KINEZIOLOŠKI FAKULTET
SVEUČILIŠTA U SPLITU

POSLIJEDIPLOMSKI DOKTORSKI STUDIJ

Akutni utjecaj treninga različitog intenziteta na imunološki odgovor, markere mišićnog oštećenja i oksidacijskog stresa

DOKTORSKA DISERTACIJA

Antonijo Đerek

Mentor 1:
Izv. prof. dr. sc. Vladimir Ivančev
Mentor 2:
Izv. prof. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić

Split, 2026.

SADRŽAJ

1.UVOD…….. 1
1.1. Vrste tjelesnih aktivnosti……... 2
1.1.1. Aerobni procesi…….. 2
1.1.2. Anaerobni procesi…….. 3
1.2. Dijagnostički postupci za procjenu energetskih kapaciteta…….. 4
1.2.1. Vrste dijagnostičkih postupaka…….. 4
1.2.2. Testovi za procjenu aerobnog energetskog kapaciteta…….. 4
1.2.3. Maksimalni primitak kisika (VO2max)……. 5
1.2.4. Aerobni i anaerobni prag……... 7
1.3. Mišićna oštećenja…….. 8
1.3.1.Direktni markeri mišićnog oštećenja…….. 8
1.3.2. Kreatin kinaza (CK)…….. 9
1.3.3. Laktat dehidrogenaza (LDH)…… 9
1.3.4. Praćenje CK i LDH pri tjelesnoj aktivnosti…….. 10
1.4. Indirektni markeri mišićnog oštećenja…….. 12
1.4.1. Imunološki sustav……... 12
1.4.2. Urođeni imunitet…… 13
1.4.3. Monocitne subpopulacija……... 14
1.4.4. Imunološki odgovor uslijed tjelesne aktivnosti…….. 15
1.4.5. Akutna aktivacija monocitnih subpopulacija uslijed tjelesne aktivnosti……... 16
1.5. Oksidacijski stres……... 17
1.5.1.Antioksidansi……... 19
1.5.2.Metode za procjenu stanja oksidacijskog stresa…….. 21
1.5.3. Mjerenje stupnja oštećenosti lipida (Lipidna peroksidacija)…….. 21
1.5.4. Oksidacijski stres uslijed tjelesne aktivnosti…….. 22
1.5.5. Akutni oksidacijski stres uslijed tjelesne aktivnosti……... 23
2. PROBLEM ISTRAŽIVANJA…….. 25
3. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA……... 27
4. METODE RADA……. 29
4.1. Uzorak ispitanika……... 30
4.2. Procedura mjerenja i varijable…… 33
4.2.1. Antropometrijska mjerenja……. 33
4.2.2. Maksimalni primitak kisika (VO2max)…….. 33

4.2.3. Program treninga……. 33
4.2.4. Uzorkovanje krvi i laboratorijska analiza…… 34
4.2.5. Protočna citometrija…… 35
4.2.6. Biokemijska analiza……... 36
4.2.7. Uzorkovanje urina i laboratorijska analiza…….. 37
4.3. Metode obrade podataka……... 39
5. REZULTATI…… 40
5.1. Opće karakteristike ispitanika…… 41
5.2. Parametri dobiveni spiroergometrijskim VO2max testom na pokretnom sagu……. 41
5.3. Praćenje markera oksidacijskog stresa……. 42
5.4. Praćenje markera mišićnih oštećenja…… 46
5.4.1. Kreatin kinaza (CK)…… 46
5.4.2. Laktat dehidrogenaza (LDH)…….. 49
5.5. Praćenje markera imunološkog odgovora…….. 52
5.5.1. C – reaktivni protein (CRP)…… 52
5.5.2. Ukupni monociti - Diferencijalna krvna slika (DKS)……. 53
5.5.3. Monocitne subpopulacije…… 56
5.5.3.1.CD14+CD16++ monociti……. 56
5.5.3.2. CD14++CD16+ monociti…… 59
5.5.3.3. CD14++CD16- monociti…… 62
5.6. Povezanost markera mišićnog oštećenja, oksidacijskog stresa i imunološkog odgovora……... 64
5.6.1.Povezanost markera mišićnog oštećenja, oksidacijskog stresa i imunološkog odgovora pri intenzitetu GET -10%..... 64
5.6.2. Povezanost markera mišićnog oštećenja, oksidacijskog stresa i imunološkog odgovora pri intenzitetu GET……... 65
5.6.3. Povezanost markera mišićnog oštećenja, oksidacijskog stresa i imunološkog odgovora pri intenzitetu GET +10%..... 66
6. RASPRAVA……. 67
6.1.Ograničenja i nedostatci istraživanja…….. 74
7. ZAKLJUČAK…….. 75
8. LITERATURA……. 78
9. SAŽETAK…… 91

10. ABSTRACT……... 94

POPIS OZNAKA I KARTICA

ATP	adenozin-trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)
ADP	adenozin-difosfat (engl. *adenosine diphosphate*)
AeP	aerobni prag
AnP	anaerobni prag
AS	aritmetička sredina
BMI	indeksom tjelesne mase (engl. *body mass indeks*)
CAT	katalaza (engl. c*atalase)*
CD14	lipopolisaharidni receptor
$CD14^{++}CD16^{-}$	klasični monociti
$CD14^{++}CD16^{+}$	intermedijarni monociti
$CD14^{+}CD16^{++}$	neklasični monociti
CD16	FcyRIII receptor
CK	kreatin kinaza (engl. *creatine kinase*)
CK-BB	moždana kreatin kinaza
CK-MB	kreatin kinaza srčanog mišića
CK-MM	kreatin kinaza skeletnog mišića
CP	kreatin-fosfat (engl. *creatine phosphate*)
CRP	C-reaktivni protein
DKS	diferencijalna krvna slika
EC-GPx	izvanstanična glutation peroksidaza
EC-SOD	izvanstanična superoksid-dismutaza
GET	aerobni prag (engl. *gas exchange threshold*)
GP_X	glutation peroksidaza
GR	glutation reduktaza
HPLC	tekuća kromatografija (engl. *high-performance liquid chromatography*)
HR_{max}	maksimalna frekvencija srca
IL-12	interleukin 12
ITM	indeks tjelesne mase
LDH	laktat dehidrogenaza (engl. *lactate dehydrogenase*)
LH	lipid sa alilnim vodikom
max	maksimalni rezultati mjerenja
MDA	malondialdehid (engl. *malondialdehyde*)
MFI	medijan intenziteta fluorescencije (engl. *median fluorescence intensity)*

min	minimalni rezultati mjerenja
MLSS	maksimalnom laktatnom stabilnom stanju
NAD^+	nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid hidrid
NK	prirodne stanice ubojice (engl. *natural killer cell)*
$O_2^{\bullet-}$	superoksidni anion
RAST	(engl. *Running-based Anaerobic Sprint Test)*
RNS	reaktivne dušikove skupine (engl. r*eactive nitrogen species)*
ROS	reaktivne kisikove skupine (engl. *reactive oxygen species)*
RQ_{max}	respiracijski kvocijent
$RVO_{2max/kg}$	relativni maksimalni primitak kisika
SD	standardna devijacija
SOD	superoksid-dismutaza (engl. *superoxide dismutase)*
TBA	tiobarbituratnom kiselinom (engl. *thiobarbituric acid*)
TNF	faktor tumorske nekroze (engl. *tumor necrosis factor)*
VCO_2	izdahnuti ugljikov (IV) oksid
VE_{max}	maksimalna minutna ventilacija
V_{max}	maksimalna postignuta brzina trčanja
VO_{2max}	maksimalni primitak kisika
$\Delta CD14^{++}CD16-$	promjena ekspresije CD16 markera na $CD14^{++}CD16^-$ monocitima
$\Delta CD14^{++}CD16^+$	promjena ekspresije CD16 markera na $CD14^{++}CD16^+$ monocitima
$\Delta CD14^+CD16^{++}$	promjena ekspresije CD16 markera na $CD14^+CD16^{++}$ monocitima
ΔCK	promjena aktivnosti kreatin kinaze
ΔCRP	promjena koncentracije C- reaktivnog proteina
ΔLDH	promjena aktivnosti laktat dehidrogenaze
ΔMDA	promjena koncentracije malondialdehida
Δmono	promjena broja ukupnih monocita

1. UVOD

Kronične bolesti predstavljaju glavni javnozdravstveni problem u svim razvijenim zemljama svijeta. Povezanost između sjedilačkog načina života i razvoja velikog broja nezaraznih kroničnih bolesti potvrdila su brojna istraživanja (Tremblay i sur., 2010). Prema Booth i sur. (2011) redovita tjelesna aktivnost/vježbanje se smatra primarnom u prevenciji čak 35 kroničnih stanja, kao što su: dijabetes tipa 2, pretilost, bolest masne jetre, hipertenzija, infarkt, kognitivna disfunkcija, depresija, anksioznost. Prema Lee i sur. (2012) čak 5 milijuna prijevremenih smrti je uzrokovano tjelesnom neaktivnosti. Odraslim osobama se, prema uputama kako svjetske tako i nacionalnih zdravstvenih organizacija, preporuča 150 minuta tjelesne aktivnosti tjedno (Pedisic i sur., 2020). Iz svega navedenog vidljive su brojne dobrobiti redovne tjelesne aktivnosti na zdravlje ljudi, no s druge strane prakticiranje dugotrajnih i/ili intenzivnih tjelesnih aktivnosti mogu dovesti do mišićnih oštećenja i stanja kroničnog umora koji mogu biti direktno vezani uz toksični efekt produkcije slobodnih radikala kao i upalni odgovor imunološkog sustava (Cooper i sur., 2002; Ostrowski i sur., 1999).

1.1. Vrste tjelesnih aktivnosti

Prema glavnim metaboličkim putevima koji su uključeni u proizvodnju energije tjelesna aktivnost se može klasificirati kao aerobna i anaerobna, s tim da je potrebno naglasiti kako ne postoji stroga granica između ova dva procesa nego je pri određenim aktivnosti dominantan aerobni proces dok je kod drugih dominantan anaerobni proces (Chamari i sur., 2015).

Energija oslobođena razgradnjom hranjivih tvari ne može se neposredno koristiti za mišićni rad. Osnovni i jedini izvor energije u tjelesnim stanicama je ATP (adenozin-trifosfat), čije su zalihe u mišićima vrlo ograničene. Kako bi se ATP resintetizirao i na taj način održavala njegova koncentracija u mišićnoj stanici konstantnom (oko 5 mmol po kg mišića), koristi se energija iz kemijskih izvora koji zahtijevaju prisustvo kisika (oksidacijski ili aerobni energetski procesi) i iz kemijskih izvora koji oslobađaju energiju bez prisustva kisika (anoksidacijski ili anaerobni energetski procesi) (Hargreaves i sur., 2020).

1.1.1. Aerobni procesi

Aerobni metabolizam, tj. oksidacija ugljikohidrata i masti (iznimno i bjelančevina) daje energiju za dugotrajnu tjelesnu aktivnost niskog ili srednjeg intenziteta (hodanje, trčanje, plivanje, planinarenje). Transportni sustav za kisik (srčano-žilni i dišni sustav) osigurava

dovoljnu količinu kisika, te u lancu oksidativnih procesa (β-oksidacija masnih kiselina, glikoliza, Krebsov ciklus i oksidativna fosforilacija) unutar mitohondrija (staničnih organela u kojima se odvijaju oksidacijski procesi) od jednog mola glukoze nastaje 38 molova ATP-a (Šentija, D., 2010; Bonora i sur., 2012; Hargreaves i sur., 2020).

1.1.2. Anaerobni procesi

Anaerobna glikoliza

Anaerobna glikoliza je proces djelomične anaerobne razgradnje glikogena, odnosno glukoze (glikogen je polimer glukoze, u kojem je obliku glukoza pohranjena u mišićima i jetrima) do mliječne kiseline (laktati – soli mliječne kiseline). Taj se proces sastoji od 12 vezanih reakcija prilikom čega iz jednog mola glukoze (180 grama) nastaju samo 3 mola ATP-a (za razliku od 38 molova ATP-a koliko nastaje aerobnim metabolizmom) (Bonora i sur., 2012; Deshpande i sur.,2023).

Anaerobna glikoliza dovodi do akumulacije mliječne kiseline u mišiću koju neutraliziraju kemijski puferi. Uslučaju duljeg rada takovg intenziteta kapacitet pufera se iscrpljuje i dolazi do smanjenja pH, odnosno acidoze, što u konačnici vrlo brzo dovodi do inhibicije mišićne kontrakcije. Stoga se značaj anaerobnog glikolitičkog sustava očituje pri tjelesnim i sportskim aktivnostima visokog ili maksimalnog intenziteta, trajanja od nekoliko sekundi do 1-2 minute (npr. produljeni sprint, trčanje na 400m), ali i pri intervalnim aktivnostima dužeg trajanja (npr. veslanje, tenis, odbojka) (Šentija, D., 2010; Hargreaves i sur., 2020).

Fosfageni (alaktatni) anaerobni sustav

Uz ATP, kreatin-fosfat (CP) je drugi fosfatni spoj koji cijepanjem na kreatin (C) i anorganski fosfat (Pa) oslobađa veliku količinu energije, kojom se jako brzo obnavlja ATP bez utroška kisika. Iako su zalihe kreatin-fosfata u mišićima nekoliko puta veće od koncentracije ATP-a (15-25 mmol po kg mišića), dovoljne su za svega 5-10 sekundi maksimalne mišićne aktivnosti. Značaj fosfagenog sustava u tjelesnim aktivnostima i sportu očituje se pri kratkim sprintevima, startovima, skokovima, brzim promjenama pravca kretanja i sličnim eksplozivnim aktivnostima koje traju do nekoliko sekundi. Ovaj sustav ima mali kapacitet (ukupnu količinu dostupne energije) ali najveći energetski tempo (veliku brzinu oslobađanja energije) (Šentija, D., 2010; Hargreaves i sur., 2020).

1.2. Dijagnostički postupci za procjenu energetskih kapaciteta

Poznato je da se zahtjevi za razvijenost energetskih kapaciteta (aerobnog i anaerobnog) razlikuje između sportaša različitih sportova ali i isto tako da postoje značajne razlike između energetskih kapaciteta sportaša istih sportova. Razvoj pojedinih energetskih kapaciteta zahtijeva specifične trenažne operatore i individualizirano definirane intenzitete i potrebne intervale rada i oporavka, koje određujemo uz pomoć preciznih podataka o trenutnom stanju funkcionalnih parametara (Vučetić, V.,2009).

1.2.1. Vrste dijagnostičkih postupaka

Testove za provedbu dijagnostike energetskih kapaciteta u praksi dijelimo, s obzirom na mjesto testiranja, na laboratorijske i terenske testove, s obzirom na karakter testa na specifične i nespecifične. S obzirom na vrstu opterećenja dijelimo ih na testove fiksnog i progresivnog opterećenja, a s obzirom na način izvedbe na kontinuirane (bez prekida između pojedinog stupnja opterećenja) ili diskontinuirane (s prekidima između pojedinih stupnjeva opterećenja) testove (Vučetić, V.,2009).

1.2.2. Testovi za procjenu aerobnog energetskog kapaciteta

Aerobni kapacitet (aerobna izdržljivost, kardiorespiratorna izdržljivost ili aerobni fitnes) definira se kao sposobnost obavljanja rada kroz dulji vremenski period u uvjetima aerobnog metabolizma. Aerobni energetski kapacitet po svojoj je definiciji mjera energetskog tempa, odnosno intenziteta oslobađanja energije u jedinici vremena (Vučetić i sur., 2005).

Opće prihvaćeni parametri za procjenu aerobnoga kapaciteta su: maksimalni primitak kisika (VO_{2max}), aerobni (AeP) i anaerobni prag (AnP). Laboratorijskim testovima opterećenja, mjerenjem ventilacijskih i metaboličkih parametara u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, mogu se precizno vrednovati sposobnosti srčanožilnog, dišnog i mišićnog sustava u njihovoj osnovnoj zajedničkoj zadaći - izmjeni plinova te dobiti uvide u pojedine fiziološke i biokemijske karakteristike sportaša (Vučetić, V.,2009).

Moderni mjerni instrumentarij (' breath by breath' matabolički analizator, ergometri i telemetrijski monitor srčane frekvencije) osiguravaju izravno ('on-line') praćenje i naknadnu analizu ventilacijskih i metaboličkih parametara. Temeljem testa provedenoga na ergometru dobiva se čitav niz izmjerenih i izvedenih ventilacijskih i metaboličkih parametara.

Parametri od interesa najčešće se mjere na pokretnom sagu, bicikl, veslačkom ili nekom drugom specijaliziranom ergometru. Danas se pretežno koriste kontinuirani progresivni testovi opterećenja na bicikl ergometru, veslačkom ergometru ili na pokretnom sagu, gdje se porast opterećenja postiže ili povećanjem brzine saga, ili povećanjem nagiba saga (Balke, UCLA test) ili se i brzina i nagib progresivno povećavaju (Bruce), ili povećanjem otpora ili snage provlaka. U pravilu se test izvodi do iscrpljenja ispitanika, ukoliko nema kontraindikacija ili limitirajućih faktora (Vučetić i sur., 2005).

1.2.3. Maksimalni primitak kisika (VO_{2max})

Maksimalni primitak kisika (VO_{2max}) (eng. *Maximal oxigen uptake*) prvi su put opisali Hill i Lupton 1923. godine kao primitak kisika postignut pri maksimalnom intenzitetu vježbanja koji se ne može povećati unatoč daljnjem povećanju otpora (Burtscheri sur., 2023). Odnosno, VO_{2max} možemo promatrati kao maksimalnu sposobnost kardiorespiratornog sustava za prijenos kisika iz zraka u tkiva (Hawkins i sur., 2007). Izražava se u apsolutnim (litra kisika u minuti - LO_2/min) ili relativnim vrijednostima (mililitri kisika po kilogramu tjelesne težine u minuti - ml/kg/min). Maksimalni primitak kisika ovisi o sposobnosti kardiorespiratornog sustava da dopremi atmosferski kisik do mišićnih stanica i o sposobnosti muskulature da iskoristi taj kisik, te se često u literaturi definira kao maksimalni aerobni kapacitet. VO_{2max} nije stabilna vrijednost te je samo nekoliko tjedana vježbanja ili prestanka treninga dovoljno za njegovo povećanje odnosno smanjenje, čineći ga osjetljivim pokazateljem kardiorespiratorne kondicije (Zheng i sur., 2022).

Vrijednosti VO_{2max} -a u populaciji su jako raznolike. Najviše vrijednosti VO_{2max} -a (>80 mL/kg/min) mjerene su kod vrhunskih sportaša u sportovima izdržljivosti kao što su skijaško trčanje, trčanje na duge staze te biciklizam (Lucia i sur., 2000). Muškarci u prosjeku imaju i do 10% više vrijednosti VO_{2max} od žena, kako u općoj populaciji tako i među elitnim sportašima (Santisteban i sur., 2022) (Tablica 1. i Tablica 2.) VO_{2max} nije važan parametar samo za sportaše već i za opću populaciju jer je usko povezan sa duljinom života. Iako je vrijednost VO_{2max}-a značajno genetski predodređen, te pod utjecajem procesa starenja, redovitim treningom izdržljivosti može se značajno poboljšati (od 15 do 20%) u bilo kojoj životnoj dobi (Bacon i sur., 2013). Nakon 30-te godine života,VO_{2max} progresivno opada s godinama brzinom od oko 10% po desetljeću (Pimentele i sur., 2003; Fleg i sur., 2005). U kontekstu praćenja vrijednosti VO_{2max} kod zdravih sjedilačkih i rekreativno aktivnih ljudi, važno je napomenuti kako su mjerene vrijednosti negativno povezan sa indeksom tjelesne mase (eng. body mass index - BMI) (Koch i sur., 2009).

Tablica 1. Normativne vrijednosti VO_{2max} za muškarce (*Preuzeto i prilagođeno prema Cooper Institute for Aerobics Research 1998.*)

Dob (godine)	Izvrsno	Iznad prosječno	Prosječno	Ispod prosječno	Slabo
20-29	>55	51-55	46-50	42-45	<42
30-39	>53	48-53	44-47	41-43	<41
40-49	>52	46-52	42-45	38-41	<38
50-59	>49	43-49	38-42	35-37	<35
60-69	>45	39-45	35-38	31-34	<31
70-79	>41	36-41	31-35	28-30	<28

*vrijednosti izražene u ml $kg^{-1}min^{-1}$

Tablica 2. Normativne vrijednosti VO_{2max} za žene (*Preuzeto i prilagođeno prema Cooper Institute for Aerobics Research 1998.*)

Dob (godine)	Izvrsno	Iznad prosječno	Prosječno	Ispod prosječno	Slabo
20-29	>49	44-49	40-43	36-39	<36
30-39	>45	41-45	37-40	34-36	<34
40-49	>44	39-44	35-38	32-34	<32
50-59	>35	31-35	29-30	25-28	<25
60-69	>35	32-35	29-31	26-28	<26
70-79	>35	32-35	27-29	24-26	<24

*vrijednosti izražene u ml $kg^{-1}min^{-1}$

1.2.4. *Aerobni i anaerobni prag*

Za procjenu aerobnog kapaciteta uz VO_{2max} ,kao osnovni parametar koriste se još i aerobni i anaerobni prag. Aerobni i anaerobni prag označavaju dva metabolička praga koji odjeljuju tri zone intenziteta tjelesne aktivnosti; laganu, umjerenu i tešku i imaju veliki značaj u kliničkoj i sportskoj funkcionalnoj dijagnostici (Skinner i sur., 1980).

Prvi, aerobni prag (AeP) (eng. *gas exchange threshold; GET)* odvaja laganu tjelesnu aktivnost pri kojoj (u vremenu od oko 3 minute) primitak kisika postiže stabilnu vrijednost koja odgovara intenzitetu rada, od umjerene tjelesne aktivnosti, pri kojoj dolazi do povećanja koncentracije mliječne kiseline u radnom mišiću i krvi iznad razine u mirovanju. Taj prag se javlja pri intenzitetu od oko 40-60% VO_{2max}, a naziva se aerobni ili laktatni prag ili prvi ventilacijski prag (Kelly, G. E., 2001).

Pri umjerenom opterećenju intenzitet je iznad aerobnog praga, no još uvijek je moguća ravnoteža između stvaranja i neutralizacije mliječne kiseline, te postizanje stabilnog stanja primitka kisika (VO_2) i stabilne koncentracije mliječne kiseline u krvi. Održavanje navedene ravnoteže moguće je do intenziteta koji odgovara tzv. maksimalnom laktatnom stabilnom stanju (MLSS), odnosno dovoljnoj raspoloživosti pufera ili anaerobnom pragu ili drugom ventilacijskom pragu (Barstow i sur., 1993).

Iznad anaerobnog (AnP) odvija se teška tjelesna aktivnost pri kojoj nije moguća ravnoteža između akumulacije i neutralizacije mliječne kiseline, te potrošnja kisika ne može podmiriti ukupne energetske zahtjeve (Heck i sur., 1985). Anaerobni prag se dostiže pri intenzitetu od oko 80-90% VO_{2max} (u ne-sportaša pri 65 - 70% VO_{2max}, a u sportaša aerobnih disciplina i do 95% VO_{2max}).

1.3. Mišićna oštećenja

Poznato je kako intenzivna tjelesna aktivnost dovodi do oštećenja mišićnih vlakana poprečno prugastih mišića koja se očituje u pojavi unutarstaničnih metabolita u međustaničnom prostoru. Ekscentrične aktivnosti koje karakterizira ponovljena elongacija mišićnih vlakana posljedično dovode do mehaničkih oštećenja na spoju dviju sarkomera (Z – linija) i smatraju se jednim od glavnih uzročnika „curenja“ unutarstaničnih metabolita (Brown i sur., 1999; Clarkson i sur., 2002).

S druge strane, uslijed metaboličkih poremećaja može doći do smanjenja dostupnog ATP i poremećaja u radu Na^+/K^+ i Ca^{2+} pumpi. U tom slučaju dolazi do naglog ulaska izvanstaničnog Ca^{2+} u unutarstanični prostor, što može izazvati niz kaskadnih proteolitičkih reakcija na staničnoj razini i u konačnici dovesti do povećanja membranske permeabilnosti, te otpuštanje viška Ca^{2+} iona i ostalih staničnih metabolita u izvanstanične prostore (Brancaccio i sur., 2010; Khan, F. Y. ,2009).

Sam mehanizam metaboličkih i mehaničkih mišićnih oštećenja nije još dobro razjašnjen. Smatra se kako uključuje niz kompleksnih događaja uključujući stanje oksidacijskog stresa, upalno stanje i imunološki odgovor (Tiidus, P. M., 2005).

U današnje vrijeme postoje brojne metode za detekciju postojanja mišićnih oštećenja. Snimanje magnetskom rezonancom, mišićna biopsija, određivanje koncentracije/aktivnosti različitih biokemijskih markera koji „cure“ iz oštećenih stanica u međustanične prostore, samo su neke od mogućih metoda (Brentano i sur., 2011).

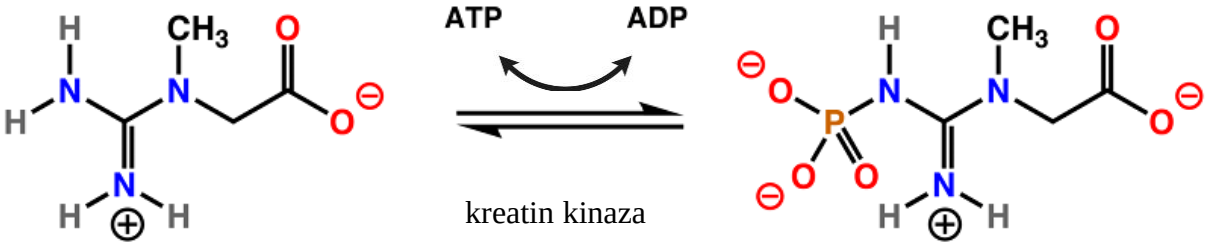
1.3.1.Direktni markeri mišićnog oštećenja

Biokemijski markeri kao što su različiti enzimi ili proteini do čijeg porasta u krvnom serumu dolazi uslijed tjelesne aktivnosti smatraju se direktnim markerima mišićnog oštećenja. Zbog činjenice što se spomenute makromolekule u pravilu nalaze u stanično/tkivnim strukturama odnosno u staničnoj citoplazmi, njihova pojava u međustaničnom prostoru nam može sugerirati da je došlo do određenog poremećaja na stanično/tkivnoj razini (Brancaccio i sur., 2010).

Najčešći „cureći“ produkti koji se koriste pri utvrđivanju postojanja mišićnih oštećenja su enzimi kreatin kinaza (CK), koji se ujedno smatra i „zlatnim standardom“, te laktat dehidrogenaza (LDH) (Baird i sur., 2012).

1.3.2. Kreatin kinaza (CK)

CK je dimerni enzim ukupne mase 86 kDa, koji je pronađen u mitohondrijima i citoplazmi svih stanica u kojima je potreba za energijom velika. CK katalizira reverzibilnu reakciju izmjene fosfatne skupine između molekule kreatinfosfata i molekule ADP–a (McLeish i sur.,2005).



kreatin kreatinfosfat

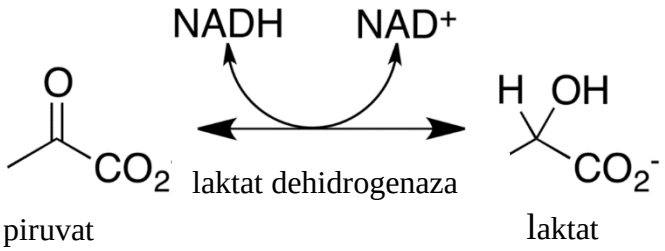
Slika 1. Reakcija katalizirana kreatin kinazom. Preuzeto i prilagođeno sa *Biology Dicitionary*.

Citoplazmatska CK može biti građena od dva tipa podjedinica: M (muscle type) i B (brain type) koje omogućavaju njihovo povezivanje u tri različita izoenzima; CK-MM (kreatin kinaza skeletnog mišića), CK-MB (kreatin kinaza srčanog mišića) te CK-BB (moždana kreatin kinaza), dok se mitohondrijska CK pojavljuje u obliku dvaju oktamernih izoenzima poznatih kao makro-CK zbog njihove velike molekulske mase. (Takagi i sur., 2001; Brancaccio i sur., 2010; Teixeira i sur., 2012).

Ukupna kreatin kinaza mjerena iz krvnog seruma zdravih osoba je kombinacija CK-MM (95%) i CK-MB (5%) izoenzima. CK-MM izoenzim je kemijski vezan na sarkoplazmatski retukulum u području M – linije miofibrila, te je također pronađen u području sarkomerne I-pruge, gdje vjerojatno predstavlja pomoć pri povećanim energetskim zahtjevima (Heled i sur., 2007; Baird i sur., 2012).

1.3.3. Laktat dehidrogenaza (LDH)

LDH je enzim glikolitičkog anaerobnog puta, ukupne mase 144 kDa, odgovoran za reverzibilnu pretvorbu piruvata u laktat, uz popratnu konverziju nikotinamid adenin dinukleotid hidrida (NADH) u njegovu oksidirajuću formu NAD^+.



