxanthin in man and primary human hepatocytes. *Arch Toxicol* 2002; 75: 665-675.
125. Knez WL, Jenkins DG, Coombes JS. Oxidative stress in half and ironman triathletes. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39: 283-288.
126. Koch AJ, Wherry AD, Petersen MC, Johnson JC, Stuart MK, Sexton WL. Salivary immunoglobulin A response to a collegiate rugby game. *J Strength Cond Res* 2007; 21: 86-90.
127. Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Stefanovic A et al. Paraoxonase-1 (PON1) activity, but not PON1Q192R phenotype, is a predictor of coronary artery disease in a middle-aged Serbian population. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 1106–1113.

128. Kratz A, Lewandrowski KB, Siegel AJ, Chun KY, Flood JG, Van Cott EM, Lee-Lewandrowski E. Effect of marathon running on hematologic and biochemical laboratory parameters, including cardiac markers. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 856-863.
129. Krzywkowski K, Petersen EW, Ostrowski K, Link-Amster H, Boza J, Halkjaer-Kristensen J. Effect of glutamine and protein supplementation on exercise-induced decreases in salivary IgA. *J Appl Physiol* 2001; 91: 832-838.
130. Kürkçü R, Tekin A, Özda S, Akçakoyun F. The effects of regular exercise on oxidative and antioxidative parameters in young wrestlers. *Afr J Pharm Pharmacol* 2010; 4: 244-251.
131. La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, Standiford TJ. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 1999; 119-120: 379-388.
132. Laing SJ, Gwynne D, Blackwell J, Williams M, Walters R, Walsh NP. Salivary IgA response to prolonged exercise in a hot environment in trained cyclists. *Eur J Appl Physiol* 2005; 93: 665-671.
133. Lauver DA, Lockwood SF, Lucchesi BR. Disodium Disuccinate Astaxanthin (Cardax) attenuates complement activation and reduces myocardial injury following ischemia/ reperfusion. *Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 686-692.
134. Lee SJ, Bai SK, Lee KS, Namkoong S, Na HJ, Ha KS, Han JA, Yim SV, Chang K, Kwon YG, Lee SK, Kim YM. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I kappa B kinase-dependent NF-kappa B activation. *Mol Cells* 2003; 16: 97-105.
135. Levando VA, Suzdalnitskii RS, Pershin BB, Zykov MP. Study of secretory and antiviral immunity in sportsmen. *Sports Training Med Rehab* 1988; 1: 49-52.
136. Lippi G, Schena F, Salvagno GL, Montagnana M, Gelati M, Tarperi C, Banfi G, Guidi GC. Acute variation of biochemical markers of muscle damage following a 21-km, half marathon run. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68: 667-672.

- 137.Liu JF, Chang WY, Chan KH, Tsai WY, Lin CL, Hsu MC. Blood lipid peroxides and muscle damage increased following intensive resistance training of female weightlifters. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1042: 255-261.
- 138.Liu X, Shibata T, Hisaka S, Osawa T. Astaxanthin inhibits reactive oxygen species-mediated cellular toxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells via mitochondria-targeted protective mechanism. *Brain Res* 2009; 1254: 18-27.
- 139.Loosli AR, Benson J, Gillien DM, Bourdet K. Nutritional habits and knowledge in competitive adolescent female gymnasts. *Phys Sportsmed* 1986; 14: 118 –130.
- 140.Lukaski CH. Vitamin and Mineral Status: Effects on Physical Performance. *Nutrition* 2004; 20: 632– 644.
- 141.Lumikara M, Johansson I, Ericson T, Virtamo J. Saliva concentrations of some selected proteins and glycoprotein markers in man after supplementary intake of beta-carotene. *Int J Vit Nutr Res* 1988; 58: 171–177.
- 142.Macedo RC, Bolin AP, Marin DP, Otton R. Astaxanthin addition improves human neutrophils function in vitro study. *Eur J Nutr* 2010; 49: 447-457.
- 143.Mackinnon LT, Chick TW, van As A, Tomasi TB. The effect of exercise on secretory and natural immunity. *Adv Exp Med Biol* 1987; 216A: 869-876.
- 144.Mackinnon LT, Ginn E, Seymour G. Decreased salivary immunoglobulin A secretion rate after intense interval exercise in elite kayakers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1993; 61: 180-184.
- 145.Mackinnon LT, Jenkins DG. Decreased salivary immunoglobulins after intense interval exercise before and after training. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25: 678-683.
- 146.Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991; 86: 193–199.
- 147.Malmsten CL, Lignell A. Dietary Supplementation with Astaxanthin-Rich Algal Meal Improves Strength Endurance – A Double Blind Placebo Controlled Study on Male Students . *Carotenoid Science* 2008; 13: 20-22.

