

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Aleksandra Č. Arsić

**UTICAJ HRONIČNOG INTENZIVNOG  
TRENINGA NA PARAMETRE  
OKSIDATIVNOG STRESA I  
MASNOKISELINSKI PROFIL PLAZME I  
ERITROCITA KOD SPORTISTKINJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Aleksandra Č. Arsić

**THE EFFECT OF CHRONIC INTESIVE  
TRAINING ON OXIDATIVE STRESS  
PARAMETERS AND FATTY ACID  
PROFILES OF PLASMA AND  
ERYTHROCYTES IN FEMALE ATHLETES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

**KOMISIJA**

**Dr Bato Korać** vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

-----

**Dr Vesna Vučić** viši naučni saradnik Instituta za medicinska istraživanja  
Univerziteta u Beogradu

-----

**Dr Marija Glibetić** naučni savetnik Instituta za medicinska istraživanja  
Univerziteta u Beogradu

-----

Beograd, 2012

*Ovaj rad je urađen u Centru izuzetne vrednosti u oblasti istraživanja ishrane i metabolizma Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Veliku zahvalnost dugujem*

- *Višem naučnom saradniku **dr Vesni Vučić**, mentoru, koja je osmislila ovaj rad, i pružala neizmernu pomoć u svim fazama izrade ovog rada,*
- ***Prof. dr Bati Koraću**, mentoru, čiji su saveti bili dragoceni u svakoj fazi izrade ovog rada,*
- *Naučnom savetniku **dr Mariji Glibetić** u okviru čijeg projekta je urađena ova teza, na iskustvu i znanju koje mi je prenela tokom rada,*
- ***Docentu dr Sanji Mazić** zameniku direktora Republičkog Zavoda za sport koja je omogućila saradnju sa zavodom, kao i kolegama i drugom medicinskom osoblju, na ukazanoj pomoći prilikom praćenja ispitanika,*
- *Višem naučnom saradniku **dr Vesni Ilić** i **dipl. biol. Jasmini Martačić-Debeljak** na pomoći koju su mi pružale prilikom izrade teze,*
- ***Dr Tamari Popović** i **dipl. biol. Jasni Tepšić** na pomoći koju su mi je pružale tokom eksperimentalnog dela izrade ove teze,*
- *Zahvaljujem se i svim saradnicima Centra izuzetne vrednosti u oblasti istraživanja ishrane i metabolizma,*
- *Veliko hvala na strpljenju i razumevanju, **MOJOJ PORODICI.***

"Uticaj hroničnog intenzivnog treninga na parametre oksidativnog stresa i masnokiselinski profil plazme i eritrocita kod sportistkinja"

## IZVOD

Intenzivna fizička aktivnost utiče na metabolizam lipida i masnih kiselina (MK), dovodi do povećane potrošnje kiseonika u mišićima i drugim tkivima što vodi povećanoj produkciji reaktivnih kiseoničnih vrsta i može uticati na funkciju imunog sistema. Uticaj hroničnog intenzivnog vežbanja na parametre oksidativnog stresa i masnokiselinski profil fosfolipida kod aktivnih sportistkinja nije dovoljno ispitivan. Zbog toga je ova studija imala za cilj da ispita MK profil fosfolipida plazme i eritrocita, parametre oksidativnog stresa, aktivnost enzima antioksidativne zaštite, kao i aktivnost monocita kao dela imunog sistema, kod dve grupe aktivnih sportistkinja: vaterpolistkinja (n=15) i fudbalerki (n=19). Kontrolnu grupu (n=14) su činile zdrave devojke istih godina starosti koje se ne bave fizičkom aktivnošću. Uprkos sličnom dijetarnom unosu, MK profil plazme pokazao je znatno veći udeo stearinske, oleinske i mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) i značajno niži procenat ukupnih i n-6 polinezasićenih MK (PUFA) kod fudbalerki u odnosu na vaterpolo i kontrolnu grupu. Sa druge strane vaterpolistkinje su imale višu procentualnu zastupljenost palmitoleinske i arahidonske kiseline u odnosu na kontrolnu grupu. MK profil eritrocita pokazao je značajno veći procenat oleinske kiseline i MUFA kod fudbalerki u odnosu na kontrolnu grupu, i smanjeni procenat stearinske kiseline uz viši udeo palmitinske i palmitoleinske kiseline kod vaterpolistkinja u odnosu na druge dve grupe. Obe grupe sportistkinja su imale značajno niži procenat n-6 PUFA i ukupnih PUFA u poređenju sa kontrolnom grupom. Procenjena aktivnost desaturaza i elongaza u eritrocitima takođe je promenjena kod sportistkinja.

Analiza parametara oksidativnog stresa pokazala je značajno veći ukupni antioksidativni status u plazmi i veći stepen lipidne peroksidacije u eritrocitima kod sportistkinja u odnosu na kontrolnu grupu. Koncentracija  $H_2O_2$  u plazmi bila je veća kod sportistkinja u odnosu na neaktivne žene, ali su fudbalerke imale viši nivo  $H_2O_2$  i u odnosu na vaterpolistkinje. Sa druge strane, koncentracija  $O_2^-$  bila je najniža kod vaterpolistkinja a najviša kod fudbalerki, značajno viša i u odnosu na kontrolnu grupu. Koncentracija  $NO_2^-$  u plazmi bila je značajno

viša kod fudbalerki u odnosu na kontrolnu grupu. Aktivnost enzima antioksidativne zaštite u eritrocitima razlikovala se između sportistkinja i kontrolne grupe. Tako je aktivnost katalaze kod sportistkinja bila značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu, dok se aktivnost glutation-peroksidaze nije razlikovala između ispitivanih grupa. Aktivnost superoksid-dismutaze bila je najviša kod vaterpolistkinja, i nije se značajno razlikovala između fudbalerki i kontrolne grupe. Analiza metaboličke aktivnosti mononuklearnih ćelija periferne krvi pokazala je veću aktivnost mononuklearnih ćelija kod sportistkinja, dok se produkcija  $O_2^-$  i  $NO_2^-$  u mononuklearnim ćelijama nije razlikovala između ispitivanih grupa.

Naši rezultati su pokazali da dugotrajna intenzivna fizička aktivnost značajno utiče na masnokiselinski profil fosfolipida plazme i eritrocita, parametre oksidativnog stresa, aktivnost enzima antioksidativne zaštite, menja aktivnost mononuklearnih ćelija periferne krvi ali ne utiče na produkciju  $O_2^-$  i  $NO_2^-$  u mononuklearnim ćelijama. Zapažene razlike između grupa vaterpolistkinja i fudbalerki ukazuju da tip sporta igra značajnu ulogu u promenama u metabolizmu kod sportistkinja.

Ključne reči: fosfolipidi, masne kiseline, fizička aktivnost, vaterpolo, fudbal, sportistkinje, slobodni radikali, enzimi antioksidativne zaštite, mononuklearne ćelije

Naučna oblast: biologija

Uža naučna oblast: fiziologija

UDK broj: 577.115.3 (043.3)

"The effect of chronic intensive training on oxidative stress parameters and fatty acid profiles of plasma and erythrocytes in female athletes"

## ABSTRACT

Intensive physical activity affects metabolism of lipids and fatty acids (FA), increases consumption of oxygen in muscles and other tissues that leads to increased production of reactive oxygen species and can affect immune system. The effect of chronic intensive exercise on parameters of oxidative stress and phospholipids FA composition in elite female athletes has not been studied extensively so far. Thus the aim of this study was to investigate FA profiles in plasma and erythrocytes phospholipids, parameters of oxidative stress, activity of antioxidative enzyme system and activity of monocytes as a part of immune system in two groups of active female athletes: water polo (n=15) and football (n=19) players. The control group was composed of 14 apparently healthy age-matched sedentary women. In spite of similar dietary patterns, plasma FA profile in the football players showed significantly higher proportion of stearic acid, oleic acid and monounsaturated FA (MUFA), and significantly lower proportion of total and n-6 polyunsaturated FA (PUFA) than the water polo and control group. The water polo players had higher percentages of palmitoleic acid and arachidonic acid than the control subjects. Erythrocyte FA profile differed among groups. We found significantly higher proportion of oleic acid and MUFA in the football group than in the controls, and decreased stearic acid and elevated palmitic and palmitoleic acid in the water polo players than in the other two groups. Both groups of athletes had significantly lower percentages of n-6 PUFA and total PUFA compared to the controls. The estimated activities of elongase and desaturases in erythrocytes were also altered in the athletes.

Analysis of oxidative stress parameters showed significantly higher plasma total antioxidant status and higher lipid peroxidation in erythrocytes of the athletes than in the controls. Concentration of  $H_2O_2$  in plasma was higher in the athletes compared with sedentary women, but also higher in football than in the water polo players. On the other hand, level of  $O_2^-$  was the lowest in water polo players and the highest in the football group. Concentrations of both  $O_2^-$  and  $NO_2^-$  were significantly higher in the football than in the

control group. Catalase activity was significantly higher in the athletes than in sedentary women, while glutathione peroxidase activity was similar in all groups. Superoxide-dismutase activity was higher in the water polo group than in the other two groups. Furthermore, metabolic activity of peripheral blood mononuclear cells was higher in the athletes, and production of  $O_2^-$  and  $NO_2^-$  in mononuclear cells did not differ among the studied groups.

Our results have shown that long-term, intense physical training significantly affected fatty acid status of plasma and erythrocyte phospholipids, oxidative stress and antioxidant enzyme activity in women. It also changes metabolic activity of mononuclear cells but not the production of  $O_2^-$  and  $NO_2^-$  in mononuclear cells. The observed differences between the water polo and the football players suggest that the type of regular training may contribute to the altered metabolism in athletes.

Key words: phospholipids, fatty acids, physical activity, water polo, football, female athletes, free radicals, antioxidant enzymes, mononuclear cells

Scientific field: biology

Special topic: physiology

UDK number: 577.115.3 (043.3)



## LISTA SKRAĆENICA

AA-arahidonska kiselina

ANOVA-analiza varijanse

ALA- $\alpha$  linoleinska kiselina

ATP-adenozin trifosfat

BHT-butilovani hidroksitoluen

BMI-indeks telesne mase (*engl.* body mass index)

CAT- katalaza

cGMP-ciklični guanozin monofosfat

CoA- koenzim A

COX-ciklooksigenaza

CPT-1- karnitin palmitoil-transferaza-1

CRP-C reaktivni protein

DHA-dokozaheksaenska kiselina

DPA-dokozapentaenska kiselina

EPA-eikozapentaenska kiselina

FFA-slobodne masne kiseline (*engl.* free fatty acid)

FL-fosfolipidi

GLC-gasno tečna hromatografija

GR- glutation reduktaza

GSH- glutation

GSH-Px- glutation peroksidaza

GST- glutation S-transferaza

HDL-lipoproteini velike gustine

HOL-holesterol

IL- interleukin

INF $\gamma$ -interferon gama

LA-linolna kiselina

LC PUFA-dugolančane polinezasićene masne kiseline-(*engl.* long chain polyunsaturated fatty acid)

LDL-lipoproteini male gustine

LPS-lipopolisaharid  
LT- leukotrijeni  
MDA-malondialdehid  
MK- masne kiseline  
MUFA-mononezasićene masne kiseline  
NADPH-nikotinamid adenine dinukleotid fosfat (redukovana forma)  
NAD<sup>+</sup>- nikotinamid adenin dinukleotid (oksidovana forma)  
NBT- *engl.* nitro blue tetrazolium  
NOS- azot oksid sintaza (*engl.* nitric oxide synthase)  
PBS-fosfatni pufer (*engl.* phosphate buffered saline)  
PG- prostaglandini  
PMA-*engl.* phorbol myristate acetate  
PUFA-polinezasićene masne kiseline  
ROS- reaktivne vrste kiseonika (*engl.* reactive oxygen species)  
RNS- reaktivne vrste azota (*engl.* reactive nitrogen species)  
SDS-natrijum dodecil sulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate)  
SFA-zasićene masne kiseline  
SOD- superoksid dismutaza  
TAS-ukupni antioksidativni status (*engl.* total antioxidant status)  
TCA-trihlorsirćetna kiselina  
TG-trigliceridi  
TLC-tankoslojna hromatografija  
TNF- $\alpha$ - *engl.* tumor necrosis factor- $\alpha$   
TX- tromboksani  
UH- ugljeni hidrati

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Biološki značaj fosfolipida .....	1
1.2. Masne kiseline .....	4
1.2.1. <i>Sinteza masnih kiselina</i> .....	6
1.2.2. <i>Razgradnja masnih kiselina</i> .....	8
1.2.3. <i>Biološki značaj zasićenih masnih kiselina</i> .....	10
1.2.4. <i>Biološki značaj mononezasićenih masnih kiselina</i> .....	11
1.2.5. <i>Biološki značaj polinezasićenih masnih kiselina</i> .....	11
1.3. Fizička aktivnost.....	13
1.3.1. <i>Metabolizam masti tokom fizičke aktivnosti</i> .....	15
1.3.2. <i>Uticaj fizičke aktivnosti na lipidni profil</i> .....	18
1.3.3. <i>Uticaj fizičke aktivnosti na masnokiselinski profil tkiva</i> .....	18
1.4. Oksidativni stres .....	21
1.4.1. <i>Sistem antioksidativne odbrane organizma</i> .....	25
1.4.2. <i>Antioksidativni enzimi</i> .....	26
1.4.3. <i>Efekat vežbanja na oksidativni stress</i> .....	28
1.5. Fizička aktivnost i imuni sistem .....	30
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	33
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	35
3.1. Dizajn studije .....	35
3.2. Antropometrijska merenja učesnica studije .....	35
3.3. Navike u ishrani ispitanica uključenih u studiju .....	36
3.4. Priprema bioloških uzoraka .....	37
3.5. Biohemijske analize .....	37
3.6. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme i eritrocita gasno-tečnom hromatografijom .....	38
3.6.1. <i>Ekstrakcija ukupnih lipida iz plazme</i> .....	38
3.6.2. <i>Ekstrakcija ukupnih lipida iz eritrocita</i> .....	38

3.6.3. Razdvajanje lipidnih klasa tankoslojnom hromatografijom (TLC) .....	38
3.6.4. Metilacija masnih kiselina .....	39
3.6.5. Analiza masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom .....	39
3.7. Određivanje parametara oksidativnog stresa .....	41
3.7.1. Određivanje totalnog antioksidativnog statusa .....	41
3.7.2. Određivanje lipidne peroksidacije .....	41
3.7.3. Određivanje superoksid anjon radikala .....	42
3.7.4. Određivanje vodonik peroksida .....	42
3.7.5. Određivanje nitrita .....	43
3.8. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane .....	43
3.8.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze .....	43
3.8.2. Određivanje aktivnosti katalaze.....	44
3.8.3. Određivanje aktivnosti glutation peroksidaze .....	45
3.9. Izolovanje mononuklearnih ćelija iz pune krvi i određivanje aktivnosti, respiratornog praska i produkcije NO u mononuklearnim ćelijama periferne krvi .....	45
3.9.1. Izolovanje mononuklearnih ćelija iz pune krvi .....	46
3.9.2. Test redukcije tetrazolijumske soli MTT.....	46
3.9.3. Test redukcije NBT soli.....	47
3.9.4. Određivanje nitrita Griess-ovom reakcijom .....	47
3.10. Statistička obrada rezultata .....	48
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>49</b>
4.1. Antropometrijske karakteristike i dijetarni unos aktivnih sportistkinja i kontrolne grupe .....	49
4.1.1. Opšte i antropometrijske karakteristike učesnica studije .....	49
4.1.2. Analiza dijetarnog upitnika .....	51
4.2. Krvna slika, sedimentacija, biohemijski parametri seruma, masnokiselinski profil fosfolipida plazme i eritrocita i procena aktivnosti elongaza i desaturaza i plazmi i eritrocitima ispitivanih grupa .....	52
4.2.1. Biohemijski parametri seruma .....	53
4.2.2. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme ispitivanih grupa .....	54
4.2.2.1. Zastupljenost zasićenih masnih kiselina u fosfolipidima plazme .....	54

4.2.2.2. Zastupljenost mononezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima plazme .....	55
4.2.2.3. Zastupljenost polinezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima plazme .....	55
4.2.2.4. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u plazmi .....	57
4.2.3. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida eritrocita ispitivanih grupa.....	58
4.2.3.1. Zastupljenost zasićenih masnih kiselina u fosfolipidima eritrocita.....	58
4.2.3.2. Zastupljenost mononezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima eritrocita .....	58
4.2.3.3. Zastupljenost polinezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima eritrocita .....	59
4.2.3.4. Procena aktivnosti desaturaza i elongaza u eritrocitima .....	61
4.3. Redoks promene plazme i eritrocita kod aktivnih sportistkinja i kontrolne grupe .....	62
4.3.1. Parametri oksidativnog stresa .....	62
4.3.1.1. Lipidna peroksidacija .....	62
4.3.1.2. Ukupni antioksidativni status .....	63
4.3.1.3. Superoksid anjon radikal .....	64
4.3.1.4. Vodonik peroksid .....	65
4.3.1.5. Nitriti .....	66
4.3.2. Aktivnost enzima antioksidativne odbrane u eritrocitima sportistkinja i kontrolne grupe .....	67
4.3.2.1. Aktivnost superoksid dismutaze .....	67
4.3.2.2. Aktivnost katalaze .....	68
4.3.2.3. Aktivnost glutation peroksidaze .....	69
4.4. Efekat fizičke aktivnosti na aktivnost mononuklearnih ćelija periferne krvi i produkciju $O_2^-$ i NO u njima kod ispitanica ženskog pola .....	70
4.4.1. Aktivnost mononuklearnih ćelija periferne krvi ispitivanih grupa .....	70
4.4.2. Produkcija superoksid anjon radikala u mononuklearnim ćelijama periferne krvi ispitivanih grupa .....	71
4.4.3. Produkcija azot monoksida u mononuklearnim ćelijama periferne ispitivanih grupa .....	72
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>74</b>

<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	87
<b>7. LITERATURA</b> .....	89

## 1.UVOD

Lipidi predstavljaju heterogenu grupu organskih jedinjenja čija je zajednička karakteristika nerastvorljivost u vodi. Uloga lipida u organizmu je višestruka. Oni predstavljaju izvore energije, strukturne i funkcionalne elemente ćelijske membrane, izvore esencijalnih masnih kiselina i nosače liposolubilnih vitamina. Prema hemijskom sastavu lipidi se dele na proste i složene. Prema naelektrisanju lipidi se dele na neutralne gde spadaju trigliceridi, holesterol i holesterol-estri; i polarne gde spadaju fosfolipidi i glikolipidi. Osnovna biološka uloga triglicerida u organizmu je da služe kao efikasan izvor energije. Holesterol, kao najrasprostranjeniji steroid u organizmu, važan je sastojak bioloških membrana i prekursor je steroidnih hormona i žučnih kiselina. Fosfolipidi su integralni delovi bioloških membrana i imaju čitav niz esencijalnih funkcija (Dowhan i Bogdanov, 2002).