Slika 2. Reakcija katalizirana laktat dehidrogenazom. Preuzeto i prilagođeno sa *medicinski leksikon.*

Poznato je pet izoenzimskih oblika LDH (LDH1, LDH2, LDH3, LDH4, LDH5) koji nastaju povezivanjem M-polipeptida i H-polipeptida u različitim kombinacijama (Brancaccio i sur., 2010). M-polipeptid katalizira pretvorbu piruvata u laktat, dok je H-polipeptid odgovoran za aerobnu oksidaciju piruvata. Kako se povećava broj M- polipetida u strukturi enzima tako je izraženiji anaerobni energetski put, a povećanjem broja H- polipeptida izraženiji je aerobni energetski put. Tako je npr. LDH1 izoenzim građen od četiri H- polipeptida i izrazito favorizira aerobni put dok je LDH5 izoenzim građen od četiri M- polipeptida i izrazito favorizira anaerobni put dok su preostal tri izoenzima kombinacija H i M polipeptida (Koukourakis i sur., 2003).

1.3.4. Praćenje CK i LDH pri tjelesnoj aktivnosti

CK (izoenzim CK-MM) u krvnom serumu zdravih osoba gotovo u cijelosti dolazi iz poprečno prugastih mišića, iako je pronađena u skoro svim tkivima/organima. LDH1 izoenzim laktat dehidrogenaze je u pravilu dominantna forma koja se može pronaći u krvnom serumu zdravih osoba, što i ne čudi s obzirom na činjenicu da je aerobni metabolizam dominantan način oslobađanja energije. Vrijednosti navedenih enzima mjerene u krvnom serumu uvelike ovise o dobi, spolu, tjelesnoj aktivnosti, vrsti tjelesne aktivnosti, pa čak i dijelu dana kada je krv uzorkovana. Mlađe osobe imaju niže vrijednosti navedenih enzima u odnosu na starije, dok žene imaju niže vrijednosti u odnosu na muškarce, što se objašnjava utjecajem estrogena na memebransku stabilnost i posljedično na manju membransku permeabilnost (Borges i sur., 1989; Strømme i sur., 2004; Brancaccio. i sur., 2008).

Najviše vrijednosti enzimske aktivnosti gore navedenih enzima u krvnom serume su izmjerene nakon jako dugih tjelesnih aktivnosti kao što su ultra maraton i triatlon, te nakon aktivnosti sa izraženom ekscentričnom komponentom kao što je trčanje nizbrdo (Clarkson i sur., 2002). U prvom slučaju imamo dugotrajne, iscrpljujuće aktivnosti koje zasigurno dovode

do metaboličkih poremećaja na staničnoj razini, dok u drugom slučaju izrazito ekscentrične aktivnosti sigurno uzrokuju mehanička oštećenja na spoju dviju sarkomera.

Svakodnevni trening može rezultirati trajno povišenim vrijednostima serumske CK što su potvrdila brojna istraživanja. Razine CK u mirovanju su više kod sportaša nego kod ne treniranih osoba, dok s druge strane uslijed treninga dolazi do značajnijeg povećanja CK kod netrenirani osoba u usporedbi sa sportašima. Zapravo, ako trenirana i ne trenirana osoba odrade istu tjelesnu aktivnost vrijednosti CK treniranih osoba su niže od onih zabilježenih kod ne treniranih osoba (Karamizrak i sur. 1994).

Dinamika pojavljivanja i čišćenja CK i LDH u krvnom serumu ovisi o vrsti treninga, stupnju utreniranosti, trajanju i intenzitetu same aktivnosti. Maksimalne vrijednosti CK i LDH nakon treninga snage mjere se 8 sati nakon aktivnosti, produljene aktivnosti maksimum pokazuju 24 sata nakon i ostaju povišene kroz idućih 48 sati, dok aktivnosti sa izraženom ekscentričnom komponentom mjere maksimum 96 sati nakon, a mogu ostati povišene i tjednima nakon aktivnosti (Stäubli i sur., 1985; Hyatt i sur., 1998; Kobayashi i sur., 2005).

Dugotrajne i iscrpljujuće aktivnosti dovode od porasta sva tri CK izoenzima u krvnom serumu,ali bez dokaza o mogućem oštećenju srčanog mišića, dok povišene vrijednosti CK-BB izoenzima pokazuju značajnu korelaciju sa simptomima i vrstom (ozbiljnosti) ozljeda kod boksača (Kilianski i sur., 2017; Noakes i sur., 1983).

Međutim, mišićni oporavak se ne može procijeniti promjenama u serumskim razinama CK, budući da nema korelacije između „curenja“ enzima u serumu i slabljenja mišićne izvedbe nakon vježbanja (Margaritis i sur., 1999). LDH nam osim kao marker mišićnog oštećenja može poslužiti i pri procjeni adaptacije organizma na česti anaerobni rad, jer su u pravilu bazalne vrijednosti više kod osoba koje prakticiraju anaerobne aktivnosti (Banfi i sur., 2012).

S obzirom na činjenicu da se CK-MM izoenzim nalazi u staničnoj citoplazmi, a istovremeno i u samoj strukturi miofibrila, postavlja se pitanje da li je pojava CK u međustaničnom prostoru znak strukturalnih oštećenja mišićnih vlakana ili uzroke pojave treba tražiti u metaboličkim poremećajima koji za posljedicu imaju povećanje permeabilnosti staničnih membrana. Aktivnosti sa izraženom ekscentričnom komponentom dovode do najvećeg porasta navedenih markera u međustaničnom prostoru (mehanička oštećenja), dok metabolički gledano, što je aktivnost više aerobna, markera je manje. Porastom anaerobnog metabolizma dolazi do povećanja membranske permeabilnosti i posljedično do porasta mjerenih markera u krvi, iz čega možemo zaključiti kako intenzitet tjelesne aktivnosti ima mnogo veći utjecaj od volumena (Bijsterbosch i sur., 1985 ; Clarkson i sur., 2002; Lippi i sur., 2010).

Prema Sorichter i sur. na dinamiku pojavljivanja biokemijskih markera mišićnog oštećenja u međustaničnom prostoru utječe i veličina samih markera i to na način da se manje molekule pojavljuju prve.

S obzirom na sve navedeno značajnost mjerenja biokemijskih markera u trenažnom procesu postaje upitna, jer je s jedne strane teško razlučiti odakle spomenuti enzimi uopće „cure“, dok s druge strane njihove izmjeren vrijednosti pokazuju svoje maksimalne vrijednosti satima, pa i danima nakon aktivnosti, a činjenica je da sportaši u današnje vrijeme ne treniraju jednom tjedno.

1.4. Indirektni markeri mišićnog oštećenja

1.4.1. Imunološki sustav

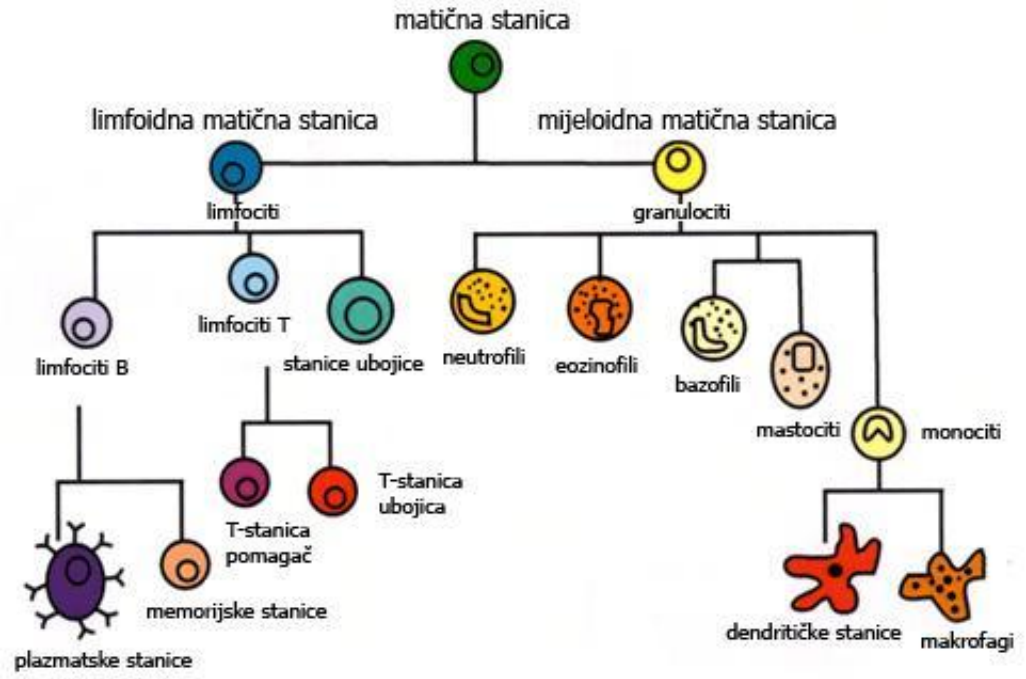
Imunološki sustav uključuje skup strukturalnih i kemijskih barijera, stanica, molekula i procesa čija je zajednička uloga zaštita organizma od stranih antigena poput mikroba, virusa, stanica raka i toksina. Stanično gledano, postoje dva različita odgovora na infekciju: urođeni i stečeni imunitet. Urođeni imunitet se smatra prvom linijom obrane organizma od patogena. Urođeni imunitet je nespecifičan i neovisan o antigenu, te su uključuje odmah ili unutar nekoliko sati od susreta sa antigenom. Urođeni imunološki odgovor nema imunološku memoriju, te nije u stanju prepoznati ili „zapamtiti“ antigen uslijed ponovnog izlaganja. S druge strane stečeni imunitet je specifičan i ovisan o antigenu zbog čega je potrebno više vremena od izlaganja i prepoznavanja antigena do maksimalnog imunološkog odgovora. No, s druge strane mogućnost pamćenja omogućuje puno brži odgovor uslijed ponovnog izlaganja istom antigenu. U urođenom odgovoru sudjeluju fagociti (neutrofili, monociti i makrofagi), stanice koje otpuštaju medijatore upale (bazofili, mastociti i eozinofili), te prirodne stanice ubojice (stanice NK, engl. *natural killer cell*). Tijekom stečenog odgovora dolazi do proliferacije antigen-specifičnih T i B stanica. Urođeni i stečeni imunitet nisu međusobno isključivi nego se zapravo nadopunjavaju (Parkin i sur., 2001.; Delves i sur., 2000.).

1.4.2. Urođeni imunitet

Stanice imunološkog sustava nastaju iz matičnih stanica koštane srži čijom diferencijacijom nastaju mijelopoetska prastanica i zajednička prastanica limfocita. Zajednička prastanica limfocita dalje diferencira u stanice limfocita B, stanice limfocita T i stanice NK. Diferencijacijom mijelopoetskih prastanica nastaju granulociti (neutrofili, bazofili, eozinofili), monociti, mastociti, trombociti i eritrociti (Delves i sur.2000).

Neutrofili se nakupljaju na mjestima bakterijske infekcije i ozljeda tkiva. Imaju sposobnost fagocitoze mikroba i molekula antigena. Proizvode velike količine ROS-a (engl. *reactive oxygen species*) citotoksičnog za bakterije, citokine TNF (engl. *tumor necrosis factor*) i IL-12 (interleukin 12) (Chaplin i sur., 2010).

Imunosne stanice u tkivima se mogu diferencirati u makrofage. Imaju sposobnost fagocitoze mikroba i molekula koje su označene za uništenje imunoglobulinima. Monociti dolaze na mjesto upale ili oštećenja tkiva ubrzo nakon neutrofila i tu ostaju duže vrijeme. Koriste dušikov oksid za učinkovito uništavanje patogena, te istovremeno proizvode velike količine citokina za pojačavanje imunološkog odgovora (IL-12 i interferon-γ) (Gordon S.,2003.).



Slika 3. Stanice imunološkog sustava. *Preuzeto i prilagođeno sa Janeway i sur., 2001.*

1.4.3. Monocitne subpopulacija

Sve do otkrića višebojne fluorescentne protočne citometrije podrijetla i stanične loze bili su slabo poznati. Ova tehnologija omogućila je identifikaciju diferenciranih staničnih populacija na temelju ekspresije specifičnih staničnih markera.

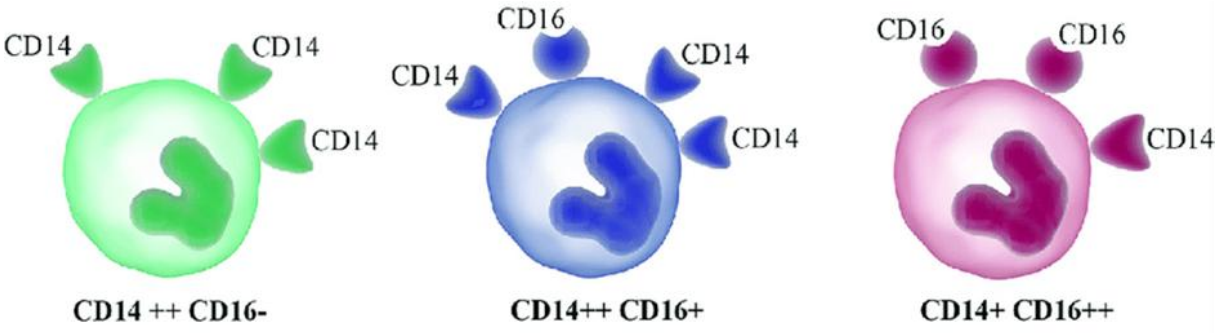
Monociti periferne krvi definirani su ekspresijom CD14 (lipopolisaharidni receptor), CD16 (FcyRIII receptor) i CD64 (Fc gama RI) staničnih površinskih markera, te ekspresijom kemokinskih receptora CD192 (također poznat kao CCR2 – ključni posrednik migracije monocita) i CX3CR1 (fraktalkin receptor) (Shi i sur.,2011).

S obzirom na ekspresiju CD14 (lipopolisaharidni receptor) i CD16 (FcyRIII receptor) poznata su tri tipa monocita:

klasični monociti Mon1 ($CD14^{++}CD16^{-}$), čine oko 90% monocita kod kojih je CD14 marker jako eksprimiran dok CD16 marker uopće nije eksprimiran (slika 4.),

intermedijarni monociti Mon2 ($CD14^{++}CD16^{+}$) kod kojih je CD14 marker jako eksprimiran, dok je CD16 marker slabo eksprimiran (slika 4.),

te neklasični monociti Mon3 ($CD14^{+}CD16^{++}$) kod kojih je CD14 slabo eksprimiran dok je CD16 jako eksprimiran (slika 4.).



Slika 4. Monocitne subpopulacije. *Preuzeto i prilagođeno sa Sanmarco i sur., 2018.*

Klasični monociti Mon1 ($CD14^{++}CD16^{-}$) smatraju se prvom linijom obrane. Uključeni su u različite funkcije, kao što je popravak tkiva i imunološki odgovor. Odgovorni su za fagocitozu te podupiru zacjeljivanje rana i koagulaciju. Pokazuju anti-apoptotičke funkcije i reakcije na podražaje. Eksprimiraju proupalne S-100 proteine, npr. S100A12 i S100A8/9 – što im daje sposobnost podržavanja upale (Wong i sur., 2011; Van Craenenbroeck i sur., 2014).

Intermedijarni monociti Mon2 ($CD14^{+}CD16^{+}$) pokazuju proupalnu i protuupalnu funkciju (produkcija TNFα i IL-10), te su odgovorni za proliferaciju i stimulaciju T stanica. Oni eksprimiraju više površinskih markera uključenih u interakcije između stanica i T stanica koje predstavljaju antigen. Intermedijarni monociti proizvode najveće količine ROS-a od svih subpopulacija i imaju ulogu u stvaranju novih krvnih žila (angiogeneza) (Wong i sur., 2011; Van Craenenbroeck i sur., 2014).

Neklasični monociti Mon3 ($CD14^{+}CD16^{++}$) pokazuju izrazitu protuupalnu aktivnost i igraju glavnu ulogu pri adaptaciji imunološkog sustava. Odgovorni su za proliferaciju i stimulaciju $CD4^{+}$ T-stanica. Pokusima na miševima je uočeno kako neklasični monociti imaju tendenciju mobilizacije na endotelu krvnih žila nakon prenošenja u miševe. In vitro eksperimenti pokazali su veću mobilnost monocita s visokom ekspresijom CD16, u odnosu na one sa slabijom ekspresijom ili bez CD16 ekspresije. Ova pojava upućuje na konstantno pomicanje neklasičnih monocita po endotelu u potrazi za znakovima upale ili oštećenja, spremnih za brzu transmigraciju (Wong i sur., 201; Shantsila i sur., 2011).

1.4.4. Imunološki odgovor uslijed tjelesne aktivnosti

Utjecaj tjelesne aktivnosti na imunološku funkciju široko se istražuje od sredine 1980-ih. U području imunologije vježbanja istraživanja su usmjerena na akutne i/ili kronične tjelesne aktivnosti i njihov utjecaj na imunološki odgovor, prilikom čega je utvrđeno kako u većini slučajeva akutna i kronična tjelesna aktivnost dovode do različitih i često suprotnih učinaka na imunitet. Akutna aktivnost u pravilu dovodi do pojačanog imunološkog odgovora, dok kronična dovodi do pada imunološkog odgovora u vidu pada bazalnih vrijednosti imunoloških stanica u krvnom optoku (Walsh i sur., 2011).

Mikro oštećenja na staničnoj razini rezultiraju pojačanim imunološkim odgovorom što su i dokazala brojna istraživanja, prilikom čega je utvrđeno kako je dovoljna jednokratna aktivnost kako bi došlo do značajnog porasta brojnosti leukocita u krvotoku (Neves i sur., 2015). Iako je postojanje veze između tjelesne aktivnosti i imunološkog odgovora očita, velika individualna varijabilnost samog imunološkog odgovora kao i brojne kontradiktornosti utjecaj treninga različitog modaliteta, intenziteta, volumena, stanja tjelesnog fitnesa ispitanika, dobi, spola na imunološki odgovor otežavaju donošenje konkretnih zaključaka (Kanda i sur., 2013).

Ako uzmemo u obzir činjenicu kako tjelesno aktivni ljudi imaju niže bazalne vrijednosti upalnih markera u odnosu na ne aktivne, očito možemo zaključiti kako postoji adaptacija imunološkog odgovora na redovitu tjelesnu aktivnost (Mikkelsen i sur., 2013). Iako tjelesna

aktivnost ima protuupalni utjecaj, jednokratne tjelesne aktivnosti dovode do prolaznog upalnog stanja (Glesson i sur., 2007). Prema Neves i sur. (2015) veći intenzitet tjelesne aktivnosti akutno dovodi do jačeg imunoškog odgovora u vidu povećanja brojnosti neutrofila i monocita.

Nastale mikrostrukturalne promjene na staničnoj razini uslijed tjelesne aktivnosti uzrokuju brzu mobilizaciju neutrofila koji migriraju unutar oštećenog tkiva gdje povećavaju produkciju reaktivnih vrsta kisika (ROS; reactive oxygen species) koje posljedično mogu dovesti do još većih oštećenja (Quindry i sur. 2003). Unutar 24 sata neutrofili bivaju zamijenjeni monocitima (makrofagi), aktivnim upalnim stanicama koje stvaraju brojne proupalne citokine (Kanda i sur., 2013).

1.4.5. Akutna aktivacija monocitnih subpopulacija uslijed tjelesne aktivnosti

Istraživanja utjecaja tjelesne aktivnosti na ekspresiju monocitnih subpopulacija u literaturi su dosta rijetka i usmjerena su na ispitanike sa određenim kroničnim oboljenjima, te na ljude starije životne dobi(Hong i sur., 2008; Timmerman i sur., 2008; Van Craenenbroeck i sur., 2014; de Matos i sur., 2019). Najčešće su korišteni različiti protokoli treninga sa otporom uz longitudinalne nacrte istraživanja kao bi se pratio utjecaj određene vrste treninga na ekspresiju monocitnih subpopulacija (Walsh i sur.. 2011; Markofski i sur., 2014; Yarbro i sur., 2018) prilikom čega je utvrđena adaptivna uloga tjelesne aktivnosti u vidu pada bazalnih vrijednosti CD16+ monocita uslijed kronične tjelesne aktivnosti što se objašnjava adaptacijom imunološkog odgovora na česta upalna stanja, te su navedena istraživanja usmjerena na moguću intervenciju tjelesne aktivnosti na smanjenje upalnih stanja uslijed kroničnih oboljenja (Walsh i sur.. 2011).

Prema Steppich i sur. (2000) dovoljna je jednokratna maksimalna anaerobna aktivnost u trajanju od jedne minute kako bi došlo do aktivacije CD16+ monocita. Do akutnog porasta CD16+ monocita (odmah nakon aktivnosti) vjerojatno dolazi zbog otpuštanja CD16+ monocita koji se prije tjelesne aktivnosti nalaze u marginalnim krvnim bazenima periferne krvi, adhezirani na manje krvne žile, zbog čega nisu mjerljivi. Uslijed stresa izazvanog tjelesnom aktivnosti dolazi do otpuštanja CD16+ monocita sa krvnih žila u centralni krvni bazen i do njihovog porasta u perifernoj krvi (Steppich i sur. 2000).

Van Craenenbroeck i sur. (2014) su prijavili akutnu aktivaciju $CD16^{+}$ i $CD16^{++}$ monocita 10 minuta nakon aerobne tjelesne aktivnosti (ramp test protokol do otkaza) dok su vrijednosti $CD16^{-}$ monocita bile snižene. Istraživanje je provedeno na uzorku ispitanika sa određenim bubrežnim oboljenjima.

Prema Wonner i sur. (2018) dovoljna je jednominutna aktivnost na biciklergometru pri intenzitetu od 400 W kako bi došlo do povećanja brojnosti svih monocitnih subpopulacija kako kod zdravih ispitanika tako i kod ispitanika sa metaboličkim sindromom.

U istraživanju koje su proveli Hong i sur. (2008) na uzorku zdravih ispitanika i ispitanika sa povišenim krvnim tlakom 20 minutno trčanje na pokretnom sagu pri intenzitetu od 70% od VO_2max dovodi do porasta brojnosti sve tri monocitne subpopulacije odmah nakon aktivnosti uz zadržavanje povišene brojnosti do 10 minuta nakon aktivnosti. Simpson i sur. (2009) su na uzorku zdravih ispitanika koji su trčali 45 minuta pri intenzitetu 75% od VO_{2max}, prijavili pad brojnosti $CD14^{++}CD16^{-}$ monocita odmah nakon aktivnosti i porast sat vremena nakon aktivnost, dok su druge dvije monocitne subpopulacije pokazale obrnutu dinamiku, porast odmah nakon aktivnosti i pad sat vremena nakon.

Prema Shantsila i sur. (2012) 15 minuta nakon trčanja na pokretnom sagu dolazi do povećanja brojnosti klasičnih (CD16-) monocita kod zdravih ispitanika.

Wells i sur. (2016) su prema našim saznanjima jedini do sada istraživali akutni utjecaj treninga različitog intenziteta (i volumena) na ekspresiju monocitnih subpopulacija, ali pri različitim modalitetima treninga s otporom za donji dio tijela. Oni su zaključili kako intenzitet i volumen imaju prilično podjednak utjecaj na porast ekspresije monocitnih subpopulacija, dok slično istraživanje pri aerobnim aktivnostima nije pronađeno.

1.5. Oksidacijski stres

Slobodni radikali su spojevi koji se prirodno stvaraju u ljudskom organizmu, te istovremeno mogu imati i pozitivne (imunološki sustav) i negativne (oštećenja lipida, proteina, DNA molekula) učinke na ljudski organizam (Finaud i sur., 2006). Prema Sen, C.K. (2001) aerobnim metabolizmom na mitohondrijskoj razini 2-5% kisikovih molekula od ukupnog volumena kisika (VO_2) se pretvori u superoksidni anion ($O_2^{\bullet -}$). Nastali superoksidni anion je jako reaktivna čestica koja vrlo brzo napada građevne makromolekule (e.g. lipide, proteine) uzrokujući oštećenja, a nastalo stanje je poznato kao oksidacijski stres.

Oksidacijski stres uključuje niz kemijskih reakcija kojima nastaju takozvani reaktivni oblici porijeklom iz kisika (engl. *Reactive oxygen species,* ROS) i dušika (engl. *Reactive nitrogen species,* RNS). Reaktivni oblici kisika označavaju molekule porijeklom iz kisika te uključuju: superoksid ($O_2^{\bullet -}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal ($\cdot OH$), ozon (O_3) i singlet kisik, dok reaktivnim oblicima dušika smatramo dušikov oksid ($\cdot NO$) i njegove derivate kao što su peroksinitrit ($ONOO^-$) i nitratni anion (NO_2^-) (Patel i sur.,1999; Preiser, J. C. 2012).

Superoksid ($O_2^{\bullet-}$) je kisik s dodatnim elektronom koji nastaje redukcijom molekule kisika jednim elektronom primarno tijekom "curenja" elektrona iz mitohondrijskog respiratornog lancu, osobito iz ubisemikinona ($QH^{\bullet-}$) McCord, J. M. (2000):

$$QH^{\bullet-+} + O_2 \leftrightarrow Q + O_2{}^{\bullet-} \quad \text{(reakcija 1)}$$

i pod utjecajem enzima NADPH oksidaze (engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphatase) koji katalizira proizvodnju superoksida ($O_2^{\bullet-}$) McCord, J. M. (2000):

$$NADPH + 2\ O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + 2\ O^{\bullet-} \quad \text{(reakcija 2)}$$

Vodikov peroksid (H_2O_2) za razliku od superoksida ($O_2^{\bullet-}$) lako difundira kroz stanične membrane. Glavni izvor vodikova peroksida (H_2O_2) je dismutacija superoksida ($O_2^{\bullet-}$) uz katalitičko djelovanje superoksid-dismutaze (engl. *superoxide dismutase*, SOD). Dvije molekule superoksida ($O_2^{\bullet-}$) međusobno reagiraju stvarajući vodikov peroksid (H_2O_2) i kisik Preiser, J. C. (2012):

$$2\ O_2^{\bullet-} + 2\ H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \quad \text{(reakcija 3)}$$

Vodikov peroksid (H_2O_2) enzimatski se reducira sa čak 15 različitih enzima. Djelovanjem katalaze (engl. *catalase*, CAT) koja se najčešće nalazi u peroksisomima, mjestima najveće produkcije vodikova peroksida (H_2O_2) dolazi do njegovog razlaganja na vodu i kisik:

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2\ H_2O + O_2 \quad \text{(reakcija 4)}$$

Važnost odstranjivanja vodikovog peroksida (H_2O_2) je u tome što je H_2O_2 sklon, u reakciji s metalnim ionima (željezo, bakar) stvarati puno opasniji hidroksilni radikal (·OH) (tzv. Fentonova reakcija) (Koppenol, W. H., 1993):

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH + Fe^{3+} + \cdot OH \quad \text{(reakcija 5)}$$

Superoksid ($O_2^{\bullet-}$) zbog svojeg negativnog naboja ne može ulaziti u unutrašnjost membrana i ne može reagirati u reakcijama peroksidacije lipida, za razliku od hidroksilnog radikala (·OH).

Jedna od reakcija odgovornih za nastanak oksidacijskog stresa je lipidna peroksidacija. To je lančana reakcija koja može biti potaknuta hidroksilnim radikalom (·OH):

$$LH + \cdot OH \rightarrow L\cdot + H_2O \qquad \text{(reakcija 6)}$$

$$L\cdot + O_2 \rightarrow LOO\cdot \qquad \text{(reakcija 7)}$$

$$LOO\cdot + LH \rightarrow LOOH + L\cdot \qquad \text{(reakcija 8)}$$

gdje je LH lipid sa alilnim vodikom koji je prisutan u višestruko nezasićenim masnim kiselinama (Tepšić i sur., 2007).