148. Margaritis I, Palazzetti S, Rousseau AS, Richard MJ, Favier A. Antioxidant supplementation and tapering exercise improve exercise-induced antioxidant response. *J Am Coll Nutr* 2003; 22: 147–156.
149. Margaritis I, Tessier F, Richard MJ, Marconnet P. No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *Int J Sports Med* 1997; 18:186-190.
150. Martinovic J, Dopsaj V, Dopsaj MJ, Kotur-Stevuljevic J, Vujovic A, Stefanovic A, Nestic G. Long-term effects of oxidative stress in volleyball players. *Int J Sports Med* 2009; 30: 851-856.
151. Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L, Della Valle G: Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 1997; 37: 235-239.
152. Mastaloudis A, Morrow JD, Hopkins DW, Devaraj S, Traber MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1329-1341.
153. Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 911-922.
154. Mastaloudis A, Yu TW, O'Donnell RP, Frei B, Dashwood RH, Traber MG. Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 966-975.
155. McAnulty S, McAnulty L, Nieman D, Morrow J, Dumke C, Utter A. Carbohydrate effect: hormone and oxidative changes. *Int J Sports Med* 2007; 28: 921-927.
156. McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Dumke CL, Morrow JD, Utter AC, Henson DA, Proulx WR, George GL. Consumption of blueberry polyphenols reduces exercise induced oxidative stress compared to vitamin C. *Nutr Res* 2004; 24: 209 –221
157. McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Morrow JD, Shooter LA, Holmes S, Heward C, Henson DA. Effect of alpha-tocopherol supplementation on plasma

homocysteine and oxidative stress in highly trained athletes before and after exhaustive exercise. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 530-537.

158. McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Morrow JD, Utter AC, Henson DA, Dumke CL, Vinci DM. Influence of carbohydrate ingestion on oxidative stress and plasma antioxidant potential following a 3 h run. *Free Radic Res* 2003; 37: 835-840.

159. McAnulty SR, Owens JT, McAnulty LS, Nieman DC, Morrow JD, Dumke CL, Milne GL. Ibuprofen use during extreme exercise: effects on oxidative stress and PGE₂. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39: 1075-1079.

160. McBride JM, Kraemer WJ, Triplett-McBride T, Sebastianelli W. Effect of resistance exercise on free radical production. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30: 67-72.

161. McCarthy DA, Dale MM. The leucocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med* 1988; 6: 333-363.

162. Melikoglu MA, Kaldirimci M, Katkat D, Sen I, Kaplan I, Senel K. The effect of regular long term training on antioxidant enzymatic activities. *J Sport Med Phys Fit* 2008; 48: 388-390.

163. Mero A, Kähkönen J, Nykänen T, Parviainen T, Jokinen I, Takala T, Nikula T, Rasi S, Leppäluoto J. IGF-I, IgA, and IgG responses to bovine colostrum supplementation during training. *J Appl Physiol* 2002; 93: 732-739.

164. Metin G, Atukeren P, Alturfan AA, Gulyasar T, Kaya M, Gumustas MK. Lipid peroxidation, erythrocyte superoxide-dismutase activity and trace metals in young male footballers. *Yonsei Med J* 2003; 44: 979-986.

165. Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis Y, Papassotiriou I, Kouretas D. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39: 1107-1113.