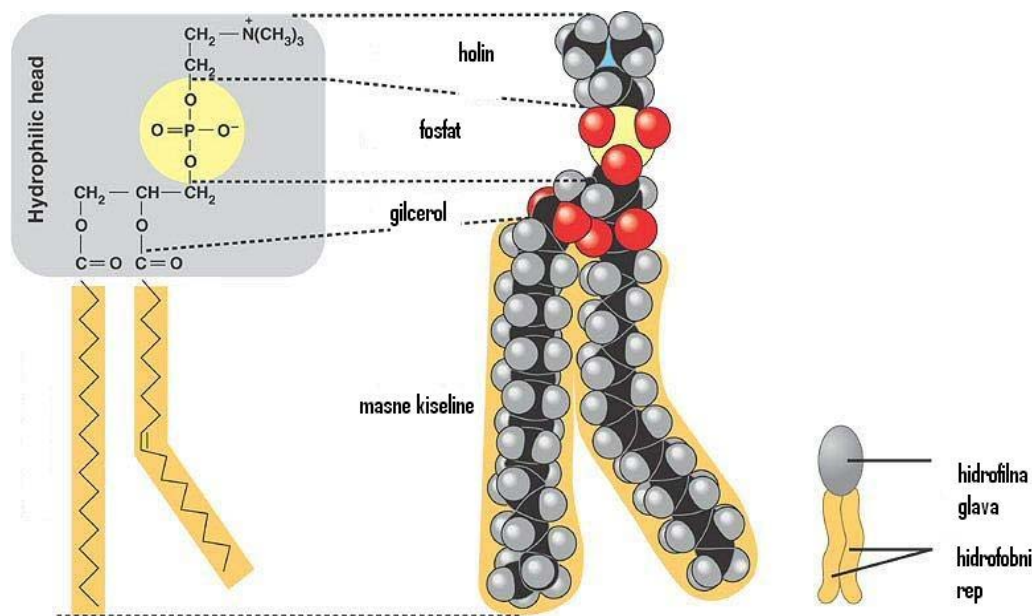
Zbog ovako kompleksne uloge u organizmu, lipidi su konstantno u fokusu naučnih istraživanja.

### 1.1. Biološki značaj fosfolipida

Fosfolipidi (FL) su složeni lipidi, čiji se molekuli sastoje iz alkohola (glicerola ili sfingozina), masnih kiselina, fosforne kiseline i azotne baze. Zavisno od vrste alkohola koji sadrže dele se u dve velike grupe:

- Glicerofosfolipide (sadrže glicerol) i
- Sfingofosfolipide (sadrže sfingozin)

Fosfolipidi su amfipatični molekuli. Njihov hidrofobni (nepolarni) deo predstavljaju lanci masnih kiselina (MK), a hidrofilni (polarni) deo je fosforilisani alkohol. Ovakva priroda omogućava stvaranje fosfolipidnog dvosloja u ćelijskim membranama i fosfolipidnog omotača na površini lipoproteinskih čestica. Hidrofilni kraj PL okrenut je ka vodenom miljeu, a hidrofobni masnokislinski rep ka nepolarnoj unutrašnjosti dvosloja (Dowhan i Bogdanov, 2002) (slika 1).



**Slika1. Strukturna formula fosfolipida**

Kao esencijalan deo svih bioloških membrana, FL omogućavaju održavanje njenog integriteta, kao i čitav niz esencijalnih funkcija (Nelson i Cox, 2005):

- fluidnost i propustljivost membrane;
- prenos signala hormona i citokina;
- regulacija aktivnosti citokina;
- influks  $\text{Ca}^{2+}$ .

Ove funkcije FL se zasnivaju na svojstvu da mogu preći iz gel stanja (u kom su čvrsto upakovani) u sol stanje (tečno kristalno), koje uslovljava njihovu veliku mobilnost - lateralnu difuziju, rotaciju oko svoje ose, kao i kretanje između spoljašnjeg i unutrašnjeg sloja (tzv. flip-flop mehanizam) na tranzicionoj temperaturi. Tranziciona temperatura membranskih fosfolipida je u funkciji njihovih polarnih grupa, dužine ugljovodonikovog lanca masnih kiselina, njihove nezasićenosti (što je kraći lanac masnih kiselina i njihova veća nezasićenost to je niža tranziciona temperatura), kao i sadržaja holesterola u membrani (Macfarlane i sar., 2008). Holesterol je prisutan u plazma membrani eukariotskih ćelija u količinama ekvimolarnim svim membranskim fosfolipidima (u membranama organela eukariota ga ima manje), a njegova osnovna uloga je kontrola fluidnosti membrana. On uleže među lance masnih kiselina fosfolipida i onemogućava njihovu kristalizaciju na niskim temperaturama, a



takođe sterički ometa velike pokrete lanaca masnih kiselina smanjujući pri tome fluidnost. Održavanje membrane u polučvrstom stanju je od najveće važnosti za održavanje nesmetanog transmembranskog transporta (Dowhan i Bogdanov, 2002).

Metabolizam FL predstavlja dinamičan proces sinteze, razgradnje i obnavljanja membrana. U ćelijskoj membrani FL su asimetrično poređani- kiseli su lokalizovani na unutrašnjoj strani membrane, a neutralni na njenoj spoljnoj strani i u stalnoj su dinamičkoj ravnoteži sa FL seruma. Stoga, nivo FL seruma i njihovih frakcija (fosfatidilholina, fosfatidiletanolamina, sfingofosfolipida i lizofosfatidilholina) predstavlja „ogledalo“ stanja membranskih FL (Nikolaidis i Mougios, 2004; **Kent, 1995**; Macfarlane i sar., 2008).

Sastav masnih kiselina fosfolipida reflektuje tip masti unetih ishranom i koristi se kao biohemijski parametar za praćenje unosa masnih kiselina. Međutim, promene u metabolizmu lipida, kod različitih fizioloških i patoloških stanja, takođe utiču na kvalitativni i kvantitativni odnos masnih kiselina fosfolipida.

Fluidnost membrane određuju pre svega fosfolipidi odnosno dužina, nezasićenost i prostorna izomerija polinezasićenih masnih kiselina koje ulaze u njihov sastav ( Laposata, 1995; Stubbs i Smith, 1984). Promena fluidnosti membranskih lipida ima uticaja na različite procese u ćeliji uključujući i aktivnosti membranskih enzima (adenilciklaze, 5-nukleozidaze,  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ATPaze). Utvrđeno je da se sinteza triglicerida u ćeliji razlikuje u zavisnosti od masnokiselinskog profila membrana. Povećana zastupljenost n-3 masnih kiselina inhibira sintezu triglicerida. Inhibicija sinteze triglicerida mogla bi se ostvariti i direktno preko kontrole transkripcije lipogenih enzima. Zastupljenost polinezasićenih masnih kiselina u membrani povećava aktivnost  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ATPaze i utiče na  $\text{H}^+$  transport u mitohondrijama što bi moglo predstavljati mehanizam kojim promene masnokiselinskog profila utiču na metaboličku aktivnost. Na aktivnost  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ ATPaze odlazi oko 20 % potrošnje energije bazalnog metabolizma, a veća propustljivost za  $\text{H}^+$  jone takođe dovodi do povećane potrošnje energije. Dijetne intervencije koje dovode do promena u membrani uključuju promene u sadržaju holesterola, odnosu holesterola i fosfolipida, distribuciji fosfolipidnih klasa, kao i tipu masnih kiselina u fosfolipidima membrana. Promene u zasićenosti MK membrane takođe dovode do promena u membranskoj fluidnosti. Membrane koje imaju manji indeks nezasićenosti sa velikim procentom zasićenih masnih kiselina u fosfolipidima

imaju manju fluidnost u odnosu na membrane sa velikim indeksom nezasićenosti (Laposata, 1995; Stubbs i Smith, 1984).

## 1.2. Masne kiseline

Masne kiseline se u organizmu nalaze u dva oblika: **slobodne** ili **neesterifikovane** (*engl.* free fatty acids, FFA) i **esterifikovane**. U plazmi FFA (5% od ukupnih masnih kiselina prisutnih u krvi) su reverzibilno vezane pre svega za albumin, a u manjoj meri za globuline i lipoproteine. Najveći deo MK u cirkulaciji (95%) je esterifikovan, vezan u obliku triglicerida (45%), holesterol-estara (15%) i fosfolipida (35%) (Simopoulos, 1999). U Tabeli 1. prikazane su najvažnije MK prisutne u mastima životinjskog porekla.

Masne kiseline, u zavisnosti od odsustva ili prisustva dvogubih veza, mogu biti **zasićene** i **nezasićene**. Prema broju dvogubih veza nezasićene MK mogu biti **mononezasićene** i **polinezasićene**. Prema geometrijskoj izomeriji nezasićene masne kiseline se mogu pojaviti u dva oblika *cis* i *trans*. *Trans* masne kiseline nastaju:

- u procesu hidrogenizacije nezasićenih masnih kiselina u biljnim uljima pri proizvodnji margarina i drugih čvrstih masnoća,
- u procesu rafinisanja biljnih ulja (koja sadrže nezasićene masne kiseline) pri visokim temperaturama i pri zagrevanju ulja na visokim temperaturama pri prženju hrane,
- u procesu hidrogenizacije nezasićenih masnih kiselina od strane bakterija u probavnom traktu preživara.

Obzirom da se *trans* masne kiseline nalaze u često upotrebljavanim namirnicama, uobičajenom ishranom ih nije moguće u potpunosti izbeći. Smatra se da visok unos *trans* masnih kiselina predstavlja značajan faktor rizika za aterosklerozu i koronarne bolesti srca jer snižava nivo HDL-holesterola a povećava nivo LDL-holesterola (Mensink, 1990). Količina unetih *trans* masnih kiselina varira u zavisnosti od geografskog područja. Literaturni podaci se razlikuju, ali se uopšteno može reći da je unos najmanji u mediteranskim zemljama, dok je u zemljama Evropske Unije i Amerike veći. Konfiguracija dvogubih veza kod nezasićenih MK u prirodi uvek je *cis* (Nikolaidis i Mougios, 2004; Macfarlane i sar., 2008). U fiziološkim uslovima masne kiseline su u jonizovanom obliku (Nikolaidis i Mougios, 2004; Macfarlane i sar., 2008).

U biološkim sistemima MK obično sadrže paran broj ugljenikovih atoma najčešće od 14-24, pri čemu su najzastupljenije masne kiseline sa 16 i 18 C atoma. Kod životinja lanac masnih kiselina gotovo je bez izuzetka nerazgranat (Macfarlane i sar., 2008). Kod polinezasićenih masnih kiselina dvogube veze su odvojene barem jednom metilenskom grupom (Nikolaidis i Mougios, 2004; Macfarlane i sar., 2008).

Tabela 1. Najvažnije MK u životinjskim mastima

<b>Masne kiseline</b>		
<b>Trivijalni naziv</b>	<b>Hemijski naziv</b>	<b>Skraćena oznaka</b>
<b>Zasićene masne kiseline (SFA)</b>		
buterna	Butanska	4:0
kapronska	Heksanska	6:0
kaprilna	Oktanska	8:0
kaprinska	Dekanska	10:0
laurinska	dodekanska	12:0
miristinska	tetradekanska	14:0
palmitinska	heksadekanska	16:0
stearinska	oktadekanska	18:0
arahinska	eikozanska	20:0
behenska	dokozanska	22:0
lignocerinska	tetrakozanska	24:0
<b>Mononezasićene masne kiseline (MUFA)</b>		
palmitoleinska	cis-9-dekaenska	16:1, n-7
oleinska	cis-9-oktadekaenska	18:1, n-9
vakcenska	cis-11-oktadekaenska	18:1, n-7
gadoleinska	cis-9-eikozanska	20:1, n-7
Eručna	cis-13-dokozenska	22:1, n-9
cetoleinska	cis-11-dokozenska	22:1, n-11
nervonska	cis-15-tetrakozaenska	24:1, n-9
<b>Polinezasićene masne kiseline (PUFA)</b>		
Linolna	cis-9,12-oktadekadienska	18:2, n-6
γ-linolenska	cis-6,9,12-oktadekatrienska	18:3, n-6
α-linolenska	cis-9,12,15-oktadekatrienska	18:3, n-3
dihomo-γ-linolenska	cis-8,11,14-eikozatrienska	20:3, n-6
arahidonska	cis-5,8,11,14-eikozatetraenska	20:4, n-6
eikozapentaenska	cis-5,8,11,14,17-eikozapentaenska	20:5, n-3
dokozapentaenska	cis-7,10,13,16,19-dokozapentaenska	22:5, n-3
dokozaheksaenska	cis-4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenska	22:6, n-3

### 1.2.1. Sinteza masnih kiselina

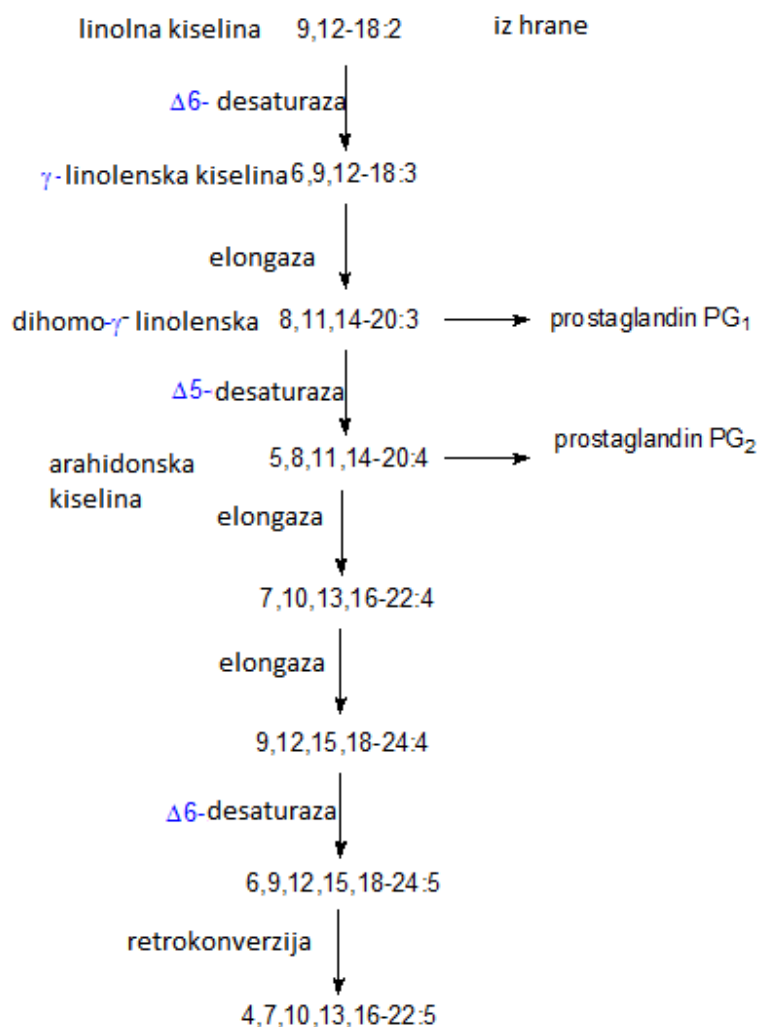
Sinteza masnih kiselina odvija se u jetri, masnom tkivu, plućima, mozgu. Prekursor svih C atoma u MK je acetyl-CoA koji nastaje oksidativnom dekarboksilacijom piruvata, razgradnjom aminokiselina i  $\beta$ -oksidacijom MK. Početna faza sinteze MK predstavlja sintezu malonil-CoA koji nastaje karboksilacijom acetyl-CoA u prisustvu acetyl-CoA karboksilaze. Nakon toga sledi niz od 4 reakcije: elongacija, redukcija, dehidracija i ponovna redukcija koji vodi sintezi butiril-ACP. Naime, najpre se acetyl-CoA i malonil-CoA, u prisustvu acetyl/malonil CoA-ACP transacilaze vežu za acil noseći protein (*engl.* Acyl carrier protein-ACP) pri čemu nastaju acetyl-ACP i malonil-ACP. U reakciji acetyl-ACP i malonil-ACP koju katalizuje acil-malonil sintaza nastaje acetoacetyl-ACP. Acetoacetyl-ACP se uz pomoć NADPH i enzima  $\beta$ -ketoacil-ACP reduktaze redukuje do D- $\beta$ -hidroksibutil-ACP. Sledi proces dehidracije u prisustvu  $\beta$ -hidroksiacyl-ACP dehidrataze u kome nastaje  $\alpha,\beta$ -trans butenoil-ACP. U prisustvu NADPH i enzima enoil-ACP-reduktaze nastaje butiril-ACP. U sledećem nizu reakcija butiril-ACP reaguje sa malonil-ACP i ciklus se ponavlja. Sinteza MK se nastavlja do palmitoil-ACP (ukupno 7 ciklusa) kada se pod dejstvom tioesteraze oslobađa palmitat.

Svi enzimi koji učestvuju u sintezi MK povezani su u jedan polipeptidni lanac, sa 7 različitih domena, kojeg nazivamo sintaza masnih kiselina (*engl.* Fatty acid synthase-FAS). FAS omogućava sintezu MK do 16 C atoma.

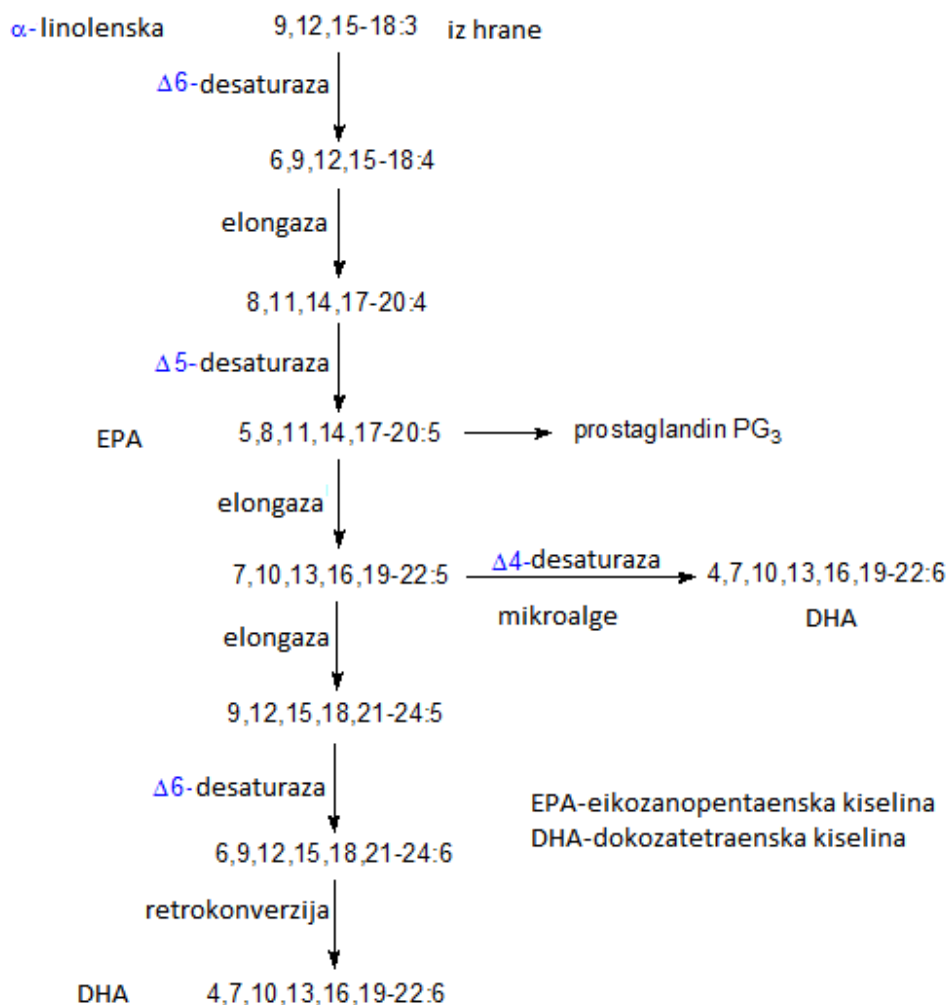
MK sa većim brojem C atoma se sintetišu pomoću enzima endoplazmatičnog retikuluma. Elongacija se nastavlja reakcijom malonil-CoA i acil-CoA, a zatim slede reakcije redukcije, dehidracije i ponovne redukcije (Cook i McMaster, 2002) koje vode elongaciji lanca MK.