1.5.1.Antioksidansi

Antioksidansi su tvari koje u malim koncentracijama, u odnosu prema oksidabilnim supstratima, odgađaju ili inhibiraju oksidaciju tih supstrata. Djelovanje antioksidansa može se opisati sljedećim mehanizmima:

– uklanjanjem kisika, ili utjecanjem na smanjivanje lokalnih koncentracija kisika

– uklanjanjem metalnih iona

Prema Tepšić i sur. (2007) antioksidanse možemo podijeliti u četiri skupine:

- Unutarstanični antioksidacijski enzimi (Tablica 1)
- Membranski antioksidansi (Tablica 2)
- Izvanstanični antioksidansi (Tablica 3)
- Niskomolekularni endogeni i nutitivni hidrofilni antioksidansi (Tablica 4)

Tablica 3. Unutarstanični antioksidacijski enzimi (Preuzeto i prilagođeno prema Štefan, L., Tepšić, T., Zavidić, T., Urukalo, M., Tota, D., & Domitrović, R. (2007). Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis, 43*(2.), 84-93)

superoksid-dismutaze	katalitički uklanjaju $O_2^{\bullet -}$
katalaza	uklanja H_2O_2 kada je prisutan u velikim koncentracijama
glutation-peroksidaze	uklanjaju H_2O_2 kada je prisutan u malim koncentracijama; također uklanjaju organske hidroperokside
citokrom-oksidaze	priječe oslobađanje aktivnih kisikovih spojeva tijekom redukcije O_2 u H_2O

Tablica 4. Membranski antioksidansi (Preuzeto i prilagođeno prema Štefan, L., Tepšić, T., Zavidić, T., Urukalo, M., Tota, D., & Domitrović, R. (2007). Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis, 43*(2.), 84-93)

vitamin E	antioksidacijsko djelovanje ostvaruje kidanjem lanaca
β-karoten	ima sposobnost uklanjanja singletnoga kisika i slobodnih radikala
koenzim Q	ima antioksidacijsko djelovanje u respiratornome lancu

Tablica 5. Izvanstanični antioksidansi (Preuzeto i prilagođeno prema Štefan, L., Tepšić, T., Zavidić, T., Urukalo, M., Tota, D., & Domitrović, R. (2007). Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis, 43*(2.), 84-93)

transferin	veže ione željeza
laktoferin	veže željezo pri nižim vrijednostima pH-a
haptoglobin	veže hemoglobin
hemopleksin	veže hem
albumin	veže bakar, hem i uklanja HOC
ceruloplazmin	veže ione bakra, koristi vodikov perokid za reoksidaciju bakra
EC-SOD	katalitički uklanja superoksidni anion
EC-GPx	katalitički uklanja hidroperokside
bilirubin	uklanja peroksilne radikale
urati	uklanjaju radikale i vežu metale
glukoza	uklanja ·OH

Tablica 6. Niskomolekularni endogeni i nutitivni hidrofilni antioksidansi (Preuzeto i prilagođeno prema Štefan, L., Tepšić, T., Zavidić, T., Urukalo, M., Tota, D., & Domitrović, R. (2007). Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis, 43*(2.), 84-93)

glutation	uklanja radikale, koristi se za konjugaciju, za regeneraciju askorbata, te kao koenzim
vitamin C	uklanja slobodne radikale doniranjem elektrona, pri čemu nastaje slabo reaktivan askorbilni radikal
polifenoli	uklanjaju slobodne radikale i vežu metalne ione
bilirubin	uklanja peroksilne radikale

urati	uklanjaju radikale i vežu metalne ione
glukoza	uklanja hidroksilne radikale
selen	koenzim glutation peroksidaza

1.5.2.Metode za procjenu stanja oksidacijskog stresa

Poznate su brojne metode za procjenu stanja oksidacijskog stresa: mjerenje koncentracije slobodnih radikala; mjerenje stupnja oštećenosti lipida, proteina ili DNA molekula; mjerenje aktivnosti i koncentracije antioksidacijske enzimske obrane. Svaka od metoda ima svojih dobrih i loših strana, a svim metodama je zajedničko to što postoje brojne kontradiktornosti među istima zbog čega interpretaciji dobivenih rezultata treba pristupati sa oprezom (Finaud i sur., 2006).

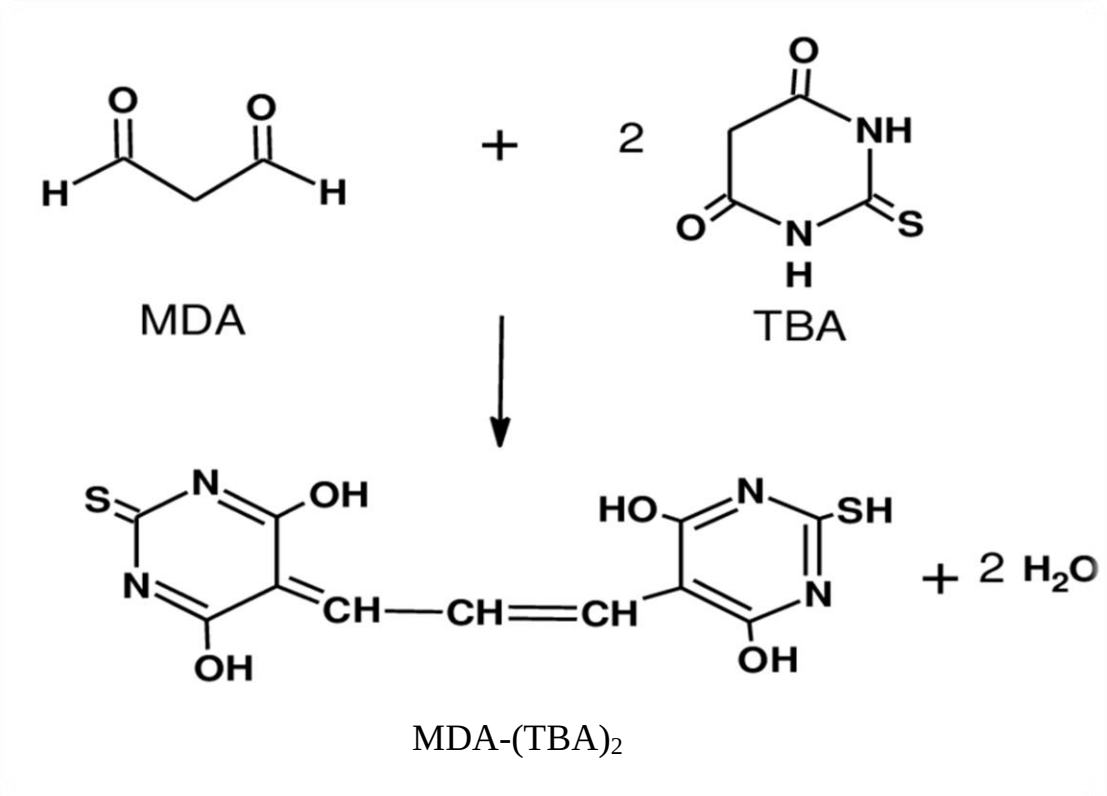
1.5.3. Mjerenje stupnja oštećenosti lipida (Lipidna peroksidacija)

Lipidnu peroksidaciju najčešće uzrokuje hidroksilni radikal (·OH). Najčešće ispitivan pokazatelj lipidne peroksidacije je malondialdehid (engl. Malondialdehyde, MDA) koji se tijekom peroksidacije lipida stvara u malim količinama.

MDA je organski spoj (aldehid) molekulske formule $CH_2(CHO)_2$, a u organizmu prevladava njegova enolna forma, te se koristi kao marker lipidne peroksidacije. Mjerenje koncentracije malondialdehida (MDA), uz brojne kontradiktornosti, je u literaturi dosta česta metoda za procjenu stanja oksidacijskog stresa (Halliwell i sur., 2004; Il'yasova i sur., 2012).

Poznate su brojne metode za detekciju i kvantifikaciju MDA u biološkim uzorcima od kojih se je HPLC (tekuća kromatografija) pokazala kao najbolja u kontekstu osjetljivosti i specifičnosti (Karatas i sur., 2002; Grotto i sur., 2009). Problem navedene metode u kontekstu njene primjene u istraživanjima povezanosti oksidacijskog stresa i tjelesne aktivnosti se nalazi u činjenici da je navedena metoda relativno skupa (aparatura, reagensi), te zahtjeva dosta veliko znanje osobe koja metodu izvodi, što dodatno povisuje cijenu.

Osim navedene HPLC metode spektrofotometrijska TBA-MDA metoda je u literaturi najčešće korištena metoda. Navedena metoda se temelji na derivatizaciji MDA s 2-tiobarbituratnom kiselinom (TBA) pri čemu MDA reagira sa dva ekvivalenta TBA prilikom čega nastaje MDA-$(TBA)_2$ kompleks. Reakcija se odvija pri povišenoj temperaturi i u kiselim uvjetima, pri čemu MDA-$(TBA)_2$ kompleks daje crveno fluorescentno obojenje (Johnston i sur., 2007; Grotto i sur., 2009) (Slika 5.).



Slika 5. Prikaz kemijske reakcije nastajanja MDA-$(TBA)_2$ derivata. *Preuzeto i prilagođeno sa Award , N. S., 2016; doktorska disertacija.*

Navedena metoda u usporedbi sa HPLC metodom je dosta jednostavnija i jeftinija, ali je njena specifičnost i osjetljivost manja uz nestabilnost produkta peroksidacije koji se određuje i mogućnost stvaranja artefakata radi uzorkovanja, pohrane i složenosti bioloških uzoraka (Štefan, L. i sur., 2007). Neovisno o tome koja metoda je odabrana, MDA se u pravilu mjeri iz uzoraka krvi (plazma, serum), dok su neki autori određivali koncentracije MDA iz urina kromatografskim metoda (Korchazhkina i sur., 2003; Hadley i sur., 2009; Yalçın i sur., 2010). Weitner i sur. (2016) prema našim saznanjima su jedini do sada prijavili spektrofotometrijsku metodu za određivanje koncentracije MDA u urinu.

1.5.4. Oksidacijski stres uslijed tjelesne aktivnosti

Tjelesna aktivnost izaziva metaboličke promjene u organizmu koje dovodi do aktivacije adaptivnih mehanizama usmjerenih na uspostavljanje nove dinamičke ravnoteže. Jedna od najznačajnijih promjena u tom pogledu događa se u mišićnom tkivu, u kojem sve veća potražnja za energijom tijekom (i nakon) tjelesne aktivnosti generira veću iskorištenost kisika od strane mitohondrija (Ashton i sur., 1998).

Poprečno prugasti mišići glavni su izvor reaktivnih oblika kisika (engl. Reactive oxygen species, ROS). Tijekom mišićne kontrakcije dolazi do povećanja prijenos elektrona iz kompleksa I i III u mitohondrijskom respiratornom lancu što u konačnici može dovesti do proizvodnje superoksidnog radikala (O_2^-); primarnog člana reaktivnih oblika kisika (ROS). Ovi toksični produkti kontraktilne aktivnosti dismutiraju se u vodikov peroksid (H_2O_2) pomoću superoksid dismutaze (SOD), koja je prva obrana od radikala, nakon čega se sukcesivno detoksiciraju drugim enzimima kao što su katalaza, glutation peroksidaza (GP_X) i glutation reduktaza (GR) (Sakellariou i sur., 2014; Powers i sur., 2011).

Ubrzani metabolički procesi (uslijed tjelesne aktivnosti) mogu dovesti do akutnog narušavanja unutarstanične antioksidacijske obrane koja se na staničnoj razini može očitovati u povećanoj propusnosti staničnih membrana uslijed lipidne peroksidacije jer slobodni radikali kisika mogu uzrokovati oksidaciju polinezasićenih masnih kiselina u strukturi staničnih membrana. (Michailidis i sur., 2007; Bloomer i sur., 2008; Deminice i sur., 2011). Navedeno stanje dovodi do smanjene membranske fluidnosti, povećane membranske propusnosti, pa čak i do imunološkog odgovora (Radak i sur., 1999; Itri i sur., 2014). Kao posljedicu oksidacije masnih kiselina u međustaničnom prostoru možemo očekivati pojavu različitih sekundarnih metabolita kao što je malondialdehid (MDA) (Janero, 1990; Finaud i sur., 2006).

1.5.5. Akutni oksidacijski stres uslijed tjelesne aktivnosti

Većina studija utjecaja tjelesne aktivnosti na markere oksidacijskog stresa je usmjerena na praćenje markera proteinskih oštećenja, te na ukupni antioksidacijskih kapacitet, dok je relativno mali broj istraživanja vezan uz istraživanje lipidne peroksidacije.

Većina istraživanja spomenute markere mjeri iz uzoraka krv i to većinom u dvije vremenske točke (prije i nakon), dok je mali broj istraživanja prikupio više od dva uzorka krvi nakon aktivnosti (Radeka i sur., 2003). Postoje velike nedosljednosti u rezultatima vezanim za učinak vježbanja na razine specifičnih biomarkera oksidacijskog stesa; razlike u subjektima (trenirani, ne trenirani), vrsti protokola (razlike u trajanju i intenzitetu), vremenskim točkama uzorkovanja krvi, načinu analize dobivenih podataka (Michailidis i sur., 2007).

Nekoliko studija je prijavilo akutni porast biomarkera lipidne peroksidacije nakon tjelesne aktivnosti. Prema Bachur i sur. (2007.) produkcija ROS-a, kao i porast markera lipidne peroksidacije (MDA) je usko vezana uz intenzitet i volumen aktivnosti s time da intenzitet aktivnosti pokazuje najviše vrijednosti (istraživanje na miševima), što su i potvrdili Deminice i sur. (2011.) uspoređujući dva različita protokola treninga sa vanjskim otporom. Blumer i sur.

(2006.) nisu zabilježili porast MDA odmah nakon aerobne aktivnosti, dok prema Michailidis i sur. (2007.) MDA pokazuje najviše vrijednosti sat vremena nakon aerobne aktivnosti. Spirlandeli i sur. (2014.) su uspoređujući tri različite metode mjerenja MDA iz uzoraka krvi (MDA-HPLC, MDA-TBARS i MDA-MP), na uzorku nogometaša primjenom RAST protokola (*Running-based Anaerobic Sprint Test*), utvrdili statistički značajan porast MDA odmah nakon aktivnosti, koji ostaje povišen kroz idućih sat vremena.

Bouzid i sur. (2014.) su uspoređujući dvoji grupe ispitanika različite po dobi, došli do zaključka kako starije osobe imaju više vrijednosti MDA u krvnoj plazmi nakon tjelesne aktivnosti, dok prema Valado i sur. (2007.) nakon intenzivne anaerobne aktivnosti (Wingate test) više vrijednosti MDA pokazuju trenirani od ne treniranih osoba. Za razliku od gore navedenih istraživanja u kojima je utvrđen porast vrijednosti MDA nakon tjelesne aktivnosti, Groussard i sur. (2003.) su još ranije prijavili snižene vrijednosti MDA (MDA-TBARS metodom iz krvne plazme) nakon provedenog Wingate testa.

2. PROBLEM ISTRAŽIVANJA

S obzirom na sve prethodno navedeno, očito postoji veza između mišićnih oštećenja, imunološkog odgovora, oksidacijskog stresa i pojave markera mišićnog oštećenja u međustaničnom prostoru, no usprkos očitom postojanju veze i brojnim istraživanjima ta veza još nije u potpunosti razjašnjena. S druge strane, većina istraživanja povezanosti imunološkog odgovora kao i stanja oksidacijskog stresa sa tjelesnom aktivnosti kao uzorak imaju sportaše, dok su istraživanja na općoj populaciji većinom usmjerena na istraživanja navedenih stanja na uzorku ljudi sa određenim kroničnim oboljenjima, te na uzorku ljudi starije životne dobi. Istraživanja ovog tipa na uzorku zdravih ljudi koji su uključeni u neki od oblika rekreativne aktivnosti dosta su rijetka. I dok brojni radovi upućuju na adaptivnu ulogu tjelesne aktivnosti na smanjenje količine oksidacijskog stresa, istraživanje samog procesa adaptacije organizma na sam oksidacijski stres je otežan. S jedne strane većina metoda zahtjeva uzorkovanje krvi (invazivna metoda) što smanjuje mogućnost istraživanja na najmlađoj populaciji (djeca), dok s druge strane relativno skupe i komplicirane metode onemogućavaju prikupljanje većeg i robusnijeg biološkog uzorka kako bi se moglo doći do konkretnijih zaključaka.

3. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Glavni ciljevi istraživanja su:

1. Utvrditi akutni utjecaj treninga različitog intenziteta na ekspresiju proupalnih i protuupalnih monocita.
2. Utvrditi akutni utjecaj treninga različitog intenziteta na pojavnost markera mišićnih oštećenja u krvnom serumu.
3. Utvrditi akutni utjecaj treninga različitog intenziteta na pojavnost markera oksidacijskog stresa (MDA) u urinu.
4. Ispitati relativno jednostavnu i ne invazivnu metodu za procjenu lipidne peroksidacije kako bi utvrdili njenu osjetljivost i reproducibilnost u svrhu daljnjih istraživanja povezanosti tjelesne aktivnosti i oksidacijskog stresa.

Sporedni cilj istraživanja je:

1. Ispitati postojanje povezanosti između markera mišićnog oštećenja, markera oksidacijskog stresa i imunološkog odgovora uslijed tjelesne aktivnosti.

Hipoteze ovog istraživanja su sljedeće:

H1 - Postoji značajna povezanost između intenziteta tjelesne aktivnosti i ekspresije proupalnih i protuupalnih monocitnih markera kod sportaša rekreativaca.
H2 - Postoji značajna povezanost između markera mišićnog oštećenja i intenziteta tjelesne aktivnosti kod sportaša rekreativaca.
H3 - Postoji značajna povezanost između markera oksidacijskog stresa i intenziteta tjelesne aktivnosti kod sportaša rekreativaca.
H4 - Spektrofotometrijska metoda za određivanje MDA u urinu je dovoljno osjetljiva i reproducibilna, te se može koristiti u istraživanjima povezanosti oksidacijskog stresa i tjelesne aktivnosti.
H5 - Postoji značajna povezanost između markera mišićnog oštećenja i markera imunološkog odgovora kod sportaša rekreativaca.
H6 - Postoji značajna povezanost između markera mišićnog oštećenja i markera oksidacijskog stresa kod sportaša rekreativaca.
H7 - Postoji značajna povezanost između markera imunološkog odgovora i markera oksidacijskog stresa kod sportaša rekreativaca.

4. METODE RADA

Istraživanje je provedeno na Kineziološkom fakultetu u Splitu, Medicinskom fakultetu u Splitu, Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Splitu, te u privatnom medicinsko-biokemijskom laboratoriju u Splitu. U laboratoriju za sportsku fiziologiju kineziološkog fakulteta odrađena su spiroergometrijska testiranja na pokretnom sagu uz nadzor izv.prof.dr.sc. Vladimira Ivančeva. U laboratoriju za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta u Splitu su odrađena mjerenja protočnim citometrom pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Nikoline Režić Mužinić. Spektrofotometrijske metode istraživanja su se provodile u laboratorijima prirodoslovno- matematičkog fakulteta uz nadzor izv.prof.dr.sc. Stjepana Orhanovića, dok su se rutinske analize krvnih uzoraka odrađene u medicinsko-biokemijskom laboratoriju LabPlus. Istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva Kineziološkog fakulteta u Splitu. Istraživanje je provedeno u skladu s načelima Helsinške deklaracije. Ispitanicima je objašnjeno o kakvom se istraživanju rade, što istraživanje uključuje, što se od njih očekuje prilikom istraživanja, te je svaki ispitanik dobrovoljno pristupio istraživanju uz mogućnost izlaska iz istraživanja u svakom trenutku.

4.1. Uzorak ispitanika

Uzorak ispitanika je bio sačinjen od 11 zdravih, rekreativno sportski aktivnih ispitanika (dob od 18 do 35 godina; ITM (indeks tjelesne mase) < 30 kg/m^2) koji prakticiraju trčanje kao rekreativnu aktivnost 3 do 4 puta tjedno u trajanju od 30 do 40 minuta. Zbog mogućeg hormonskog utjecaja na rezultate mjerenja svi ispitanici su bili muškog spola.

Mjesec dana prije uključivanja u studiju ispitanici su upućeni u čitavi protokol istraživanja nakon čega su dali pisani pristanak o svojevoljnom uključivanju u studiju sa mogućnošću izlaska iz studije u svakom trenutku studije.

Ispitanici su upućeni da barem 7 dana prije dolaska na testiranje ne koriste nikakve antioksidanse (vitamin C, vitamin E), da izbjegavaju aktivnosti sa izraženom ekscentričnom komponentom (dizanje utega, pliometrija, trčanje nizbrdo), te da na dan dolaska na testiranje ne koriste nikakve supstance sa diuretskim efektom (kava, čaj) zbog mogućeg razrjeđenja urina.

Prije uključivanja u istraživanje ispitanici su ispunili upitnik o zdravstvenom statusu kako bi utvrdili moguće dodatne utjecaje na imunološki odgovor, dok je dodatni isključujući faktor bila vrijednosti C – reaktivnog proteina (akutni upalni marker) koji je određen prilikom svih testiranja i u slučaju povišenih bazalnih vrijednosti ispitanik je isključen iz daljnjeg istraživanja. Svim ispitanicima je prije početka istraživanja (najkasnije dva tjedna prije) određen maksimalni primitak kisika (VO_{2max}) na pokretnom sagu, metaboličkim analizatorom

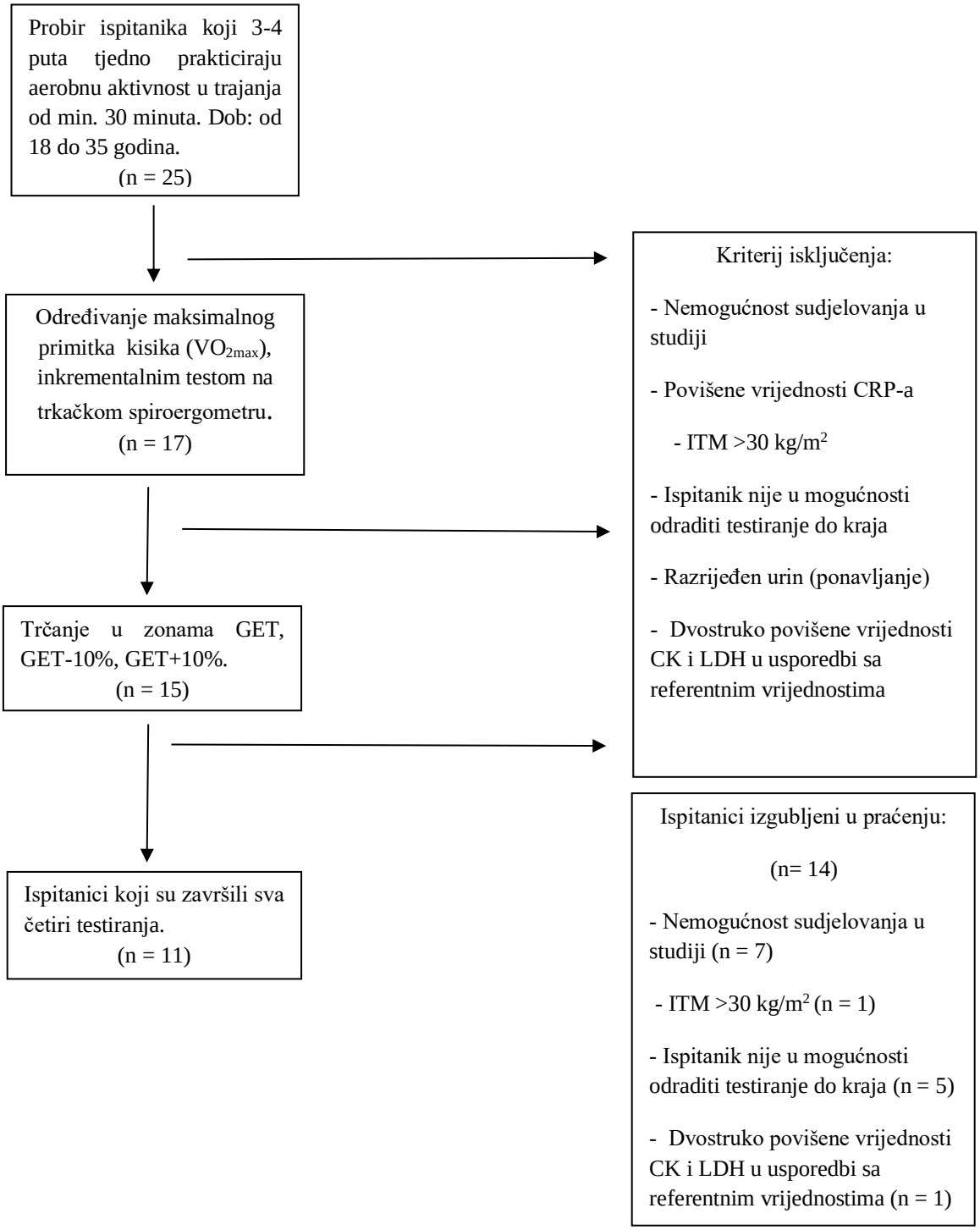
(Quark, Cosmed, Italia). Ukoliko ispitanik nije mogao odraditi testiranje do kraja bio bi isključen iz daljnjeg istraživanja.

Ispitanicima je tijekom istraživanja mjerena tjelesna masa i tjelesna visinu, te ukoliko je ITM bio viši od 30 kg/m^2 ispitanici nisu bili uključeni u istraživanje.

Na početku istraživanja 25 ispitanika je bilo zainteresirano za uključivanje u istraživanje. Nakon što je svima objašnjen protokol istraživanja 7 ispitanika je odustalo od uključivanja u istraživanje zbog ne mogućnosti poštivanja protokola iz određenih osobnih razloga.

1 ispitanik je isključen zbog povišenog ITM-a, a 17 ih je pristupilo spiroergometrijskom testiranju za procjenu maksimalnog primitka kisika (VO_{2max} test). Prilikom VO_{2max} testa dvoje ispitanika nije uspjelo odraditi testiranje do kraja (nemogućnost dosezanja anaerobnog praga), te su isključeni iz daljnjeg istraživanja.

Nakon probira ispitanika, 15 ispitanika je uključeno u istraživanje od kojih je dvoje isključeno zbog nemogućnosti odrađivanja testova do kraja (20 minuta pri intenzitetu GET +10%; engl. *gas exchange threshold*), jedan ispitanik je odustao zbog ozlijede na radu, dok je jedan ispitanik isključen od strane provoditelja istraživanja zbog konstantno povišenih vrijednosti markera mišićnih oštećenja (CK, LDH), što je uzrokovano prirodom posla kojim se bavi, tako da nije bilo moguće da se pridržava preporuka o tjelesnoj ne aktivnosti prije istraživanja. Ukupno je 11 ispitanika završilo istraživanje (Slika 3).



Slika 6. Hodogram istraživanja

4.2. Procedura mjerenja i varijable

4.2.1. Antropometrijska mjerenja

Sva antropometrijska mjerenja izvodio je pristupnik osobno. Pri prvom dolasku u laboratorij svakom ispitaniku izmjerene su tjelesna masa i tjelesna visina. Tjelesna masa i visina izmjereni su koristeći kalibriranu vagu i visinomjer (Seca, Birmingham, UK). Iz prikupljenih antropometrijskih mjerenja izračunat je ITM koji je izračunat prema formuli ITM= tjelesna masa (kg)/kvadrat tjelesne visine u metrima (m^2).

4.2.2. Maksimalni primitak kisika (VO_{2max})

Pri prvom dolasku u laboratorij svakom je ispitaniku određen maksimalni primitak kisika (VO_{2max}) inkrementnim testom na pokretnom sagu, metaboličkim analizatorom. Ukoliko ispitanik nema iskustvo u trčanju na pokretnom sagu isti je prije uključivanja u istraživanje bio uključen u jedan neovisni VO_{2max} test kako bi bio upoznat sa metodom testiranja kao i sa pokretnim sagom. Protokol testiranja se sastojao od dva dijela. Prvi dio testa je počinjao pri brzini od 5 km/h nakon čega se brzina povećavala svakih 3 minute za 1 km/h dok se ne postigne brzina od 7 km/h i služio je za zagrijavanje ispitanika. Nakon što bi se postigla brzina od 7 km/h brzina bi se povećavala za 0.1 km/h svakih 6 sekundi. Testiranje je prekinuto kada bi ispitanik dao znak da ne može više održavati brzinu pokretnog saga. Inkrementalni test sa „ramp“ protokolom sa povećanjem brzine svakih 6 sekundi se je koristio kako bi se svakom ispitaniku što točnije odredio individualni aerobni prag (GET- *gas exchange threshold*) (Schneider i sur., 2005) .

4.2.3. Program treninga

S obzirom na sastav ispitanika u uzorku (rekreativni sportaši) intenzitet tjelesne aktivnosti u istraživanju je bila aktivnost u zoni rada koja je prilagođena ispitanicima – aktivnost u zoni aerobnog praga. Iz podataka dobivenih VO_{2max} testom svakom ispitaniku je tzv. V- slope metodom određen individualni aerobni prag (GET) (Beaver i sur., 1986; Schneider i sur., 1993). Dobiveni rezultati su korigirani za 30 sekundi (vraćeni unatrag) kako bi se smanjio utjecaj vremenskog odmaka stvarnog stanja u mišićima sa podacima koji se dobiju iz izdahnutih plinova (Iannetta i sur. 2019). Nakon što je svakom ispitaniku određena njegova individualna GET zona, svakom je ispitaniku prema brzini trčanja u GET zoni izračunata brzina trčanja u

zonama 10% ispod (GET-10%,) i 10% iznad (GET+10%) aerobnog praga. Svaki ispitanik je nakon VO_{2max} testa odradio tri testiranja u gore navedenim zonama (GET, GET-10%, GET+10%) u trajanju od 20 minuta (Slika 6). Svaki od navedenih testova je započeo 5 minutnim hodanjem na pokretnom sagu pri brzini od 5 km/h nakon čega bi uslijedilo trčanje pri individualnim brzinama svakog ispitanika. Vrijeme trajanja navedenih testova je određeno s obzirom na pilot istraživanje u kojem je utvrđeno kako je GET+10% zona u trajanju od 20 minuta maksimalno trajanje aktivnosti koju izabrani profil ispitanika može izdržati. Ispitanici su testiranja odraditi u razmaku od tjedan dana, uvijek u jutarnjim satima. Kako bi smanjili mogući psihogeni učinak na rezultate testova, ispitanici su prije svakog testiranja izvlačili šifrirane kartice intenziteta aktivnosti (šifre poznate samo istraživačima) koju trebaju odraditi taj dan.