166. Miletić VD, Miletić I: Imunohemijske metode, Društvo medicinskih biohemičara Jugoslavije, 1997. god., Beograd.

167. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase *J Biol Chem* 1972; 247: 3170–3175.
168. Miura M, Umeda T, Nakaji S, Liu Q, Tanabe M, Kojima A ET AL. Effect of 6 months' training on the reactive oxygen species production capacity of neutrophils and serum opsonic activity in judoists. *Luminescence* 2005; 20: 1–7.
169. Miyawaki H, Takahashi J, Tsukahara H, Takehara I. Effects of Astaxanthin on Human Blood Rheology *J Clin Biochem Nutr* 2008; 43: 69–74.
170. Moreira A, Arsati F, Cury PR, Franciscon C, de Oliveira PR, de Araújo VC. Salivary immunoglobulin a response to a match in top-level brazilian soccer players. *J Strength Cond Res* 2009; 23: 1968-1973.
171. Morgan MJ, Liu Y. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 2011; 21: 103-115.
172. Nagaki Y, Mihara M, Tsukahara H, Ono S. The supplementation effect of astaxanthin on accommodation and asthenopia. *J Clin Ther Med* 2006; 22: 41–54.
173. Naghizadeh H, Afzalpour ME, Zarban A. The comparison of antioxidant status and lipid profile of karate athletes with nonathletes. *J Birjand Univ Med Sci* 2009; 16: 54–61.
174. Naguib YMA. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 1150–1154.
175. Nakamura A, Isobe R, Otaka Y, Abematsu Y, Nakata D, Honma C, Sakurai S, Shumada Yoshiaki, Horiguchi Masayuki. Changes in visual function following peroral astaxanthin. *Jpn J Clin Ophthalmol* 2004; 58: 1051–1054.
176. Naziroğlu M, Kiliç F, Uğuz AC, Celik O, Bal R, Butterworth PJ, Baydar ML. Oral vitamin C and E combination modulates blood lipid peroxidation and antioxidant vitamin levels in maximal exercising basketball players. *Cell Biochem Funct* 2010; 28: 300-305.

- 177.Nehlsen-Cannarella SL, Nieman DC, Fagoaga OR, Kelln WJ, Henson DA, Shannon M, Davis JM. Saliva immunoglobulins in elite women rowers and controls. *Eur J Appl Physiol* 2000; 81: 222–228.
- 178.Nelson Steen S, Mayer K, Brownell KD, Wadden TA. Dietary intake of female collegiate heavy weight rowers. *Int J Sports Nutr* 1995; 5: 225-231.
- 179.Neubauer O, Konig D, Kern N, Nics L, Wagner KH. No indications of persistent oxidative stress in response to an ironman triathlon. *Med Sci Sports Exerc* 2008; 40: 2119-2128.
- 180.Nguyen SD, Sok DE. Oxidative inactivation of paraoxonase 1 an antioxidant protein and its effect on antioxidant action. *Free Radic Res* 2003; 37: 77–83.
- 181.Nieman DC, Dumke CL, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty LS, Lind RH, Morrow JD. Immune and oxidative changes during and following the Western States Endurance Run. *Int J Sports Med* 2003b; 24: 541-547.
- 182.Nieman DC, Henson DA, Fagoaga OR, Utter AC, Vinci DM, Davis JM, Nehlsen-Cannarella SL. Change in salivary IgA following a competitive marathon race. *Int J Sports Med* 2002a; 23: 69-75.
- 183.Nieman DC, Henson DA, Gross SJ, Jenkins DP, Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Dumke CL, Utter AC, McAnulty SR, McAnulty LS, Mayer EP. Quercetin reduces illness but not immune perturbations after intensive exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39: 1561-1569.
- 184.Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Opiela SJ, Morrow JD. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon. *J Appl Physiol* 2002; 92: 1970-1977.
- 185.Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty LS, Morrow JD, Ahmed A, Heward CB. Vitamin E and immunity after the Kona Triathlon World Championship. *Med Sci Sports Exerc* 2004, 36: 1328-1335.
- 186.Nieman DC. Exercise immunology: nutritional countermeasures. *Can J Appl Physiol* 2001; 26: S45-S55.