Nezasićene masne kiseline se sintetišu u prisustvu enzima acil-CoA desaturaza. Konverzija zasićenih u mononezasićene masne kiseline se vrši u jetri, kao najvažnijem organu, pod dejstvom ključnog enzima stearil-CoA desaturaze ( $\Delta 9$  desaturaze) koji vrši inserciju dvogube *cis* veze na  $\Delta 9$  poziciji pri čemu iz stearil-CoA nastaje oleil-CoA, a iz palmitoil-CoA nastaje palmitoleil-CoA (Kim i Ntambi, 1999). Na taj način se iz SFA palmitinske (16:0) i stearinske (18:0) kiseline dobijaju MUFA palmitoleinska (16:1 n-7) i oleinska kiselina (18:1 n-9).

Pored ovih enzima u endoplazmatičnom retikulumu se nalaze kompleksni sistemi desaturaza  $\Delta 6$  i  $\Delta 5$  odgovornih za stvaranje dvostrukih veza u dugolančanim masnim kiselinama. Pod dejstvom ovih desaturaza nastaju metaboliti linolne i  $\alpha$ -linoleinske kiseline (slika 2 i 3). Desaturacija linolne i  $\alpha$ -linoleinske kiseline dešava se pod dejstvom  $\Delta 6$  desaturaze, dok je brzina desaturacije dihomog- $\gamma$ -linolenske ( $20:3n-6$ ) i arahidonske kiseline ( $20:4n-6$ ) određena aktivnošću  $\Delta 5$  desaturaze (Benatti i sar., 2004). Sinteza DHA ( $22:6n-3$ ) odvija iz  $22:5n-3$  putem dve sukcesivne elongacije, koju prate  $\Delta 6$  desaturacija  $24:5n-3$  u  $24:6n-3$ , a potom retrokonverzija do DHA (Marzo i sar., 1999; Marzo i sar., 1996).



**Slika 2. Biosinteza polinezasićenih masnih kiselina n-6 familije**



**Slika 3. Biosinteza polinezasićenih masnih kiselina n-3 familije**

Kičmenjaci nemaju  $\Delta 12$  i  $\Delta 15$  desaturaze odgovorne za konverziju oleinske kiseline u linolnu i  $\alpha$ -linolensku kiselinu. Stoga nisu u mogućnosti da sintetišu polinezasićene n-6 i n-3 MK *de novo* (Hastings i sar., 2001), već se moraju unositi hranom. Esencijalne masne kiseline su linolna i  $\alpha$ -linolenska kiselina.

### 1.2.2. Razgradnja masnih kiselina

MK su hemijski relativno inertne i da bi se povećala njihova reaktivna sposobnost neophodno je da se pod dejstvom enzima acil-CoA sintetaze i utrošak ATP-a u procesu oksidativne fosforilacije prevedu u tioestre, jedinjenja bogata energijom koja poseduju visok

potencijal za prenos grupa. Proces aktivacije MK katalizuje acil-CoA sintaze (tiokinaze), pri čemu najpre nastaje acil-adenilat anhidrid a zatim acil-CoA. Obzirom da se proces,  $\beta$ -oksidacije MK se odvija u mitohondrijalnom matriksu, acil-CoA nastao u citoplazmi na spoljašnjoj mitohondrijalnoj membrani, mora biti transportovan u matriks mitohondrija. Za prolaz aktivirane MK kroz unutrašnju mitohondrijalnu membranu neophodan je karnitin. U međumembranskom prostoru mitohondrija acil-CoA reaguje sa karnitinom u prisustvu enzima karnitin aciltransferaze I pri čemu nastaje acil-karnitin. Acil-karnitin se zahvaljujući translokazi koja se nalazi u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani prenosi u mitohondrijalni matriks uz istovremeni prenos karnitina iz matriksa u međumembranski prostor. U matriksu acil-karnitin reaguje sa CoA u prisustvu karnitin aciltransferaze II i tako nastaje acil-CoA i oslobađa se karnitin (Kerner i Hoppel, 2000). Acil-CoA u mitohondrijalnom matriksu podleže procesu  $\beta$ -oksidacije.

Proces  $\beta$ -oksidacije MK odvija se kroz 4 reakcije: prva reakcija je oksidacija acil-CoA, pomoću enzima acil-CoA dehidrogenaze pri čemu nastaje trans- $\Delta^2$ -enoil-CoA. Sledeći korak je hidratacijom dvostruke veze, u prisustvu enoil-CoA-hidrataze i stvarnje se L-3-hidroksi acil-CoA. Dehidrogenizacijom  $\beta$ -hidroksi acil-CoA, pomoću L-3-hidroksil acil-CoA dehidrogenaze nastaje  $\beta$ -keto acil-CoA. Poslednji korak je raskidanje  $C\alpha$ - $C\beta$  veze u reakciji tiolize (Claisen estarskim cepanjem), pomoću tiol-grupe drugog molekula CoA, u prisustvu  $\beta$ -keto acil-CoA-tiolaze i formiranje acetil-CoA i novog acil-CoA, koji sadrži 2C atoma manje nego početni (Macfarlane, 2008).

Mitohondrija sadrži 3 acil-CoA-dehidrogenaze specifične za kratke, srednje i dugolančane MK-acil-CoA. Reakcija katalizovana ovim enzimom uključuje uklanjanje protona sa  $C\alpha$  i transfer vodonikovog jona sa  $C\beta$  na FAD. Rezultujući  $FADH_2$  se reoksiduje u mitohondrijalnom elektron transportnom lancu.

Svaki krug oksidacije MK produkuje jedan NADH, jedan  $FADH_2$ , jedan acetil-CoA. Oksidacija acetil-CoA u ciklusu limunske kiseline generiše dodatno jedan  $FADH_2$  i tri NADH koji se reoksiduju kroz oksidativnu fosforilaciju uz stvaranje ATP-a.

U slučajevima povišene lipolize, kao što se dešava u neregulisanoj dijabetes melitusu ili prekomerenom gladovanju, molekuli acetil-CoA reaguju gradeći acetoacil-CoA iz kog se u Lynenn-ovom ciklusu ketogeneze stvaraju *ketonska tela* (acetoacetat, hidroksibuterna kiselina i aceton).

Proces  $\beta$ -oksidacije odvija se i u **peroksizomima** na odvojen i nezavisan način, i ima sasvim drugačiju ulogu u odnosu na opisan način u mitohondrijama. MK u peroksizomima ne podležu oksidativnoj fosforilaciji i predstavljaju glavni izvor acetil jedinica neophodnih za sintezu novih MK u procesu elongacije. Uloga ovog sistema je u obezbeđivanju homeostaze esencijalnih polinezasićenih MK u organizmu neophodnih za sintezu membranskih lipida (Lee i sar., 1998).

### **1.2.3. Biološki značaj zasićenih masnih kiselina**

Zasićene masne kiseline (engl. *Saturated fatty acids*-SFA) mogu biti kratkolančane, srednjelančane i dugolančane. Iako u sastav membranskih i serumskih FL ulaze samo dugolančane zasićene MK, od biološkog značaja su i kratkolančane. Zasićene MK mogu različito uticati na zdravlje ljudi (Grandy, 1994; Thormar i sar., 1994; German, 1999; Mensink i sar., 2003). Tako na primer buterna kiselina (C4:0) pozitivno deluje na ljudsko zdravlje, jer je dobro poznat modulator genske funkcije i ima ulogu u prevenciji kancerogenih oboljenja (German, 1999). Kaprilna (C8:0) i kaprinska (C10:0) kiselina mogu imati antiviralnu aktivnost (Thormar i sar., 1994). Laurinska kiselina (C12:0), osim antiviralne, može imati i antibakterijsku aktivnost (Sun i sar., 2002) i može delovati kao agens protiv karijesa (Schuster i sar., 1980). Sa druge strane, laurinska, miristinska i palmitinska kiselina imaju negativan efekat na zdravlje, jer deluju izrazito aterogeno i trombogeno. Ove masne kiseline su zastupljene najviše u hrani životinjskog porekla.

Dugolančanim zasićenim MK bogate su masti životinjskog porekla. Povećan unos ovih MK dovodi do povećanja nivoa ukupnog i LDL holesterola što može dovesti do povećanja telesne težine, gojaznosti i srčanih oboljenja. Stearinska kiselina se dugo smatrala masnom kiselinom koja deluje proaterogeno i povećava rizik za kardiovaskularne bolesti. Međutim, novija istraživanja su pokazala da stearinska kiselina ne povećava nivo holesterola i nije aterogena (Grandy, 1994; Thormar i sar., 1994; German, 1999; Mensink i sar., 2003) već čak ima protektivni efekat na proces ateroskleroze (Kelly i sar., 2001). Takođe pokazano je da stearinska kiselina ima antikancerogeni efekat time što indukuje apoptozu u ćelijama tumora (Evans i sar., 2009).



#### **1.2.4. Biološki značaj mononezasićenih masnih kiselina**

Mononezasićene masne kiseline (engl. *monounsaturated fatty acids*-MUFA) koje ulaze u sastav FL su palmitoleinska i oleinska kiselina. U ishrani glavni izvor nezasićenih MK je maslinovo ulje. Preko 92% unetih MUFA hranom čini oleinska kiselina (Kris-Etherton, 1999). Osim maslinovog ulja, bogat izvor oleinske kiseline su i ulje od repice, masno meso, slanina, mleko i mlečni proizvodi, koštunjavo voće i avokado (Vučić i sar., 2012). U cirkulaciji se prenosi vezana za albumin. Transport kroz ćelijske membrane vrši se olakšanom difuzijom i pasivnim flip-flop mehanizmom (Stump i sar, 2001). Oleinska kiselina ima čitav niz biološki važnih uloga. Ona snižava nivo ukupnog i LDL holesterola u organizmu. Uzrokuje kvantitativne promene u LDL česticama i čini ih rezistentnijim na oksidativnu modifikaciju (Haug i sar., 1992). Osim toga, oleinska kiselina dovodi do snižavanja nivoa triglicerida u organizmu (Haug i sar., 1992), smanjuje rizik od koronarnih arterijskih oboljenja (Mensink i sar., 2003). Postoje indikacije da ima i protektivni efekat na razvoj maligniteta (Ip, 1997). Smatra se da je oleinska kiselina najznačajniji faktor blagotvornog efekta mediteranskog načina ishrane, za koji je pokazano da snižava rizik od kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti. Integrisana u sastavu membranskih fosfolipida, oleinska kiselina reguliše fluidnost ćelijske membrane, reguliše aktivnost niza enzima, uključujući i desaturaze, efikasnost transmembranskog transporta i receptorsku aktivnost, deluje na transukciju signala i gensku ekspresiju (Kris-Etherton, 1999).

#### **1.2.5. Biološki značaj polinezasićenih masnih kiselina**

Linolna kiselina (LA, 18:2 n-6) i  $\alpha$ -linolenska kiselina (ALA, 18:3 n-3) su esencijalne masne kiseline koje se moraju uneti u organizam putem ishrane (Haug i sar., 2007). LA je prekursor n-6 serije polinezasićenih MK (engl. *Polyunsaturated fatty acid*-PUFA) dok je ALA prekursor n-3 serije. One podležu procesima elongacije i desaturacije i zahvaljujući posebnom enzimskom sistemu proizvode se n-6 i n-3 dugolančane masne kiseline (engl. *Long-chain polyunsaturated fatty acid*- LC PUFA) u organizmu. Dok se dijetarne LA i ALA nalaze prvenstveno u biljnim uljima, dugolančane masne kiseline mogu biti konzumirane i iz hrane životinjskog porekla (Haug i sar., 2007). PUFA u organizmu imaju čitav niz veoma bitnih bioloških funkcija: regulacija rasta i razvoja organizma, razvoj retine i moždanih

funkcija, regulacija imunog odgovora, uticaj na kancerogenezu (Benatti i sar., 2004). Značajnost LC PUFA povezana je sa njihovom strukturnom ulogom, njihovim specifičnim interakcijama sa membranskim proteinima, i njihovom sposobnošću da služe kao prekursori sekundarnih glasnika. Dugolančane n-6 i n-3 masne kiseline sintetišu se iz LA i ALA u prisustvu istog enzimskog sistema mikrozomalnih desaturaza i elongaza pri čemu je  $\Delta 6$  desaturaza mera tj. kontrolni korak u ovom procesu. Afinitet  $\Delta 6$  desaturaze je najveći za ALA, manji za LA i najmanji za oleinsku kiselinu i zbog toga se desaturacija i elongacija n-9 PUFA dešava pri kombinovanom deficitu n-3 i n-6 PUFA (Carnam i Beare-Rogers, 1988). Afinitet  $\Delta 6$  desaturaze opada od n-3 > n-6 > n-9. Ljudski organizam konvertuje ALA do eikozapentaenske kiseline (EPA) i DHA, ali je kapacitet za ovu konverziju limitiran. Neumereno unošenje n-6 masnih kiselina može redukovati elongaciju i desaturaciju ALA i time dovesti do deficita n-3 masnih kiselina. Zbog toga je izbalansirani unos n-6 i n-3 masnih kiselina veoma važan za optimalni funkcionisanje organizma. Najčešći metabolički odgovor na deficit n-3 PUFA je kompezatorno povećanje n-6 masnih kiselina, a pre svega dokozapentaenske (DPA 22:5 n-6) koja se takođe sintetiše u prisustvu desaturaza i elongaza (Van Houwelingen i sar., 1996). Međutim, uloga PUFA n-3 i n-6 serije je različita, a nekada i sasvim suprotna. Masne kiseline eikozapentaenska (EPA n-3) i arahidonska (AA n-6) kiselina su prekursori lipidnih medijatora tzv. eikozanoida gde spadaju prostaglandini (PG), tromboksani (TX) i leukotrijeni (LT). Eikozanoidi se sintetišu iz MK sa 20 C atoma EPA i AA u prisustvu enzima ciklooksigenaze 1 i 2 pri čemu nastaju PG i TX, dok u prisustvu lipooksigenaze LT. Eikozanoidi su regulatorni molekuli koji imaju autokrino ili parakrino dejstvo. Oni menjaju aktivnost ćelija u kojima su sintetisani ili susednih ćelija. Prostaglandini stimulišu inflamaciju, regulišu protok krvi u određenim organima, kontrolišu transport jona kroz membranu. Tromboksani su vazokonstriktori i veoma jaki hipertenzivni agensi koji olakšavaju agregaciju trombocita. Međutim, različite serije eikozanoida sintetišu se iz EPA i AA imaju sasvim različito dejstvo u organizmu. Tako PGE-2 i LTB-4 koji se sintetišu iz AA kao odgovor na povrede i stres i imaju snažno proinflamatorno dejstvo, dok PGE-3 i LTB-5 sintetisani iz EPA moduliraju efekat PGB-2 i LTB-4, obično na istim ciljnim ćelijama. Derivati EPA se formiraju sporije u odnosu na derivate AA ali slabe njihov efekat, štiteći tako organizam od srčanog i moždanog udara, ali i od inflamatornih bolesti kakve su lupus, artritis i astma (Calder, 2003). Osim toga, EPA preko svojih mono- i trihidroksi

derivata suzbija proizvodnju proinflammatoryh citokina kao što su IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ . Shodno tome, jedna od veoma važnih funkcija n-3 PUFA je antiinflammatoryno dejstvo (Simopoulos, 2002; Calder i Yaqoob, 2009).

Poremećaj nivoa PUFA i odnosa n-6/n-3 PUFA u organizmu učestvuje u nastanku niza inflamatornih (astma) i autoimunih oboljenja (reumatoidni artritis, Sjegnerov sindrom, psorijaza, Kronova bolest), neuroloških i psihijatrijskih oboljenja (multipla skleroza, Alchajmerova bolest, šizofrenija), metaboličkih i endokrinih (dijabetes melitus, gojaznost), hroničnih neinflamatornih oboljenja (ciroza jetre, bubrežna insuficijencija) kao i malignih oboljenja (Fernandes i Venkatraman, 1993; Finstad i sar., 1994; Herrocks i Yeo, 1999; Josyla i Schut 1999; Liu i sar., 2001; Mukutmoni-Norris i sar., 2000; Nair i sar., 1997; Siddiqui i sar., 2001; Simopoulos, 1991; Weneger i sar., 1999; Yaqoob i sar., 1994).

### **1.3. Fizička aktivnost**

Fizička aktivnost predstavlja planirano, kontrolisano vežbanje koje se ponavlja sa ciljem da se održi ili poboljša jedna ili više komponenti fizičke spremnosti. Redovna i umerena fizička aktivnost ima snažan pozitivan uticaj na ljudsko zdravlje. Postoji mnogo različitih mehanizama kojima vežbanje blagotvorno deluje na funkcionisanje organizma uključujući efekte na metabolizam lipida, arterijski pritisak, funkcije endotela, vazodilataciju, koagulaciju, fibrinolizu, osetljivost na insulin i telesni sastav (Lee i sar., 2003; Endres i sar., 2003).

Prema bioenergetskim karakteristikama sportovi se mogu klasifikovati na one koje koriste dominantno aerobni, anaerobni ili mešoviti tj. aerobno-anaerobni metabolizam. Energija koje je neophodna organizmu za dugotrajnu fizičku aktivnost niskog ili srednjeg intenziteta nastaje oksidacijom ugljenih hidrata (UH) i masti a u retkim sličajevima i proteina. Rezerve UH u organizmu u obliku glikogena nalaze se u jetri i skeletnim mišićima. Razgradnjom glikogena u prisustvu enzima glikogen fosforilaze nastaje glukozo 1-fosfat koji pomoću fosfoglukomutaze daje glukozo 6-fosfat. Glukozo 6-fosfat u glikolitičkom putu prelazi u piruvat uz istovremeno stvaranje ATP. U aerobnim uslovima naredni korak za dobijanje energije iz glukoze je oksidativna dekarboksilacija piruvata, kojom nastaje acetyl-CoA.

Acetil-CoA se u ciklusu limunske kiseline potpuno oksiduje do CO<sub>2</sub>. U slučaju kada u ćeliji nema dovoljno kiseonika, kakav je slučaj sa mišićima koji se intenzivno kontrahuju, piruvat prelazi u laktat. Redukciju piruvata u laktat katalizuje laktat dehidrogenaza u prisustvu NADH. U toj reakciji se regeneriše NAD<sup>+</sup> koji omogućava da se održi kontinuitet procesa glikolize, i oslobađa se mala količina energije. Laktat koji nastaje u aktivnim mišićima prenosi se krvotokom u jetru gde se uključuje u proces glukoneogeneze. Znatno više energije se oslobodi u aerobnim uslovima ciklusom limunske kiseline i oksidativnom dekarboksilacijom piruvata. Ukoliko se koncentracija laktata poveća u mišićima može doći do pada pH vrednosti. U uslovima kada pH vrednost padne ispod 6.9 može doći do inhibicije mišićne kontrakcije i zamora kod sportiste.