Slika 7. Spiroergometrijesko testiranje

4.2.4. Uzorkovanje krvi i laboratorijska analiza

Svakom ispitaniku je neposredno prije i 30 minuta nakon aktivnosti u medicinsko-biokemijskom laboratoriju LabPlus uzet uzorak krvi (4mL) iz kubitalne vene. Pristupnik prilikom svakog testiranja ispitanike osobno vozio u laboratoriji na uzorkovanje krvi od strane

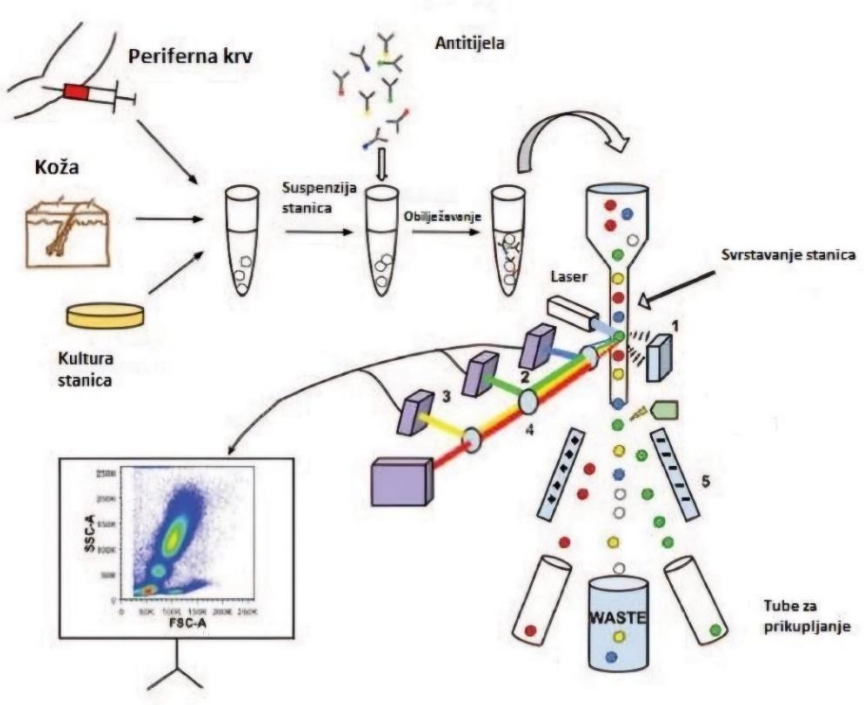
licenciranih laboratorijskih tehničara. Nakon što je krv uzorkovana dio uzorka je ostajao u laboratoriju LabPlus na analizi dok je dio uzorka pristupnik dostavljao u laboratorij za medicinsku kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta u Splitu na daljnju analizu. Uzorkovanje krvi je napravljeno 30 minuta nakon aktivnosti kako bi se umanjio mogući utjecaj promjene volumena krvne plazme na dobivene rezultate (Bloomer i sur. 2013).

Iz uzoraka krvi određene su sljedeće varijable:

1. Markeri imunološkog odgovora
   a) Ukupni monociti (DKS)
   b) Proupalni i protuupalni monociti: Mon1 ($CD14^{++}$ $CD16^{-}$), Mon2 ($CD14^{++}$ $CD16^{+}$), Mon3 ($CD14^{+}$ $CD16^{++}$)
   c) C-reaktivni protein (CRP)
2. Markeri mišićnog oštećenja
   a) Enzim kreatin-kinaza (CK)
   b) Enzim laktat-dehidrogenaza (LDH)

4.2.5. Protočna citometrija

Monocitne subpopulacije su određene pomoću antitijela: anti - CD14 i anti - CD16, metodom protočne citometrije iz uzoraka pune krvi (slika 4).



Slika 8. Princip rada protočnog citometra. Preuzeto i prilagođeno *sa Bandov, I.,2014; doktorska disertacija*.

Uzorci krvi potrebni za protočnu citometriju i biokemijsku analizu prikupljeni su od svih sudionika u razdoblju prije i 30 minuta nakon treninga. Krv je uzeta iz polietilenskog katetera umetnutog u antekubitalnu venu. Sto mikrolitara pune krvi prethodno je tretirano reagensom koji blokira Fc receptor (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka) kako bi se spriječilo nespecifično vezanje i inkubirano je 20 minuta u mraku na 25°C s 4 μL PerCP-Cy5.5-konjugiranih antitijela protiv ljudskog CD14s (eBioscience, SAD) i 5 μL fikoeritrinom konjugiranih antitijela koja reagiraju na ljudski CD16 (eBioscience, SAD). Nakon lize eritrocita otopinom za lizu (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka), stanice su analizirane protočnom citometrijom (BD Accuri C6, BD Biosciences, Belgija). Neobojeni uzorci stanica izmjereni su i obrađeni kao negativne kontrole za postavljanje odgovarajućih regija. Za definiciju staničnih populacija najčešće se koristi točkasti dijagram veličine i zrnatosti stanica (FSC×SSC) na kojem se postavlja regija (R) analize oko ciljnih stanica iz kojih će se analizirati specifični fluorescentni signali. Akvizicija stanica zaustavljena je na 10^6 stanica.

Podaci dobiveni citometrom analizirani su pomoću FlowLogic softvera (Inivai Technologies, Mentone Victoria, Australija).

4.2.6. Biokemijska analiza

Sve uzorke analizirao je iskusni biokemičar u laboratoriju LabPlus slijedeći isti standardni postupak.

Diferencijalna krvna slika (DKS) je dobivena iz uzoraka pune krvi (venska krv) Coulterovom metodom pomoću Beckman Coulter Olympus AU480 biokemijskog auto-analizatora.

C-reaktivni protein (CRP) je određen imunoturbidimetrijskim testom za kvantitativno određivanje C-reaktivnog proteina (CRP) u humanom serumu, pomoću Beckman Coulter Olympus AU480 biokemijskog auto- analizatora.

Aktivnost kreatin-kinaze (CK) u krvnom serumu je određena kinetičkim UV testom pomoću Beckman Coulter Olympus AU480 biokemijskog auto- analizatora.

Aktivnost laktat-dehidrogenaze (LDH) u krvnom serumu je određena kinetičkim UV testom pomoću Beckman Coulter Olympus AU480 biokemijskog auto- analizatora.

4.2.7. Uzorkovanje urina i laboratorijska analiza

Uzorci urina su uzorkovani u pet vremenskih točaka, prema slijedećim vremenskim intervalima: prije aktivnosti, 30 minuta nakon aktivnosti, nakon 6 sati, nakon 12 sati i nakon 24 sata. Uzorci su pohranjeni u sterilne čaše za urin sa čepom. Pri uzorkovanju urina ispitanici su upućeni da mjehur uvijek isprazne do kraja. Uzrokovanje urina prije i 30 minuta nakon aktivnosti je bilo pod vremenskom kontrolom pristupnika, dok su ostala tri uzorkovanja odrađena na odgovornost samih ispitanika.

Iz uzoraka urina određena je sljedeća varijabla:

1. Marker oksidacijskog stresa
    a) Malondialdehid (MDA)

Koncentracija malondialdehida (MDA) je određena iz uzoraka urina spektrofotometrijskom metodom prema Weitner i sur. (2016).

2-tiobarbiturna kiselina (TBA) i o-fosforna kiselina (o-H_3PO_4)nabavljeni su od Kemike, Zagreb,Hrvatska. 1,1,3,3-tetraetoksipropan (malondialdehid bisdimetilacetal) (Sigma, St. Louis, MO, SAD) korišten je kao MDA standard. Sve kemikalije bile su p.a. kvalitete i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja.

Osnovna otopina MDA (u koncentraciji od 3,0 M) pripremljena je razrjeđivanjem MDA standarda u MilliQ vodi uz dodavanje 0.1 M HCl. Osnovna otopina MDA pohranjena je u alikvotima na –20 °C. Radni standardi koncentracije 0.3035 mM pripremani su svježi svakodnevno otapanjem u MilliQ vodi (Weitner i sur. 2016; Reitnezerova i sur. 2017).

Metodom dodavanja standarda „ standard addition method“ određena je koncentracija MDA u uzorcima urina. Metoda pripreme uzoraka prikazana je u Tablici 1.

Tablica 7. Priprema uzoraka za metodu dodavanja standarda. Preuzeto i prilagođeno prema Weinter i sur. 2016.

Uzorak	**V(urin) /µl**	**V(o-H_3PO_4, 1%)/µl**	**V(TBA,0.6%) /µl**	**V(MilliQ voda)/µl**	**V(standard) /µl**
Slijepa proba	400	750	-	260	-
Uzorak	400	750	250	10	-
Standard 1	400	750	250	5	5
Standard 2	400	750	250	-	10

Nakon pripreme uzoraka prema tablici 1. reakcijske smjese zagrijavane su na 90 °C tijekom 30 minuta u temperaturno kontroliranom bloku za grijanje (G-Term 035, Fratelli Galli, Milano, Italija). Reakcija je zaustavljena stavljanjem uzoraka na led. Koncentracija MDA mjerena je spektrofotometrijski pri $\lambda = 532$ nm. Koncentracija MDA u uzorku urina je na kraju izračunata kao [MDA] = – b / a, gdje su b i a odsječak i nagib pravca regresijske linije.

Prije spektrofotometrijskih mjerenja svakom uzorku urina je izmjerena gustoća zbog mogućeg utjecaja gustoće na izmjerene rezultate. Uzorci urina su uzorkovani u pet vremenskih točaka kako bi se mogla pratit dinamika mjerenog markera u urinu.

Koncentracija malondialdehida (MDA) je određena iz uzoraka urina spektrofotometrijskom metodom, pri čemu je ukupno izmjereno 165 uzoraka (55 uzoraka po intenzitet). Svaki uzorak je mjeren tri puta kako bi se umanjila vjerojatnost pogreške pri mjerenju, te su konačne vrijednosti izražene kao prosječne vrijednosti od tri mjerenja. Sva mjerenja je obavio pristupnik osobno u biokemijskom laboratoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu. Vrijednosti MDA u uzorcima koji su uzorkovani prije i nakon aktivnosti (prvo i drugo mjerenje) su određene neposredno nakon aktivnosti, dok su vrijednosti u uzorcima trećeg, četvrtog i petog mjerenja određene kroz 24 sata od uzorkovanja. Svi uzorci su u periodu između uzorkovanja i mjerenja bili pohranjeni u hladnjaku.

4.3. Metode obrade podataka

Sve mjerene varijable su opisane standardnim deskriptivnim statističkim parametrima: aritmetičkom sredinom i pripadajućom standardnom devijacijom, minimalnim i maksimalnim rezultatom, te medijalnom vrijednosti.

Normalitet distribucije izmjerenih varijabli je utvrđen pomoću Kolmogorov-Smirnovljevog testa. Za usporedbu bazalnih vrijednosti svih izmjerenih varijabli korištena je jednofaktorska ANOVA.

T- testom za zavisne uzorke testirane su razlike između dva mjerenja. Za testiranje razlika između tri ili više mjerenja korištena je analiza varijance ponovljenih mjerenja (RM ANOVA) uz Fisher LSD post hoc test. Dvofaktorskom ANOVOM ponovljenih mjerenja procijenjen je mogući utjecaj gustoće uzoraka urina na izmjerene vrijednosti, uz Bonferroni post hoc test. Povezanost varijabli ocijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije r.

Razina značajnosti je postavljena na $p<0.05$. Svi podatci su obrađeni u programu statistica 13.3 (TIBCO Software Inc, USA).

5. REZULTATI

5.1. Opće karakteristike ispitanika

U istraživanje je uključeno 11 ispitanika koji su odradili tri testiranja pri tri različita intenziteta u razmaku od tjedan dana. Antropometrijske karakteristike su prikazane u tablici 1.

Tablica 8. Antropometrijske karakteristike ispitanika

Broj ispitanika (n)	Dob (godine)	Visina (cm)	Tjelsna masa (kg)	ITM (kg/m^2)
11	34,4 ±0,9	185,2±3,3	89,7±7,7	26,1±1,7

*Vrijednosti su izražene kao aritmetička sredina uz pripadajuću standardnu devijaciju.

Kratice: ITM – indeks tjelesne mase

5.2. Parametri dobiveni spiroergometrijskim VO_{2max} testom na pokretnom sagu

Spiroergometrijskim VO_{2max} testom na pokretnom sagu na uzorku od 11 ispitanika izmjerena je prosječna vrijednost relativnog maksimalnog primitka kisika ($RVO_{2max/kg}$) u visini od 48,65 mL/kg/min, što prema literaturi (s obzirom na dob ispitanika) odgovara iznad prosječnim vrijednostima. $RVO_{2max/kg}$ kao i ostali parametri dobiveni VO_{2max} testom su prikazani u tablici 2.

Tablica 9. Parametri dobiveni spiroergometrijskim VO_{2max} testom na pokretnom sagu

Varijable	AS	Min	Max	SD
VE_{max} (L/min)	150,86	124,4	176,2	15,6
VO_2 (mL/min)	4264	3632	5161	485,1
VCO_2(mL/min)	4711	4091	5632	496,6
$RVO_{2max/kg}$ (mL/kg/min)	48,65	42,23	55,68	4,6
HR_{max}(otk,/min)	188,91	179	198	6,3
RQ_{max}	1,14	0,96	1,24	0,1
V_{max}	15,07	12	17	1,6

Kratice: AS - aritmetička sredina, Min - minimalni rezultati mjerenja, Max - maksimalni rezultati mjerenja, SD - standardna devijacija, VE_{max} – maksimalna minutna ventilacija, VO_2 – maksimalni primitak kisika, VCO_2 – izdahnuti ugljikov (IV) oksid, $RVO_{2max/kg}$ – relativni maksimalni primitak kisika, HR_{max} – maksimalna frekvencija srca, RQ_{max} – respiracijski kvocijent, V_{max} – maksimalna postignuta brzina trčanja.

5.3. Praćenje markera oksidacijskog stresa

Određivanjem MDA iz urina pri tri različita intenziteta trčanja (GET – 10%, GET i GET + 10 %) utvrđen je porast koncentracije MDA nakon tjelesne aktivnosti u odnosnu na početno stanje pri sva tri intenziteta aktivnosti. U sva tri slučaja porast je veći od 50% u odnosu na početno stanje; GET -10% (63,1%), GET (72,9%) i GET +10% (91,5%). Primjetna je i relativno pravilna dinamika smanjenja koncentracije mjerenog markera u oporavku, 6, 12 i 24 sata nakon aktivnosti (opaska: uzorkovanje urina nije bilo pod kontrolom voditelja istraživanja).
Dobivene vrijednosti uz pripadajuće deskriptivne parametre su prikazane u tablici 3.
*GET (*Gas exchange threshold* – aerobni prag)

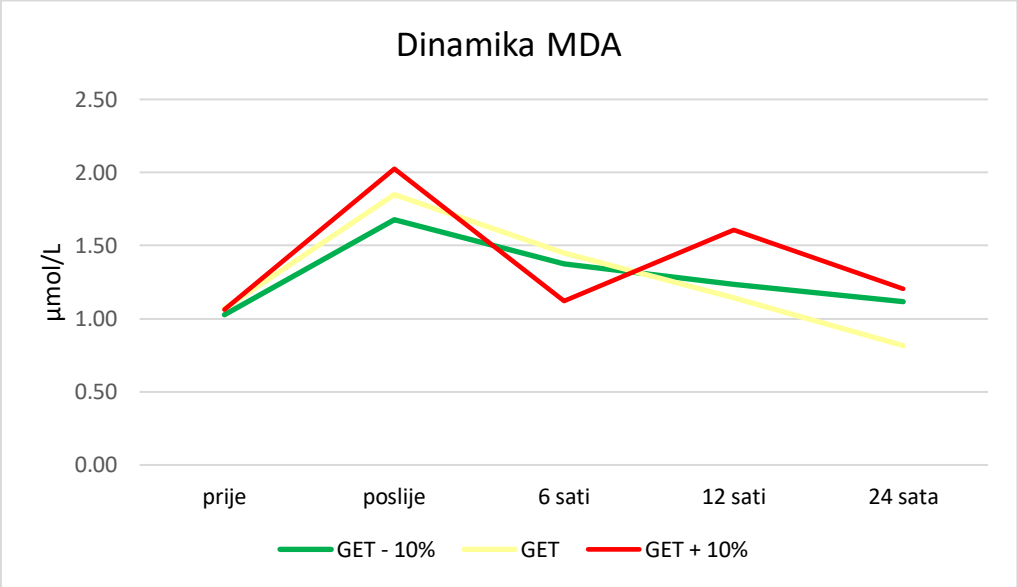
Tablici 10. Deskriptivni parametri za izmjerene vrijednosti malondialdehida (MDA) iz uzoraka urina pri tri različita intenziteta u pet vremenskih točaka

Vrijeme uzorkovanja (MDA)	N	AS*	SD	Min	Max	Median
A1	11	1,03	0,55	0,10	2,08	0,98
A2	11	1,68	0,74	0,23	2,82	1,79
A3	11	1,38	0,63	0,65	2,50	1,47
A4	11	1,23	0,68	0,13	2,45	0,95
A5	11	1,12	0,92	0,12	2,88	0,92
B1	11	1,07	0,44	0,27	1,83	1,12
B2	11	1,85	1,01	0,70	4,25	1,65
B3	11	1,45	0,90	0,05	3,48	1,28
B4	11	1,14	0,57	0,53	2,38	1,05
B5	11	0,82	0,62	0,17	2,41	0,60
C1	11	1,06	0,73	0,10	3,10	0,92
C2	11	2,03	2,06	0,35	7,66	1,49
C3	11	1,12	0,71	0,08	2,15	0,97
C4	11	1,61	0,98	0,87	4,20	1,29
C5	11	1,21	0,77	0,23	2,85	1,10

*vrijednosti MDA izražene u µmol/L

Kratice: A – GET – 10%, B – GET, C - GET + 10 %; 1 – prije aktivnosti, 2 – nakon aktivnosti, 3 – šest sati nakon aktivnosti, 4 – dvanaest sati nakon aktivnosti, 5 – dvadeset i četiri sata nakon aktivnosti

MDA – malondialdehid, N – broj uzoraka, AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, Min – minimalni rezultati mjerenja, Max – maksimalni rezultati mjerenja, Medijan – medijalna vrijednost)



Slika 9. Grafički prikaz dinamike MDA pri tri različita intenziteta u pet vremenskih točaka

Iz grafičkog prikaza (Slika 2.) je vidljiv porast vrijednosti MDA nakon aktivnosti pri sva tri intenziteta. Dinamika nakon 6, 12 i 24 sata pokazuje veća ili manja odstupanja ovisno o intenzitetu. Analizom varijance ponovljenih mjerenja utvrđena je statistički značajna razlika samo unutar intenziteta GET ($p < 0,05$) dok kod ostala dva intenziteta GET – 10% ($p=0,106$) i GET +10% ($p=0,137$) nije utvrđena. Post hoc analizom utvrđene su statistički značajne razlike kako je prikazano u tablicama 4,5,6.

Fisher LSD post hoc testom rezultata izmjerenih pri intenzitetu GET – 10% utvrđene su statistički značajne razlike između prvog i drugog mjerenje ($p=0,01$), te između drugog i petog mjerenja ($p=0,03$). Daljnjom analizom može se vidjeti kako je vrijednost između drugog i četvrtog mjerenja statistički granično značajna ($p=0,09$) (Tablica 4).

Tablica 11. Fisher LSD test pri intenzitetu GET – 10%

Vrijeme uzorkovanja	**A1 (1,03)**	**A2 (1,68)**	**A3 (1,38)**	**A4 (1,23)**	**A5 (1,12)**
A1					
A2	**0,01**				
A3	0,17	0,24			
A4	0,42	0,09	0,57		
A5	0,72	**0,03**	0,31	0,65	

Kratice: A - GET – 10%; 1 – prije aktivnosti, 2 – nakon aktivnosti, 3 – šest sati nakon aktivnosti, 4 – dvanaest sati nakon aktivnosti, 5 – dvadeset i četiri sata nakon aktivnosti

Fisher LSD post hoc testom rezultata izmjerenih pri intenzitetu GET utvrđene su statistički značajne razlike između prvog i drugog mjerenje (p=0,00), drugog i četvrtog mjerenja (p=0,00), drugog i petog mjerenja (p=0,00), te između trećeg i petog mjerenja (p=0,01). Daljnjom analizom može se vidjeti kako je vrijednost između drugog i trećeg mjerenja statistički granično značajna (p=0,08) (Tablica 5).

Tablica 12. Fisher LSD test pri intenzitetu GET

Vrijeme uzorkovanja	**B1** (1,07)	**B2** (1,85)	**B3** (1,45)	**B4** (1,14)	**B5** (0,82)
B1					
B2	**0,00**				
B3	0,10	0,08			
B4	0,74	**0,00**	0,18		
B5	0,27	**0,00**	**0,01**	0,15	

Kratice: B - GET; 1 – prije aktivnosti, 2 – nakon aktivnosti, 3 – šest sati nakon aktivnosti, 4 – dvanaest sati nakon aktivnosti, 5 – dvadeset i četiri sata nakon aktivnosti

Fisher LSD post hoc testom rezultata izmjerenih pri intenzitetu GET +10% utvrđene su statistički značajne razlike između prvog i drugog mjerenje te između drugog i trećeg mjerenja. Granična značajnost utvrđena je između drugog i petog mjerenja(Tablica 6).

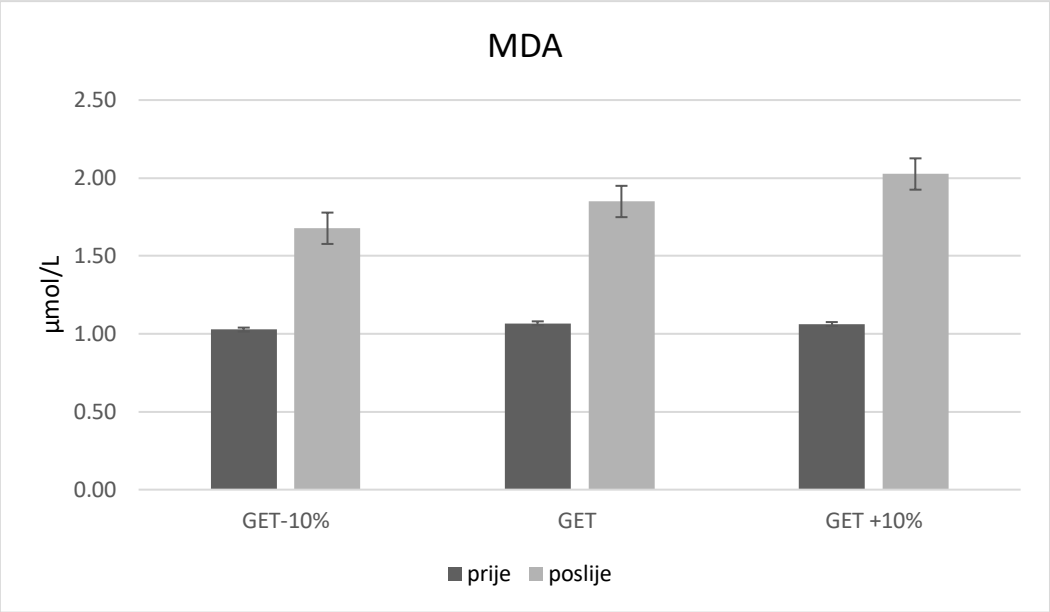
Tablica 13. Fisher LSD test pri intenzitetu GET + 10%

Vrijeme uzorkovanja	**C1** (1,06)	**C2** (2,03)	**C3** (1,12)	**C4** (1,61)	**C5** (1,21)
C1					
C2	**0,03**				
C3	0,89	**0,04**			
C4	0,20	0,33	0,25		
C5	0,74	0,06	0,84	0,35	

Kratice: C - GET + 10%; 1 – prije aktivnosti, 2 – nakon aktivnosti, 3 – šest sati nakon aktivnosti, 4 – dvanaest sati nakon aktivnosti, 5 – dvadeset i četiri sata nakon aktivnosti

Fisher LSD post hoc testom rezultata izmjerenih pri sva tri intenziteta aktivnosti utvrđene su statistički značajne razlike između početnog mjerenja i 30 minuta nakon aktivnosti,

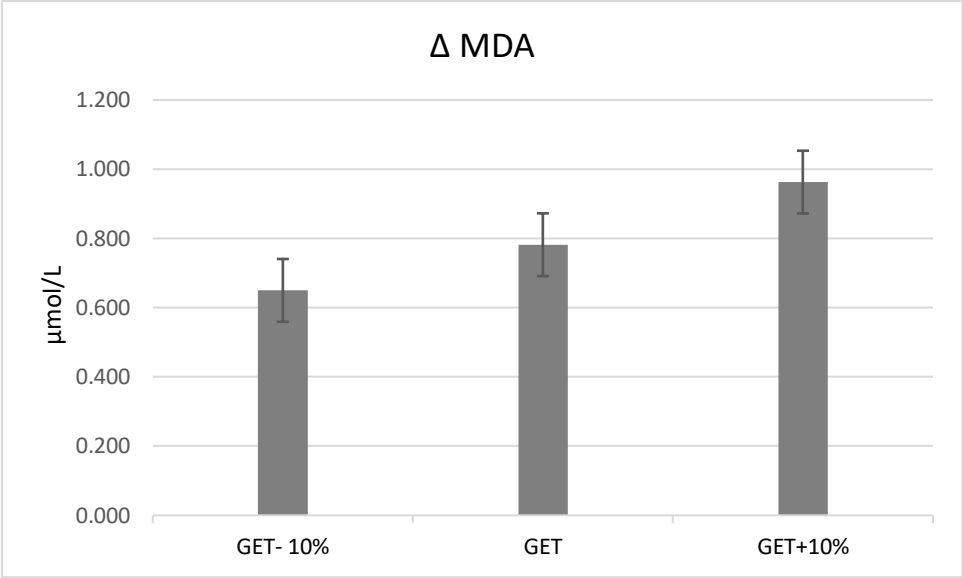
što je vidljivo iz podataka u tablicama 4, 5 i 6. Grafički prikaz dobivenih rezultata prokazan je na slici 2.



Slika 10. Grafički prikaz izmjerenih vrijednosti MDA prije i 30 minuta nakon aktivnosti pri tri različita intenziteta trčanja, prikazan kao vrijednosti aritmetičke sredine

Usporedbom vrijednosti MDA u urinu prije i 30 minuta nakon aktivnosti utvrđen je porast koncentracije mjerenog markera preko 50% pri sva tri intenziteta (Slika 3), dok analizom varijance ponovljenih mjerenja nije utvrđena statistički značajna razlika u porastu mjerenog markera između tri različita intenziteta (p=0,78). Za potrebe analize navedenih promjena korištene su vrijednosti ΔMDA1, ΔMDA2 i ΔMDA3 koje su izračunate kako slijedi: Vrijednost ΔMDA1 pri intenzitetu GET-10% dobivena je kao razlika A2–A1; Vrijednost ΔMDA2 pri intenzitetu GET dobivena je kao razlika B2 – B1; Vrijednost ΔMDA3 pri intenzitetu GET+10% dobivena je kao razlika C2–C1. Fisher LSD post hoc testom nisu utvrđene statističke značajnost između ΔMDA1, ΔMDA2 i ΔMDA3 varijabli.

.



Slika 11. Grafički prikaz promjene koncentracije malondialdehida (izražen kao Δ MDA) pri tri različita intenziteta trčanja.

Zbog mogućeg utjecaja gustoće na izmjerene vrijednosti MDA u uzorcima urina svakom uzorku je izmjerena gustoća. Dvofaktorskom ANOVOM ponovljenih mjerenja nije utvrđena statistički značajna razlika izmjerenih vrijednosti gustoće unutar faktora intenzitet ($p= 0,84$; $\eta^2=0,017$), unutar faktora vrijeme ($p=0,37$; $\eta^2=0,01$) kao ni unutar interakcije intenzitet*vrijeme ($p=0,14$; $\eta^2=0,14$).Bonferroni post hoc testom nisu utvrđene statistički značajne razlike između izmjerenih vrijednosti gustoće urina.

5.4. Praćenje markera mišićnih oštećenja

Markeri mišićnih oštećenja kreatin kinaza (CK) i laktat dehidrogenaza (LDH) određeni su iz krvnog seruma.