- 187.Nieman DC. Is infection risk linked to exercise workload? *Med Sci Sports Exerc* 2000; 32: S406-S411.
- 188.Niess AM, Hartmann A, Grunert-Fuchs M, Poch B, Speit G. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med* 1996; 17: 397-403.
- 189.Nikolaidis MG, Kyparos A, Hadziioannou M, Panou N, Samaras L, Jamurtas AZ, Kouretas D. Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; 32(2):197-205.
- 190.Nikolaidis MG, Paschalis V, Giakas G, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D, Jamurtas AZ. Decreased blood oxidative stress after repeated muscle-damaging exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39: 1080-1089.
- 191.Nikolaidis MG, Protosygelou MD, Petridou A, Tsalis G, Tsigilis N, Mougios V. Hematologic and biochemical profile of juvenile and adult athletes of both sexes: implications for clinical evaluation. *Int J Sports Med* 2003; 24: 506-511.
- 192.Nishida Y, Yamashita E, Miki W. Quenching activities of common hydrophilic and lipophilic antioxidants against singlet oxygen using chemiluminescence detection system. *Carotenoid Science* 2007; 11: 16-20.
- 193.Nitta T, Ogami K, Shiratori K. The effects of astaxanthin on accommodation and asthenopia—dose finding study in healthy volunteers. *Clin Med* 2005; 21: 543-556.
- 194.Novas AM, Rowbottom DG, Jenkins DG. Tennis , incidence of URTI and salivary IgA. *Int J Sports Med* 2003; 24: 223-229.
- 195.Odeberg JM, Lignell A, Pettersson A, Hoglund P. Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. *Eur J Pharm Sci* 2003; 19: 299–304
- 196.Ohigami K, Shiratori K, Kotake S, Nishida T, Mizuki N, Yazawa K, Ohno S. Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2694–2701.

- 197.Okai Y, Higashi-Okai K. Possible immunomodulating activities of carotenoids in in vitro cell culture experiments. *Int J Immunopharmacol* 1996; 18: 753-758.
- 198.Orhan H, van Holland B, Krab B, Moeken J, Vermeulen NP, Hollander P, Meerman JH. Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. *Free Radic Res* 2004; 38: 1269-1279.
- 199.Orino K, Lehman L, Tsuji Y. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* 2001; 357: 241-247.
- 200.Ortenblad N, Madsen K, Djurhuus MS. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *Am J Physiol* 1997; 272: R1258–R1263.
- 201.Otsuki T, Shimizu K, Iemitsu M, Kono I. Salivary secretory immunoglobulin A secretion increases after 4-weeks ingestion of chlorella-derived multicomponent supplement in humans: a randomized cross over study. *Nutr J* 2011; 10: 91.
- 202.Paker L. Oxidants, antioxidants nutrients and the athlete. *J Sport Sci* 1997; 15: 353–363.
- 203.Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Morrow JD. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol* 2003; 89: 100-107.
- 204.Panza VS, Wazlawik E, Ricardo Schütz G, Comin L, Hecht KC, da Silva EL. Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men. *Nutrition* 2008; 24: 433-442.
- 205.Park JS, Chyun JH, Kim Y, Line LL, ChewBP. Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutr Metab* 2010; 7: 18.

206. Park JS, Mathison BD, Hayek MG, Massimino S, Reinhart GA, Chew BP. Astaxanthin stimulates cell-mediated and humoral immune responses in cats. *Vet Immunol Immunopathology* 2011; 144: 455-461.
207. Paschalis V, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Giakas G, Koutedakis Y, Karatzaferi C, Kouretas D, Jamurtas AZ. Uniform and prolonged changes in blood oxidative stress after muscle-damaging exercise. *In Vivo* 2007; 21: 877-883.
208. Peake JM. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exerc Immunol Rev* 2002; 8: 49-100.
209. Pelletier DM, Lacerte G, Goulet E DB. Effects of Quercetin Supplementation on Endurance Performance and Maximal Oxygen Consumption: A Meta-Analysis. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2012, in press.
210. Pette D, Spamer C. Metabolic properties of muscle fibers. *Fed Proc* 1986; 45: 291.
211. Philips TAC, Childs DM, Dreon S, Phinney S, Leeuwenburgh C. A dietary supplement attenuates IL-6 and CRP after eccentric exercise in untrained males. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35: 2032-2037.
212. Pialoux V, Mounier R, Brugniaux JV, Rock E, Mazur A, Richalet JP, Robach P, Couldert J, Fellmann N. Thirteen days of „live high-train low“ does not affect prooxidant/antioxidant balance in elite swimmers. *Eur J Appl Physiol* 2009; 106: 517-524.
213. Popovic M, Puchner S, Endler G, Foraschik C, Minar E, Bucek RA. The effects of endurance and recreational exercise on subclinical evidence of atherosclerosis in young adults. *Am J Med Sci* 2010; 339: 332-336.
214. Powers SK, Nelson WB, Hudson MB. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic Biol Med* 2011; 51: 942-950.
215. Powers SK, Deruisseau KC, Quindry J, Hamilton KL. Dietary antioxidants and exercise. *J Sport Sci* 2004; 22: 81-94.

216. Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 2008; 88: 1243–1276.
217. Radak Z, Pucsek J, Boros S, Jolfai L, Taylor AW. Changes in urine 8-hydroxy deoxyguanosine levels of super-marathon runners during a four-day race period. *Life Sci* 2000; 66: 1763-1767.
218. Rajković MG, Rumora L, Juretić D, Grubisić TZ, Flegar-Mestrić Z, Vrkić N, Sinjeri Z, Barisić K. Effect of non-genetic factors on paraoxonase 1 activity in patients undergoing hemodialysis. *Clin Biochem* 2010; 43: 1375-1380.
219. Razmjou S, Rajabi H, Jannati M, Azizi M, Jahandideh AA. The effects of delorme and oxford techniques on serum cell injury indices and growth factor in untrained women. *World Journal of Sport Sciences* 2010; 3: 44-52
220. Richter B, Niessner A, Penka M, Grdić M, Steiner S, Strasser B, Ziegler S, Zorn G, Maurer G, Simeon-Rudolf V, Wojta J, Huber K. Endurance training reduces circulating asymmetric dimethylarginine and myeloperoxidase levels in persons at risk of coronary events. *Thromb Haemost* 2005; 94: 1306-1311.
221. Richter R, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 745–753.
222. Richter RJ, Jampsa RL, Jarvik GP, Costa LG, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status and genotypes at specific polymorphisms sites. In: Maines M, Costa LG, Reed DJ, Hodgson E, editors. *Current Protocols in Toxicology*. New York: John Wiley and Sons, 2004.
223. Rokitzki L, Logemann E, Sagredos AN, Murphy M, Wetzel-Roth W, Keul J. Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress. *Acta Physiol Scand* 1994; 151: 149-158.
224. Romani R, De Medio G, di Tullio S, Lapalombella R, Pirisinu I, Margonato V, Veicsteinas A, Marini M, Rosi G. Modulation of paraoxonase 1 and 3 expression after moderate exercise training in the rat. *J Lipid Res* 2009; 50: 2036–2045.

- 225.Rush JW, Sandiford SD. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. *Clin Biochem* 2003; 36: 345-351.
- 226.Sari-Sarraf V, Reully T, Doran DA, Atkinson G. The effects of single and repeated bouts of soccer-specific exercise on salivary IgA. *Arch Oral Biol* 2007; 52: 526-532.
- 227.Sawaki K, Yoshigi H, Aoki K, Koikawa N, Azumane A, Kaneko K, Yamaguchi M. Sports performance benefits from taking natural astaxanthin characterized by visual acuity and muscular fatigue improvements in humans. *J Clin Ther Med* 2002; 18: 1085–1100.
- 228.Schiffman SS, Miletic ID. Effect of taste and smell on secretion rate of salivary IgA in elderly and young persons. *J Nutr Health Aging* 1999; 3:158-64.
- 229.Schiffman SS, Warwick ZS. Effect of flavor enhancement of foods for elderly on nutritional status: food intake, biochemical indices and anthropometric measures. *Physiol Behav* 1993; 53: 395-402.
- 230.Schiffman SS. Intensification of sensory properties of foods for the elderly. *J Nutr* 2000; 130 (suppl): 927-930.
- 231.Schmidt W, Maassen N, Tegtbur U, Braumann KM. Changes in plasma volume and red cell formation after a marathon competition. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1989; 58: 453–458.
- 232.Schroder H, Navarro E, Mora J, Galiano D, Tramullas A. Effects of α -tocopherol, β -carotene and ascorbic acid on oxidative, hormonal and enzymatic exercise stress markers in habitual training activity of professional basketball players. *Eur J Nutr* 2001; 40: 178–184.
- 233.Schroder H, Navarro E, Tramullas A. Nutrition antioxidant status and oxidative stress in profesional basketball players: effects of three compound antioxidative supplement. *Int J Sports Med* 2000; 21: 146-150.
- 234.Schumacher YO, Schmid A, Grathwohl D, Bultermann D, Berg A. Hematological indices and iron status in athletes of various sports and performances. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34: 869-875.