Masti skladište znatno veću količinu energije od ugljenih hidrata (9 Kcal : 4 Kcal po gramu težine), ali za oslobađanje iste količinu energije, neophodno im je oko 15% više kiseonika. Za razliku od ugljenih hidrata, rezerve telesnih masti u organizmu su velike- oko 16% telesne težene kod muškaraca i 24% kod žena. Relativni udeo masti kao izvor energije najveći je u mirovanju, i opada s povećanjem intenziteta telesne aktivnosti. Apsolutni udeo masti kao izvora energije (izražen u gramima/minuti), međutim, raste s povećanjem opterećenja, i postiže maksimalnu vrednost pri intenzitetu od približno 60-70% VO<sub>2</sub>max. VO<sub>2</sub>max se definiše kao maksimalna količina kiseonika koju organizam može da potroši pri intenzivnoj fizičkoj aktivnosti u vremenu od jednog minuta. VO<sub>2</sub>max zavisi od sposobnosti sistema organa za disanje, nervnog sistema i srca da dopreme kiseonik iz atmosfere do mišićnih ćelija i sposobnosti radne muskulature da iskoristi O<sub>2</sub> u procesu oksidativne razgradnje hranljivih materija. Kada je intenzitet vežbanja preko 85% VO<sub>2</sub>max (približni intenzitet pri anaerobnom pragu), udeo masti kao izvora energije za mišićni rad je zanemariv. U tim slučajevima kao izvor energije mišićne ćelije koriste zalihe glikogena.

Razlaganje proteina kao izvora energije dešava se samo u izuzetnim stanjima gladovanja, nedostatka UH ili kod produženih fizičkih aktivnosti koje mogu trajati i nekoliko dana.

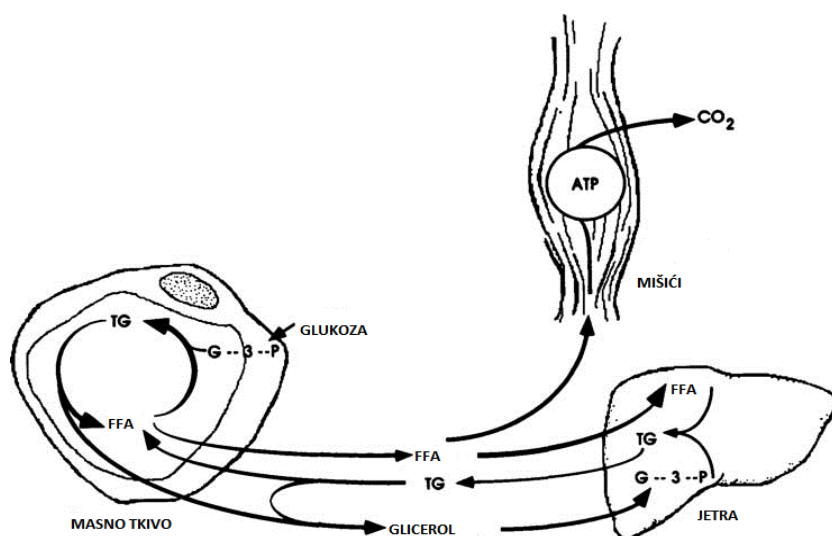
Vaterpolo je timski, mešoviti sport i predstavlja kombinaciju plivanja, bacanja lopte i borilačkih veština (Smith, 1998). Zajedno sa fudbalom, veslanjem i kriketom, u konkurenciji muškaraca, predstavlja jedan od sportova sa najdužom tradicijom olimpijskog timskog takmičenja (Radovanović i sar., 2007). Međutim, vaterpolo je u konkurenciji žena postao olimpijski sport tek na Olimpijadi 2000. godine u Sidneju. Mada Srbija ima dugu i uspešnu

tradiciju u muškom vaterpolu, vaterpolo u konkurenciji žena je u usponu u našoj zemlji tek u poslednjih nekoliko godina.

Fudbal je sport u kome se visok intenzitet igre smenjuje sa periodima redovnog oporavka (Bangsbo i sar., 2006; Bradley i sar., 2009; Krstrup i sar., 2010; Mohr i sar., 2005). To je uglavnom aerobni sport, ali tokom intenzivnog perioda igre, koju odlikuju kratki sprintevi, dolazi do perioda anaerobnog metabolizma (Krustup i sar., 2010; Mohr i sar., 2003). Kada je u pitanju takmičenje u ženskoj konkurenciji i razvoj ženskog fudala u Srbiji, on je veoma sličan razvoju vaterpola.

### **1.3.1. Metabolizam masti tokom fizičke aktivnosti**

Kao što je već pomenuto energija koja pretvara hemijsku energiju u mišićni rad smeštena je u ATP. Najveće energetske rezerve u organizmu su endogeni triacilgliceroli (TG). TG su predominantno smešteni u adipoznom tkivu oko 17500 mmol kod odraslog normalno uhranjenog čoveka, a znatno manja u mišićima oko 300 mmol i u plazmi oko 5 mmol. Ukupni sadržaj energije koji je smešten u TG kod odraslog čoveka je 60 puta veći od onog koji se nalazi u glikogenu. Dakle oksidacija masnih kiselina tokom vežbanja predstavlja glavni izvor energije. Korišćenje MK kao izvora energije zahteva hidrolizu triacilglicerola koji se nalaze u adipoznom tkivu, mišićima i plazmi i isporuku oslobođenih MK do mitohondrija skeletnih mišića gde će se oksidovati. Posle 12 časovnog gladovanja, najveći deo energije koja se obezbeđuje organizmu u stanju mirovanja je  $\beta$ -oksidacijom masnih kiselina iz triacilglicerola koji su smešteni u adipoznom tkivu (Horowitz i Klein, 2000). Lipolitička aktivnost adipoznog tkiva je regulisana ravnotežom hormona koji stimulišu (kateholamini) ili inhibiraju (insulin) hormon-senzitivnu lipazu, koja pak hidrolizuje TG do glicerola i masnih kiselina. Tokom mirovanja, količina masnih kiselina koja se oslobodi iz masnog tkiva obično prevazilazi količinu oksidovanih MK, tj. stopa oksidovanih MK je dva puta manja od one koja je oslobođena u plazmi (Klein i sar., 1989). Zbog toga se veliki deo MK koje su se oslobodile u procesu lipolize iz TG masnog tkiva, reestirifikuju u TG i to uglavnom u jetri (slika 4).



**Slika 4. Metabolizam masti**

Vežbanje umerenog intenziteta u kome je maksimalna potrošnja kiseonika od 25-65%, povezano je sa 5-10 puta povećanom oksidacijom masnih kiselina u odnosu na količinu MK koja se oksiduje u stanju mirovanja. Do toga dolazi usled povećanih energetske potreba mišića i poboljšane dostupnosti MK. Veliki deo ovih MK potiče od TG iz adipoznog tkiva u kome se lipoliza povećava 2-3 puta (Wolfe i sar., 1990; Klein i sar., 1994) pod dejstvom povećane  $\beta$  adrenergične stimulacije (Arner i sar., 1990). Osim toga procenat oslobođenih MK koje su se reesterifikovale se smanjuje za polovinu (Wolfe i sar., 1990), verovatno zbog povećanog protoka krvi što omogućava isporuku MK iz adipoznog tkiva u mišiće. Umereno vežbanje dvostruko povećava prokrvljenost u adipoznog tkiva a više od 10 puta u mišićima (Horowitz i Klein, 2000). Povećano uklanjanje MK iz adipoznog tkiva posebno je značajno za prevenciju potencijalno toksičnog efekta regionalnog nagomilavanja MK. Masne kiseline se kroz cirkulaciju transportuju vezane za albumin. Hodgetts i saradnici (1991) su pokazali da se odnos albumina i MK u venskoj krvi koja dolazi iz potkožnog masnog tkiva povećala sa 2:1 iz stanja mirovanja na 6:1 kolika je bila na kraju vežbanja. Nekoliko istraživača je pokazalo da se tokom 120 minuta vežbanja lipolitička razgradnja TG dešava ne samo u adipoznom tkivu, nego i u mišićima i plazmi (Romijn i sar., 1993; Martin i sar., 1993; Phillips i sar., 1996). Međutim, minimalne promene u koncentraciji TG u mišićima nakon dužeg vežbanja ukazuju da mišići nisu glavni izvor

MK tokom vežbanja (Kiens i Richter, 1998; Starling i sar., 1997; Bergman i sar., 1999; Wendling i sar., 1996). Takođe, literaturni podaci govore da se u toku odmora 5-10% ukupne oksidacije masnih kiselina potiče iz TG plazme (Turcotte i sar., 1992). Dakle, TG iz adipoznog tkiva su dominantni izvor MK u toku fizičke aktivnosti.

I tokom intenzivnog vežbanja dolazi do lipolize u adipoznom tkivu. Slično kao kod umerenog vežbanja, potreba za MK postaje veća od stope oksidacije MK i MK koje se oslobađaju u plazmu iz TG adipoznog tkiva se transportuju do mišića. Tako se tokom povećanja dužine vežbanja, relativni doprinos intramuskularnih TG za hidrolizu i oksidaciju MK smanjuje, jer se povećava koncentracija MK u plazmi iz TG adipoznog tkiva. Treninzi izdržljivosti dovode do povećanja maksimalne oksidacije masti tokom vežbanja (Horowitz i Klein, 2000). Postoji nekoliko faktora koji doprinose adaptivnom odgovoru organizma na intenzivan trening. To su: povećanje gustine mitohondrija u skeletnim mišićima, što povećava kapacitet za oksidaciju masti; širenje kapilara u skeletnim mišićima, što povećava isporuku MK mišićima; povećanje količine karnitin-transferaze koja omogućava prenos dugolančanih MK kroz mitohondrijalnu membranu i povećanje količine MK vezujućeg proteina koji reguliše prenos MK u miocite (Turcotte i sar., 1991; Turcotte i sar., 1999). Međutim, kod vežbanja visokog intenziteta, smanjuje se mogućnost oksidovanja MK u mišićima (Sidossis i sar., 1997). Smanjenje oksidacije MK u mišićima tokom intenzivnog vežbanja povezano je sa povećanjem metabolizma glikogena u mišićima. Visoka stopa glikogenolize tokom vežbanja visokog intenziteta povećava koncentraciju malonil-CoA u mišićima (Elayan i Winder, 1991; Saddik i sar., 1993). Malonil-CoA inhibira O-karnitin palmitoil transferazu-I tj. CPT-I koji omogućava unos dugolančanih MK u mitohondrije (Horowitz i Klein, 2000). Na taj način visoka stopa glikogenolize tokom vežbanja visokog intenziteta smanjuje prenos MK u mitohondrije inhibicijom CPT (Sidossis i sar., 1997).

Osim triglicerida, i FL mogu hidrolizovati na alkohol i masne kiseline i obezbediti energiju u skeletnim mišićima tokom intenzivnog rada. Međutim, ova funkcija fosfolipida nije važna, jer je utvrđeno da prolongirano vežbanje ne utiče na sadržaj FL u mišićima i jetri (Nikolaidis i Mougios, 2004), a neznatno smanjuje količinu FL u srcu (Horowitz i Klein, 2000).

### **1.3.2. Uticaj fizičke aktivnosti na lipidni profil**

Poznato je da fizička aktivnost utiče na metabolizam lipoproteina i usporava stepen ateroskleroze u koronarnim arterijama kod ljudi (Petrović-Oggiano, 2010). Studije pokazuju da umerena fizička aktivnost redukuje rizik za kardiovaskularne bolesti za 20%, a kod osoba koje su fizički znatno aktivnije i do 27% (Lee i sar., 2003; Williams i sar., 2002) i dovodi do povećanja koncentracije HDL-holesterola i snižavanja vrednosti triglicerida, ukupnog i LDL- holesterola u cirkulaciji (Wannamethee i Schaper, 2001; Secco i sar., 2000). Sa druge strane, ne postoje detaljni podaci o promenama u metabolizmu lipida uzrokovanim intenzivnim, napornim dugogodišnjim treningom, kakav je slučaj kod vrhunskih sportista. Mora se uzeti u obzir da se sportovi veoma razlikuju po bioenergetskim karakteristikama i da se prema tome variraju i osobine treninga i takmičenja, što sve utiče na metaboličke promene.

### **1.3.3. Uticaj fizičke aktivnosti na masnokiselinski profil tkiva**

Podaci iz literature govore da i akutno i hronično vežbanje utiču na promene u masnokiselinskom profilu u gotovo svim lipidnim klasama u plazmi (Nikolaidis i Mougios, 2004). Tako je pokazano da akutno vežbanje utiče na kratkotrajne promene FFA u plazmi tako što dovodi do povećanja nivoa neesterifikovanih MK u plazmi i u animalnim i u humanim studijama (Bernard i sar., 1999; Børsheim i sar., 1999; Conquer i sar., 2002; McClelland i sar., 1995; McClelland i sar., 1999; Mougios i sar., 1995; Mougios i sar., 1998; Mougios i sar., 2003; Vincent i Brackenbu, 1987). Slobodne MK su važan energetske izvor za skeletne mišiće (Nikolaidis i Mougios, 2004). One su najlabilnija klasa lipida u plazmi prilikom vežbanja koja nastaje pri hidrolizi TG u adipoznom tkivu, pa su zbog toga i najproučavanija klasa lipida u smislu efekta vežbanja na lipide (Mougios i sar., 1995; Borsheim i sar., 1999). Međutim, mnogi autori tvrde da su ove promene kratkog daha, i da nakon nekoliko sati od momenta kada se vežbanje završilo, te promene nestaju. Kada su u pitanju esterifikovane MK, analiza MK profila u TG, estrima holesterola i FL pokazuje različite rezultate u različitim studijama. Dok neki autori nalaze promene u MK pojedinih lipidnih klasa, drugi navode da akutno vežbanje ne dovodi do promena u MK profilima lipidnih klasa u plazmi (Nikolaidis i Mougios, 2004). Tako Mougios i saradnici (1995) u



studiji u kojoj ispituju MK profil TG seruma rukometaša navode da nakon 60 minutne utakmice dolazi do povećanja udela MUFA tj, palmitoleinske i oleinske kiseline a smanjenja udela palmitinske kiseline sugerirajući da akutno vežbanje uglavnom deluje na MUFA TG i menja odnos MUFA/SFA u TG seruma (Mougiou i sar., 1995). Međutim, kada je isti autor analizirao MK profil u TG seruma, pokazao je da nakon akutnog vežbanja dolazi do povećanja procentualne zastupljenosti samo linolne kiseline kod muškaraca srednjih godina, dok kod žena iste starosne dobi nije bilo značajnih promene u MK profilu TG seruma (Mougiou i sar., 1998).

Za razliku od akutnog vežbanja, broj studija koji se bavio uticajem hroničnog vežbanja na MK profil lipidnih klasa plazme i tkiva, znatno je manji. Osim toga i promene u MK profilu slobodnih MK ali i MK koje ulaze u sastav TG i FL u plazmi su znatno manje u hroničnom, u odnosu na akutno vežbanje (Nikolaidis i Mougiou, 2004). Tako su Allard i saradnici (1973) pokazali da hronično vežbanje utiče na MK profil FL i TG plazme i nalaze povećanje PUFA i n-6 PUFA u obe lipidne klase, kod pacijenata sa koronarnim oboljenjima srca. MUFA se povećava u TG a smanjuje u FL kao odgovor na hronično vežbanje kod ljudi sa koronarnim oboljenjem srca. Osim toga dve studije iz iste laboratorije pokazuju da nema promena u MK profilu u FL i estrima holesterola plazme kod ljudi koju su 12 nedelja bili izloženi aktivnosti vožnje bicikla i trčanja (Andersson i sar., 1998; Andersson i sar., 2000). Ono što se može zaključiti iz ovih studija je da rezultati na humanim i animalnim studijama nisu konzistentni. Takođe, moguće je da razlike potiču i od vrste sporta, intenziteta i dužine vežbanja ne samo pojedinačnih treninga već i koliko se dugo ispitanici bave određenom fizičkom aktivnošću.

Za razliku od plazme efekat dugotrajnog vežbanja na masnokiselinski profil skeletnih mišića znatno je više proučavan. Na metabolizam mišića dnevno se troši 20% energije u toku mirovanja (Pan i sar., 1995), čineći ga jednim od najvažnijih tkiva za homeostazu glukoze i masnih kiselina. Kada se ispituje efekat vežbanja na MK profil skeletne muskulature, treba naglasiti da različiti tipovi mišića različito odgovaraju i adaptiraju se na stimulus koji se oslobađa tokom vežbanja. Osim toga rezultati različitih studija govore da MK profil skeletnih mišića kod akutnog vežbanja umnogome zavisi od tipa mišićnog vlakna i ishrane. Ipak, studije na ljudima i eksperimentalnim životinjama su pokazale da redovno vežbanje menja MK status u mišićima nezavisno od ishrane (Helge i sar., 1999). Analiza

uticaja hroničnog vežbanja na MK profil FL skeletnih mišića pokazuje granične promene u zastupljenosti MUFA i PUFA. Odnos n-6/n-3 se smanjuje u studijama (Andersson i sar., 2000; Helge i sar., 1999; Thomas i sar., 1977), ili se ne menja (Andersson i sar., 1998), dakle rezultati nisu konzistentni na skeletnim mišićima.

Glavna metabolička uloga masnog tkiva je skladištenje i oslobađanje masti. Danas se zna da je masno tkivo dinamično tkivo i da se morfološki i metabolički adaptira na vežbe izdržljivosti kod ljudi. Malo studija je ispitivalo efekat vežbanja na MK profil u adipoznom tkivu. Međutim ono što je pokazano je da hronično vežbanje vodi povećanju zastupljenosti PUFA i n-6 PUFA i aktivnosti  $\Delta 6$  i  $\Delta 5$  desaturaze, a smanjenju MUFA i aktivnosti  $\Delta 9$  desaturaze u adipoznom tkivu.

Opšti metabolizam masnih kiselina u različitim organima i tkivima, uključujući i skeletne mišiće, odražava se u MK sastavu eritrocita. Eritrociti se zbog toga često koriste za proučavanje promena u sastavu ćelijske membrane izazvanih različitim faktorima (kao što je oksidativni stres) jer ih je lakše dobiti u poređenju sa ćelijama iz tkiva. Eritrociti reflektuju i promene MK u mišićima, veoma su pogodni za ispitivanje efekta hroničnog vežbanja na metabolizam MK. Međutim, mali broj studija ispituje uticaj akutnog vežbanja na FA profil u eritrocitima. Ceder i saradnici (1988) nalaze povećanje procentualnog udela PUFA, n-6 i n-3 PUFA u ukupnim lipidima eritrocita neposredno nakon maratonske trke, ali već nakon 21h od završetka trke, ove vrednosti se vraćaju na minimum. Sumikawa i saradnici (1993) su ispitivali efekat jedrenja na MK sastav u 2 klase FL. Oni su našli smanjenje zastupljenosti PUFA, n-6 i n-3 PUFA nakon vežbanja. Druge studije su pokazale da se MK profil u lipidima eritrocita uglavnom ne menja kod hroničnog vežbanja (Kamada i sar., 1993; Nakano i sar., 2001). U ovim studijama uglavnom dolazi do malog sniženja udela MUFA i proporcionalno malog povećanja PUFA kod muškaraca sportista u odnosu na kontrolnu grupu. Raniji rezultati iz naše laboratorije su pokazali razliku uglavnom u zasićenim MK i linolnoj kiselini između sportista i kontrolne grupe. Tako je u studiji u kojoj je proučavan efekat fudbala i košarke na MK profil eritrocita, pokazana značajno veća zastupljenost stearinske kiseline i SFA u eritrocitima košarkaša u odnosu na kontrolnu grupu. Osim toga, košarkaši su imali i značano niži udeo linolne kiseline kako u odnosu na kontrolnu grupu tako i u odnosu na fudbalere (Tepšić i sar, 2009). U studiji u kojoj je praćen efekat boksa na MK profil eritrocita, takođe je pokazan značajno viši nivo palmitinske i stearinske kiseline i

ukupnih SFA, a niži nivo linolne kiseline kod sportista u poređenju sa muškarcima koji ne treniraju (Tepšić i sar., 2011).