5.4.1. Kreatin kinaza (CK)

Utvrđene su statistički značajne razlike između aktivnosti enzima kreatin-kinaze prije i 30 minuta nakon aktivnosti pri sva tri praćena intenziteta aktivnosti. T- testom za zavisne uzorke na razini $p < 0,05$ utvrđene su značajne razlike kako slijedi: CK1 vs. CK1' ($p=0,0009$), CK2 vs. CK2' ($p=0,01$) i CK3 vs. CK3' ($p=0,002$). Kretanje aktivnosti CK prikazani su u tablici 8**.** i na slici 4**.**

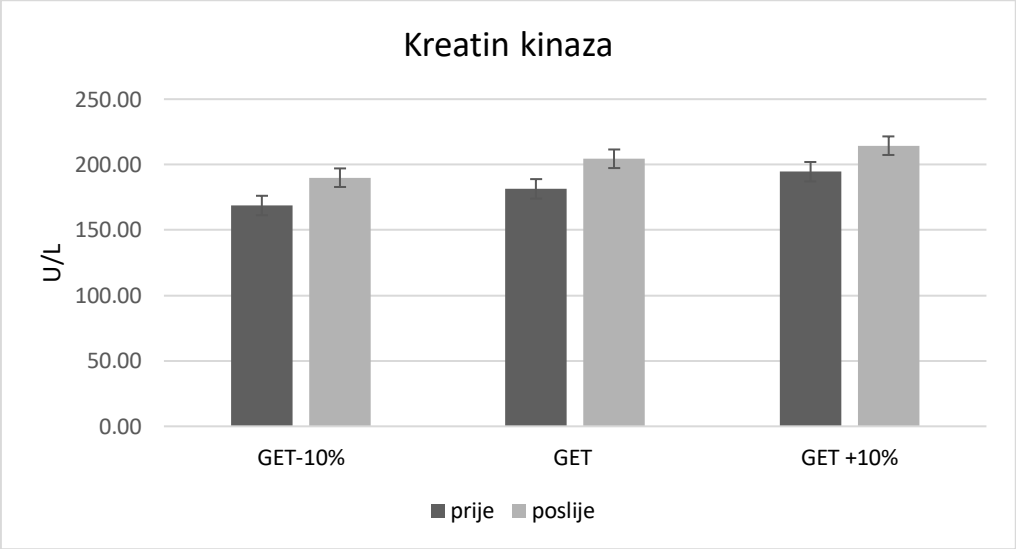
Tablica 14. Deskriptivni parametri aktivnosti enzima kreatin kinaze (CK) prije i nakon tjelesne aktivnosti pri tri različita intenziteta trčanja

Varijabla	N	AS*	SD	Min	Max	Median
CK1	11	168,73	66,90	79,00	292,00	160
CK1'	11	190,00	72,84	87,00	346,00	190
CK2	11	181,45	109,66	87	430	181,45
CK2'	11	204,45	127,34	88	513	204,45
CK3	11	194,55	52,53	107	259	205
CK3'	11	214,45	52,99	118	300	221

*vrijednost CK izražena kao U/L

Kratice: N – broj uzoraka, AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, Min – minimalni rezultati mjerenja, Max – maksimalni rezultati mjerenja, Medijan – medijalna vrijednost

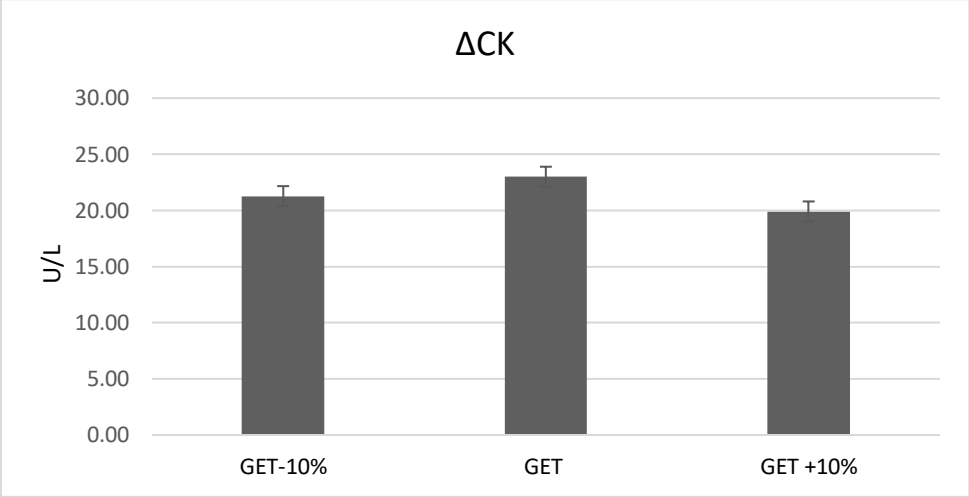
CK1/CK1' – vrijednosti kreatin kinaze prije i nakon GET – 10% intenziteta, CK2/CK2' – vrijednosti kreatin kinaze prije i nakon GET intenziteta, CK3/CK3' – vrijednosti kreatin kinaze prije i nakon GET + 10% intenziteta



Slika 12. Grafički prikaz izmjerenih vrijednosti CK prije i 30 minuta nakon aktivnosti pri tri različita intenziteta trčanja, prikazan kao vrijednosti aritmetičke sredine

Usporedbom aktivnosti CK u krvi prije i 30 minuta nakon tjelesne aktivnosti utvrđen je porast aktivnosti mjerenog markera praćenog pri sva tri intenziteta (Slika 5). Najveći apsolutni porast enzimske aktivnosti utvrđen je pri intenzitetu GET (23 U/L), dok je pri intenzitetima GET-10% (21,27 U/L) i GET+10% (19,9 U/L) porast manji. Izračunom rezultata u postotcima utvrđene su promjene kako slijedi: GET-10% (+12,5%), GET (+12,7%) i GET+10% (+10,2%). Analizom varijance ponovljenih mjerenja nije utvrđena statistički značajna razlika u porastu aktivnosti mjerenog markera između tri različita intenziteta ($p=0,92$). Za potrebe analize

navedenih promjena korištene su vrijednosti ΔCK1, ΔCK2 i ΔCK3 koje su izračunate kako slijedi: Vrijednost ΔCK1 pri intenzitetu GET-10% dobivena je kao razlika CK1'–CK1; Vrijednost ΔCK2 pri intenzitetu GET dobivena je kao razlika CK2'–CK2; Vrijednost ΔCK3 pri intenzitetu GET+10% dobivena je kao razlika CK3'–CK3. Daljnjom analizom dobivenih rezultata Fisher LSD post hoc testom nije utvrđena statistička značajnost između ΔCK1, ΔCK2 i ΔCK3 varijabli (tablica 9).



Slika 13. Grafički prikaz promjene aktivnosti kreatin kinaze (izražen kao ΔCK) pri tri različita intenziteta tjelesne aktivnosti

Tablica 15. Fisher LSD test razlika u aktivnosti kreatin kinaze (ΔCK**)** pri tri različita intenziteta aktivnosti

Δ CK	**Δ CK1** (21,27)	**Δ CK2** (23,00)	**Δ CK3** (19,91)
Δ CK1			
Δ CK2	0,83		
Δ CK3	0,86	0,69	

Kratice: ΔCK1- razlika CK1' i CK1; ΔCK2- razlika CK2' i CK2; ΔCK3 - razlika CK3' i CK3

5.4.2. Laktat dehidrogenaza (LDH)

Utvrđene su statistički značajne razlike između aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze prije i 30 minuta nakon aktivnosti pri sva tri praćena intenziteta aktivnosti. T- testom za zavisne uzorke na razini $P < 0,05$ utvrđene su značajne razlike kako slijedi: LDH1 vs. LDH1' (p= 0,0004), LDH2 vs. LDH2' (p=0,01) i LDH3 vs. LDH3' (p=0,0007). Kretanje aktivnosti LDH prikazani su u tablici 8. i na slici 6.

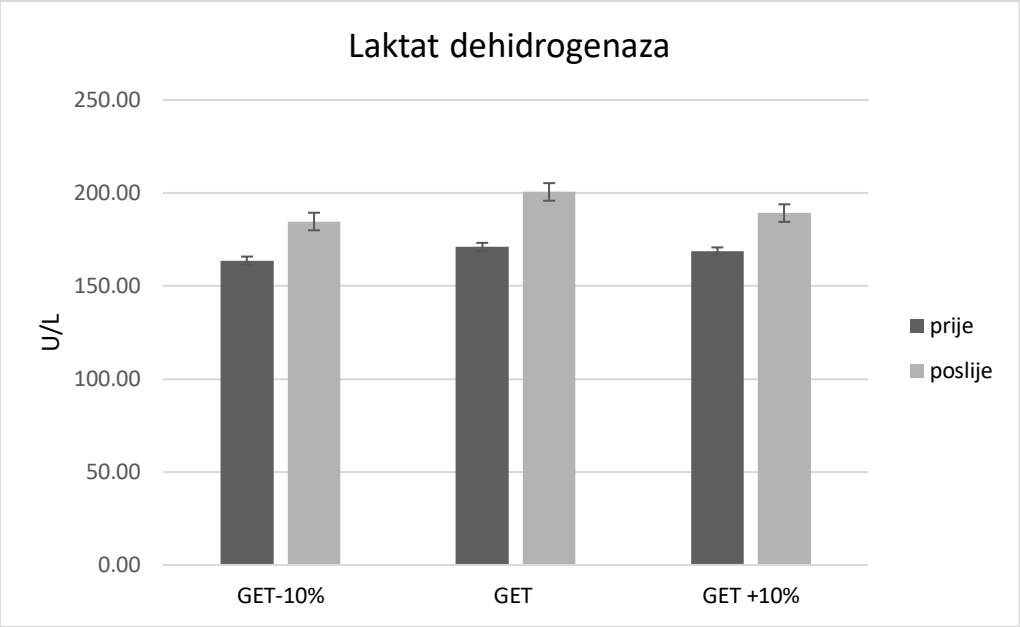
Tablica 16. Deskriptivni parametri enzima laktat dehidrogenaze (LDH) prije i nakon tjelesne aktivnosti pri tri različita intenziteta aktivnosti

Varijabla	N	AS*	SD	Min	Max	Median
LDH1	11	163,64	30,70	129	210	159
LDH1'	11	184,64	34,47	149	250	177
LDH2	11	171,00	57,94	108	331	151
LDH2'	11	200,55	83,87	123	432	187
LDH3	11	168,55	45,71	64	216	180
LDH3'	11	189,18	53,31	72	257	204

*vrijednost LDH izražena kao U/L

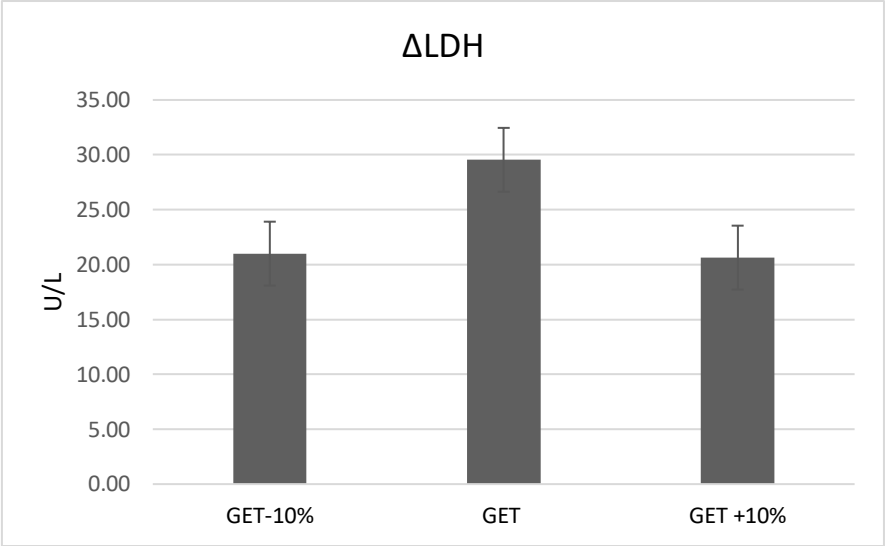
Kratice: N – broj uzoraka, AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, Min – minimalni rezultati mjerenja, Max – maksimalni rezultati mjerenja, Medijan – medijalna vrijednost

LDH1/LDH1' – vrijednosti laktat dehidrogenaze prije i nakon GET – 10% intenziteta, LDH2/LDH2' – vrijednosti laktat dehidrogenaze prije i nakon GET intenziteta, LDH3/LDH3' – vrijednosti laktat dehidrogenaze prije i nakon GET + 10% intenziteta



Slika 14. Grafički prikaz izmjerenih vrijednosti LDH prije i 30 minuta nakon aktivnosti pri tri različita intenziteta trčanja, prikazan kao vrijednosti aritmetičke sredine

Praćenjem aktivnosti LDH u krvi prije i 30 minuta nakon tjelesne aktivnosti utvrđen je porast aktivnosti mjerenog markera praćenog pri sva tri intenziteta. Najveći apsolutni porast enzimske aktivnosti utvrđen je pri intenzitetu GET (29,55 U/L), dok je pri intenzitetima GET-10% (21 U/L) i GET+10% (20,63 U/L) porast manji i približno jednak. Izračunom rezultata u postotcima utvrđene su promjene kako slijedi: GET-10% (+13%), GET (+17%) i GET+10% (+12%). Analizom varijance ponovljenih mjerenja nije utvrđena statistički značajna razlika u porastu aktivnosti mjerenog markera između tri različita intenziteta ($p=0,52$). Za označavanje vrijednosti navedenih promjena korištene su kratice ΔLDH1, ΔLDH2 i ΔLDH3 (Slika 7). Vrijednost ΔLDH1 pri intenzitetu GET-10% dobivena je kao razlika LDH1'–LDH1; Vrijednost ΔLDH2 pri intenzitetu GET dobivena je kao razlika LDH2'–LDH2; Vrijednost ΔLDH3 pri intenzitetu GET+10% dobivena je kao razlika LDH3'–LDH3. Daljnjom analizom dobivenih rezultata Fisher LSD post hoc testom nije utvrđena statistička značajnost između ΔLDH1, ΔLDH2 i ΔLDH3 varijabli (tablica 11).



Slika 15. Grafički prikaz promjene aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze (izražen kao ΔLDH) pri tri različita intenziteta tjelesne aktivnosti

Tablica 17. Fisher LSD test razlika u aktivnosti laktat dehidrogenaze (ΔLDH**)** pri tri različita intenziteta aktivnosti

Δ LDH	**Δ LDH1** (21,00)	**Δ LDH2** (29,55)	**Δ LDH3** (20,64)
Δ LDH1			
Δ LDH2	0,34		
Δ LDH3	0,96	0,32	

Kratice: ΔLDH1- razlika LDH1' i LDH1; ΔLDH2- razlika LDH2' i LDH2; ΔLDH3 - razlika LDH3' i LDH3

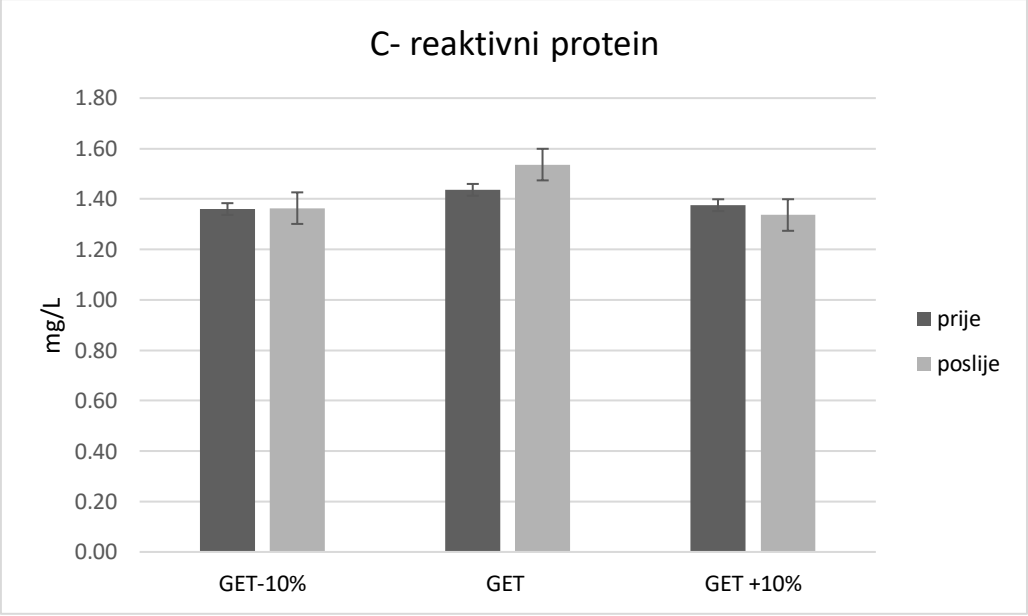
5.5. Praćenje markera imunološkog odgovora

5.5.1. C – reaktivni protein (CRP)

Koncentracija C – reaktivnog proteina u krvnom serumu je određivana zbog činjenice da je samo istraživanje započeto u vrijeme pandemije COVID – 19, kao i zbog potrebe da se utvrde potencijala akutna upalna stanja kod ispitanika zbog samog nacrta istraživanja, te je služila kao mogući isključujući faktor.

Praćenjem koncentracije C- reaktivnog proteina (CRP) nisu tvrđene statistički značajne razlike između koncentracija CRP-a prije i 30 minuta nakon aktivnosti pri sva tri praćena intenziteta aktivnosti. T- testom za zavisne uzorke na razini $p < 0,05$ nisu utvrđene statistički značajne razlike kako slijedi: CRP1 vs. CRP1' (p=0,89), CRP2 vs. CRP2' (p=0,30) i CRP3 vs. CRP3' (p=0,47). Kretanje koncentracija CRP-a prikazane su na slici 8**.**

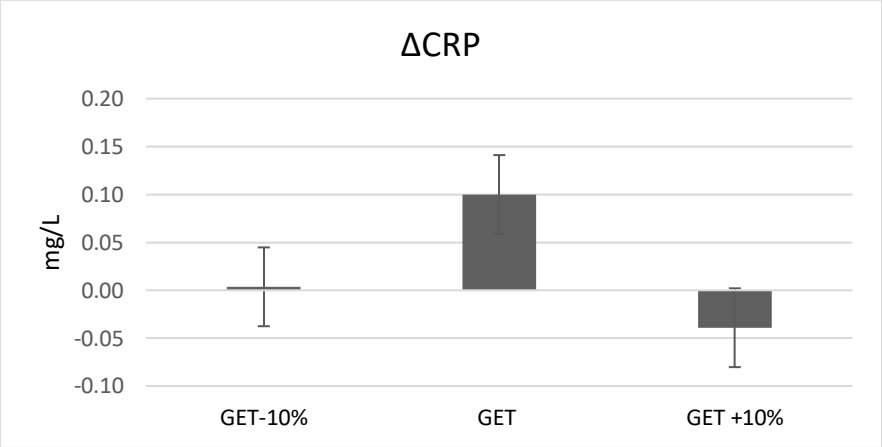
Izmjeren vrijednosti CRP-a svih sudionika u istraživanju su kroz cijelo vrijeme istraživanja bile unutar referentnih vrijednosti (CRP < 5 mg/L) što je također vidljivo u grafičkom prikazu **(**Slika 8.).



Slika 16. Grafički prikaz promjene koncentracije C – reaktivnog proteina (CRP) pri tri različita intenziteta tjelesne aktivnosti

Praćenjem promjene koncentracije C – reaktivnog proteina pri tri različita intenziteta tjelesne aktivnosti nisu utvrđene značajne razlike između prvog i drugog mjerenja kod sva tri intenziteta, što je vidljivo iz izračunatih vrijednosti promjena izraženih kao varijable ΔCRP1= 0,00, ΔCRP2=0,1 i ΔCRP3=-0,04 **(**Slika 9**)**. Vrijednost ΔCRP1 pri intenzitetu GET-10% dobivena je kao razlika CRP1'–CRP1; Vrijednost ΔCRP2 pri intenzitetu GET dobivena je kao razlika CRP2'–CRP2; Vrijednost ΔCRP3 pri intenzitetu GET+10% dobivena je kao razlika CRP3'–CRP3. Pri intenzitetu GET-10% nije došlo do promjene mjeren koncentracije, intenzitet GET pokazuje blagi porast, a intenzitet GET +10% blagi pad koncentracije.

Analizom varijance ponovljenih mjerenja nije utvrđena statistički značajna razlika među varijablama ΔCRP1, ΔCRP2 i ΔCRP3 (p = 0,36).



Slika 17. Grafički prikaz promjene koncentracije C- reaktivnog proteina (izražen kao ΔCRP) pri tri različita intenziteta tjelesne aktivnosti

5.5.2. Ukupni monociti - Diferencijalna krvna slika (DKS)

Standardnim biokemijskim metodama određeni su ukupni monociti prije i nakon tjelesne aktivnosti pri tri različita intenziteta. Deskriptivni parametri broja ukupnih monocita prikazani su u tablici 12.

Praćenjem broja ukupnih monocita nisu tvrđene statistički značajne razlike prije i 30 minuta nakon aktivnosti pri sva tri praćena intenziteta aktivnosti. T- testom za zavisne uzorke na razini $p < 0,05$ dobiveni su sljedeći rezultati: monociti 1 vs. monociti 1' (p=0,12), monociti 2 vs. monociti 2' (p=0,98) i monociti 3 vs. monociti 3' (p=0,73).

Tablica 18. Deskriptivni parametri ukupnih monocita prije i nakon tjelesne aktivnosti pri tri različita intenziteta trčanja

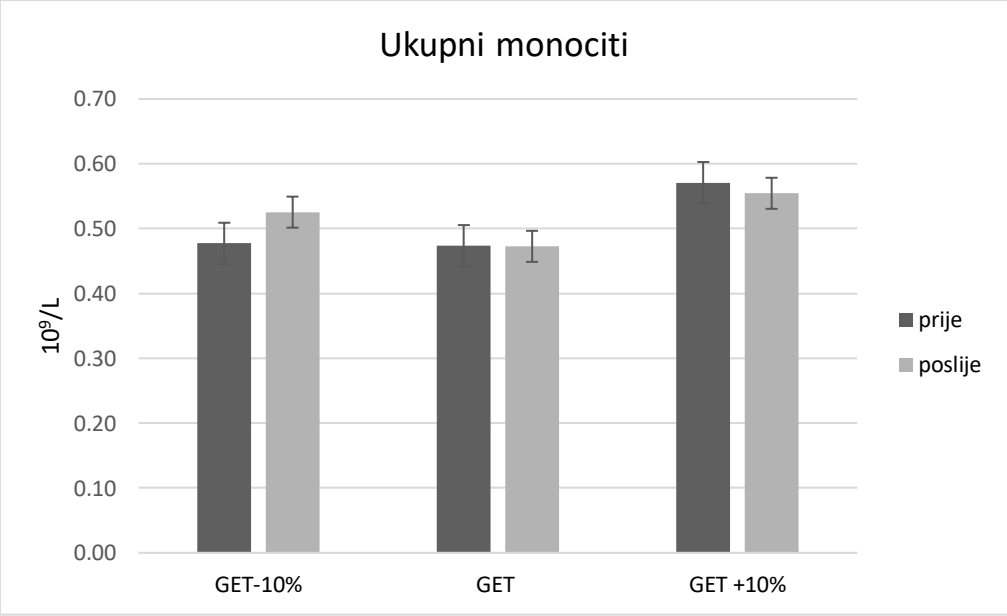
Varijabla	N	AS*	SD	Min	Max	Median
monociti1	11	0,48	0,09	0,31	0,64	0,48
monociti1'	11	0,53	0,12	0,40	0,70	0,50
monociti2	11	0,47	0,17	0,30	0,90	0,40
monociti2'	11	0,47	0,13	0,26	0,66	0,41
monociti3	11	0,57	0,14	0,36	0,90	0,57
monociti3'	11	0,55	0,13	0,35	0,74	0,53

*vrijednost monociti izražena kao x 10^9/L

Kratice: N – broj uzoraka, AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, Min – minimalni rezultati mjerenja, Max – maksimalni rezultati mjerenja, Medijan – medijalna vrijednost

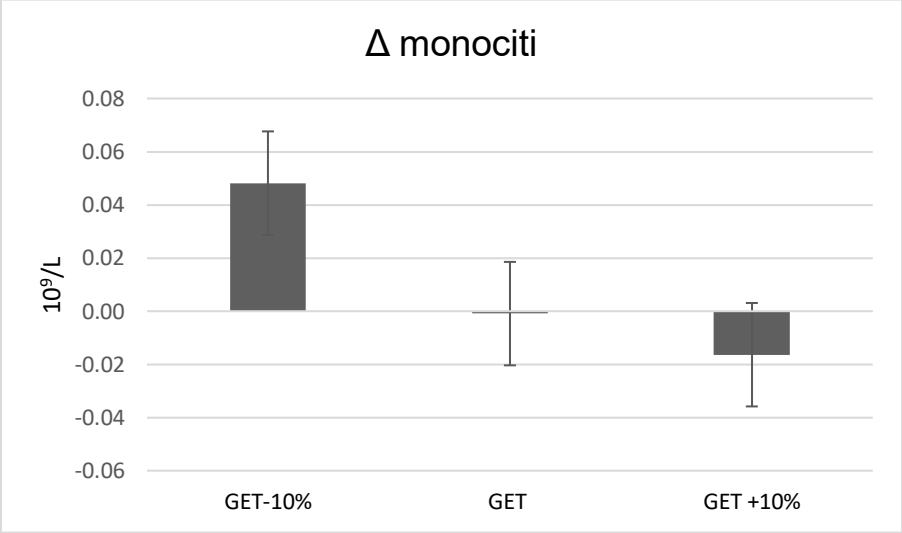
monociti 1/monociti 1' – broj monocita prije/nakon GET – 10% intenziteta, monociti 2/monociti 2'- broj monocita prije/nakon GET intenziteta, monociti 3/monociti 3' – broj monocita prije/nakon GET + 10% intenziteta

Iz grafičkog prikaza je vidljiv trend pada broja monocita s porastom intenziteta trčanja (Slika 9).



Slika 18. Grafički prikaz broja monocita pri tri različita intenziteta tjelesne aktivnosti

Pri intenzitetu GET- 10% došlo je do porasta broja monocita, pri intenzitetu GET nije došlo do promjene, dok je pri intenzitetu GET+ 10% utvrđen pad broja ukupnih monocita (Slika 10). Analizom varijance ponovljenih mjerenja nije utvrđena statistički značajna razlika među varijablama Δmono1, Δmono2 i Δmono3 (p=0,56). Vrijednost Δmono1 pri intenzitetu GET-10% dobivena je kao razlika mono1'–mono1; Vrijednost Δmono2 pri intenzitetu GET dobivena je kao razlika mono2'–mono2; Vrijednost Δmono3 pri intenzitetu GET+ 10% dobivena je kao razlika mono3'–mono3. Daljnjom analizom dobivenih rezultata Fisher LSD post hoc testom nije utvrđena statistička značajnost između Δmono1, Δmono2 i Δmono3 izračunatih vrijednosti (tablica 10).



Slika 19. Grafički prikaz promjene broja ukupnih monocita (izražen kao Δmono) pri tri različita intenziteta tjelesne aktivnosti

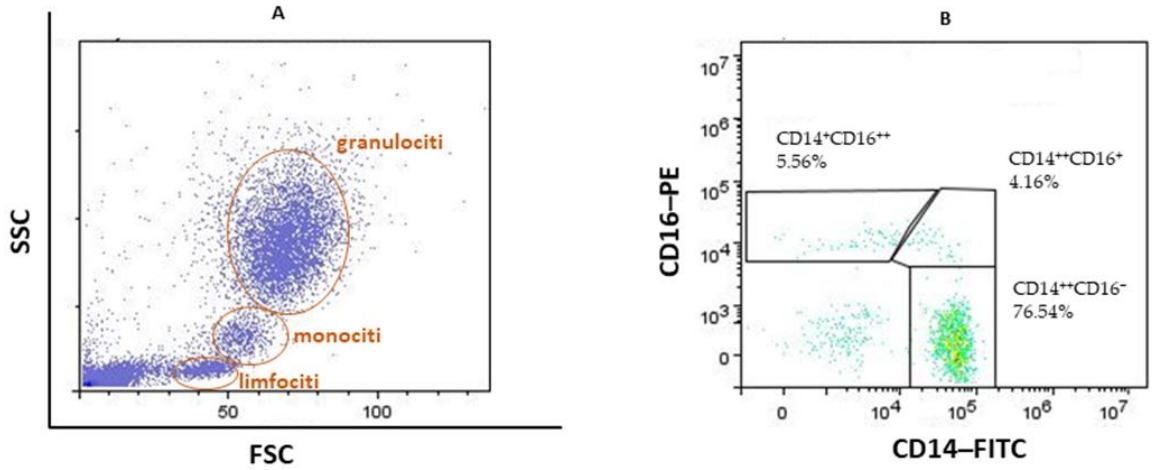
Tablica 19. Fisher LSD test razlika u broju monocita (Δ mono**)** pri tri različita intenziteta aktivnosti

Δ monociti	**Δ mono1** (0,05)	**Δ mono2** (0,00)	**Δ mono3** (-0,02)
Δ mono1			
Δ mono2	0,44		
Δ mono3	0,31	0,81	

Kratice: Δmono1- razlika mono1' i mono1; Δmono2- razlika mono2' i mono2; Δmono3 - razlika mono3' i mono3

5.5.3. Monocitne subpopulacije

Metodom protočne citometrije određena su protutijela na humane biljege monocita konjugiranih s odgovarajućim kromogenima: CD14-FITC (BD Pharmingen, San Diego, CA), 4 µL CD16-PE (BD Pharmingen, San Diego, CA). Populacije su razdvojene na neklasične $CD14^{+}CD16^{++}$ (protuupalni monociti), klasične $CD14^{++}CD16^{-}$ (proupalni monociti) i intermedijarne $CD14^{++}CD16^{+}$ (proupalni/protuupalni monociti) slika 20. Izmjerene vrijednosti izražene su kao medijan intenziteta fluorescencije (MFI- *median fluorescence intensity*) praćenih tipova monocita. Ekspresija navedenih monocitnih subpopulacija praćene su prije tjelesne aktivnosti i 30 minuta nakon aktivnosti pri tri različita intenziteta.



Slika 20. Reprezentativni gate za leukocite (**A**) i monocitne subpopulacije intermedijernih ($CD14^{++}CD16^{+}$), klasičnih ($CD14^{++}CD16^{-}$) i neklasničnih ($CD14^{+}CD16^{++}$) stanica (**B**).

5.5.3.1. $CD14^{+}CD16^{++}$ monociti

Praćenjem ekspresije CD16 na ne klasičnim $CD14^{+}CD16^{++}$ monocitima nisu tvrđene statistički značajne razlike prije i 30 minuta nakon aktivnosti pri sva tri intenziteta aktivnosti (deskriptivni parametri prikazani u tablici 11). T- testom za zavisne uzorke na razini $p < 0,05$ dobivene su značajnosti kako slijedi: $CD14^{+}CD16^{++}1$ vs. $CD14^{+}CD16^{++}1'$ (p=0,22), $CD14^{+}CD16^{++}2$ vs. $CD14^{+}CD16^{++}2'$ (p=0,22) i $CD14^{+}CD16^{++}3$ vs. $CD14^{+}CD16^{++}3'$ (p=0,15).