- 235.Selmeci L, Seres L, Antal M, Lukács J, Regöly-Mérei A, Acsády G. Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 294 – 297.
- 236.Shafat A, Butler P, Jensen RL, Donnelly AE. Effects of dietary supplementation with vitamin C and E on muscle function during and after eccentric contractions in humans. *Eur J Appl Physiol* 2004; 93: 196-202.
- 237.Shek PN, Sabiston BH, Buguet A and Radomski MW. Strenuous exercise and immunological changes: a multiple-time-point analysis of leukocyte subsets, CD4/CD8 ratio, immunoglobulin production and NK cell response. *Int J Sports Med* 1995; 16: 466-474.
- 238.Shiratori K, Ogami K, Nitta T. The effects of Astaxanthin on Accommodation and Asthenopia—Efficacy Identification Study in Healthy Volunteers. *Clin Med* 2005; 21: 637-650.
- 239.Silva LA, Pinho CA, Scarabelot CS, Fraga DB, Volpato AM, Boeck CR, De Souza CT, Streck EL, Pinho RA. Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 2009; 105: 861–867.
- 240.Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Su BN. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 7187–7191.
- 241.Speranza L, Pesce M, Patruno A, Franceschelli S, de Lutiis MA, Grilli A, Felaco M. Astaxanthin Treatment Reduced Oxidative Induced Pro-Inflammatory Cytokines Secretion in U937: SHP-1 as a Novel Biological Target. *Mar Drugs* 2012; 10: 890-899.
- 242.Steen SN, McKinney S. Nutritional assessment of college wrestlers. *Phys Sports Med* 1986; 14: 101
- 243.Stefanovic A, Ardalic D, Kotur-Stevuljevic J, Vujovic A, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Mandic-Markovic V, Mikovic Z, Cerovic N.

- Longitudinal changes in PON1 activities, PON1 phenotype distribution and oxidative status throughout normal pregnancy. *Repro Tox* 2012; 33: 20-26.
244. Steinberg JG, Delliaux S, Jammes Y. Reliability of different blood indices to explore the oxidative stress in response to maximal cycling and static exercises. *Clin Physiol Funct Imaging* 2006; 26: 106-112.
245. Sun Y, Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 335-348.
246. Suzuki Y, Ohgami K, Shiratori K, Jin XH, Ilieva I, Koyama Y, Yazawa K, Yoshida K, Kase S, Ohno S. Suppressive effects of astaxanthin against rat endotoxin-induced uveitis by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. *Exp Eye Res* 2006; 82: 275-281.
247. Tauler P, Aguilo A, Gimeno I, Fuentespina E, Tur JA, Pons A. Response of blood cell antioxidant enzyme defences to antioxidant diet supplementation and to intense exercise. *Eur J Nutr* 2006; 45: 187-195.
248. Tauler P, Aguilo A, Gimeno I, Fuentespina E, Tur JA, Pons A. Influence of vitamin C diet supplementation on endogenous anti-oxidant defences during exhaustive exercise. *Pflugers Arch* 2003; 446: 658-664.
249. Tauler P, Ferrer MD, Sureda A, Pujol P, Drobic F, Tur JA, Pons A. Supplementation with an antioxidant cocktail containing coenzyme Q prevents plasma oxidative damage induced by soccer. *Eur J Appl Physiol* 2008; 104: 777-785.
250. Tauler P, Gimeno I, Aguiló A, Guix MP, Pons A, Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activities in athletes during competition and short-term recovery. *Pflugers Arch* 1999; 438: 782-787.
251. Tauler P, Sureda A, Cases N, Aguilo A, Rodriguez-Marroyo JA, Villa G, Tur JA, Pons A. Increased lymphocyte antioxidant defences in response to exhaustive exercise do not prevent oxidative damage. *J Nutr Biochem* 2006; 17: 665-671.
252. Teeuw W, Bosch JA, Veerman ECI, Nieuw Amerongen AV. Neuroendocrine regulation of salivary IgA synthesis and secretion: implications for oral health. *Biol Chem* 2004; 385: 1137-1146.