Iz svega navedenog može se zaključiti da su promene u masnokiselinskom profilu kod redovnog izlaganja fizičkoj aktivnosti nedovoljno ispitane. Posebno je nejasan uticaj višegodišnjeg intenzivnog vežbanja kao što je slučaj sa vrhunskim sportistima. Broj studija koje su ispitivale promene u sastavu MK kod aktivnih sportista je veoma mali, najčešće na vrlo malom broju ispitanika, a dobijeni rezultati pokazuju značajne varijacije među studijama. To ukazuje da bi i sama vrsta sporta kojom se ispitanik bavi mogla značajno da utiče na metabolizam MK. Takođe, prema našim saznanjima literaturni podaci koji pokazuju efekat dugotrajne intenzivne fizičke aktivnosti na ženama uopšte ne postoji. Uzimajući u obzir dokazani uticaj hormona na sistem desaturaza i elongaza, kao i činjenicu da tip i intenzitet treninga nisu jednaki kod muškaraca i žena čak i kad se bave istim sportom, može se očekivati da promene u metabolizmu MK nađene kod elitnih sportista nisu iste kao kod žena. Zbog toga je jedan od ciljeva ove doktorske disertacije bio da se ispita status MK u FL plazme i eritrocita kod žena koje se aktivno bave vrhunskim sportom.

#### **1.4. Oksidativni stres**

Oksidativni stres je definisan kao stanje izmenjene ravnoteže između slobodnih radikala sa jedne i sistema antioksidativne zaštite sa druge strane (Sies, 1991). Reaktivne vrste kiseonika (*engl.* Reactive oxygen species-ROS) i reaktivne vrste azota (*engl.* Reactive nitrogen species-RNS) nastaju tokom normalnih fizioloških procesa u ćeliji i učestvuju u odbrani organizma od infektivnih agenasa, a kao signalni molekuli i regulatori ćelijskih funkcija u procesima preživljavanja, proliferacije i ćelijske smrti, kao i u regulaciji metabolizma i intercelularnoj komunikaciji (Valko i sar., 2007). U ROS se ubrajaju slobodni radikali kiseonika: superoksid anion radikal, hidroksil radikal, hidroperoksid radikal, peroksid radikal i alkoksil radikal, kao i neradikalske vrste: vodonik peroksid, hipohlorasta kiselina, ozon, singletni kiseonik. U RNS se ubrajaju slobodno radikalske vrste kao što su azot oksid radikal i azot dioksidni radikal, kao i neradikalske vrste: azotasta kiselina, nitrozo katjon, nitroksidni anjon, peroksinitrit, azot-(IV) oksid, azot-(III) oksid itd. (Leeuwenburgh i Heinecke 2001). Kada u biološkim sistemima dođe do prevelike produkcije ROS i RNS, ovi molekuli reaguju sa ćelijskim komponentama izazivajući oštećenja DNK, oksidativnu

modifikaciju proteina i menjaju strukturu lipida i polinezasićenih masnih kiselina. Posledice ovih reakcija vode ka nastanku degenerativnih procesa, sindroma i bolesti kakvi su proces starenja, osteoporoza, ishemijska bolest srca, akutne i hronične inflamatorne bolesti, oboljenja centralnog nervnog sistema i kancera (Ames i sar., 1993; Dargel, 1992, Pešić i sar., 2009). Ravnoteža između korisnih i štetnih dejstava slobodnih radikala je veoma značajan aspekt živih organizama i postiže se mehanizmom koji se zove "redoks regulacija".

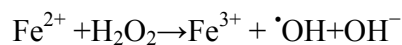
Fagocitujuće ćelije takođe proizvode jake oksidanse, generišući reaktivne vrste koje ubijaju patogene. Aktivirani neutrofilni koriste membranski enzimski kompleks-NADPH oksidazu koji proizvodi  $O_2^-$ . Superoksid anion radikal može direktno da reaguje sa biomolekulima ili da se prevede u  $H_2O_2$ . Vodonik peroksid se zauzvrat prevodi u hipohlornu kiselinu (HOCl) posredstvom mijeloperoksidaza, enzima koga sekretuju neutrofilni i monociti (Leeuwenburgh i Heinecke, 2001). HOCl je inflamatorni medijator i jak oksidans koji može da u prisustvu nitrita generiše druge metabolite kao što je nitril-hlorid ( $NO_2Cl$ ). Međutim, aktivirani neutrofilni mogu da koriste mijeloperoksidaze i  $H_2O_2$  i da konvertuju nitrite u azot dioksid radikal ( $NO_2^{\cdot}$ ), i na taj način formiraju potencijalno štetna jedinjenja (Eiserich i sar., 1998).

ROS u ćelijama nastaju i tokom drugih metaboličkih procesa kao što su oksidacija D-amino kiselina, aktivacija citohroma  $P_{450}$ , degradacija ksantina do mokraćne kiseline, autooksidacija kateholamina i intenzivna  $\beta$ -oksidacija MK (Ji, 1999).

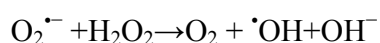
**Superoksid anjon radikal ( $O_2^-$ )** nastaje uglavnom u mitohondrijama redukcijom molekula kiseonika jednim elektronom uključujući NADH-dehidrogenazu i ubihinon-Q-citohrom b kompleks. U procesu prenošenja elektrona u elektrontransportnom lancu mitohondrija, dešava se da se mali broj elektrona prebaci na kiseonik prerano i dođe do formiranja  $O_2^-$ . Ovako nastao  $O_2^-$  spontano dismutuje do  $H_2O_2$  i  $O_2$ , ili je reakcija efikasno katalizovana mitohondrijalnom MnSOD. Pretpostavlja se da između 1-3% elektrona u elektrontransportnom lancu dolazi do  $O_2$  i tako formiraju  $O_2^-$  umesto da redukuju  $O_2$  do  $H_2O$ . Superoksid anjon radikal nastaje i pri autooksidaciji flavina, pterina, kateholamina, kao i delovanjem spoljašnjih agenasa kao što je zračenje i delovanjem citostatika. Može nastati i oksidacijom hemoglobina i mioglobina u methemoglobin i metmioglobin (Valko i sar., 2006). U fiziološkim uslovima  $O_2^-$  ne izaziva toksične efekte jer ga enzim superoksid-dismutaza transformiše u manje aktivan vodonik peroksid.

Glavno mesto stvaranja **vodonik peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** redukcijom kiseonika sa dva elektrona u prisustvu brojnih oksidaza, u ćelijama su peroksizomi. Toksičnost vodonik peroksida u peroksizomima sprečena je dejstvom katalaze koja ga razlaže do vode i kiseonika. Osim u peroksizomima, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> može da nastane i u mitohondrijama, mikrozomima i endoplazmatičnom retikulumu delovanjem: urat-oksidaze, monoaminooksidaze, oksidaze D-aminokiselina, oksidaze L-hidroksikiselina, kao i u reakcijama autooksidacije askorbata, glutaciona, tiola i kateholamina. Iako se ne može definisati kao slobodni radikal jer nema nesparenih elektrona i mada predstavlja najstabilniji intermedijerni produkt redukcije kiseonika, vodonik peroksid iskazuje brojne toksične efekte. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dovodi do oksidacije sulfhidrilnih grupa proteina i do inicijacije procesa lipidne peroksidacije, a u reakciji sa jonima metala dovodi do stvaranja izuzetno reaktivnog hidroksil radikala (Valko i sar., 2007). U slučajevima kada dođe do oštećenja peroksizoma, veliki deo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se oslobađa u citoplazmu, indukujući stanje oksidativnog stresa u ćeliji.

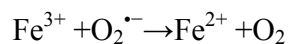
**Hidroksil radikal (•OH)** je neutralni oblik hidroksil anjona. On je najreaktivniji intermedijerni produkt parcijalne redukcije kiseonika i ima veoma kratak poluživot, svega 10<sup>-9</sup>s (Pastor i sar., 2000). Redok stanje u ćeliji zavisi od redoks para Fe<sup>2+</sup> i Cu<sup>+</sup> i održava se u okviru veoma strogih fizioloških granica. U uslovima stresa pod dejstvom O<sub>2</sub><sup>-</sup> dolazi do oslobađanja Fe<sup>2+</sup> iz molekula u kojima se nalazi. Oslobođeno Fe<sup>2+</sup> može reagovati sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u tzv. Fentonovoj reakciji



pri čemu stvara •OH. Osim toga O<sub>2</sub><sup>-</sup> može reagovati sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u tzv. Haber–Weiss-ovoj reakciji



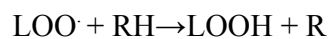
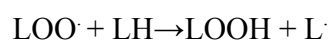
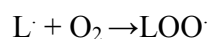
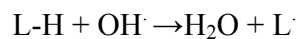
i takođe generisati hidroksil-radikal, a u kombinaciji sa Fentonovom reakcijom vršiti redukciju Fe<sup>3+</sup> dajući O<sub>2</sub>.



Hidroksil radikal oštećuje mitohondrijsku membranu, DNK, membranu ćelije i izaziva lipidnu peroksidaciju. Ove promene mogu dovesti do ireverzibilnog oštećenja ćelije.

**Peroksil radikali (ROO•)** su derivati O<sub>2</sub> koji takođe nastaju u živim sistemima. Najjednostavniji peroksil radikal je protonovana forma O<sub>2</sub><sup>-</sup> koji se naziva hidroperoksil radikal ili perhidroksil radikal (HOO•). Hidroperoksil radikal vrši peroksidaciju

polinezasićenih masnih kiselina u živim sistemima u procesu koji se zove lipidna peroksidacija (LP). LP predstavlja niz lančanih slobodno radikalskih reakcija koje dovode do oksidativne modifikacije PUFA, što za posledicu može imati razaranje ćelijskih membrana i ćelijsku smrt (Close i sar., 2005). Prvi korak u inicijaciji LP predstavlja oduzimanje atoma vodonika iz PUFA koje ulaze u sastav bioloških membrana i tako nastaje lipidni radikal (L $\cdot$ ). Što je veći broj dvogubih veza u lancu viših masnih kiselina, to je lakše odvajanje vodonikovog atoma. Zbog toga su PUFA tako podložne lipidnoj peroksidaciji, a među njima su LA, EPA i DHA najčešći supstrati za LP. U daljim procesima LP, teku lančane slobodno-radikalske reakcije (propagacija) u kojima dolazi do stvaranja peroksil-radikala i organskih hidroperoksida (Dargel, 1992). Tok propagacije zavisi od odnosa lipida i proteina u membrani. Sastav MK i koncentracija kiseonika, takođe utiču na fazu propagacije. Za vreme propagacije lipidni hidroperoksidi (LOOH) u prisustvu gvožđa disosuju do lipooksidnog (LO $\cdot$ ) i peroksil radikala (LOO $\cdot$ ) koji reiniciraju peroksidaciju.



Finalni proizvodi lipidne peroksidacije su: malondialdehid (MDA) i 4-hidroksi nonenal (*engl.* 4-Hydroxynonenal-HNE). MDA može da reaguje sa slobodnim amino-grupama proteina i sa nukleinskim kiselinama i da dovede do još većih oštećenja ćelije (Aikens i Dix, 1991). Proizvod peroksidacije n-6 PUFA (LA i AA), 4-hidroksi nonenal, je toksičan i inhibira rast ćelija, modifikuje lipoproteine, podstiče aterosklerozu. Metabolize se preko GSH-konjugata do merkapturane kiseline (Valko i sar., 2007). Prooksidansi prekidaju lančane reakcije i stvaraju stabilne proizvode tj. uvode reakcije u terminalne faze. Terminaciju otpočinje vitamin E koji daje elektrone za prekidanje reakcije.

**Azot oksid (NO)** je značajan regulator i medijator brojnih procesa u nervnom, imunom i kardiovaskularnom sistemu (Valko i sar., 2007). Kao intracelularni signalni molekul, NO učestvuje u vazodilataciji krvnih sudova, vaskularnom permeabilitetu i inhibiciji adhezije i agregacije trombocita. NO je neurotransmitter, a u imunom sistemu modulira citotoksičnost makrofaga. Azot oksid nastaje u gotovo svim ćelijama, oksidacijom L-arginina u prisustvu azot oksid sintaze (*engl.* Nitric oxide synthase- NOS) (Ghafourifar i Cadenas, 2005). Postoje

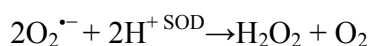
tri NOS izoforme: tip I ili neuronalna NOS (nNOS), tip II ili inducibilna NOS (iNOS), i tip III ili endotelijalna NOS (eNOS). NO je ključni regulator funkcije i broja mitohondrija koji uključuje sintezu novih, funkcionalno aktivnih mitohondrija (Clementi i Nisoli, 2005) a može imati i anti-apoptotsku aktivnost (Gladwin i sar., 2004). Negativne efekte na ljudsko zdravlje NO ispoljava gradeći ONOO<sup>-</sup> koji u reakciji sa drugim molekulima produkuje OH<sup>-</sup> (Cadenas, 2004). U ekstracelularnoj sredini reaguje sa O<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>O i formira nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) i nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) anjone.

#### **1.4.1. Sistem antioksidativne odbrane organizma**

Reaktivne vrste koje nastaju kao deo metaboličkih procesa u organizmu neutrališu se sistemom antioksidativne odbrane. U normalnim fiziološkim uslovima, proizvodnja ROS i RNS je u ravnoteži s antioksidativnim sistemom. To omogućava telu da održi uravnoteženi redoks status (Djordjević, 2004). Antioksidativni sistem ima ulogu da inaktivira ROS i RNS ili da prekida reakcije u kojima oni nastaju. Čine ga enzimska i neenzimska endogena jedinjenja, kao i antioksidativna jedinjenja koja u organizam dospevaju putem hrane. Enzimi superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i glutation peroksidaza (GSH-Px) su glavni delovi endogenog antioksidativnog sistema (Ji i sar., 2000). Neenzimski endogeni antioksidanti, kao što su mokraćna kiselina i tioli (uključujući i ukupni glutation, L-cistein, homocistein i cistein-glicin) su priznati kao ključni fiziološki antioksidanti koji direktno reaguju sa ROS i RNS i poboljšavaju funkcionalnu sposobnost drugih antioksidanta (Hellsten i sur 1997; Sen i Packer, 2000). Osim toga, postoji nekoliko moćnih antioksidanata koji su prisutni u hrani. Tokoferoli (vitamin E), na primer, su efikasni čistači slobodnih radikala koji mogu konvertovati superoksid anjon radikal, hidroksil radikal i lipid peroksil radikal u manje reaktivne molekule (Powers i sar., 2004). Askorbinska kiselina (vitamin C) je takođe efikasan antioksidant jer direktno reaguje sa slobodnim radikalima i formira stabilan proizvod (Gomez-Cabrera i sar., 2008). I neka jedinjenja karotenoida su veoma efikasni dijetarni antioksidanti čija antioksidativna funkcija zavisi od njihove strukture (Young i Lowe, 2001). Na primer, likopen je jedan od najmoćnijih antioksidanata iz grupe karotenoida koji direktno može deaktivirati singletni kiseonik (Di Mascio i sar., 1989), dok je β-karoten vrlo reaktivan za peroksil-radikale (Burton i Ingold, 1984).

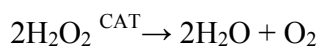
### 1.4.2. Antioksidativni enzimi

Aktivnost enzima SOD, CAT, GSH-Px i glutation reduktaze se najčešće ispituje kao odgovor organizma na oksidativni stres (Urso i Clarkson, 2003). Jedan od najefikasnijih intracelularnih enzima antioksidativne odbrane od superoksid anjon radikala je **superoksid dismutaza** (Powers i Lennon, 1999) (slika 5). SOD je antioksidativni enzim koji katalizuje dismutaciju  $O_2^{\cdot-}$  do molekuskog kiseonika i manje reaktivne vrste vodonik-peroksida  $H_2O_2$  (Valko i sar., 2006).



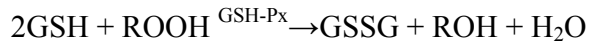
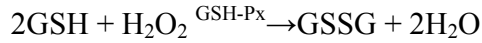
SOD postoji u nekoliko izoformi koje se razlikuju po prirodi metala i aminokiselinskog sastava u aktivnom mestu, kao i po broju subjedinica, kofaktora i drugih karakteristika. Kod ljudi postoje tri forme SOD: citoplazmatična CuZn-SOD, mitohondrijalna Mn-SOD i ekstracelularna SOD (EC-SOD) (Landis i Tower, 2005). SOD neutrališe  $O_2^{\cdot-}$  u reakcijama sukcesivne oksidacije i redukcije i tranzicije metalnog jona u aktivnom mestu (Mates i sar., 1999). CuZn-SOD je enzim molekulske mase od 32kDa koji se sastoji od 2 subjedinice. Svaka subjedinica sadrži u aktivnom mestu metalnu grupu koju čine joni Cu i Zn. Enzimska aktivnost ne zavisi od pH u intervalu od 5-9.5. Mitohondrijska Mn-SOD je homotetramer, težine 96kDa koja u svakoj subjedinici sadrži jedan atom Mn. Tokom dismutacije  $O_2^{\cdot-}$  dolazi do redukcije Mn(III) u Mn(II) a zatim oksidacije u Mn(III). Mn-SOD je jedan od najefikasnijih enzima koji ima antitumorsku aktivnost. Ekstracelularna SOD je tetramer, sekretorni glikoprotein sa Cu i Zn u aktivnom mestu i visokim afinitetom za određene glikozaminoglikane kao što su heparin i heparin-sulfat. Ona se u tkivima sisara pojavljuje uglavnom da kordinira citokine a ne kao odgovor pojedinih ćelija na oksidaciju (Mates i sar., 1999).

Razgradnja  $H_2O_2$  do vode i kiseonika u ćelijama se ostvaruje preko **katalaze** koja je smeštena u mitohondrijama i peroksidzomima u svim tkivima sisara (Urso i Clarkson, 2003). Može se naći i slobodna u citosolu retikulocita i zrelih eritrocita (slika 5). Katalaza je tetramerni hemoprotein molekulske mase 240kDa. Sastoji od 4 subjedinice i sadrži protoporfirinsko jezgro sa jonom gvožđa u aktivnom centru.