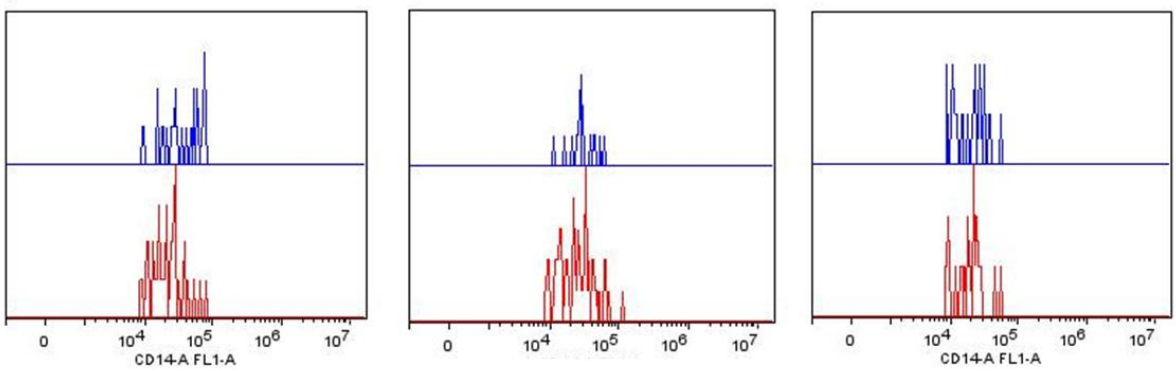
Tablica 20. Deskriptivni parametri ne klasičnih $CD14^{+}CD16^{++}$ monocita prije i nakon tjelesne aktivnosti pri tri različita intenziteta trčanja

Varijabla	N	AS*	SD	Min	Max	Medijan
$CD14^{+}CD16^{++}1$	11	24753,95	14474,36	3185,000	46306,0	29273,00
$CD14^{+}CD16^{++}1'$	11	21335,59	11147,43	3295,000	37535,0	21875,00
$CD14^{+}CD16^{++}2$	11	18540,18	10997,74	4125,000	32770,0	20313,00
$CD14^{+}CD16^{++}2'$	11	20800,64	9632,90	4793,000	33565,5	21563,00
$CD14^{+}CD16^{++}3$	11	18291,18	9442,73	3247,500	31921,5	18087,00
$CD14^{+}CD16^{++}3'$	11	19436,86	10043,87	2995,000	35628,0	19224,00

* izražen kao MFI (median fluorescence intensity)

N – broj uzoraka, AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, Min – minimalni rezultati mjerenja, Max – maksimalni rezultati mjerenja, Medijan – medijalna vrijednost

$CD14^{+}CD16^{++}1$/ $CD14^{+}CD16^{++}1'$- ekspresija protuupalnih monocita prije/nakon GET – 10% intenziteta, $CD14^{+}CD16^{++}2$/ $CD14^{+}CD16^{++}2'$ - ekspresija protuupalnih monocita prije/nakon GET intenziteta, $CD14^{+}CD16^{++}3$/ $CD14^{+}CD16^{++}3'$- ekspresija protuupalnih monocita prije/nakon GET + 10% intenziteta

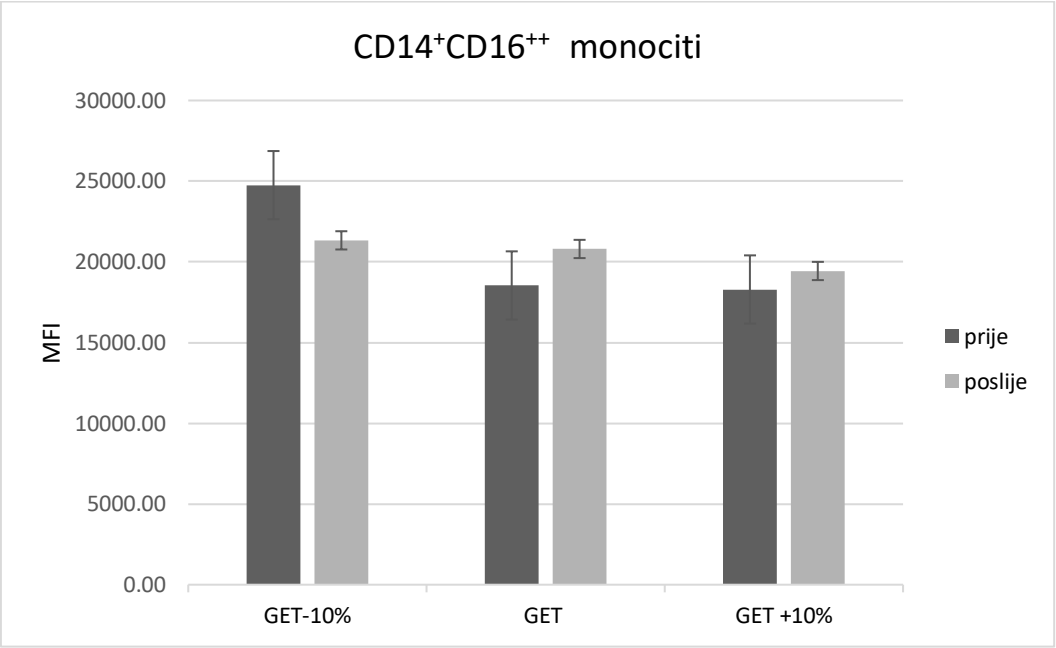


Slika 21. Promjena ekspresije ne klasičnih $CD14^{+}CD16^{++}$ monocita (MFI) prije i nakon tjelesne aktivnosti pri tri različita intenziteta trčanja

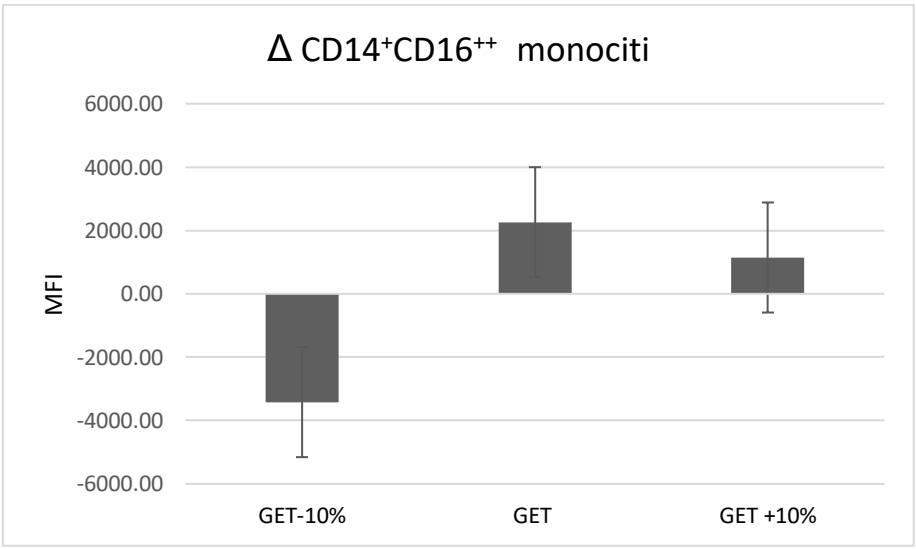
Zabilježen je pad ekspresije CD16 na $CD14^{+}CD16^{++}$ monocitima pri aktivnosti intenziteta GET-10%, dok je pri intenzitetima GET i GET+10% utvrđeno povećanje ekspresije CD16 praćenih monocita (Slika 12. i Slika 13.**)**

Analizom varijance ponovljenih mjerenja nije utvrđena statistički značajna razlika među varijablama $\Delta CD14^{+}CD16^{++}1$, $\Delta CD14^{+}CD16^{++}2$ i $\Delta CD14^{+}CD16^{++}3$ (p=0,10). Vrijednost $\Delta CD14^{+}CD16^{++}$ pri intenzitetu GET -10% dobivena je kao razlika $CD14^{+}CD16^{++}$ 1' i $CD14^{+}CD16^{++}$ 1; Vrijednost $\Delta CD14^{+}CD16^{++}$ pri intenzitetu GET dobivena je kao razlika $CD14^{+}CD16^{++}$ 2' i $CD14^{+}CD16^{++}$ 2; Vrijednost $\Delta CD14^{+}CD16^{++}$ pri intenzitetu GET+10% dobivena je kao razlika $CD14^{+}CD16^{++}$ 3' i $CD14^{+}CD16^{++}$ 3. Daljnjom analizom dobivenih

rezultata Fisher LSD post hoc testom utvrđena je statistička značajnost između $\Delta CD14^{+}CD16^{++}1$ i $\Delta CD14^{+}CD16^{++}2$, dok između ostalih varijabli statistička značajnost nije utvrđena (tablica 12).



Slika 22. Grafički prikaz promjene ekspresije CD16 neklasičnih $CD14^{+}CD16^{++}$ monocita (izražen kao MFI) prije i nakon tjelesne aktivnosti pri tri različita intenziteta trčanja.



Slika 23. Grafički prikaz promjene ekspresije CD16 neklasičnih $CD14^{+}CD16^{++}$ monocita (izražen kao $\Delta CD14^{+}CD16^{++}$) pri tri različita intenziteta trčanja

Tablica 21. Fisher LSD test razlika u ekspresiji CD 16 neklasičnih $CD14^{+}CD16^{++}$ monocita (Δ $CD14^{+}CD16^{++}$**)** pri tri različita intenziteta trčanja

Δ$CD14^{+}CD16^{++}$	**Δ$CD14^{+}CD16^{++}$1** (-3418,36)	**Δ$CD14^{+}CD16^{++}$2** (2260,45)	**Δ $CD14^{+}CD16^{++}$3** (1145,68)
Δ$CD14^{+}CD16^{++}$1			
Δ$CD14^{+}CD16^{++}$2	**0,04**		
Δ $CD14^{+}CD16^{++}$3	0,10	0,68	

Kratice: Δ$CD14^{+}CD16^{++}$1- razlika $CD14^{+}CD16^{++}$ 1' i $CD14^{+}CD16^{++}$1; Δ$CD14^{+}CD16^{++}$2- razlika $CD14^{+}CD16^{++}$ 2' i $CD14^{+}CD16^{++}$ 2 ; Δ$CD14^{+}CD16^{++}$3- razlika $CD14^{+}CD16^{++}$ 3' i $CD14^{+}CD16^{++}$ 3

5.5.3.2. $CD14^{++}CD16^{+}$ monociti

Praćenjem ekspresije CD16 na intermedijarnim $CD14^{++}CD16^{+}$ monocita nisu tvrđene statistički značajne razlike prije i 30 minuta nakon aktivnosti pri sva tri praćena intenziteta aktivnosti (deskriptivni parametri prikazani u tablici 13). T- testom za zavisne uzorke na razini $p < 0,05$ dobivene su značajnosti kako slijedi: $CD14^{++}CD16^{+}$1 vs. $CD14^{++}CD16^{+}$1' (p=0,71), $CD14^{++}CD16^{+}$2 vs. $CD14^{++}CD16^{+}$2' (p=0,45) i $CD14^{++}CD16^{+}$3 vs. $CD14^{++}CD16^{+}$3' (p=0,63).

Tablica 22. Deskriptivni parametri intermedijarnih $CD14^{++}CD16^{+}$ monocita prije i nakon tjelesne aktivnosti pri tri različita intenziteta trčanja

Varijabla	**N**	**AS***	**SD**	**Min**	**Max**	**Medijan**
$CD14^{++}CD16^{+}$1	11	15556,64	14661,46	2350,000	55105,0	11041,00
$CD14^{++}CD16^{+}$1'	11	13340,64	13476,88	2323,500	49188,0	8776,00
$CD14^{++}CD16^{+}$2	11	9685,00	7947,67	2703,000	22729,0	6697,00
$CD14^{++}CD16^{+}$2'	11	7922,77	4441,62	3251,000	17161,0	7659,00
$CD14^{++}CD16^{+}$3	11	10205,00	7191,26	2013,000	26039,0	9728,00
$CD14^{++}CD16^{+}$3'	11	10921,18	8790,61	2248,000	29128,5	9245,00

* izražen kao MFI (median fluorescence intensity)

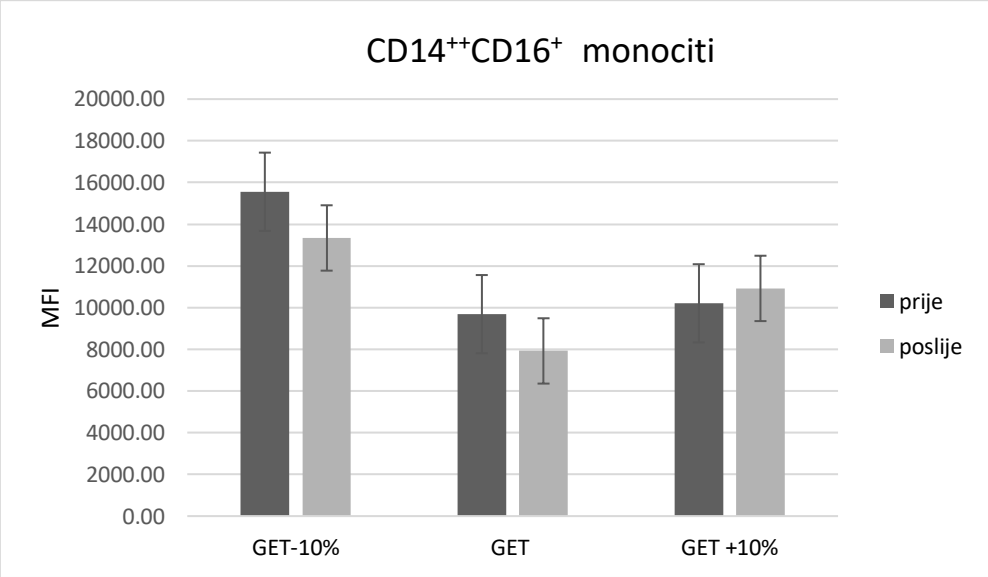
Kratice: N – broj uzoraka, AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, Min – minimalni rezultati mjerenja, Max – maksimalni rezultati mjerenja, Medijan – medijalna vrijednost

$CD14^{++}CD16^{+}$1/ $CD14^{++}CD16^{+}$1'- ekspresija intermedijarnih monocita prije/nakon GET – 10% intenziteta, $CD14^{++}CD16^{+}$2/ $CD14^{++}CD16^{+}$2'- ekspresija intermedijarnih monocita prije/nakon GET intenziteta, $CD14^{++}CD16^{+}$3/ $CD14^{++}CD16^{+}$3'- ekspresija intermedijarnih monocita prije/nakon GET + 10% intenziteta

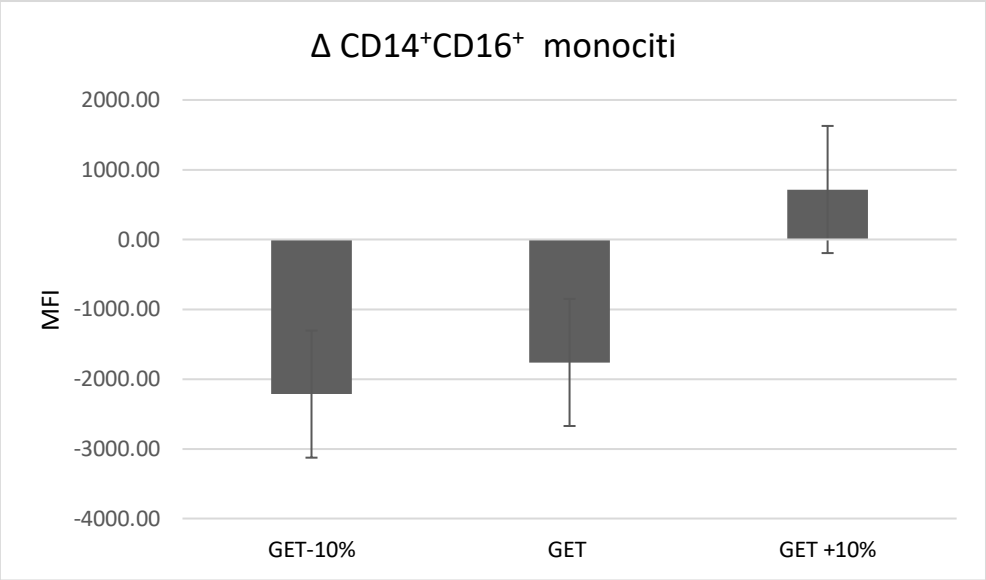
Praćenjem ekspresije CD16 na $CD14^{++}CD16^{+}$ monocitima utvrđen je pad ekspresije pri aktivnostima intenziteta GET-10% i GET, dok je pri intenzitetu GET+10% utvrđeno povećanje ekspresije intermedijarnih monocita (Slika 14. i Slika 15.)

Analizom varijance ponovljenih mjerenja nije utvrđena statistički značajna razlika među varijablama $\Delta CD14^{++}CD16^{+}1$, $\Delta CD14^{++}CD16^{+}2$ i $\Delta CD14+^{+}CD16^{+}3$ (p=0,78). Vrijednost $\Delta CD14^{++}CD16^{+}$ pri intenzitetu GET-10% dobivena je kao razlika $CD14^{++}CD16^{+}1'$ i $CD14^{++}CD16^{+}1$; Vrijednost $\Delta CD14^{++}CD16^{+}$ pri intenzitetu GET dobivena je kao razlika $CD14^{++}CD16^{+}2'$ i $CD14^{++}CD16^{+}2$; Vrijednost $\Delta CD14^{++}CD16^{+}$ pri intenzitetu GET+10% dobivena je kao razlika $CD14^{++}CD16^{+}3'$ i $CD14^{++}CD16^{+}3$.

Daljnjom analizom dobivenih rezultata Fisher LSD post hoc testom nije utvrđena statistička značajnost među $\Delta CD14^{++}CD16^{+}1$, $\Delta CD14^{++}CD16^{+}2$ i $\Delta CD14^{++}CD16^{+}3$ varijablama što je vidljivo u tablici 14.



Slika 24. Grafički prikaz promjene ekspresije CD16 intermedijarnih $CD14^{++}CD16^{+}$ monocita (izražena kao MFI) prije i nakon tjelesne aktivnosti pri tri različita intenziteta trčanja.



Slika 25. Grafički prikaz promjene ekspresije CD16 intermedijarnih $CD14^{++}CD16^{+}$ monocita (izražen kao $\Delta CD14^{++}CD16^{+}$) pri tri različita intenziteta trčanja

Tablica 23. Fisher LSD test razlika u ekspresiji CD16 intermedijarnih $CD14^{++}CD16^{+}$ monocita (Δ $CD14^{+}CD16^{+}$**)** pri tri različita intenziteta trčanja

$\Delta CD14^{++}CD16^{+}$	**$\Delta CD14^{++}CD16^{+}1$** (-2216,00)	**$\Delta CD14^{++}CD16^{+}2$** (-1762,23)	**Δ $CD14^{++}CD16^{+}3$** (716,18)
$\Delta CD14^{++}CD16^{+}1$			
$\Delta CD14^{++}CD16^{+}2$	0,92		
Δ $CD14^{++}CD16^{+}3$	0,52	0,58	

Kratice: $\Delta CD14^{++}CD16^{+}1$- razlika $CD14^{++}CD16^{+}1'$ i $CD14^{++}CD16^{+}1$; $\Delta CD14^{++}CD16^{+}2$- razlika $CD14^{++}CD16^{+}2'$ i $CD14^{++}CD16^{+}2$; $\Delta CD14^{++}CD16^{+}3$- razlika $CD14^{++}CD16^{+}3'$ i $CD14^{++}CD16^{+}3$

5.5.3.3. $CD14^{++}CD16^{-}$ monociti

Praćenjem ekspresije CD16 na klasičnim $CD14^{++}CD16^{-}$ monocitima nisu tvrđene statistički značajne razlike u ekspresiji prije i 30 minuta nakon aktivnosti pri sva tri praćena intenziteta aktivnosti (deskriptivni parametri prikazani u tablici 15). T- testom za zavisne uzorke na razini $p < 0,05$ dobiveni su značajnosti kako slijedi: $CD14^{++}CD16^{-}1$ vs. $CD14^{++}CD16^{-}1'$ (p=0,67), $CD14^{++}CD16^{-}2$ vs. $CD14^{++}CD16^{-}2'$ (p=0,07) i $CD14^{++}CD16^{-}3$ vs. $CD14^{++}CD16^{-}3'$ (p=0,12).

Tablica 24. Deskriptivni parametri klasičnih $CD14^{++}CD16^{-}$ monocita prije i nakon tjelesne aktivnosti pri tri različita intenziteta trčanja

Varijabla	N	AS*	SD	Min	Max	Median
$CD14^{++}CD16^{-}1$	11	385,55	63,65	313,00	510,0	358,00
$CD14^{++}CD16^{-}1'$	11	389,05	50,58	327,00	512,0	375,50
$CD14^{++}CD16^{-}2$	11	357,64	72,60	244,50	491,5	347,00
$CD14^{++}CD16^{-}2'$	11	378,41	52,92	313,00	464,0	360,50
$CD14^{++}CD16^{-}3$	11	370,95	52,75	290,50	478,0	365,50
$CD14^{++}CD16^{-}3'$	11	379,59	49,98	308,00	456,0	362,00

* izražen kao MFI (median fluorescence intensity)

Kratice: N – broj uzoraka, AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, Min – minimalni rezultati mjerenja, Max – maksimalni rezultati mjerenja, Medijan – medijalna vrijednost

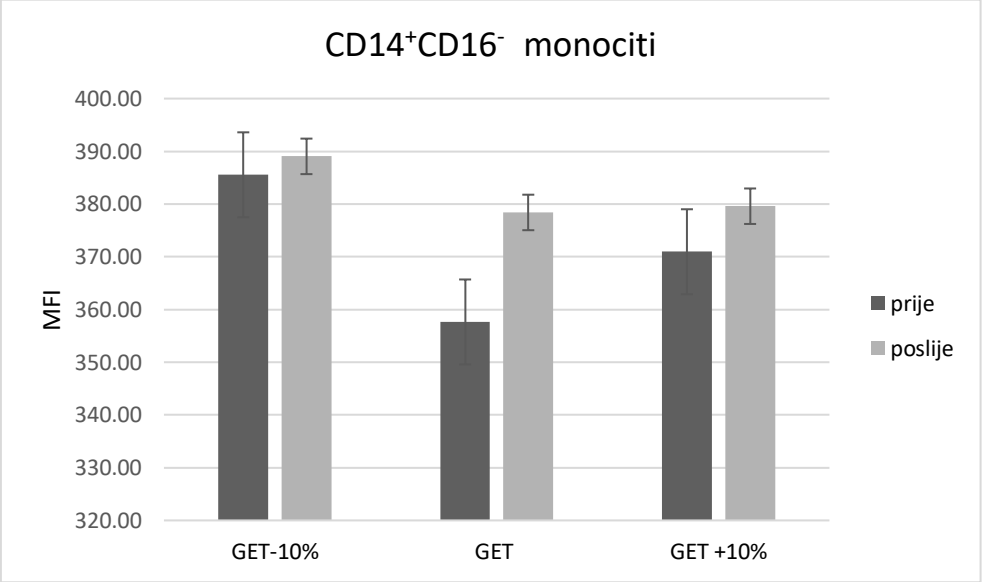
$CD14^{++}CD16^{-}1$/$CD14^{++}CD16^{-}1'$- ekspresija klasičnih monocita prije/nakon GET–10% intenziteta, $CD14^{++}CD16^{-}2$/ $CD14^{++}CD16^{-}2'$- ekspresija klasičnih monocita prije/nakon GET intenziteta,

$CD14^{++}CD16^{-}3$/ $CD14^{++}CD16^{-}3'$- ekspresija klasičnih monocita prije/nakon GET + 10% intenziteta

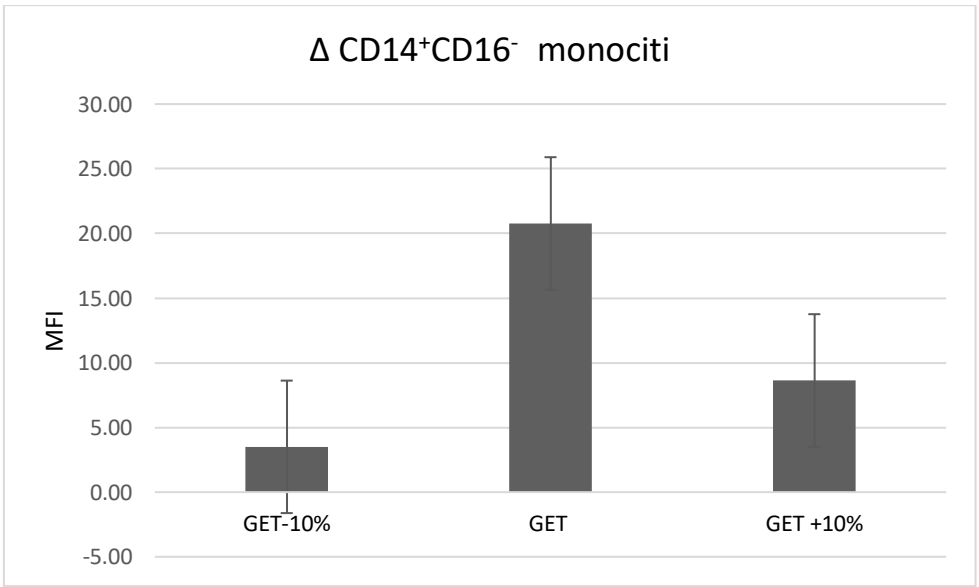
Utvrđena je povećana ekspresija CD16 na klasičnim $CD14^{++}CD16^{-}$ monocitima pri sva tri intenziteta tjelesne aktivnosti (GET-10%, GET i GET+10%), što je i vidljivo na slikama 15 i 16.

Analizom varijance ponovljenih mjerenja nije utvrđena statistički značajna razlika među varijablama $\Delta CD14^{++}CD16^{-}1$, $\Delta CD14^{++}CD16^{-}2$ i $\Delta CD14^{++}CD16^{-}3$ (p=0,28). Vrijednost $\Delta CD14^{++}CD16^{-}$ pri intenzitetu GET -10% dobivena je kao razlika $CD14^{++}CD16^{-}1'$ i $CD14^{++}CD16^{-}1$; Vrijednost $\Delta CD14^{++}CD16^{-}$ pri intenzitetu GET dobivena je kao razlika $CD14^{++}CD16^{-}2'$ i $CD14^{++}CD16^{-}2$; Vrijednost $\Delta CD14^{++}CD16^{-}$ pri intenzitetu GET+10% dobivena je kao razlika $CD14^{++}CD16^{-}3'$ i $CD14^{++}CD16^{-}3$.

Daljnjom analizom dobivenih rezultata Fisher LSD post hoc testom nije utvrđena statistička značajnost među ΔCD14^{++}CD16^{-}1, ΔCD14^{++}CD16^{-}2 i ΔCD14^{++}CD16^{-}3 varijablama što je vidljivo u tablici 15.



Slika 26. Grafički prikaz promjene ekspresije CD16 klasičnih CD14^{++}CD16^{-} monocita (izražen kao MFI) prije i nakon tjelesne aktivnosti pri tri različita intenziteta trčanja.



Slika 27. Grafički prikaz promjene ekspresije CD16 klasičnih CD14^{++}CD16^{-} monocita (izražen kao ΔCD14^{++}CD16^{-}) pri tri različita intenziteta trčanja

Tablica 25. Fisher LSD test razlika u ekspresiji CD16 klasičnih $CD14^{++}CD16^{-}$ monocita (Δ $CD14^{+}CD16^{-}$**)** pri tri različita intenziteta aktivnosti

Δ$CD14^{++}CD16$-	**Δ$CD14^{++}CD16^{-}$1** (3,50)	**Δ$CD14^{++}CD16^{-}$2** (20,77)	**Δ $CD14^{++}CD16^{-}$3** (8,64)
Δ$CD14^{++}CD16^{-}$1			
Δ$CD14^{++}CD16^{-}$2	0,12		
Δ $CD14^{++}CD16^{-}$3	0,64	0,27	

Kratice: Δ$CD14^{++}CD16^{-}$1- razlika $CD14^{++}CD16^{-}$1' i $CD14^{++}CD16^{-}$1; Δ$CD14^{++}CD16^{-}$2- razlika $CD14^{++}CD16^{-}$2' i $CD14^{++}CD16^{-}$2 ; Δ$CD14^{++}CD16^{-}$3- razlika $CD14^{++}CD16^{-}$3' i $CD14^{++}CD16^{-}$3

5.6. Povezanost markera mišićnog oštećenja, oksidacijskog stresa i imunološkog odgovora

5.6.1.Povezanost markera mišićnog oštećenja, oksidacijskog stresa i imunološkog odgovora pri intenzitetu GET -10%

Pri intenzitetu GET -10% nisu utvrđena značajne korelacija između markera mišićnog oštećenja, oksidacijskog stresa i imunološkog odgovora. Daljnjom analizom dobivenih rezultata može se vidjeti kako je povezanost markera oksidacijskog stresa (MDA) i markera mišićnih oštećenja (CK i LDH) granično značajna i to sa negativnim predznakom (tablica 18). Povezanosti između ostalih praćenih markera nisu utvrđene, a njihove p vrijednosti Pearsonova koeficijenta korelacije prikazane su u tablicama 17 i 19.