253. Teixeira V, Valente H, Casal S, Marques F, Moreira P. Antioxidant status, oxidative stress, and damage in elite trained kayakers and canoeists and sedentary controls. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2009; 19: 443-456.
254. Teixeira VH, Valente HF, Casal SI, Marques AF, Moreira PA. Antioxidants do not prevent postexercise peroxidation and may delay muscle recovery. *Med Sci Sports Exerc* 2009; 41: 1752-1760.
255. Tharp GD. Basketball exercise and secretory immunoglobulin A. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1991; 63: 312-314.
256. Tian Y, Nie J, Tong TK, Baker JS, Thomas NE, Shi O. Serum oxidant and antioxidant status during early and late recovery periods following an all-out 21-km run in trained adolescent runners. *Eur J Appl Physiol* 2010; 110: 971-976.
257. Tiollier E, Gomez-Merino D, Burnat P, Jouanin JC, Bourrilhon C, Filaire E. Intense training: mucosal immunity and incidence of respiratory infections. *Eur J Appl Physiol* 2005; 93: 421-428.
258. Tomasi TB. The discovery of secretory IgA and the mucosal immune system. *Immunol Today* 1992; 13: 416-418.
259. Tripathi DN, Jena GB. Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: A study in mice. *Chem-Biol Interact* 2009; 180: 398-406.
260. Tsakiris S, Karikas GA, Parthimos T, Tsakiris T, Bakogiannis C, Schulpis KH. Alpha-tocopherol supplementation prevents the exercise-induced reduction of serum paraoxonase 1/arylesterase activities in healthy individuals. *Eur J Clin Nutr* 2009; 63: 215-221.
261. Tso MOM, Lam TT. Method of retarding and meliorating central nervous system and eye damage. U.S. Patent, #5527533. 1996.
262. Turner JE, Hodges NJ, Bosch JA, Aldred S. Prolonged depletion of antioxidant capacity after ultraendurance exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2011; 43: 1770-1776.

263. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54.
264. Vaughan S, Jat PS. Deciphering the role of nuclear factor-kappa B in cellular senescence. *Aging (Albany N.Y.)* 2011; 3: 913-919.
265. Viitala PE, Newhouse IJ, LaVoie N, Gottardo C: The effects of antioxidant vitamin supplementation on resistance exercise induced lipid peroxidation in trained and untrained participants. *Lipids Health Dis* 2004; 3: 14.
266. Waring WS, Convery A, Mishra V, Shenkin A, Webb DJ, Maxwell SR. Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin Sci (Lond)* 2003; 105: 425-430.
267. Watson TA, Callister R, Taylor RD, Sibbritt DW, MacDonald-Wicks LK, Garg ML. Antioxidant restriction and oxidative stress in short-duration exhaustive exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2005; 37: 63-71.
268. Welch PK, Zager KA, Endres J, Poon SW. Nutrition education, body composition and dietary intake of female college athletes. *Phys Sports Med* 1987; 15: 63-74
269. Wolz E, Liechti H, Notter B, Oesterhelt G, Kistler A. Characterization of metabolites of astaxanthin in primary cultures of rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 1999; 27: 456-462.
270. Wu HJ, Chen KT, Shee BW, Chang HC, Huang YJ, Yang RS. Effects of 24 h ultra-marathon on biochemical and hematological parameters. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2711-2714.
271. Yasunori N, Miharuru M, Jiro T, Akitoshi K, Yoshiharu H, Yuri S, Hiroki T. The effect of astaxanthin on retinal capillary blood flow in normal volunteers. *J Clin Ther Med* 2005; 21: 537-542.
272. Yılmaz N, Eren E, Erel O. Activity paraoxonase and arylesterase and its relationship to antioxidant profiles in young basketball players and sedentary controls. *Medicina Sportiva* 2007; 11: 20-26.