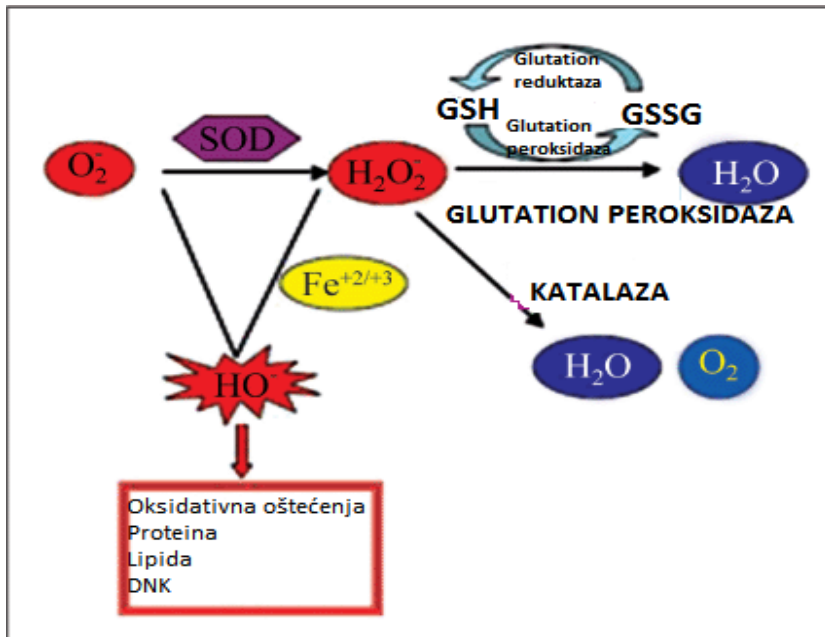




**Glutation peroksidaza** katalizuje glutation zavisnu redukciju vodonik peroksida u vodu i organskih hidroperoksida u odgovarajuće alkohole prema sledećim jednačinama:



GSH je snažan reduktant koji učestvuje i oksido redukujućim reakcijama u kojima se neutrališu peroksidi, u održanju tiol grupa protein u redukovanom stanju i u konjugaciji sa ksenobioticima koja je posredovana glutation-S transferazom (GST). Nakon učešća u oksidoreducionim reakcijama, redukovani glutation se regeneriše iz oksidovane forme dejstvom glutation reduktaze (GR) (Mates i sar., 1999) (slika 5). Metabolizam glutationa je jedan od najvažnijih mehanizama antioksidativne odbrane. Postoje 2 forme GSH-Px od kojih je jedna Se zavisna (citoplazmatična i mitohondrijalna) a druga Se nezavisna i pripada familiji enzima glutation-S-transferazne aktivnosti (Mates i sar., 1999). Ove dve forme enzima se razlikuju po broju subjedinica, prirodni vezivanja Se u aktivnom mestu, i njihovih katalitičkih mehanizama. Kod ljudi postoje 4 različite Se-zavisne glutation peroksidaze (Mates i sar., 1999). Poznato je da svi enzimi daju 2 elektrona za redukciju peroksida i formiraju selen-hidroksid (Se-OH). Antioksidativna svojstva svih seleno enzima je da eliminišu perokside kao potencijalne supstrate za Fentonovu reakciju.



**Slika 5. Slobodni radikali i putevi njihove međusobne konverzije**

### 1.4.3. Efekat vežbanja na oksidativni stres

Tokom intenzivnog vežbanja, ukupna potrošnja kiseonika može da poraste do 20 puta (Saltin i Astrand, 1967), dok potrošnja kiseonika u aktivnim mišićima može biti i do 100 puta veća u odnosu na potrošnju u stanju mirovanja (Davies i sar., 1982). Oko 95-98% od ukupne potrošnje kiseonika se koristi za proizvodnju ATP-a, dok 2-5% kiseonika može biti redukovana i dovesti do stvaranja ROS i RNS. Antioksidativni enzimi mogu biti aktivirani selektivno tokom akutnog vežbanja u zavisnosti od izloženosti tkiva oksidativnom stresu kao i od unutrašnjeg sistema antioksidativne zaštite (Powers i Jackson, 2008). Već pomenuti SOD, katalaza, glutation- peroksidaza i glutation-reduktaza predstavljaju primarnu odbranu organizma od oksidativnog stresa tokom vežbanja (Dekany i sar., 2006). Poznato je da naporno vežbanje dovodi do proizvodnje preterane količine ROS i RNS i vodi pojavi oksidativnog stresa (Sastre i sar., 1992). Takođe se predpostavlja da slobodni radikali, čija je proizvodnja povećana tokom intenzivnog vežbanja, deluju kao signali za poboljšanje produkcije enzima važnih za obranu ćelije i adaptaciju na vežbanje (Jackson, 2008).

Za potvrdu oksidativnog stresa u organizmu izazvanog intenzivnom fizičkom aktivnošću najčešće se ispituje aktivnost enzima antioksidativne odbrane u eritrocitima i skeletnim mišićima. Brojna istraživanja ukazuju na višu aktivnost SOD u krvi i mišićima kod sportista u odnosu na ljude koji se ne bave sportom. Tako je pokazana veća aktivnost SOD u mitohondrijama mišića kod odbojkaša (Ortenblad i sar., 1997), veća aktivnost SOD u plazmi fudbalera (Brites i sar., 1999), kao i veća aktivnost SOD u eritrocitima maratonaca i sprintera (Marzatico i sar., 1997), u odnosu na ljude koji ne treniraju. Međutim, nisu sve studije u skladu sa ovim zaključcima. Neki autori pokazuju da nema promena u aktivnosti SOD kod biciklista u odnosu na ljude koji se ne bave sportom (Tiidus i sar., 1996). Tauler i sar. (1999) nisu pronašli nikakve promene u aktivnosti SOD u eritrocitima kod dijatlonaca, dok Hubner-Wozniak i sar. (1994) pokazuju da kod skijaša letača nakon akutnog vežbanja dolazi do smanjenja aktivnosti SOD u eritrocitima.

U studijama Oh-Ishi i sar., (1997) i Hollander i sar., (1999) određivana je aktivnost katalaze u skeletnim mišićima, i pokazana je povećana aktivnost ovog enzima nakon treninga. Međutim, nasuprot njima rezultati većine studija ne pokazuju promene u aktivnosti CAT u mišićima nakon treninga (Ji, 1999; Jenkins, 1988; Ji, 1995), dok je mali broj autora pronašao smanjenje aktivnosti CAT u skeletnim mišićima nakon treninga (Leeuwenburgh i sar., 1994; Laughlin i sar., 1990). Aktivnost katalaze u eritrocitima sprintera određivali su, Ohno i sar., (1988), Robertson i sar., (1991) i Marzatico i sar., (1997) i u svim radovima nađeno je povećanje aktivnosti ovog enzima u odnosu na kontrolnu grupu.

Rezultati istraživanja aktivnosti GSH-Px kod sportista i ljudi koji se ne bave fizičkom aktivnošću, takođe se razlikuju i nisu konzistentni. Dok su neki autori pokazali da je aktivnost GSH-Px kod trkača u stanju mirovanja bila veća od ljudi koji ne treniraju (Marzatico i sar., 1997), ima i onih koji ne nalaze značajne razlike u aktivnosti GSH-Px ili glutation-reduktaze između sportista i kontrolne grupe (Robertson i sar., 1991).

Iako se zna da povećana fizička aktivnost vodi povećanoj produkciji ROS i RNS, novija istraživanja pokazuju da su kod sportista dobro razvijeni adaptivni procesi na pojavu stresa, te da je kod njih promenjena aktivnost enzima antioksidativne zaštite i nivo endogenih antioksidanasa. Osim toga, brojne studije ispituju efekat vežbanja na oksidaciju lipida i proteina ali rezultati se veoma razlikuju i poruka o uticaju vežbanja na oksidativni status je donekle zbunjujuća. Takođe, većina studija koje proučavaju oksidativni stres i

antioksidativni status odnosi se na programe i protokole iscrpljujućeg vežbanja i to uglavnom kod muškaraca (Aguilo i sar., 2005; Fatouros i sar., 2010; Tauler i sar., 2005). Kako estrogen može imati zaštitnu funkciju protiv ROS tokom vežbanja kod netreniranih žena (Akova i sar., 2001), postojanje polnih razlika u oksidativniom stresu i antioksidativnom odgovoru izazvanih treningom, ne može se isključiti. Zbog toga je jedan od ciljeva ove teze bio da se ispita da li se kod dugogodišnjeg treniranja fudbala i vaterpola menja oksidativni status sportistkinja i aktivnost enzima antioksidativne odbrane u odnosu na žene koje se ne bave sportom.

### **1.5. Fizička aktivnost i imuni sistem**

Imuni sistem se sastoji od specifične i nespecifične odbrane organizma od stranih materija i deli se na urođeni i adaptivni ili stečeni. Urođeni odbrambeni sistem je prva linija odbrane protiv infekcija. On obuhvata prirodne ćelije ubice (*engl.* Natural Killer cells-NK ćelije), različite fagocitne ćelije (neutrofili, bazofili, eozinofili, monociti i makrofage) i još nekoliko važnih faktora kao što su proteini akutne faze, komponente komplemента, lizozimi i interferoni. Adaptivni ili stečeni imuni sistem omogućava da se dobije odgovor na specifične antigene. On obuhvata T i B limfocite i imunoglobuline (Shephard i Shek, 1994).

Fizička aktivnost može imati i pozitivan i negativan efekat na funkciju imunog sistema (Gleeson, 2007). Smatra se da redovna, umerena fizička aktivnost blagotvorno deluje na imunitet i da je povezana sa smanjenom incidencom od infekcija. Sa druge strane pokazano je da dugotrajno i iscrpljujuće vežbanje dovodi do depresije različitih funkcija imunog sistema i da ove promene zavise od dužine i intenziteta vežbanja (Gleeson, 2007).

Reakcija imunog sistema na dugotrajno intenzivno vežbanje može biti akutna i hronična. Akutni odgovor organizma na naporno i produženo vežbanje praćen je odgovorima sličnim onima koje organizam ima u slučaju infekcija, sepse ili traume i traje 3-24 časa posle vežbanja (Northoff i sar., 1998). Ti odgovori podrazumevaju značajno povećanje broja leukocita kao i povećanje koncentracije supstanci u cirkulaciji koje utiču na funkciju leukocita. Tu priradaju: TNF- $\alpha$ , inflamatorni protein-1 makrofaga, IL-1 $\beta$ , antiinflamatorni citokini: IL-6, IL-10 i IL-1 receptor agonist (IL-1ra), proteini akutne faze i CRP (Northoff i sar., 1998).

Broj limfocita, neutrofila i monocita značajno se povećava tokom ili neposredno nakon vežbanja (Rhind i sar., 2001). Osim povećanja broja leukocita, funkcija leukocita takođe se menja kao odgovor na organizma na fizičku aktivnost. Tako je pokazano da kod sportista nakon vežbanja dolazi do privremenog smanjenja različitih imunoloških funkcija kakve su respiratorni prasak neutrofila, smanjenja proliferacije limfocita, i da to može trajati i nekoliko sati po završetku treninga (Pyne, 1994; Robson i sar., 1999). Osim toga, pokazano je i da je proizvodnja IL-6 od strane monocita (Starkie i sar., 2001) kao i IL-2 i IFN- $\gamma$  u T limfocitima inhibirana nekoliko sati nakon vežbanja (Lancaster i sar., 2004; Northoff i sar., 1998).

Kao posledice intenzivne fizičke aktivnosti, javljaju se promene u koncentraciji hormona koji imaju imunomodulatorni efekat. Pokazano je da se nakon treninga u plazmi povećava koncentracija adrenalina, kortizola, hormona rasta i prolaktina (Rhind i sar., 2001). Sve ove promene su akutni odgovor organizma na vežbanje.

Nekoliko studija je pokazalo da se broj i funkcija leukocita kod sportista, nakon više od 24 h od poslednjeg treninga, ne razlikuje od kontrolne grupe tj. da se ove promene gube nakon tog perioda (Gleeson, 2007). Međutim, kada sportisti intenziviraju pripreme, što u proseku traje nekoliko dana ili nedelja, može doći do pojave pretreniranosti koja se odražava na imunološke funkcije. Hronični odgovor imunog sistema na intenzivnu i napornu fizičku aktivnost u velikoj meri zavisi od hormonalnih faktora i takođe se odražava na broj i funkciju ćelija imunog sistema. Premda se u ranoj fazi vežbanja pod dejstvom kateholamina povećava broj leukocita, kada je fizička aktivnost izuzetno produžena ukupan broj leukocita se smanjuje jer monociti i NK ćelije migriraju u oštećeno tkivo tj. mišić (Shephard i Shek, 1994). Osim toga i funkcija ćelija imunog sistema tj. oksidativni prasak neutrofila i monocita, odnos CD4/CD8 T limfocita, sinteza antitela i citotoksičnost NK ćelija se smanjuje čak i kod dobro utreniranih sportista, kada se poveća intenzitet i trajanje treninga (Gleeson i sar., 1995; Lancaster i sar., 2004; Robson i sar., 1999; Verde i sar., 1992).

Monociti imaju važnu ulogu i u urođenom i u adaptivnom imunom odgovoru. U stečenom odgovoru učestvuju tako što prezentuju antigene T limfocitima, a u urođenom proizvodnjom citokina (Morgado i sar., 2012). Iako je imuni sistem suprimiran tokom perioda veoma napornih treninga, sportisti nisu imuno deficijentni. Oni se u periodu intenzivnih priprema nalaze u većem riziku od čestih infekcija, kakve su infekcije gornjih

disajnih puteva ili grip, što je nekoliko studija na fudbalerima i pokazalo (Bury i sar 1998; Fahlman i Engels, 2005; Rebelo i sar., 1998). Takođe treba naglasiti da intenzivan trening često uključuje ne samo napornu fizičku aktivnost, već i dijetarni energetska deficit a takođe i nedostatak sna i različite fiziološke promene. Ovi višestruki činioci utiču na promene u funkciji imunog sistema.

Naporno vežbanje dovodi i do povećane proizvodnje ROS i pojave oksidativnog stresa u organizmu. Međutim, i fagocitne ćelije kao što su neutrofil, monociti i makrofage proizvode ROS pomoću membranskog enzimskog kompleksa NADPH oksidaze (Nielsen i sar., 2008). Aktivacija NADPH oksidaze može biti indukovana brojnim faktorima kao što su mikrobnim agensima. Vezivanjem mikrobnih agenasa (bakterija ili virusa), kakav je lipopolisaharid LPS za receptore neutrofila, monocita i makrofaga, enzimski kompleks NADPH oksidaze redukuje molekularni kiseonik i stvara velike količine  $O_2^-$ . Ovako nastao  $O_2^-$  indukuje uništavanje mikroba zarobljenih u fagolizozomima čime se organizam bori protiv infekcija. Međutim, pokazano je da NADPH oksidaza može biti aktivirana i pod dejstvom različitih stimulusa koji nastaju tokom intenzivnog vežbanja (Miyazaki i sar., 2001). Dong i saradnici (2011) su pokazali da je ovaj enzim značajno aktiviran u neutrofilima pretreniranih pacova, i da kao rezultat toga dolazi do povećane produkcije  $O_2^-$  a i respiratornog praska u neutrofilima. Povećana produkcija  $O_2^-$  može dovesti do reakcije sa a NO i stvaranja visokoreaktivnih peroksinitrita  $ONOO^-$  koji mogu indukovati lipidnu peroksidaciju i sulfhidrilnu oksidaciju proteina. Pored ostalog, NO učestvuje i u ćelijski posredovanom imunom odgovoru, pošto ima jaku antimikrobnu i antiviralnu aktivnost (Nijs i sar., 2005). Literaturni podaci govore da intenzivna fizička aktivnost aktivira iNOS i dovodi do povećane produkcije NO u makrofagama (Woots i sar., 2000). Dakle, produženo vežbanje dovodi do povećanja ROS i RNS u pojedinim ćelijama imunog sistema i time utiče na imuni odgovor. Ipak, efekti hroničnog intenzivnog vežbanja kod vrhunskih sportista na ćelije imunog sistema nisu dovoljno ispitani, a posebno kod žena koje se bave sportom. Zato je jedan od ciljeva ove teze bio da se ispituju promene u funkciji monocita kod aktivnih sportistkinja koje treniraju u proseku 2 sata dnevno i više od 8 godina se aktivno bave fudbalom ili vaterpolom.

## 2.CILJ ISTRAŽIVANJA

Brojne kliničke studije pokazale su da redovna i umerena fizička aktivnost pozitivno deluje na ukupno zdravstveno stanje organizma i učestvuje u prevenciji većine metaboličkih poremaćaja kao što su gojaznost, dijabet tipa 2 i ateroskleroze. Važne prednosti redovne fizičke aktivnosti su pozitivan efekat na metabolizam masti i povećanje koncentracije HDL-holesterola i smanjenje koncentracije TG i LDL-holesterola, kao i pojačan klirens hilomikrona uz povećanje aktivnosti lipoproteinske lipase. Tokom intenzivnog vežbanja potrebe za slobodnim masnim kiselinama, pre svega PUFA i u manjoj meri SFA, u mišićnom tkivu rastu, jer su i potrebe za energijom znatno veće. Zbog toga je adekvatan status PUFA kod sportista, veoma važan i neophodan ne samo da bi zadovoljile energetske potrebe organizma, već i da se ne naruše važne regulatorne i strukturne uloge koje n-3 i n-6 PUFA imaju u organizmu. Međutim, neke studije su pokazale da masnokiselinski profil različitih tkiva može biti promenjen usled redovne fizičke aktivnosti, i da to može uticati na opšte zdravstveno stanje sportista i postizanje rezultata.

Tokom intenzivnog vežbanja povećava se potrošnja kiseonika u mišićima i drugim tkivima što dovodi do povećanja produkcije slobodnih radikala u organizmu. Kada koncentracija slobodnih radikala prevaziđe kapacitet antioksidativne odbrane organizma, dolazi do pojave oksidativnog stresa. Literaturni podaci o uticaju vežbanja na redoks homeostazu kod ljudi su kontroverzni, zbog različite vrste i uslova treninga, i zato ih je veoma teško porediti. Osim toga, mali broj studija je proučavao parametre oksidativnog stresa i aktivnost enzima antioksidativne odbrane kod aktivnih sportistkinja.

Redovna i umerena fizička aktivnost blagotvorno deluje na funkciju imunog sistema i povezana je sa smanjenom incidencom od infekcija. Međutim, dugotrajno i iscrpljujuće vežbanje dovodi do depresije različitih funkcija imunog sistema i te promene zavise od dužine i intenziteta vežbanja. Da li, i u kolikoj meri dugogodišnja intenzivna fizička aktivnost utiče na MK profil plazme i eritrocita, oksidativni stres i aktivnost mononuklearnih ćelija periferne krvi, kod žena nije u potpunosti razjašnjeno.

Zbog toga je osnovni cilj ovog rada bio da se **ispita delovanje redovne, programirane i kontrolisane fizičke aktivnosti** na:

- Antropometrijske karakteristike, kompletnu krvnu sliku (KS), sedimentaciju (SE) i biohemijske parametre krvi, kod ispitanica ženskog pola;
- Masnokiselinski profil fosfolipida plazme i eritrocita kod ispitanica ženskog pola;
- Parametre oksidativnog stresa i aktivnost enzima antioksidativne odbrane plazme i eritrocita kod ispitanica ženskog pola;
- Aktivnost mononuklearnih ćelija periferne krvi i produkciju  $O_2^-$  i NO u mononuklearnim ćelijama kod ispitanica ženskog pola;
- Da se uporede ispitivani parametri između dve grupe sportistkinja i kontrolne grupe.



### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Dizajn studije**

U studiju je uključeno 15 vaterpolistkinja i 19 fudbalerki koje predstavljaju reprezentaciju Srbije a regrutovane su iz vodećih klubova iz Beograda. Kontrolnu grupu činilo je 14 ženskih osoba sličnog indeksa telesne mase i godina starosti, koje se ne bave fizičkom aktivnošću. Kriterijum za uključivanje u studiju bio je da su ispitanice zdrave, nepušači, da su vrednosti jutarnje glikemije  $<5.89$  mmol/l, holesterola  $<5.2$  mmol/l i triglicerida  $<1.7$  mmol/l, kao i da 6 meseci pre uključivanja u studiju nisu uzimale lekove koji utiču na metabolizam lipida (hipolipidemike, beta blokatore, diuretike ili hormone), dijetetske suplemente ili biljne preparate. Tokom ispitivanog perioda, sportistkinje su trenirale  $5.77 \pm 1.09$  dana nedeljno i  $1.93 \pm 0.29$  sati dnevno ( $X \pm SD$ ). Sve ispitanice dobrovoljno su potpisale saglasnost za učestvovanje u istraživanju. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Republičkog zavoda za medicine sporta, gde je obavljen intervju za dobijanje opštih informacija o navikama u ishrani, uzeta krv i gde su izvršena antropometrijska merenja. Opšti podaci kao što su starosna dob, dužina dnevnog i nedeljnog treninga, kao i korišćenje suplemenata u ishrani, dobijeni su kroz odgovore na standardizovane upitnike pod nadzorom nutricioniste. Takođe, sve ispitanice su imale redovan menstrualni ciklus (26-32 dana), nisu uzimale oralna kontraceptivna sredstva niti druge oblike hormonske terapije i uključene su u studiju u ranoj folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa.