Tablica 26. Povezanost markera mišićnog oštećenja sa markerima imunološkog odgovora pri intenzitetu GET -10%.*

Varijabla	**$CD14^{+}CD16^{++}$ (MFI)**	**$CD14^{++}CD16^{+}$ (MFI)**	**$CD14^{++}CD16^{-}$ (MFI)**
CK (U/L)	- 0,011 (0,97)	- 0,12 (0,72)	-0,352 (0,28)
LDH (U/L)	0,023 (0,94)	-0,376 (0,25)	0,384 (0,24)

* Pearsonov koeficijent korelacije r (p vrijednost)

Tablica 27. Povezanost markera mišićnog oštećenja sa markerima oksidacijskog stresa pri intenzitetu GET -10%.*

Varijabla	**MDA (mmol/L)**
CK (U/L)	- 0,533 (0,09)
LDH (U/L)	- 0,571 (0,06)

* Pearsonov koeficijent korelacije r (p vrijednost)

Tablica 28. Povezanost markera oksidacijskog stresa i markera imunološkog odgovora pri intenzitetu GET – 10%.*

Varijabla	$CD14^{+}CD16^{++}$ (MFI)	$CD14^{++}CD16^{+}$ (MFI)	$CD14^{++}CD16^{-}$ (MFI)
MDA (mmol/L)	0,353 (0,28)	0,441 (0,17)	-0,308 (0,35)

* Pearsonov koeficijent korelacije r (p vrijednost)

5.6.2. Povezanost markera mišićnog oštećenja, oksidacijskog stresa i imunološkog odgovora pri intenzitetu GET

Pri intenzitetu GET utvrđena je značajna negativna korelacija između ekspresije monocitne subpopulacije $CD14^{+}CD16^{++}$ i markera mišićnih oštećenja (LDH) (tablica 20). Povezanosti između ostalih praćenih markera nisu utvrđene, a njihove p vrijednosti Pearsonova koeficijenta korelacije prikazane su u tablicama 20,21 i 22.

Tablica 29. Povezanost markera mišićnog oštećenja sa markerima imunološkog odgovora pri intenzitetu GET.*

Varijabla	$CD14^{+}CD16^{++}$ (MFI)	$CD14^{++}CD16^{+}$ (MFI)	$CD14^{++}CD16^{-}$ (MFI)
CK (U/L)	-0,423 (0,19)	0,140 (0,67)	-0,211 (0,53)
LDH (U/L)	**-0,627 (0,03)**	-0,183 (0,58)	-0,563 (0,07)

* Pearsonov koeficijent korelacije r (p vrijednost)

Tablica 30. Povezanost markera mišićnog oštećenja sa markerima oksidacijskog stresa pri intenzitetu GET.*

Varijabla	MDA (mmol/L)
CK (U/L)	-0,350 (0,29)
LDH (U/L)	0,159 (0,63)

* Pearsonov koeficijent korelacije r (p vrijednost)

Tablica 31. Povezanost markera oksidacijskog stresa i markera imunološkog odgovora pri intenzitetu GET.*

Varijabla	$CD14^{+}CD16^{++}$ (MFI)	$CD14^{++}CD16^{+}$ (MFI)	$CD14^{++}CD16^{-}$ (MFI)
MDA (mmol/L)	-0,119 (0,72)	-0,466 (0,14)	-0,447 (0,16)

* Pearsonov koeficijent korelacije r (p vrijednost)

5.6.3. Povezanost markera mišićnog oštećenja, oksidacijskog stresa i imunološkog odgovora pri intenzitetu GET +10%

Pri intenzitetu GET +10% utvrđena je značajna pozitivna korelacija između ekspresije monocitne subpopulacije $CD14^{++}CD16^{-}$ i markera mišićnih oštećenja (LDH) (tablica 23). Povezanosti između ostalih praćenih markera nisu utvrđene, a njihove p vrijednosti Pearsonova koeficijenta korelacije prikazane su u tablicama 23,24 i 25.

Tablica 32. Povezanost markera mišićnog oštećenja sa markerima imunološkog odgovora pri intenzitetu GET +10%.*

Varijabla	$CD14^{+}CD16^{++}$ (MFI)	$CD14^{++}CD16^{+}$ (MFI)	$CD14^{++}CD16^{-}$ (MFI)
CK (U/L)	0,047 (0,88)	0,344 (0,29)	0,374 (0,25)
LDH (U/L)	0,079 (0,81)	0,352 (0,28)	**0,602 (0,04)**

* Pearsonov koeficijent korelacije r (p vrijednost)

Tablica 33. Povezanost markera mišićnog oštećenja sa markerima oksidacijskog stresa pri intenzitetu GET +10%.*

Varijabla	MDA (mmol/L)
CK (U/L)	0,158 (0,64)
LDH (U/L)	-0,244 (0,46)

* Pearsonov koeficijent korelacije r (p vrijednost)

Tablica 34. Povezanost markera oksidacijskog stresa i markera imunološkog odgovora pri intenzitetu GET +10%.*

Varijabla	$CD14^{+}CD16^{++}$ (MFI)	$CD14^{++}CD16^{+}$ (MFI)	$CD14^{++}CD16^{-}$ (MFI)
MDA (mmol/L)	-0,408 (0,21)	-0,151 (0,65)	-0,423 (0,19)

* Pearsonov koeficijent korelacije r (p vrijednost)

6. RASPRAVA

Provedeno istraživanje analiziralo je utjecaj tjelesne aktivnosti različitih intenziteta (i jednakog volumena) na pojavnosti i dinamiku određenih markera mišićnog oštećenja, oksidacijskog stresa i imunološkog odgovora. Dobiveni rezultati ukazuju na određene varijabilnosti praćenih markera, dok značajne pravilnosti u povezanosti među istima nisu utvrđene.

S obzirom na činjenicu da je uzorak ispitanika (rekreativci) u osnovi jako heterogena skupina, nakon probira i odrađenih svih predviđenih testiranja pokazalo se da smo na kraju dobili relativno homogenu skupinu sa prosječnim relativnim maksimalnim primitkom kisika ($RVO_{2max/kg}$) u visini od 48,65 mL/kg/min, što prema Cooper institutu za aerobna istraživanja odgovara iznad prosječnim vrijednostima s obzirom na dob ispitanika.

Praćenjem aktivnosti kreatin kinaze (CK) i laktat dehidrogenaze (LDH) pri tri različite intenziteta tjelesne aktivnosti (GET -10%, GET, GET +10%) rezultati su pokazali kako je dovoljna 20-minutna aktivnost pri najnižem intenzitetu kako bi došlo do statistički značajnog porasta aktivnosti mjerenih markera 30 minuta nakon aktivnosti, a shodno tome statistički značajan porast je utvrđen i pri ostala dva (viša) intenziteta, dok statistički značajna razlika među intenzitetima nije utvrđena.

Ne postojanje razlika među intenzitetima može nas uputiti na zaključak kako navedena metoda nije dovoljno osjetljiva za razlikovanje praćenih intenziteta, dok s druge strane i vrijeme uzorkovanja (30 minuta nakon) vjerojatno nije dovoljno kako bi vrijednosti praćenih markera dosegle svoj maksimum.

U istraživanjima često možemo vidjeti nacrte koji prate aktivnosti navedenih markera u više vremenskih točaka kako bi se došlo do maksimalnih vrijednosti, no njihov značaj u sportskoj dijagnostici ostaje upitan. Razlog je što različiti tipovi, intenziteti i volumeni tjelesnih aktivnosti dosežu svoj maksimum u različito vrijeme, a CK i LDH ne dosežu svoje vrhunce istovremeno (LDH maksimum doseže ranije). Prema rezultatima sličnih istraživanja CK doseže svoj maksimum u vremenskom rasponu od 6h do 24h, a LDH u rasponu od 3h do 12h. Povećanjem volumena aktivnosti (polumaraton, maraton) maksimalne vrijednosti praćenih enzima mjere se i danima nakon aktivnosti (Callegari i sur., 2017; Brancaccio i sur., 2006; Bessa, A. L. i sur., 2016).

Prema nekim autorima na pojavnost praćenih molekula u krvnom serumu može utjecati i veličina samih molekula, pri čemu se manje molekule pojavljuju prve zbog potencijalne manje membranske propusnosti na početku stvaranja mikroruptura mišićnog tkiva. No, rezultati ovog istraživanja ne upućuju na takav zaključak jer je najveća izmjerena promjena aktivnosti,

uspoređujući početno stanje i stanje nakon 30 minuta, utvrđena kod LDH enzima (koji je veći) i to pri GET (srednjem) intenzitetu aktivnosti.

Nadalje, iako se intenzitet tjelesne aktivnosti smatra jednim od glavnih čimbenika koji utječu na pojavnost mjerenih markera, dobiveni rezultati mjerenja ne potvrđuju takvu pretpostavku, jer uvidom u rezultate mjerenja može se vidjeti kako CK i LDH najveće promjene bilježe pri srednjem intenzitetu (GET).

Iako se praćenje biokemijskih markera kao što su kreatin kinaza (CK) i laktat dehodrogenza (LDH) u kontekstu procjene potencijalnih mišićnih oštećenja koristi već dugi niz godina, te bi se moglo reći kako su to postale rutinske analize i dalje postoje očite kontradiktornosti u interpretaciji dobivenih rezultata istraživanja gledano kroz različit intenzitet, volumen, vrstu aktivnosti, vrijeme uzorkovanja kao i kroz same biokemijske karakteristike praćenih molekula. S obzirom na sve navedeno možemo zaključiti kako značaj ovakvih istraživanja možemo tražiti jedino u kontekstu praćenja potrebnog vremena za oporavak nakon određene iscrpljujuće tjelesne aktivnosti (npr. maraton) ili nakon određenog perioda sportskih priprema.

Tijekom praćenja promjene koncentracije malondialdehida (MDA) u urinu ispitanika utvrđen je porast koncentracije mjerenog markera pri sva tri intenziteta aktivnosti. Iako je porast u sva tri slučaja veći od 50% u odnosu na početno stanje: GET -10% (63,1%), GET (72,9%) i GET +10% (91,5%), statistički značajna razlika među intenzitetima nije utvrđena. Razloge ne postojanja razlika među intenzitetima vjerojatno možemo tražiti u relativno malom uzorku ili u mogućem utjecaju neke druge varijable koja pri ovom istraživanju nije kontrolirana npr. turbiditet uzoraka (kontrolirana samo gustoća).

Fisher LSD post hoc testom rezultata izmjerenih pri intenzitetu GET – 10% utvrđene su statistički značajne razlike između prvog i drugog mjerenje, te između drugog i petog mjerenja. Na temelju dobivenih rezultata testa može se zaključiti kako dvadeset minutno trčanje pri intenzitetu za 10 % manjem (brzinski) od aerobnog praga (GET – 10%) dovodi do mjerljivog i statistički značajnog porasta MDA u urinu nakon aktivnosti. Utvrđena statistički značajna razlika između drugog i petog mjerenja (nakon 24 h) vjerojatno ukazuje na vrijeme potrebno kako bi se vrijednosti MDA u urinu vratile na početno stanje (prije aktivnosti). Daljnjom analizom može se vidjeti kako je vrijednost između drugog i četvrtog mjerenja statistički granično značajna, iz čega se može zaključiti kako je potrebno između 12 i 24 sata kako bi se vrijednosti MDA vratile u početno stanje.

Fisher LSD post hoc testom rezultata izmjerenih pri intenzitetu GET utvrđene su statistički značajne razlike između prvog i drugog mjerenje, drugog i četvrtog mjerenja, drugog i petog mjerenja, te između trećeg i petog mjerenja. Na temelju dobivenih rezultata testa može se zaključiti kako dvadeset minutno trčanje pri intenzitetu na aerobnom pragu (GET) dovodi do mjerljivog i statistički značajnog porasta MDA u urinu nakon aktivnosti. Ostale statistički utvrđene razlike nam vjerojatno sugeriraju kako je potrebno oko 12 sati kao bi se povišene vrijednosti MDA u urinu vratile na razinu početnog stanja

Fisher LSD post hoc testom rezultata izmjerenih pri intenzitetu GET +10% utvrđene su statistički značajne razlike između prvog i drugog mjerenje te između drugog i trećeg mjerenja. Na temelju dobivenih rezultata testa može se zaključiti kako dvadeset minutno trčanje pri intenzitetu za 10% iznad (brzinski) aerobnog praga (GET +10%) dovodi do mjerljivog i statistički značajnog porasta MDA u urinu nakon aktivnosti. Utvrđena razlika između drugog i trećeg mjerenja vjerojatno je uzrokovana greškom u mjerenju (protokolu; zbog nemogućnosti kontrole ispitanika pri uzorkovanju trećeg, četvrtog i petog uzorka) što je vidljivo i iz grafičkog prikaza (Graf 1.).

S obzirom na provedene post hoc analize svih intenziteta možemo zaključiti kako je pri sva tri intenziteta došlo do značajnog i mjerljivog porasta koncentracije MDA u urinu 30 minuta nakon aktivnosti. Nadalje, očekivano vrijeme čišćenja MDA iz urina je pri aktivnostima intenziteta do aerobnog praga (GET -10% i GET) vjerojatno do 12 sati, dok je pri aktivnosti iznad aerobnog praga (GET +10%) vjerojatno potrebno više vremena (do 24h), s tim da vrijednosti izmjeren pri intenzitetu GET +10% trebamo promatrati s rezervom zbog očite (već spomenute) greške u mjerenju.

Prema dostupnoj literaturi, rezultati ovog istraživanja se u cijelosti uklapaju u već provedena istraživanja sličnog tipa, pri čemu je MDA određivan iz uzoraka krvi MDA- HPLC i MDA- TBARS metodama (Spirlandeli, A., 2014; Thirupathi, A., 2021).

Na temelju svega navedenog možemo zaključiti kako je provedena spektrofotometrijska MDA -TBARS metoda iz uzoraka urina dovoljno osjetljiva da može detektirati stanje oksidacijskog stresa uslijed tjelesne aktivnosti, dok samu osjetljivost metode treba još ispitati kroz potencijalno drugačije intenzitete i volumene tjelesne aktivnosti uz moguće paralelno praćenje koncentracije MDA u krvi MDA- HPLC metodom koja se smatra zlatnim standardom za ovakvu vrstu istraživanja.

C- reaktivni protein (CRP) tijekom čitavog istraživanja nije mjerio nikakva odstupanja od referentnih vrijednosti što nam sugerira da nitko od ispitanika nije imao potencijalu akutnu

upalu koja bi mogla utjecati na rezultate istraživanja. Moguću potencijalu aktivaciju CRP-a u kontekstu akutnog odgovora uslijed tjelesne aktivnosti u ovom slučaju nismo mogli ni očekivati zbog relativno malog volumena treninga i kratkog vremenskog razmaka od aktivnosti do uzorkovanja krvi (30 minuta). Samo jedna studija do sada je prijavila porast CRP-a uslijed tjelesne aktivnosti na uzorku rekreativaca, ali unutar 24h od aktivnosti, dok ostale provedene studije nisu zabilježile značajne promjene CRP-a u krvnom serumu (Brown, W. M. i sur., 2015).

Praćenjem ukupnog broja monocita prije i 30 minuta nakon aktivnosti, pri sva tri intenziteta nisu utvrđene statistički značajne razlika, ali je ipak vidljiva određena monocitna dinamika koja je u suprotnosti sa većinom istraživanja sličnog tipa. Naime, pregledom literature autori većinom navode akutni porast brojnosti ukupnih monocita odmah nakon aktivnosti, čije vrijednosti ostaju povišene 3-4 sata nakon aktivnosti, neovisno o intenzitetu i volumenu same aktivnosti, što u ovom istraživanju nije slučaj (Natale, V i sur., 2003; Bhatti, R. i sur., 2007; Peake, J. M. i sur., 2017). Rezultati ovog istraživanja sugeriraju pad brojnosti ukupnih monocita s porastom intenziteta što potencijalno može biti vezano uz nastanak mišićnih oštećenja i monocitnu aktivaciju u popravku istih. Moguće je da pri višem intenzitetu (potencijalno veća i ranija oštećenja) uzrokuju raniju migraciju monocita iz krvi u tkivo (gdje je i došlo do oštećenja) zbog čega je u diferencijalnoj krvnoj slici povećanjem intenziteta aktivnosti zabilježen pad ukupnih monocita 30 minuta nakon aktivnosti.

Analizom podataka dobivenih protočnom citometrijom, tijekom praćenja monocitnih subpopulacija nisu utvrđene bitnije statističke značajnosti kod nijedne subpopulacije, mada su uočene određene varijabilnosti i pravilnosti u dinamici mjerenih subpopulacija.

Sva tri tipa monocitnih subpopulacija pokazuju povećanu ekspresiju CD16 pri intenzitetu iznad aerobnog praga (GET +10%), dok je kod klasičnih $CD14^{++}CD16^{-}$ (proupalnih) monocita utvrđena povećana ekspresija pri sva tri intenziteta. Ekspresija na ne klasičnim $CD14^{+}CD16^{++}$ (protuupalni) monocitima pri intenzitetu GET (na aerobnom pragu) je također u porastu, dok je pri intenzitetu ispod praga u padu. Intermedijarni $CD14^{++}CD16^{+}$ (pro/protuupalni) monociti pokazuju smanjenu ekspresiju CD 16 pri oba niža intenziteta (GET -10% i GET). S obzirom na činjenicu kako postoji jako mali broj istraživanja u kojima se prate monocitne subpopulacije u kontekstu utjecaja tjelesne aktivnosti na ekspresiju istih jako je teško uklopiti dobivene rezultate u postojeća istraživanja. Moguće objašnjenje dobivenih rezultata se vjerojatno krije u samoj dinamici pojavljivanja, aktivacije i migracije u tkivo, praćenih monocitnih subpopulacija, koja je uvelike ne razjašnjena. Pitanje je, u kojem trenutku već postojeći monociti u perifernoj krv migriraju u oštećeno tkivo kod tjelesne aktivnosti, a kojem

trenutku se aktiviraju monociti iz marginalnih perifernih sudova kojih inače nema u krvnom optoku i zašto se uopće aktiviraju. Povećan intenzitet tjelesne aktivnosti dovodi do povećanja ekspresije CD16 markera kod svih tipova monocita što je vidljivo i iz rezultata ovog istraživanja, jer je pri intenzitetu GET +10% ekspresija CD16 markera kod sva tri tipa monocita u porastu, iako nije statistički dokazano. Nadalje, iz rezultata je vidljivo kako se monocitnim subpopulacijama koje eksprimiraju CD16 (FcyRIII receptor) pri nižim intenzitetima ekspresija CD16 markera smanjuje 30 minuta nakon aktivnosti. Ako uzmemo u obzir činjenicu kako neutrofili također imaju FcyRIII receptor (Hundt i sur., 1993), a prema literaturi oni su prvi koji ulaze u oštećeno tkivo, postoji mogućnost da je FcyRIII receptor aktivator inicijalne migracije monocita unutar oštećenog tkiva, zbog čega već postojeći monociti koji pokazuju najvišu ekspresiju CD16 markera, iz periferne krvi migriraju u oštećeno tkivo, što u konačnici mjerimo kao pad ekspresije. Nadalje, visoki intenzitet u zoni GET+10% moguće dovodi do uključivanja monocita iz marginalnih perifernih sudova što uzrokuje porast mjerene ekspresije CD16 markera. Moguću ulogu CD16 markera u inicijalnoj migraciji monocita u tkivo (Ruiz i sur., 2025) dodatno potkrepljuje primjećeno povećanje ekspresije CD16 kod klasičnih ($CD16^-$) monocita pri sva tri intenziteta, što nam ukazuje na kretanje klasičnih monocita prema intermedijerima.

Kako se u literaturi ekspresija CD16 markera često povezuje sa određenim kroničnim oboljenjima (Ruiz i sur., 2025) moguće je da redovna (kronična) tjelesna aktivnost dovodi do adaptacije monocitne aktivnosti u stanje kroničnog imunološkog odogovora, samo što i dalje ostaje nerazjašnjeno je li taj odgovor proupalni, protuupalni ili je kombinacija i jednog i drugog.

Praćenjem povezanost markera mišićnog oštećenja, oksidacijskog stresa i imunološkog odgovora pri tri različita intenziteta tjelesne aktivnosti utvrđeno je nekoliko značajnih korelacija koje se ne mogu promatrati same za sebe zbog očite velike kompleksnosti u povezanosti praćenih događaja do kojih dolazi uslijed mišićnih oštećenja.

Porastom intenziteta aktivnosti uočena je negativna povezanost markera oksidacijskog stresa (MDA) i monocitnih subpopulacija, što dodatno potvrđuje teoriju o migraciji već postojećih subpopulacija u oštećeno tkivo, ukoliko je ta teorija točna. Naime, povećana vrijednost MDA trebala bi ukazivati na izraženiju lipidnu peroksidaciju i potencijalno veća mišićna oštećenja čija je pojavnost pozitivno povezana sa intenzitetom; što je intenzitet aktivnosti veći, do oštećenja bi trebalo dolaziti ranije, što u konačnici dovodi do ranije migracije monocita u tkivo i njihovog nestanka iz krvnog optoka. No ovakvu teoriju treba uzeti s rezervom zbog činjenice da je MDA određivan iz urina, dok su monocitne subpopulacije

određivane iz krvi što potencijalno može dovesti do krivih zaključaka u vremenskom slijedu događaj jer zasigurno postoji vremenski odmak od pojave MDA u krvi do njegove pojave u urinu.

Povezanosti između markera mišićnih oštećenja (CK i LDH) i monocitnih subpopulacija pri nižim intenzitetima (GET -10% i GET) ne pokazuju nekakvu veliku pravilnost (neke su pozitivne, a neke negativne) dok prelaskom aerobnog praga (GET +10%) možemo vidjeti trend pozitivnih korelacija između svih praćenih varijabli pri čemu je utvrđena i statistički značajna korelacija između LDH i $CD14^{++}CD16^{-}$ monocita ($p=0,04$). Moguće je da se pri intenzitetima ispod aerobnog praga isprepleću različiti procesi koji ne pokazuju pravilnost i različiti su od osobe do osobe. Nadalje, još uvijek nije sa sigurnošću poznato što, odakle i u kojem trenutku „curi“, no pretpostavlja se da prelaskom aerobnog praga metabolički procesi postaju konzistentniji i bolje regulirani, te manje variraju ovisno o pojedincu. Stoga, utvrđene pozitivne korelacije nam mogu sugerirati blisku povezanost markera mišićnih oštećenja i aktivacije monocitinih subpopulacija iz perifernih krvnih sudova uslijed aktivnosti visokog intenziteta (iznad aerobnog praga).

Značajnije povezanosti između markera mišićnih oštećenja i oksidacijskog stresa nisu utvrđene, niti postoje određene pravilnosti, limitacija studije je vjerojatno uzrokovana nepravilnim vremenskim slijedom u uzorkovanju odnosno pojavnosti, mjerenih markera u krvi i u urinu.

Ograničenja i nedostatci istraživanja

Glavni ograničavajući faktor kod ovog istraživanja je invazivna metoda procjene postojanja mišićnih oštećenja i markera imunološkog odgovora (uzorkovanje krvi) koji ujedno dovodi i do glavnog nedostatka ovog istraživanja. Kako sam nacrt istraživanja zahtjeva četiri dolaska u laboratorij od kojih tri dolaska uključuju uzorkovanje krvi prije i poslije aktivnosti (ukupno 6 uzorkovanja) pronalazak ispitanika koji bi bili zainteresirani za sudjelovanje je bio otežan, što je u konačnici, nakon probira ispitanika dovelo do relativno malog broja ispitanika u uzorku. Nadalje, već spomenuta invazivna metoda onemogućila je praćenje dinamike markera mišićnih oštećenja i markera imunološkog odgovora kroz 24 sata nakon aktivnosti, jer bi navedeno zahtijevalo dodatnih 6 do 9 uzorkovanja krvi po ispitaniku, što bi zasigurno dodatno otežalo pronalazak zainteresiranih ispitanika.

Nedostatak ovog istraživanja je i nemogućnost praćenja da li se ispitanici pridržavaju preporuka i pravila u koja su bili upućeni prije dolaska na testiranje.

Uzorkovanje urina prije i 30 minuta nakon aktivnosti je bilo pod kontrolom provoditelja istraživanja, dok su ostala tri uzorkovanja odrađena na odgovornost samih ispitanika, što je također nedostatak ovog istraživanja (vidljivo iz rezultata).

7. ZAKLJUČAK

1. Praćenjem markera mišićnih oštećenja (CK i LDH), pri tri različita intenziteta tjelesne aktivnosti, došlo je do statistički značajnog porasta aktivnosti navedenih markera u krvnom serumu pri sva tri intenziteta 30 minuta nakon aktivnosti. Statistički značajna razlika između intenziteta nije utvrđena.

2. Praćenja promjene koncentracije malondialdehida (MDA) u urinu ispitanika utvrđen je porast koncentracije mjerenog markera pri sva tri intenziteta aktivnosti, dok statistički značajna razlika među intenzitetima nije utvrđena.

3. Potrebno vrijeme čišćenja MDA iz urina pri 20 minutnom trčanju čiji je intenziteta oko aerobnog praga je 12 do 24 sata.

4. Provedena spektrofotometrijska MDA -TBARS metoda iz uzoraka urina je dovoljno osjetljiva da može detektirati stanje oksidacijskog stresa uslijed tjelesne aktivnosti.

5. Utvrđena je povećana ekspresija CD16 kod sva tri tipa monocitnih subpopulacija ($CD14^{+}CD16^{++}$, $CD14^{++}CD16^{+}$, $CD14^{++}CD16^{-}$) pri intenzitetu iznad aerobnog praga. Ekspresija CD16 kod upalnih $CD14^{++}CD16^{-}$ je u porastu pri sva tri intenziteta.

6. Uočene potencijalne povezanosti između markera mišićnog oštećenja, oksidacijskog stresa i imunološkog odgovora, nastale uslijed tjelesne aktivnosti, potrebno je dalje istraživati kao bi se došlo do konkretnijih zaključaka.

Značaj ovog istraživanja je činjenica da je istraživanje odrađeno na populaciji rekreativaca što nije čest slučaj u istraživanjima ovog tipa. Istražene su zone aktivnosti sportaša rekreativaca, a prema dobivenom rezultatima očito je kako i rekreativne aktivnosti, kao što je 20 minutno trčanje u zonama ispod aerobnog također dovode do mišićnih oštećenja koja se očituju u povećanju markera CK i LDH.

Ovaj rad je utvrdio dovoljnu osjetljivost spektrofotometrijske MDA -TBARS metode iz uzoraka urina i njen mogući potencijal za daljnja istraživanja utjecaja tjelesne aktivnosti na stanje oksidacijskog stresa, osobiti u kontekstu dobivanja većeg i robusnijeg uzorka, kao i mogućnosti provođenja istraživanja na mlađoj populaciji zbog činjenice da metoda nije invazivna jer ne zahtjeva uzorkovanje krvi.

Utvrđene promjene na monocitnim subpopulacijama daju nam smjernice za daljnja istraživanja povezanosti imunološkog sustava i tjelesne aktivnosti, ali i mogućeg utjecaja tjelesne aktivnosti na modifikacije imunološkog sustava u kontekstu različitih patoloških stanja, kroz aktivnosti primjerene općoj populaciji.

8. LITERATURA

1. Awad, N. S. (2016). *Enhancing the Growth of the Green Alga Chlamydomonas reinhardtii* (Doctoral dissertation, Aston University).
2. Bachur, J. A., Garcia, S. B., Vannucchi, H., Jordao, A. A., Chiarello, P. G., & Zucoloto, S. (2007). Anti-oxidative systems in rat skeletal muscle after acute physical exercise. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, *32*(2), 190-196.
3. Bacon, A. P., Carter, R. E., Ogle, E. A., & Joyner, M. J. (2013). VO2max trainability and high intensity interval training in humans: a meta-analysis. *PloS one*, *8*(9), e73182.
4. Baird, M. F., Graham, S. M., Baker, J. S., & Bickerstaff, G. F. (2012). Creatine-kinase- and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. *Journal of nutrition and metabolism*, *2012*.
5. Bandov, I. (2014). *Izražaj biljega CD34 i CD77 na plazma membrani srčanih stanica hiperkalcijemičnih štakora* (Doctoral dissertation, Sveučilište u Splitu, Sveučilište u Splitu, Fakultet zdravstvenih znanosti bez pravne osobnosti).
6. Banfi, G., Colombini, A., Lombardi, G., & Lubkowska, A. (2012). Metabolic markers in sports medicine. *Advances in clinical chemistry*, *56*, 2.
7. Barstow, T. J., Casaburi, R. I. C. H. A. R. D., & Wasserman, K. A. R. L. M. A. N. (1993). O2 uptake kinetics and the O2 deficit as related to exercise intensity and blood lactate. *Journal of applied physiology*, *75*(2), 755-762.
8. Beaver, W. L., Wasserman, K. A. R. L. M. A. N., & Whipp, B. J. (1986). A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange. *Journal of applied physiology*, *60*(6), 2020-2027.
9. Bessa, A. L., Oliveira, V. N., Agostini, G. G., Oliveira, R. J., Oliveira, A. C., White, G. E., ... & Espindola, F. S. (2016). Exercise intensity and recovery: biomarkers of injury, inflammation, and oxidative stress. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, *30*(2), 311-319.
10. Bhatti, R., & Shaikh, D. M. (2007). The effect of exercise on blood parameters. *Pakistan Journal of physiology*, *3*(2).
11. Bijsterbosch, M. K., Duursma, A. M., Smit, M. J., Bos, O. J., Bouma, J. M., & Gruber, M. (1985). Several dehydrogenases and kinases compete for endocytosis from plasma by rat tissues. *Biochemical Journal*, *229*(2), 409-417.
12. Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H., Wideman, L., McKenzie, M. J., & Consitt, L. A. (2005). Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. The Journal of Strength & Conditioning Research, 19(2), 276-285.