273. Yuan J, Peng J, Yin K, Wang J. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55: 150–165.
274. Zaripheh S, Erdman Jr JW. Factors that influence the bioavailability of xanthophylls. *J Nutr* 2002; 132: 531S–534S
275. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2003; 33: 337–349.
276. Zembron-Lacny A, Slowinska-Lisowska M, Szygula Z. Assessment of the antioxidant effectiveness of alpha-lipoic acid in healthy men exposed to muscle damaging exercise. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 139-143.
277. Ziegler DM. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiol-disulfides in metabolic regulation. *Ann Rev Biochem* 1985; 54: 305-329.
278. Zoppi CC, Hohl R, Silva FC, Lazarim FL, Neto JM, Stancanneli M, Macedo DVI. Vitamin C and E supplementation effects in professional soccer players under regular training. *J Int Soc Sports Nutr* 2006; 3: 37-44.

Biografija

Ivana Baralić je rođena 26. maja 1976. godine u Čačku. Na Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer diplomirani farmaceut, upisana je školske 1995/96. godine, a diplomirala 2002. godine sa srednjom ocenom 9,26 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Po obavljenom jednogodišnjem pripravničkom stažu za farmaceute, položila je stručni ispit 27.07.2004. godine.

Školske 2002/2003. godine upisana je na poslediplomske magistarske studije na predmetu Bromatologija, a od oktobra 2009. godine pohađa doktorske akademske studije, modul Bromatologija. Novembra 2006. godine upisala je specijalističke studije iz Farmakoekonomije i farmaceutske legislative na Farmaceutskom fakultetu. Aprila 2008. godine specijalizirala je iz oblasti farmaceutske legislative sa radom »Analiza dijetetskih suplemenata na bazi glukozamina na tržištu Srbije« sa odličnom ocenom.

Autor je i koautor u 5 originalnih radova objavljenih u časopisima od međunarodnog značaja, kao i 23 sažetaka radova prezentovanih na domaćim i međunarodnim skupovima farmaceuta i doktora medicine.

Učestvovala je u naučno-istraživačkom radu u okviru istraživačkog razvojnog projekta »Napitak od surutke-nova tehnologija« u okviru »Nacionalnog programa biotehnologije i agroindustrije«, čiji je nosilac Tehnološki fakultet iz Novog Sada. U okviru ovog projekta radila je ispitivanje uticaja senzorne stimulacije napicima od surutke na produkciju sekretornog IgA u salivi kod karatista. Učestvovala je ispitivanju potencijalnih prognostičkih markera za Wilms-ov tumor na Insitutu za Patologiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu. Učestvuje u naučno-istraživačkom radu Katedre za Bromatologiju, Farmaceutskog fakulteta u Beogradu i Udruženja za Medicinu Sporta Srbije. Od 2011. godine je aktivan član Centra za sportsku ishranu i suplementaciju. Takođe je angažovana kao doping kontrolor u okviru Antidoping agencije Republike Srbije.

Od oktobra 2002. godine do aprila 2005. godine je bila zaposlena u Institutu za Bromatologiju, Farmaceutskog fakulteta kao stručni saradnik. Učestvovala je u izvođenju praktične nastave na Farmaceutskom fakultetu u Banja Luci. Od aprila 2005. godine je zaposlena u Velefarmu A.D. Holding kao viši komercijalno stručni saradnik.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ивана Баралић

број уписа 31/09

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај суплементације астаксантином на ниво маркера оксидативног стреса и ниво секреторног ИгА у саливи код младих фудбалера“

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

Потпис докторанда

У Београду, 23.10.2012.

Ивана Баралић

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Ивана Баралић _____
Број уписа _____ 31/09 _____
Студијски програм _Докторске академске студије -модул Броматологија _____
Наслов рада „Утицај суплементације атаксантином на ниво маркера
оксидативног стреса и ниво секреторног ИГА у сливи код младих фудбалера“ _____
Ментор ___ др сц. Брижита Ђорђевић _____

Потписани _____ Ивана Баралић _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, ___ 23.10.2012. _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Утицај суплементације атаксантином на ниво маркера оксидативног стреса и ниво секреторног ИГА у саливи код младих фудбалера“

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, __23.10.2012._____