#### **3.2. Antropometrijska merenja učesnica studije**

Merenje visine tela, izraženo u centimetrima, vršeno je prema standardizovanoj proceduri stadiometrom (Perspective Enterprises, Kalamazoo, MI) sa preciznošću od 1mm. Telesna masa, masa masnog tkiva, mišićna masa i ukupna voda, izražene u kilogramima, procenjivane su metodom analize bioelektrične impadance. Za analizu bioelektrične impedance, koja se zasniva se na određivanju otpora koji pruža tkivo prilikom prolaska slabe naizmjenične struje (800 mikroampera) kroz ljudski organizam, korišćen je elektronski aparat (Tanita TBF-300, Tanita Corp, Japan), sa preciznošću od 0.1kg. Za procenu stepena uhranjenosti ispitanica korišćen je indeks telesne mase (BMI) koji predstavlja količnik

telesne mase u kilogramima i kvadrata telesne visine u metrima ( $BMI = TM(kg)/(TV(m))^2$ ) (Garrow i Webster, 1985). Procenat telesnih masti automatski je određivan na aparatu Tanita TBF-300.

### **3.3. Navike u ishrani ispitanica uključenih u studiju**

Sve ispitanice koje su uključene u studiju su se hranile tipičnom ishranom našeg podneblja u kojoj su najzastupljenije namirnice bile mleko i mlečni proizvodi, juneće meso i jaja, dok je riba konzumirana jednom u dve nedelje ili ređe. Način ishrane i da ispitanice nisu koristile dijetetske suplemente u vreme uključenja u studiju, utvrdili smo na osnovu metode za utvrđivanje stanja ishrane - Anketa o učestalosti uzimanja pojedinih namirnica (semi-quantified food frequency questionnaire-FFQ) (McNaughton i sar., 2007, Wolk i sar., 2001). Ovaj anketni metod zasniva se na grupama namirnica kojima ispitanik određuje učestalost konzumiranja namirnica u toku dana, nedelje, meseca. FFQ je sadržao 142 namirnice i napitke koji se najčešće koriste u Srbiji. Namirnice su podeljene u grupe (mleko i mlečni proizvodi, meso i prerađevine od mesa, riba i jaja, masti i ulja, žitarice, voće i povrće, orašasti plodovi, brza hrana, konzervisana hrana i napitci. Za svaku grupu namirnica beleženi su sledeći podaci: (a) učestalost konzumiranja tokom nedelje (1-7), 1-3 puta tokom meseca ili ne konzumira, i (b) veličina porcije (mala, srednja i velika) prikazana slikom. Učestalost konzumiranja je prevođena u srednje vrednosti dnevnog unosa u gramima za svaku namirnicu ili grupu namirnica. Preračunavanje nutrijenta vršeno je korišćenjem US Department of Agriculture food composition tables (2006) i nutritivnim tabelama sastava namirnica Jokića i saradnika (1999).

Da je kontrolna grupa bila fizički neaktivna ili su se minimalno bavile fizičkom aktivnošću (hodanje ili vožnja bicikla manje od 2 sata nedeljno) a sportistkinje trenirale u proseku 2 sata dnevno, utvrdili smo na osnovu standardnih pitanja vezanih za fizičku aktivnost. Individualne ankete sa ispitanicama o načinu ishrane i fizičkoj aktivnosti, kao i nutritivnu kalkulaciju sam lično sprovodila da bi se izbegle razlike u načinu interpretacije.

### **3.4. Priprema bioloških uzoraka**

Krv je uzimana ujutru, posle 12 h gladovanja, 18 h nakon poslednjeg treninga. Serum je izolovan spontanom koagulacijom na sobnoj temperaturi. Koagulum je odvojen centrifugiranjem 10 min na 1860 x g obrtaja u Eppendorf 5804 centrifugi i u serumu su, odmah nakon odvajanja, određeni biohemijski parametri.

Masnokiselinski profil fosfolipida, totalni antioksidativni status, koncentracije nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ), kao i reaktivnih kiseoničnih vrsta vodonik peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i superoksid-anjon-radikala ( $\text{O}_2^-$ ), određivani su u plazmi. Plazma je izolovana centrifugiranjem 20 min na 2880 x g pune krvi sa citratom kao antikoagulansom, odvojena od ćelija krvi i zamrznuta u porcijama od 0.5 ml.

Nakon odvajanja plazme i leukocita, eritrociti su isprani 3 puta u fizioloskom rastvoru, centrifugiranjem 10 min na 1860 x g, razdeljeni u manje porcije i do analize čuvani na  $-70^\circ\text{C}$ . U eritrocitima je određivan masnokiselinski profil fosfolipida, a u hemolizatu eritrocita aktivnost SOD, CAT i GSH-Px, kao i MDA kao mera stepena lipidne peroksidacije.

Priprema hemolizata sastojala se u odvajanju eritrocita iz heparinirane krvi centrifugiranjem (10 minuta na 1860 x g u minuti), nakon čega su eritrociti isprani tri puta sa 3 ml fiziološkog rastvora i centrifugirani 10 minuta na 1860 x g u minuti. Nakon poslednjeg odlivanja supernatanta, eritrociti su lizirani sa 2 ml hladne vode i preneti na  $4^\circ\text{C}$  15 minuta, kako bi se završio proces hemolize.

Mononuklearne ćelije u kojima je određivana metaboločka aktivnost, kao i sposobnost produkcije  $\text{O}_2^-$  i NO, izolovani su iz periferne krvi ispitanica.

### **3.5. Biohemijske analize**

Kompletna krvna slika određena je automatski na hematološkom analizatoru ABX MICROS 60. Za određivanje koncentracije triglicerida, ukupnog holesterola, HDL-holesterola, LDL-holesterola i glukoze, korišćeni su komercijalni testovi (ELITECH Diagnostic, Švajcarska) prema uputstvu proizvođača. Analize su urađene na biohemijskom analizatoru Cobas Mira, Roche, Švajcarska.

### **3.6. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme i eritrocita gasno-tečnom hromatografijom**

Ukupni lipidi plazme i eritrocita ekstrahovani su smešom organskih rastvarača hloroform-metanol 2:1 (v/v). Lipidne klase su razdvojene tankoslojnom hromatografijom (TLC). Masne kiseline fosfolipidne frakcije su esterifikovane, a dobijeni metil estri MK su razdvajani gasno-tečnom hromatografijom (GLC).

#### **3.6.1. Ekstrakcija ukupnih lipida iz plazme**

U 0.5 ml plazme dodato je 4,5 ml smeše organskih rastvarača hloroform-metanol 2:1 (v/v) koji sadrži 50 mg butilhidroksitoluena (BHT) ili 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenola, kao antioksidansa u 100 ml smeše rastvarača, uz snažno mućkanje. Dobijeni lipidni ekstrakt je propušten kroz disk natrijum sulfata i uparen do suva. Suvi prečišćen ekstrakt je rastvoren u 0.2 ml smeše hloroform-metanol 2:1 (v/v) i korišćen za hromatografsko razdvajanje lipidnih klasa.

#### **3.6.2. Ekstrakcija ukupnih lipida iz eritrocita**

Homogenizacija oko 2 g eritrocita vršena je u avanu sa 5 ml smeše rastvarača hloroform-metanol 2:1 (v/v) u koji je dodat BHT (antioksidans). Nakon toga je dodato 5 ml smeše hloroform-metanola 1:2 (v/v), 5 ml smeše hloroform-metanola 1:1 (v/v) i uzorak ostavljen preko noći u zamrzivaču. Dobijeni lipidni ekstrakt je proceden kroz filter papir i uparen do suva. Nakon toga suvi lipidni ekstrakt je prečišćen 3 puta sa po 2 ml smeše organskih rastvarača hloroform-metanol 1:1 (v/v). Tako prečišćeni ekstrakt rastvoren je u 0.2 ml smeše hloroform-metanol 2:1 (v/v) i korišćen za hromatografsko razdvajanje lipidnih klasa.

#### **3.6.3. Razdvajanje lipidnih klasa tankoslojnom hromatografijom (TLC)**

Fosfolipidi plazme i eritrocita izolovani su jednodimenzionom TLC na silika gelu GH<sub>600</sub>, MERCK, Velika Britanija, debljine 0.5 mm. Ukupni lipidni ekstrakt plazme i eritrocita nanošen je na prethodno aktiviranu ploču. Kao sistem za razvijanje korišćena je smeša rastvarača petroletar-dietiletar-sirćetna kiselina (87:12:1, v/v/v). Razdvojene frakcije lipida identifikovane su pod UV lampom (slika 6).



Slika 6. TLC hromatogram neutralnih lipida

(PL = fosfolipidi, DG = diacilgliceroli, HOL = holesterol,  
TG = triacilgliceroli, HOL-E =estri holesterola.

#### **3.6.4. Metilacija masnih kiselina**

Masne kiseline su direktno esterifikovane po modifikovanoj metodi transesterifikacije (Cristopherson i Glass, 1969). Frakcija fosfolipida plazme i eritrocita preneti je u epruvete za metilaciju, ekstrakcijom sa odgovarajućeg sloja silika gela sa 1.5 ml heksana. Proces esterifikacije počeo je dodatkom 0.2 ml 2M NaOH u metanolu i termostatiranjem na 85°C 1 sat, a nastavljen dodatkom 0.2 ml 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u metanolu i termostatiranjem 2 sata na 85°C. Posle metilacije ohlađene epruvete su centrifugirane na 1860 x g, 15 minuta, i heksanski sloj uparen do suva u struji azota.

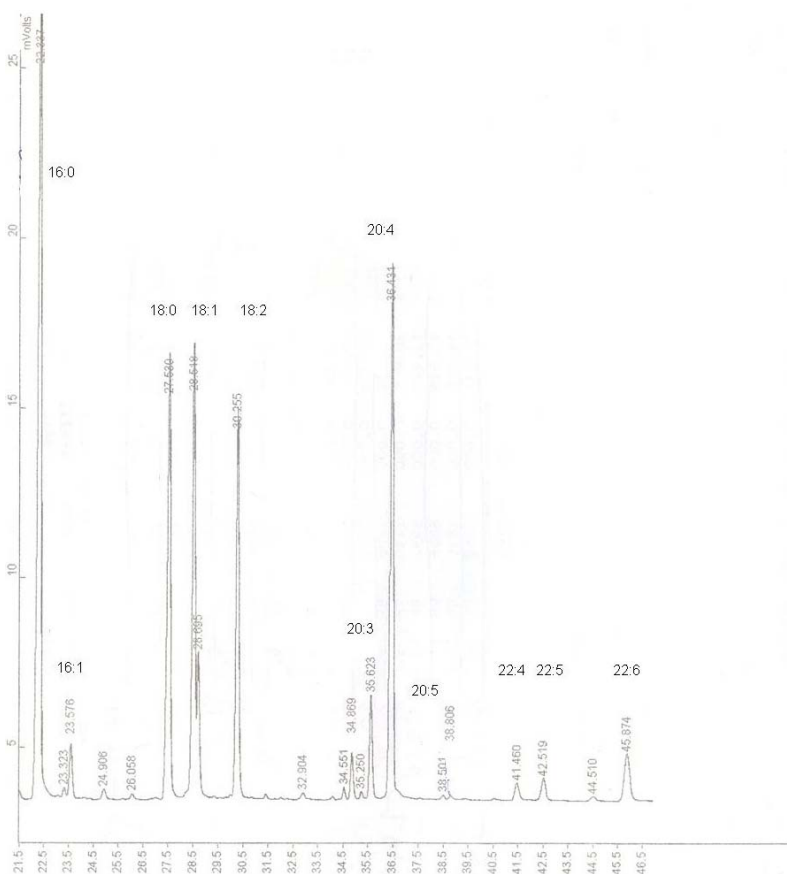
#### **3.6.5. Analiza masnih kiselina gasno-tečnom hromatografijom**

Masne kiseline su analizirane gasno-tečnom hromatografijom (*engl.* Gas liquid chromatography-GLC) na aparatu SHIMADZU 2014, Kyoto, Japan. Korišćena je kapilarna kolona Rtx 2330, RESTEK,USA, dimenzija 60 m i 0.25 mm ID. Debljina filma stacionarne

faze je 0.20  $\mu\text{m}$ . Protok nosećeg gasa (helijuma) bio je 5 ml/min, protok vazduha 320 ml/min, a vodonika 30 ml/min. Temperatura detektora bila je 240°C a injektora 220°C. Temperatura kolone sa 140°C kolika je bila na startu, je podizana do 190°C, brzinom 3°C/minutu, a zatim do 210°C brzinom od 1°C/minutu.

Uzorci pripremljenih metil-estara rastvoreni su neposredno pre injektovanja u oko 20  $\mu\text{l}$  heksana (zavisno od količine suvog ostatka), a od toga je injektovan 1  $\mu\text{l}$ .

Masne kiseline su indentifikovane upoređivanjem sa hromatogramom standarda masnih kiselina PUFA-2 standard (Supelco, Inc., Belleforte, Pa., USA). Rezultati su izraženi u procentima od ukupno razdvojenih masnih kiselina. Primer GLC hromatograma masnih kiselina fosfolipida seruma prikazan je na slici 7.



Slika 7: GLC hromatogram masnih kiselina PL seruma

### 3.7. Određivanje parametara oksidativnog stresa

#### 3.7.1. *Određivanje ukupnog antioksidativnog statusa*

Ukupni antioksidativni status (*engl.* Total Antioxidant Status-TAS) je određivan u plazmi, spektrofotometrijski po metodi Millera i saradnika (1993). Test se zasniva na redukciji  $ABTS^{+}$  (1,2'-azino-di-(3-etilbenzilazolin sulfonat)) katjon radikala antioksidansima iz plazme, što vodi smanjenju apsorbance na 660 nm.  $ABTS^{+}$ , koji ima stabilnu plavo-zelenu boju, nastaje u reakciji  $ABTS$  (1,2'-azino-di-(3-etilbenzilazolin sulfonat)) sa metmioglobinom i vodonik-peroksidom. Antioksidansi suzbijaju stvaranje ove boje u stepenu koji je proporcionalan njihovoj koncentraciji u plazmi. TAS je određivan na biohemijском analizatoru Cobas Mira a rezultati su izraženi kao mmol/l. U 5  $\mu$ l plazme dodato je 250  $\mu$ l 80 mM fosfatnog pufera a nakon 30 s 20  $\mu$ l TAS hromogena ( $ABTS$  610  $\mu$ mol/l i metmioglobin 6.1  $\mu$ mol/l). Koncentracija antioksidanasa u plazmi izračunata je na sledeći način:

$$F=1/\Delta Asp- \Delta ASt$$

sp - slepa proba

$$C=F \times (\Delta Asp- \Delta Auzorka)$$

St-standard-uzorak poznate koncentracije

Gde je:  $\Delta Asp=A_2-A_1$

$A_1$ -apsorbanca na početku reakcije

$$\Delta Auzorka= A_2-A_1$$

$A_2$ -apsorbanca na kraju reakcije

$$\Delta ASt= A_2-A_1$$

#### 3.7.2. *Određivanje lipidne peroksidacije*

Koncentracija malondialdehida (MDA), krajnjeg proizvoda lipidne peroksidacije u eritrocitima, određivana je reakcijom sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) po metodi Cynamon i saradnika (1985). U 0.125 ml lizata eritrocita dodato je 1.25 ml 20% trihlorsirćetne kiseline i 0.5 ml 0.67% TBA. Smeša je zatim zagrevana 60 minuta na 95°C, ohlađena na sobnoj temperaturi i u svaki uzorak dodato je 2 ml n-butanola. Nakon toga smeša je centrifugirana a koncentracija MDA se određivana u supernatantu spektrofotometrijski na 535 nm. Koncentracija MDA je izračunata upotrebom molarnog ekstincionog koeficijenta za kompleks MDA-tiobarbiturna kiselina koji iznosi  $1.56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  i izražena je u nmol/gHb.

### 3.7.3. *Određivanje superoksid anjon radikala*

Koncentracija superoksid anjon radikala ( $O_2^-$ ) u plazmi određivana je po metodi Auclaira i Voisina (1985). Metoda je zasnovana na sposobnosti  $O_2^-$  da redukuje nitro grupu nitro tetrazolium plavog (*engl.* Nitro Blue Tetrazolium – NBT) (2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difetil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difetil)-ditetrazolium hlorid) do nitroformazan plavog. Redukcija žuto obojenog NBT-a do plavog formazana korišćena je kao mera stvaranja superoksid-anjon- radikala. Apsorbanca je merena na talasnoj dužini maksimalne apsorpcije formazana od 550 nm. U 0.05 ml plazme dodato je 0.95 ml esejne smeše koja sadrži: 50 mM TRIS pufer (pH = 8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mg/ml želatina i 0.1 mM NBT. Na početku reakcije izmerena je apsorbanca uzorka ( $A_1$ ), a zatim svakih 60 s do stabilizacije apsorbance što je podrazumevalo dobijanje dve uzastopne približno iste vrednosti. Poslednja vrednost označena je kao  $A_2$ . Kao slepa proba korišćena je destilovana voda. Koncentracija oslobođenog  $O_2^-$  izražena u nmol/ml plazme, izračunata je na sledeći način:

$$\text{nmol } O_2^-/\text{ml plazme} = \Delta E / 0.015 \times 1/0.05$$

gde je:

$$\Delta E = \Delta E_u - \Delta E_{sp}$$

$$\Delta E_{uzorka} = E_{2u} - E_{1u}$$

$$\Delta E_{slepe\ probe} = E_{2sp} - E_{1sp}$$

### 3.7.4. *Određivanje vodonik peroksida*

Određivanje koncentracije vodonik peroksida ( $H_2O_2$ ) je zasnovano na oksidaciji fenol-crvenog tj. fenolsulfonftaleina vodonik peroksidom iz plazme, u prisustvu peroksidaze, po metodi Picka i Keisaria (1980). U 0.2 ml plazme dodato je 0.8 ml sveže napravljenog rastvora fenol crvenog (Phenol Red Solution – PRS) koji sadrži 140 mM NaCl, 10 mM fosfatnog pufera pH=7, 5.5 mM glukoze i 0.28 mM fenol crvenog. Nakon toga, uzorcima je dodato 10  $\mu$ l peroksidaze i inkubirani su 10 minuta na sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena i boja razvijena dodatkom 1N NaOH. Apsorbanca oksidovanog fenol crvenog merena je na 610 nm. Koncentracija  $H_2O_2$  je određivana na osnovu standardne krive za  $H_2O_2$  i izražena u nmol/ml plazme.



### **3.7.5. Određivanje nitrita**

Koncentracija nitrita, koja je mera produkcije NO je određivana u plazmi Grisovim reagensom. U 0.2 ml plazme je dodato 0.1 ml 3 N PCA (*engl.* Perchloride acid) i 0.4 ml 20 mM EDTA (*engl.* Ethylenediaminetetraacetic acid) i ostavljeno na ledu 15 minuta. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 15 minuta na 3825 x g, supernatant je odliven, a talog je resuspendovan u 2M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> do pH=7.4. U 0.1 ml ovog uzorka dodaje se 0.25 ml Grisovog reagensa (Green i saradnici, 1982) koji sadrži jednake zapremine 0.1% rastvora naftil-etilendiamin-dihidrohlorida u destilovanoj vodi i 1 % rastvor sulfanilamida u 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i sa nitritima gradi kompleks ljubičaste boje. Nakon 5-10 minuta inkubacije na sobnoj temperature, određivana je koncentracija oslobođenih nitrita spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 550 nm.