13. Bloomer, R. J. (2008). Effect of exercise on oxidative stress biomarkers. *Advances in clinical chemistry*, *46*, 1-50.
14. Bloomer, R. J., & Farney, T. M. (2013). Acute plasma volume change with high-intensity sprint exercise. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, *27*(10), 2874-2878.
15. Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., De Marchi, E., Suski, J. M., Bononi, A., ... & Pinton, P. (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic signalling*, *8*(3), 343-357.
16. Booth, F. W., Roberts, C. K., & Laye, M. J. (2011). Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Comprehensive physiology*, *2*(2), 1143-1211.
17. Bouzid, M. A., Hammouda, O., Matran, R., Robin, S., & Fabre, C. (2014). Changes in oxidative stress markers and biological markers of muscle injury with aging at rest and in response to an exhaustive exercise. PloS one, 9(3), e90420.
18. Brancaccio, P., Limongelli, F. M., & Maffulli, N. (2006). Monitoring of serum enzymes in sport. *British journal of sports medicine*, *40*(2), 96-97.
19. Brancaccio, P., Lippi, G., & Maffulli, N. (2010). Biochemical markers of muscular damage. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, *48*(6), 757-767.
20. Brentano, M. A., & Martins Kruel, L. F. (2011). A review on strength exercise-induced muscle damage: applications, adaptation mechanisms and limitations. J Sports Med Phys Fitness, 51(1), 1-10.
21. Brown, S., Day, S., & Donnelly, A. (1999). Indirect evidence of human skeletal muscle damage and collagen breakdown after eccentric muscle actions. *Journal of sports sciences*, *17*(5), 397-402.
22. Brown, W. M., Davison, G. W., McClean, C. M., & Murphy, M. H. (2015). A systematic review of the acute effects of exercise on immune and inflammatory indices in untrained adults. *Sports medicine-open*, *1*(1), 35.
23. Brunelli, S., & Rovere-Querini, P. (2008). The immune system and the repair of skeletal muscle. *Pharmacological research*, *58*(2), 117-121.
24. Burtscher, J., Millet, G. P., & Burtscher, M. (2023). Celebrating 100 years of VO2max. *QJM: An International Journal of Medicine*, *116*(9), 809-809.
25. Callegari, G. A., Novaes, J. S., Neto, G. R., Dias, I., Garrido, N. D., & Dani, C. (2017). Creatine kinase and lactate dehydrogenase responses after different resistance and aerobic exercise protocols. *Journal of human kinetics*, *58*, 65.
26. Chamari, K., & Padulo, J. (2015). 'Aerobic'and 'Anaerobic'terms used in exercise physiology: a critical terminology reflection. Sports medicine-open, 1(1), 9.

27. Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of allergy and clinical immunology*, *125*(2), S3-S23.
28. Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, *49*(3), 481-493.
29. Chen MF, Chang CL, Liou SY. Increase in resting levels of superoxide anion in the whole blood of uremic patients on chronic hemodialysis. Blood Purif. 1998;16(5):290-300.
30. Clarkson, P. M., & Hubal, M. J. (2002). Exercise-induced muscle damage in humans. *American journal of physical medicine & rehabilitation*, *81*(11), S52-S69.
31. Cooper, C. E. (2002). Vollaard NB, Choueiri T, and Wilson MT. *Exercise, free radicals and oxidative stress. Biochem Soc Trans*, *30*, 280-285.
32. de Matos, M. A., Garcia, B. C. C., Vieira, D. V., de Oliveira, M. F. A., Costa, K. B., Aguiar, P. F., ... & Rocha-Vieira, E. (2019). High-intensity interval training reduces monocyte activation in obese adults. *Brain, behavior, and immunity*, *80*, 818-824.
33. Deminice, R., Sicchieri, T., Mialich, M. S., Milani, F., Ovidio, P. P., & Jordao, A. A. (2011). Oxidative stress biomarker responses to an acute session of hypertrophy-resistance traditional interval training and circuit training. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, *25*(3), 798-804.
34. Deshpande, O. A., & Mohiuddin, S. S. (2023). Biochemistry, oxidative phosphorylation. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
35. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev.2002;82(1):47-95.
36. Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress. *Sports medicine*, *36*(4), 327-358.
37. Fleg, J. L., Morrell, C. H., Bos, A. G., Brant, L. J., Talbot, L. A., Wright, J. G., & Lakatta, E. G. (2005). Accelerated longitudinal decline of aerobic capacity in healthy older adults. *Circulation*, *112*(5), 674-682.
38. Gleeson, M. (2007). Immune function in sport and exercise. *Journal of applied physiology*, *103*(2), 693-699.
39. Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature reviews immunology*, *3*(1), 23-35.
40. Grotto D , Santa Maria L , Valentini J , Paniz C , Schimtt G , Garcia SC , Pomblum VJ , Rocha JBT , Farina M . Importance of the lipid peroxidation biomarkers and

methodological aspects for malondialdehyde quantifi cation . Química Nova 2009 ; 32 : 169 – 174

41. Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Vincent, S., Sergent, O., ... & Gratas-Delamarche, A. (2003). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. European journal of applied physiology, 89(1), 14-20
42. Hadley, Visser, & Steen, V. (2009). Antioxidant effect on urinary excretion of malondialdehyde in non-athletes during aerobic training. *International journal for vitamin and nutrition research*, *79*(1), 5-13.
43. Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, *142*(2), 231-255.
44. Hargreaves, M., & Spriet, L. L. (2020). Skeletal muscle energy metabolism during exercise. Nature metabolism, 2(9), 817-828.
45. Hawkins, M. N., Raven, P. B., Snell, P. G., Stray-Gundersen, J., & Levine, B. D. (2007). Maximal oxygen uptake as a parametric measure of cardiorespiratory capacity. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *39*(1), 103-107.
46. Heck, H., Mader, A., Hess, G., Mücke, S., Müller, R., & Hollmann, W. (1985). Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. *International journal of sports medicine*, *6*(03), 117-130.
47. Heled, Y., Bloom, M. S., Wu, T. J., Stephens, Q., & Deuster, P. A. (2007). CM-MM and ACE genotypes and physiological prediction of the creatine kinase response to exercise. *Journal of Applied Physiology*, *103*(2), 504-510.
48. Heyward, V. H. (1998). The physical fitness specialist certification manual. Dallas, TX: The Cooper Institute for Aerobics Research, 48.
49. Hong, S., & Mills, P. J. (2008). Effects of an exercise challenge on mobilization and surface marker expression of monocyte subsets in individuals with normal vs. elevated blood pressure. *Brain, behavior, and immunity*, *22*(4), 590-599.
50. Hong, S., & Mills, P. J. (2008). Effects of an exercise challenge on mobilization and surface marker expression of monocyte subsets in individuals with normal vs. elevated blood pressure. *Brain, behavior, and immunity*, *22*(4), 590-599.
51. Hundt, M., Zielinska-Skowronek, M., & Schmidt, R. E. (1993). Fcγ receptor activation of neutrophils in cryoglobulin-induced leukocytoclastic vasculitis. Arthritis &

Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology, 36(7), 974-982.

52. Iannetta, D., Murias, J. M., & Keir, D. A. (2019). A Simple Method to Quantify the V̇ O2 Mean Response Time of Ramp-Incremental Exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, *51*(5), 1080-1086.
53. Il'yasova, D., Scarbrough, P., & Spasojevic, I. (2012). Urinary biomarkers of oxidative status. *Clinica chimica acta*, *413*(19-20), 1446-1453.
54. Itri, R., Junqueira, H. C., Mertins, O., & Baptista, M. S. (2014). Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids. *Biophysical reviews*, *6*(1), 47-61.
55. Jackson, M. J., & Farrell, S. O. (1993). Free radicals and muscle damage. *British medical bulletin*, *49*(3), 630-641.
56. Janero, D. R. (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free radical biology and medicine*, *9*(6), 515-540.
57. Janeway Jr, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). The components of the immune system. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition*. Garland Science.
58. Johnston, J. W., Horne, S., Harding, K., & Benson, E. E. (2007). Evaluation of the 1-methyl-2-phenylindole colorimetric assay for aldehydic lipid peroxidation products in plants: malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Plant Physiology and Biochemistry*, *45*(2), 108-112.
59. Kanda, K., Sugama, K., Hayashida, H., Sakuma, J., Kawakami, Y., Miura, S., ... & Suzuki, K. (2013). Eccentric exercise-induced delayed-onset muscle soreness and changes in markers of muscle damage and inflammation. *Exercise immunology review*, *19*.
60. Karamizrak, S. O., Ergen, E., Töre, I. R., & Akgün, N. (1994). Changes in serum creatine kinase, lactate dehydrogenase and aldolase activities following supramaximal exercise in athletes. *The Journal of sports medicine and physical fitness*, *34*(2), 141-146.
61. Karatas, F., Karatepe, M., & Baysar, A. H. M. E. T. (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, *311*(1), 76-79.
62. Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. Crit Rev Toxicol. 2015;45(9):765-98.

63. Kelly, G. E. (2001). Estimation of the gas exchange threshold in humans: a time series approach. *European journal of applied physiology*, *85*(6), 586-592.
64. Khan, F. Y. (2009). Rhabdomyolysis: a review of the literature. *Neth J Med*, *67*(9), 272-83.
65. Koch, B., Schäper, C., Ittermann, T., Spielhagen, T., Dörr, M., Völzke, H., ... & Gläser, S. (2009). Reference values for cardiopulmonary exercise testing in healthy volunteers: the SHIP study. *European Respiratory Journal*, *33*(2), 389-397.
66. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicol Pathol. 2002;30(6):620-50.
67. Koppenol, W. H. (1993). The centennial of the Fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine*, *15*(6), 645-651.
68. Korchazhkina, O., Exley, C., & Spencer, S. A. (2003). Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2, 4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography B*, *794*(2), 353-362.
69. Lee, I. M., Shiroma, E. J., Lobelo, F., Puska, P., Blair, S. N., Katzmarzyk, P. T., & Lancet Physical Activity Series Working Group. (2012). Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy. *The lancet*, *380*(9838), 219-229.
70. Lippi, G., & Banfi, G. (2010). Exercise-related increase of cardiac troponin release in sports: An apparent paradox finally elucidated?. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, *411*(7-8), 610-611.
71. Lucía, A. L. E. J. A. N. D. R. O., Hoyos, J. E. S. Ú. S., Pérez, M. A. R. G. A. R. I. T. A., & Chicharro, J. L. (2000). Heart rate and performance parameters in elite cyclists: a longitudinal study. *Medicine and science in sports and exercise*, *32*(10), 1777-1782.
72. Margaritis, I., Tessier, F., Verdera, F., Bermon, S., & Marconnet, P. (1999). Muscle enzyme release does not predict muscle function impairment after triathlon. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, *39*(2), 133-139.
73. Markofski, M. M., Flynn, M. G., Carrillo, A. E., Armstrong, C. L., Campbell, W. W., & Sedlock, D. A. (2014). Resistance exercise training-induced decrease in circulating inflammatory CD14+ CD16+ monocyte percentage without weight loss in older adults. European journal of applied physiology, 114(8), 1737-1748

74. McKinnon, K. M. (2018). Flow cytometry: an overview. Current protocols in immunology, 120(1), 5-1.
75. McLeish, M. J., & Kenyon, G. L. (2005). Relating structure to mechanism in creatine kinase. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *40*(1), 1-20.
76. McCord, J. M. (2000). The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine*, *108*(8), 652-659.
77. Michailidis, Y., Jamurtas, A. Z., Nikolaidis, M. G., Fatouros, I. G., Koutedakis, Y., Papassotiriou, I., & Kouretas, D. (2007). Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Medicine and science in sports and exercise*, *39*(7), 1107-1113.
78. Michailidis, Y., Jamurtas, A. Z., Nikolaidis, M. G., Fatouros, I. G., Koutedakis, Y., Papassotiriou, I., & Kouretas, D. (2007). Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *39*(7), 1107-1113.
79. Mikkelsen, U. R., Couppé, C., Karlsen, A., Grosset, J. F., Schjerling, P., Mackey, A. L., ... & Kjær, M. (2013). Life-long endurance exercise in humans: circulating levels of inflammatory markers and leg muscle size. *Mechanisms of ageing and development*, *134*(11-12), 531-540.
80. Natale, V. M., Brenner, I. K., Moldoveanu, A. I., Vasiliou, P., Shek, P., & Shephard, R. J. (2003). Effects of three different types of exercise on blood leukocyte count during and following exercise. *Sao Paulo Medical Journal*, *121*, 09-14.
81. Neves, P. R. D. S., Tenório, T. R. D. S., Lins, T. A., Muniz, M. T. C., Pithon-Curi, T. C., Botero, J. P., & Do Prado, W. L. (2015). Acute effects of high-and low-intensity exercise bouts on leukocyte counts. *Journal of Exercise Science & Fitness*, *13*(1), 24-28.
82. Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P., & Pedersen, B. K. (1999). Pro-and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *The Journal of physiology*, *515*(1), 287-291.
83. P. J. Delves, I. M. Roitt, The immune system. First of two parts. N Engl J Med 343, 37-49 (2000).
84. Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, *357*(9270), 1777-1789.

85. Patel, R. P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C. R., Jo, H., Freeman, B. A., & Darley-Usmar, V. M. (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1411*(2-3), 385-400.
86. Peake, J. M., Neubauer, O., Walsh, N. P., & Simpson, R. J. (2017). Recovery of the immune system after exercise. *Journal of Applied Physiology*, *122*(5), 1077-1087.
87. Pedisic, Z., Shrestha, N., Kovalchik, S., Stamatakis, E., Liangruenrom, N., Grgic, J., ... & Oja, P. (2020). Is running associated with a lower risk of all-cause, cardiovascular and cancer mortality, and is the more the better? A systematic review and meta-analysis. *British journal of sports medicine*, *54*(15), 898-905.
88. Pimentel, A. E., Gentile, C. L., Tanaka, H., Seals, D. R., & Gates, P. E. (2003). Greater rate of decline in maximal aerobic capacity with age in endurance-trained than in sedentary men. *Journal of applied physiology*, *94*(6), 2406-2413.
89. Polgar, M., Domijan, A. M., & Ralić, J. Optimiziranje metode za određivanje koncentracije malondialdehida u biološkim uzorcima. *8. susret mladih kemijskih inženjera 2010.-knjiga sažetaka*, 167.
90. Preiser, J. C. (2012). Oxidative stress. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, *36*(2), 147-154.
91. Quindry, J. C., Stone, W. L., King, J., & Broeder, C. E. (2003). The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. Medicine & Science in Sports &Exercise,35(7),1139-1145.
92. RADak, Z. S. O. L. T., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., SASVari, M., ... & Goto, S. (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology and Medicine*, *27*(1-2), 69-74.
93. Ruiz, V. Y., Calderon, T. M., Leon-Rivera, R., Chilunda, V., Zhang, J., & Berman, J. W. (2025). Single-cell analysis of CD14+ CD16+ monocytes identifies a subpopulation with an enhanced migratory and inflammatory phenotype. *Frontiers in Immunology*, *16*, 1475480.
94. Samet J, Wages P. Oxidative stress from environmental exposures. Curr Opin Toxicol.2018;7:60-6.
95. Sanmarco, L. M., Eberhardt, N., Ponce, N. E., Cano, R. C., Bonacci, G., & Aoki, M. P. (2018). New insights into the immunobiology of mononuclear phagocytic cells and their relevance to the pathogenesis of cardiovascular diseases. *Frontiers in immunology*, *8*, 1921.

96. Santisteban, K. J., Lovering, A. T., Halliwill, J. R., & Minson, C. T. (2022). Sex differences in VO2max and the impact on endurance-exercise performance. *International journal of environmental research and public health*, *19*(9), 4946.
97. Schneider, C. D., Barp, J., Ribeiro, J. L., Belló-Klein, A., & Oliveira, A. R. (2005). Oxidative stress after three different intensities of running. *Canadian journal of applied physiology*, *30*(6), 723-734.
98. Schneider, D. A., Phillips, S. E., & Stoffolano, S. H. A. N. (1993). The simplified V-slope method of detecting the gas exchange threshold. *Medicine and science in sports and exercise*, *25*(10), 1180-1184.
99. SEN, C. K. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *33*(3), 368-370.
100. Shantsila, E., Tapp, L. D., Wrigley, B. J., Montoro-Garcia, S., Ghattas, A., Jaipersad, A., & Lip, G. Y. (2012). The effects of exercise and diurnal variation on monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates. *European journal of clinical investigation*, *42*(8), 832-839.
101. Shantsila, E., Wrigley, B., Tapp, L., Apostolakis, S., Montoro-Garcia, S., Drayson, M. T., & Lip, G. Y. H. (2011). Immunophenotypic characterization of human monocyte subsets: possible implications for cardiovascular disease pathophysiology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *9*(5), 1056-1066.
102. Shi, C., & Pamer, E. G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews immunology*, *11*(11), 762-774.
103. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. Redox Biol. 2017 Apr;11:613-619.
104. Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative stress. *Annual review of biochemistry*, *86*(1), 715-748.
105. Simpson, R. J., McFarlin, B. K., McSporran, C., Spielmann, G., ó Hartaigh, B., & Guy, K. (2009). Toll-like receptor expression on classic and pro-inflammatory blood monocytes after acute exercise in humans. *Brain, behavior, and immunity*, *23*(2), 232-239.
106. Skinner, J. S., & McLellan, T. H. (1980). The transition from aerobic to anaerobic metabolism. *Research quarterly for exercise and sport*, *51*(1), 234-248.

107. Sorichter Stephan, Bernd Puschendorf, and Johannes Mair. "Skeletal muscle injury induced by eccentric muscle action: muscle proteins as markers of muscle fiber injury." *Exercise immunology review* 5 (1999): 5-21
108. Souissi, W., Bouzid, M. A., Farjallah, M. A., Ben Mahmoud, L., Boudaya, M., Engel, F. A., & Sahnoun, Z. (2020). Effect of different running exercise modalities on post-exercise oxidative stress markers in trained athletes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(10), 3729.
109. Spirlandeli, A. L., Deminice, R., & Jordao, A. A. (2014). Plasma malondialdehyde as biomarker of lipid peroxidation: effects of acute exercise. *International journal of sports medicine*, *35*(01), 14-18.
110. Steppich, B., Dayyani, F., Gruber, R., Lorenz, R., Mack, M., & Ziegler-Heitbrock, H. L. (2000). Selective mobilization of CD14+ CD16+ monocytes by exercise. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *279*(3), C578-C586.
111. Šentija, D. (2010). Fiziologija sporta. *Zagreb: Kineziološki fakultet Zagreb*, *15*, 214-219.
112. Štefan, L., Tepšić, T., Zavidić, T., Urukalo, M., Tota, D., & Domitrović, R. (2007). Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. *Medicina Fluminensis: Medicina Fluminensis*, *43*(2.), 84-93.
113. Teixeira, A. M., & Borges, G. F. (2012). Creatine kinase: structure and function. *Brazilian Journal of Biomotricity*, *6*(2), 53-65.
114. Thirupathi, A., Pinho, R. A., Ugbolue, U. C., He, Y., Meng, Y., & Gu, Y. (2021). Effect of running exercise on oxidative stress biomarkers: a systematic review. *Frontiers in physiology*, *11*, 610112.
115. Tiidus, P. M. (2005). Can oestrogen influence skeletal muscle damage, inflammation, and repair?. *British journal of sports medicine*, *39*(5), 251-253.
116. Timmerman, K. L., Flynn, M. G., Coen, P. M., Markofski, M. M., & Pence, B. D. (2008). Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14+ CD16+) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise?. *Journal of leukocyte biology*, *84*(5), 1271-1278.
117. Tremblay, M. S., Colley, R. C., Saunders, T. J., Healy, G. N., & Owen, N. (2010). Physiological and health implications of a sedentary lifestyle. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*, *35*(6), 725-740.

118. Valado, A., Pereira, L., & Paula, C. (2007). Effect of the intense anaerobic exercise on nitric oxide and malondialdehyde in studies of oxidative stress. International Journal of Biology and Biomedical Engineering, 1(1), 26-32.
119. Van Craenenbroeck, A. H., Van Ackeren, K., Hoymans, V. Y., Roeykens, J., Verpooten, G. A., Vrints, C. J., ... & Van Craenenbroeck, E. M. (2014). Acute exercise-induced response of monocyte subtypes in chronic heart and renal failure. *Mediators of inflammation*, *2014*.
120. Vučetić, V. (2009). Dijagnostički postupci za procjenu energetskih kapaciteta sportaša. *U Jukić, I., Milanović, D., Šalaj, S. & Gregov, C.(ur.). Zbornik radova*, *7*, 20-31.
121. Vučetić, V., & Šentija, D. (2005). Dijagnostika funkcionalnih sposobnosti–zašto, kada i kako testirati sportaše?. *Kondicijski trening*, *2*(2), 8-14.
122. Walsh, N. P., Gleeson, M., Shephard, R. J., Gleeson, M., Woods, J. A., Bishop, N. C., ... & Simon, P. (2011). Position statement part one: immune function and exercise. Exercise immunology review, 17.
123. Weitner, T., Inić, S., Jablan, J., Gabričević, M., & Domijan, A. M. (2016). Spectrophotometric determination of malondialdehyde in urine suitable for epidemiological studies. *Croatica Chemica Acta*, *89*(1), 133-139.
124. Wells, A. J., Hoffman, J. R., Jatner, A. R., Varanoske, A. N., Church, D. D., & Mangine, G. T. (2016). *Monocyte recruitment following high-intensity and high-volume resistance exercise*. DigitalCommons@ Kennesaw State University.
125. Wong, K. L., Tai, J. J. Y., Wong, W. C., Han, H., Sem, X., Yeap, W. H., ... & Wong, S. C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, *118*(5), e16-e31.
126. Wonner, R., Wallner, S., Orsó, E., & Schmitz, G. (2018). Effects of acute exercise on monocyte subpopulations in metabolic syndrome patients. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *94*(4), 596-605.
127. Wonner, R., Wallner, S., Orsó, E., & Schmitz, G. (2018). Effects of acute exercise on monocyte subpopulations in metabolic syndrome patients. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *94*(4), 596-605.
128. Yalçın, A. S., Kılınç, A., & Cöbek, B. (2010). Evaluation of a simple colorimetric analysis for urinary malondialdehyde determination. *Pathology and Laboratory Medicine International*, *1*, 23-26.

129. Yarbro, J. R., & Pence, B. D. (2018). Monocytes in aging and exercise. Exercise Medicine, 2.
130. Zheng, J., Pan, T., Jiang, Y., & Shen, Y. (2022). Effects of Short-and Long-Term Detraining on Maximal Oxygen Uptake in Athletes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed research international*, *2022*(1), 2130993.

9. SAŽETAK

Opće je poznato kako intenzivna tjelesna aktivnost dovodi do oštećenja mišićnih vlakana koja se očituje u pojavi unutarstaničnih metabolita u međustaničnom prostoru. Mikro oštećenja na staničnoj razini rezultiraju pojačanim imunološkim odgovorom u vidu monocitne aktivacije. S obzirom na ekspresiju CD14 (lipopolisaharidni receptor) i CD16 (FcyRIII receptor) poznata su tri tipa monocita. Ubrzani metabolički procesi mogu dovesti do stanja oksidacijskog stresa koje se očituje u povećanoj membranskoj propusnosti uslijed lipidne peroksidacije (malondialdehida u međustaničnom prostoru).

Očito postoji veza između mišićnog oštećenja, imunološkog odgovora i oksidacijskog stresa, te je stoga i cilj ovog rada bio utvrditi postojanje veze između navedenih pojava uslijed tjelesne aktivnosti različitog intenziteta uz primjenu relativno jednostavne i ne invazivne metode za procjenu moguće lipidne peroksidacije.

Kako su ispitivanja ovog tipa većinom usmjerena na istraživanja na populaciji sportaša, dok je opća populacija relativno zapostavljen, uzorak ispitanika u ovom istraživanju je bio sačinjen od 11 sportaša rekreativaca, prosječne dobi 34 godine, koji su odraditi tri testiranja pri tri različita intenziteta (intenzitet GET *(gas exchange threshold)*, intenzitet GET – 10% i intenzitet GET + 10%) u trajanju od 20 minuta, prilikom čega su prikupljeni uzroci krvi prije i 30 minuta nakon aktivnosti, te uzroci urina prije, te 30 minuta, 6 sat, 12 sat i 24 sata nakon aktivnosti. Iz uzoraka krvi određeni su markeri mišićnih oštećenja (CK i LDH), te monocitne subpopulacije $CD14^{+}CD16^{++}$, $CD14^{++}CD16^{+}$, $CD14^{++}CD16^{-}$, dok je iz uzoraka urina određen marker lipidne perokisdacije MDA spektrofotometrijskom MDA-TBARS metodom.

Rezultati su pokazali da je dovoljna 20 minutna aktivnost intenziteta GET – 10% kako bi došlo do značajnog porasta aktivnosti CK i LDH ($p=0,0009$; $p=0,0004$), dok značajna razlika između intenziteta nije utvrđena ($p=0,92$; $p=0,52$). Marker lipidne peroksidacije MDA pri sva tri intenziteta pokazuje značajan porast 30 minuta nakon aktivnosti ($p=0,01$; $p=0,00$; $p=0,03$), dok statistički značajna razlika između intenziteta nije utvrđena ($p=0,78$). Utvrđeno je kao je pri intenzitetima do anaerobnog praga potrebno do 12 sati kako bi došlo vraćanja MDA na vrijednosti prije aktivnosti, a dok je pri intenzitetu iznad praga potrebno do 24 sata za isto.

Sva tri tipa monocitnih subpopulacija pokazuju povećanu ekspresiju pri intenzitetu iznad aerobnog prag (GET +10%), dok klasični $CD14^{++}CD16^{-}$ (proupalni) monociti pokazuju povećanje ekspresije pri sva tri intenziteta, ali dinamika pojavljivanja, aktivacije i migracije u tkivo, praćenih monocitnih subpopulacija ostaje i dalje nedovoljno razjašnjena.

Ovo istraživanje pokazalo je kako i rekreativne aktivnosti, relativno niskog intenziteta, također dovode do mišićnih oštećenja. Nadalje, spektrofotometrijska MDA-TBARS metoda dovoljno je osjetljiva za istraživanja povezanosti tjelesne aktivnosti i oksidacijskog stresa, te

smo dobili nove smjernice u istraživanju utjecaja intenziteta tjelesne aktivnosti na ekspresiju monocitnih subpopulacija.

10. ABSTRACT

It is well known that intense physical activity leads to muscle fiber damage, which is manifested in the appearance of intracellular metabolites in the intercellular space. Micro-damage at the cellular level results in an enhanced immune response in the form of monocyte activation. Three types of monocytes are known based on the expression of CD14 (lipopolysaccharide receptor) and CD16 (FcγRIII receptor). Accelerated metabolic processes can lead to a state of oxidative stress, which is manifested in increased membrane permeability due to lipid peroxidation (malondialdehyde in the intercellular space).

There is obviously a connection between muscle damage, immune response and oxidative stress, and therefore the aim of this work was to determine the existence of a connection between the mentioned phenomena due to physical activity of different intensity with the application of a relatively simple and non-invasive method for assessing possible lipid peroxidation.

As tests of this type are mostly focused on research on the population of athletes, while the general population is relatively neglected, the sample of subjects in this study was made up of 11 recreational athletes, average age 34, who performed three tests at three different intensities (intensity GET (gas exchange threshold), intensity GET - 10% and intensity GET + 10%) for a duration of 20 minutes, during which blood samples were collected before and 30 minutes after the activity, as well as urine samples before, and 30 minutes, 6 hours, 12 hours and 24 hours after the activity. Muscle damage markers (CK and LDH) and monocyte subpopulations $CD14^{+}CD16^{++}$, $CD14^{++}CD16^{+}$, $CD14^{++}CD16^{-}$ were determined from the blood samples, while the lipid peroxidation marker MDA was determined from the urine samples using the spectrophotometric MDA-TBARS method.

The results showed that 20 minutes of GET - 10% intensity activity is sufficient to cause a significant increase in CK and LDH activity ($p=0.0009$; $p=0.0004$), while no significant difference between the intensities was found ($p=0.92$; $p=0.52$). The lipid peroxidation marker MDA at all three intensities shows a significant increase 30 minutes after the activity ($p=0.01$; $p=0.00$; $p=0.03$), while a statistically significant difference between the intensities was not determined ($p=0.78$).

It was determined that at intensities up to the anaerobic threshold, it takes up to 12 hours for MDA to return to pre-activity values, while at intensities above the threshold, it takes up to 24 hours for the same.

All three types of monocyte subpopulations show increased expression at an intensity above the aerobic threshold (GET +10%), while classic $CD14^{++}CD16^{-}$ (proinflammatory) monocytes show an increase in expression at all three intensities, but the dynamics of

appearance, activation and migration into the tissue of the monitored monocyte subpopulations remains insufficiently elucidated.

This study showed that even relatively low-intensity recreational activities also lead to muscle damage. Furthermore, the spectrophotometric MDA-TBARS method is sensitive enough to investigate the relationship between physical activity and oxidative stress, and we have obtained new guidelines in investigating the influence of physical activity intensity on the expression of monocyte subpopulations.