## **3.8. Određivanje aktivnosti enzima antioksidativne odbrane**

Kao što je ranije navedeno, intenzivna fizička aktivnost dovodi do povećane potrošnje kiseonika u mišićima, srcu, jetri i drugim tkivima i do povećane produkcije ROS u mišićima i miokardu. Kada produkcija ROS prevaziđe kapacitet antioksidativne zaštite kao procesa koji neprestano funkcioniše u zdravom organizmu, dolazi do pojave oksidativnog stresa. Enzimi superoksid dismutaza, katalaza i glutacion peroksidaza, koji su prisutni u gotovo svim ćelijama i čine deo sistema antioksidativne zaštite organizma, predstavljaju prvu liniju odbrane protiv ROS nastalih tokom intenzivnog vežbanja. Uloga SOD je da katalizuje dismutaciju toksičnog O<sub>2</sub><sup>-</sup>, nastalog tokom oksidativnih energetskih procesa, do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>. CAT direktno razgrađuje toksični H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do H<sub>2</sub>O i O<sub>2</sub>, dok GSH-Px razlaže H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koristeći ga za oksidaciju drugog supstrata, glutationa (GSH) koji prelazi u oksidovani glutation (GSSG).

### **3.8.1. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze**

Aktivnost superoksid dismutaze određivana je u eritrocitima po metodi Goldsteina i saradnika (1988). Kao izvor superoksid anjon radikala u ovoj metodi koristi se ksantin. Superoksid anjon radikal, generisan iz ksantina prilikom prevođenja u mokraćnu kiselinu u prisustvu ksantin oksidaze, reaguje sa akceptorom elektrona 2-(4-jodfenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hloridom (INT) i formira crvenu boju. SOD iz uzorka uklanja superoksid

anjon radikal pri čemu inhibira ovu reakciju. Jedinica aktivnosti superoksid dismutaze definisana je kao količina enzima koja uzrokuje inhibiciju ove reakcije za 50% u odgovarajućim uslovima. U 5µl uzorka (lizata eritrocita koji je razblažen 25 puta sa 0.01M fosfatnim puferom, pH=7) dodato je 170 µl radnog reagensa (koji sadrži 0.05 mmol/l ksantina, 0.025 mmol/l INT i 0.94 mmol/l fosfatnog pufera) a nakon 30 s 25 µl ksantin oksidaze (80U/l). Procenat inhibicije SOD određivan je na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbanci očitanih za seriju standardnih rastvora poznate koncentracije SOD (4.84, 2.42, 1.21, 0.60, 0.30 U/ml). Standardi su razblaženi u 0.01M fosfatnom puferu, pH=7. Aktivnost SOD merena je na 500 nm i izražena u jedinicama po gramu prethodno određenog hemoglobina (U/gHb). Za izračunavanje aktivnosti enzima koristili smo sledeću formulu:

$$(100 - A_{\text{uzorka}}) \times 25 / Hg_{\text{iz lizata ER}}$$

### 3.8.2. *Određivanje aktivnosti katalaze*

Aktivnost katalaze je određivana po metodi Aebi i saradnika (1984), koja se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju promene apsorbance na 230 nm. Na ovoj talasnoj dužini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ima maksimum apsorpcije koji se menja usled razgradnje standardne koncentracije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) katalazom iz uzorka. Jedinica aktivnosti CAT definisana kao aktivnost enzima potrebna za razgradnju 1 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za 60 s na 25 °C i pH =7.0. CAT je izražena kao U/gHb. U 50 µl uzorka (lizata eritrocita koji je pripremljen tako što je u 50 µl hemolizata dodato 50 µl 95% etanola i 5 ml vode i inkubirano 10 minuta na 37°C) dodato je 50 µl 1M Tris pufera pH =8 i 1 ml 10 mM rastvora vodonik peroksida. Na spektrofotometru se prati pad apsorbance svakih 30 sekundi, tokom 3 minuta. Aktivnost katalaze izračunata je pomoću formule:

$$CAT = \frac{100 \times R \times \Delta A}{Hb \times V \times 0.071}$$

gde je:

ΔA - srednja vrednost promene apsorbance u minuti;

R - faktor razblaženja (101);

Hb - količina hemoglobina (u g/100 ml lizata);

V - zapremina uzorka (u ml);

0.071 - milimolarni apsorptivni koeficijent vodonik peroksida.

### **3.8.3. Određivanje aktivnosti glutathion peroksidaze**

Aktivnost glutathion peroksidaze određivana je u eritrocitima po metodi Paglia i Valentine (1967). Glutathion peroksidaza katalizuje oksidaciju glutathiona sa kumen hidroperoksidom. Oksidovani glutathion se konvertuje do redukovane forme u prisustvu glutathion-reduktaze i NADPH koji se oksiduje do  $\text{NADP}^+$  što se odražava padom apsorbanca na 340 nm. Jedinica aktivnosti GSH-Px je definisana kao količina enzima koja oksiduje 1nM NADPH u minuti i izražava se u U/g Hb. U 5 $\mu\text{l}$  uzorka (0.05 ml heparizirane krvi u koju je dodato 1ml destilovane  $\text{H}_2\text{O}$ , a nakon 5 minuta inkubiranja na sobnoj temperaturi i 1 ml Drapkinovog reagensa) dodato je 220  $\mu\text{l}$  radnog reagensa (koji sadrži 4 mmol/l glutathiona, 0.5 mmol/l glutathion reduktaze, 0.034 mmol/l NADPH, 0.05M fosfatnog pufera pH=7.2 i EDTA 4.3mmol/l) i 10  $\mu\text{l}$  kumen hidroksiperoksida koncentracije 0.18 mmol/l. Apsorbanca je merena na 340 nm a aktivnost enzima izračunata na sledeći način:

$$\frac{(\text{Auzorka-Aslepe probe}) \times 41}{\text{Hemoglobin(g)}} = \text{U/gHb}$$

### **3.9. Izolovanje mononuklearnih ćelija iz pune krvi i određivanje aktivnosti, respiratornog praska i produkcije NO u mononuklearnim ćelijama periferne krvi**

Ćelije imunog sistema proizvode  $\text{O}_2^-$  i NO tokom oksidativnog praska koji se aktivira u toku zapaljenskih procesa. Međutim, obzirom da je pokazano da se imuni sistem aktivira i pod dejstvom stimulatora nastalih tokom fizičke aktivnosti, jedan od naših ciljeva bio da utvrdimo da li je u mononuklearnim ćelijama sportistkinja povećana produkcija  $\text{O}_2^-$ , kao i da li se aktivnost (održivost) mononuklearnih ćelija ali i produkcija NO razlikuje između sportistkinja i fizički neaktivnih žena.

### **3.9.1. Izolovanje mononuklearnih ćelija iz pune krvi**

Puna krv sa EDTA pomešana je u odnosu 1:2 sa PBS (*engl.* Phosphate buffered saline: 2,8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 7,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,8% NaCl). Na po 15 ml gustinskog gradijenta za izdvajanje mononuklearnih ćelija (1,077 g/ml) u 50 ml-skim epruvetama nanošeno je po 30 ml razblažene ćelijske suspenzije i centrifugirano 40 minuta na 400 x g. Po završenom centrifugiranju, gornji sloj razblažene plazme je odbačen a mononuklearne ćelije iz interfaznog prstena su skupljene u resuspendovane u PBS-u. Ćelije su taložene centrifugiranjem (10 min, 405 x g), a zatim dva puta resuspendovane u PBS-u i isprane od gustinskog gradijenta centrifugiranjem. Treći put su ćelije resuspendovane u RPMI 1640 medijumu (10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) sa 1% L-glutamin, 1% Streptavidin-Penicilin i 7,5% NaHCO<sub>3</sub>) i centrifugirane 5 minuta na 180 x g da bi se pored ostataka gustinskog gradijenta uklonili i trombociti. Za kultivaciju ćelija korišćen je osnovni medijum obogaćen inaktivisanim fetalnim telećim serumom (FCS *engl.* fetal calf serum), u koncentraciji od 10%.

### **3.9.2. Test redukcije tetrazolijumske soli MTT**

Metabolička aktivnost (održivost) ćelija je analizirana kvantitativnom kolorimetrijskom metodom u kojoj je MTT (*engl.* (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT, ICN Biomedicals, Ohio, USA) metabolički redukovan do formazana karakteristične boje (Mosmann, 1983). MTT mogu da redukuju samo aktivne mitohondrije živih ćelija pa je stoga ovaj test pogodan za merenje broja vijabilnih ćelija, njihovog stanja aktivacije i proliferacije. Po 100 µl sveže izolovane ćelijske suspenzije u koncentraciji od 5x10<sup>6</sup> ćelija/ml, dodato je u bunarčiće ploče sa 96 mesta. Svaki uzorak rađen je u 6 ponavljanja. U 3 bunarčića svakog uzorka dodato je po 10 µl LPS (*engl.* lipopolysaccharide from *E. coli*, serotype 055: B5 strain; Sigma Chemicals Co., St. Louis, Mo., USA), koncentracije 100 µg/ml a u preostala 3 po 10 µl medijuma. Ćelije su postavljene na 1 ploču za 24-satnu kultivaciju. Nakon završene kultivacije u svaki bunarčić je dodato po 10 µl radnog rastvora MTT-a, koncentracije 5 mg/ml. Kulture su inkubirane još 3 sata na 37°C, u vlažnoj atmosferi. Proces redukcije je prekinut dodavanjem 100 µl 10% SDS-a u HCl. Dobijena boja je rastvarana preko noći na 37°C. Apsorbanca rastvora, čiji intenzitet odgovara stepenu redukcije MTT-a izmerena je na 540 nm na ELISA čitaču.

### **3.9.3. Test redukcije NBT soli**

Određivanje produkcije superoksid-anjon-radikala  $O_2^-$  u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, zasnovano je na reakciji redukcije nitro tetrazolium plavog (*engl.* Nitro Blue Tetrazolium – NBT) (Merck, Nemačka,) (2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difetil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difetilen)-ditetrazolium hlorid) sa  $O_2^-$  do nitroformazan plavog. Test se radi u ćelijskim kulturama sa i bez PMA (*engl.* phorbol 12-myristate 13-acetate) (Sigma Chemicals Co., St. Louis, Mo., USA), kao stimulatora. Po 100  $\mu$ l ćelijske suspenzije u koncentraciji od  $5 \times 10^6$  ćelija/ml, dodato je u bunarčiče ploče sa 96 mesta. Svaki uzorak rađen je u 6 ponavljanja. U 3 bunarčića svakog uzorka dodato je 10  $\mu$ l PMA koncentracije 500 ng/ml, a u preostala 3 po 10  $\mu$ l medijuma. Nakon 5 minuta inkubiranja u svaki bunarčić je dodato po 10  $\mu$ l NBT reagensa koncentracije 5 mg/ml, i ćelijska kultura je inkubirana 30 minuta na 37°C u vlažnoj atmosferi. Proces redukcije je prekinut dodavanjem 100  $\mu$ l 10% SDS-a sa 1M HCl (10  $\mu$ l 1M HCl na 1 ml 10% SDS-a). Razvijanje dobijene boje se nastavlja na 37°C, preko noći. Intenzitet reakcije se izražava na osnovu intenziteta apsorbanca na 540 nm na ELISA čitaču (Labsystems Multiskan PLUS, Finska).

### **3.9.4. Određivanje nitrita Griess-ovom reakcijom**

Proizvodnja NO, kvantifikovana kao akumulacija nitrita u 24 časovnoj ćelijskoj kulturi, određivana je spektrofotometrijski koristeći Grisovu reakciju sa natrijum nitritom kao standardom (Green i sar., 1982). Po 100  $\mu$ l ćelijske suspenzije u koncentraciji od  $5 \times 10^6$  ćelija/ml, dodato je u bunarčiče ploče sa 96 mesta. Svaki uzorak rađen je u 6 ponavljanja. U 3 bunarčića svakog uzorka dodato je po 10  $\mu$ l LPS, koncentracije 100  $\mu$ g/ml a u preostala 3 po 10  $\mu$ l medijuma. Ćelije su postavljene u ploče za 24-časovnu kultivaciju. Po završenoj kultivaciji, neadherentne ćelije i supernatanti su skupljane i centrifugirane. Supernatanti su odvojeni i zamrznuti do analize.

U 50  $\mu$ l supernatnata ćelijskih kultura, standarda i slepe probe (medijum) dodato je 50  $\mu$ l radnog rastvora Grisovog reagensa (jednake zapremine 0,1% rastvora naftil-etilendiamin-dihidrohlorida u destilovanoj vodi i 1 % rastvor sulfanilamida u 5%  $H_3PO_4$ ). Reakcija se odvija u pločama od 96 mesta sa ravnim dnom. Posle inkubiranja od 10 minuta na sobnoj temperaturi, određivana je apsorbanca na 540 nm. Koncentracija nitrita određivana je na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorbanca očitanih za seriju

standardnih rastvora poznate koncentracije NaNO<sub>2</sub> (100, 50, 25, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 μM). Standardi su razblaženi u medijumu.

### **3.10. Statistička obrada rezultata**

Za obradu dobijenih rezultata korišćen je statistički paket SPSS for Windows (Release 13.0, Chicago, IL, USA). Pre testiranja numeričkih varijabli proveravan je tip distribucije. Normalnost raspodele podataka ispitivana je Shapiro–Wilkovim testom. Kod normalne raspodele podataka, za poređenje rezultata između grupa korišćena je jednofaktorska ANOVA, dok su razlike među grupama ispitane Tukey *post hoc* testom. U neparametrijskoj statistici gde raspodela podataka nije bila normalna korišćen je Mann Whitney U-test. Za najniži stepen značajnosti uzeta je vrednost verovatnoće  $p < 0.05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Antropometrijske karakteristike i dijetarni unos aktivnih sportistkinja i kontrolne grupe

#### 4.1.1. Opšte i antropometrijske karakteristike učesnica studije

Demografske i antropometrijske karakteristike ispitanica koje su uključene u studiju prikazane su u Tabeli 2. Sve učesnice studije su bile slične životne dobi. Sportistkinje su se bavile sportom više od 9 godina: 9.88 godina vaterpolistkinje i 9.1 godina fudbalerke. Distribucije telesne visine i indeksa telesne mase (BMI) se nisu značajno razlikovale između ispitivanih grupa, dok je telesna masa fudbalerki bila značajno niža ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa vaterpolistkinjama.

Tabela 2. Opšte karakteristike učesnica studije

Opšte karakteristike	Kontrolna grupa (n=14)	Grupa vaterpolistkinja (n=15)	Grupa fudbalerki (n=19)
Životno doba (godine)	23.67±1.56	21.71±4.5	21.19±2.45
Telesna visina (cm)	169.64±4.37	170.54±5.27	169.33±5.04
Telesna masa (kg)	62.66±8.20	67.59±6.53	62.74±4.77#
Indeks telesne mase BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.53±2.28	23.04±1.49	22.01±1.23
Sportski staž (godine)		9.88±2.10	9.12±1.98

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. # $p < 0.05$  značajna razlika u odnosu na grupu vaterpolistkinja. Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.*

Metodom bioelektrične impedance procenjeni su procenat telesnih masti, masa masnog tkiva, bezmasna masa tela i ukupna voda u organizmu, u sve tri ispitivane grupe. Svi ispitivani parametri su se razlikovali između sportistkinja i kontrolne grupe, a bilo je razlika i među samim sportistkinjama (tabela 3). Tako su ukupna voda i bezmasna masa tela bile značajno veće, a procenat masti značajno manji kod obe grupe sportistkinja u odnosu na kontrolnu grupu. Osim toga, masa masnog tkiva i procenat masti fudbalerki bili su značajno niži ( $p<0.01$ ;  $p<0.05$ ) i u odnosu na vaterpolistkinje.

Tabela 3. Antropometrijske karakteristike učesnica u studiji

	<b>Kontrolna grupa (n=14)</b>	<b>Grupa vaterpolistkinja (n=15)</b>	<b>Grupa fudbalerki (n=19)</b>
<b>Procenat masti (%)</b>	<b>25.50±4.31</b>	<b>23.43±3.76*</b>	<b>19.81±3.34***#</b>
<b>Masa masnog tkiva (kg)</b>	<b>16.24±4.60</b>	<b>15.94±4.08</b>	<b>12.45±2.38**##</b>
<b>Bezmasna masa tela (kg)</b>	<b>46.43±4.19</b>	<b>51.26±3.26**</b>	<b>50.29±4.16*</b>
<b>Ukupna voda TBW (kg)</b>	<b>34.00±3.07</b>	<b>37.51±2.40**</b>	<b>36.81±3.04*</b>

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \*  $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , #  $p<0.05$ , ##  $p<0.01$ , ###  $p<0.001$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.*



#### 4.1.2. Analiza dijetarnog upitnika

Dijetarni unos ispitanica određen je metodom za utvrđivanja stanja ishrane - Anketa o učestalosti uzimanja pojedinih namirnica (semi-quantified food frequency questionnaire-FFQ) za poslednja 3 meseca, i prikazan u Tabeli 4. Rezultati anketnih upitnika pokazali su da se ispitivane grupe ne razlikuju značajno, kako u ukupnom energetske unosu, tako ni u unosu proteina, ugljenih hidrata, masti i masnih kiselina.

Tabela 4. Dijetarni unos ispitivanih grupa

	<b>Kontrolna grupa (n=14)</b>	<b>Grupa vaterpolistkinja (n=15)</b>	<b>Grupa fudbalerki (n=19)</b>
<b>Energija (kcal/day)</b>	<b>2295.67±109.64</b>	<b>2417.09±108.48</b>	<b>2350.14±83.98</b>
<b>Proteini (% energije)</b>	<b>17.25 ±1.10</b>	<b>18.08±1.61</b>	<b>17.87±1.35</b>
<b>Ugljeni hidrati (% energije)</b>	<b>55.83±1.92</b>	<b>54.70±1.74</b>	<b>55.46±1.61</b>
<b>Masti (% energije)</b>	<b>30.80±1.08</b>	<b>30.08±1.77</b>	<b>30.32±1.34</b>
<b>Zasićene masne kiseline (% energije)</b>	<b>9.78±1.26</b>	<b>9.24±1.21</b>	<b>9.23±1.12</b>
<b>Mononezasićene masne kiseline (%energije)</b>	<b>9.94±1.19</b>	<b>9.91±1.53</b>	<b>9.87±1.42</b>
<b>Polinezasićene masne kiseline (% energije)</b>	<b>7.02±1.26</b>	<b>6.70±2.24</b>	<b>6.84±1.72</b>

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.*

#### 4.2. Krvna slika, sedimentacija, biohemijski parametri seruma, masnokiselinski profil fosfolipida plazme i eritrocita i procena aktivnosti elongaza i desaturaza i plazmi i eritrocitima ispitivanih grupa

Krvna slika i sedimentacija određivane su neposredno nakon vađenja krvi. Iako je bilo značajnih razlika u koncentraciji hemoglobina između fudbalerki i druge dve ispitivane grupe, sve vrednosti su se nalazile u okvirima referentnih (tabela 5).

Tabela 5. Vrednosti krvne slike i sedimentacije krvi ispitivanih grupa

Krvna slika i sedimentacija	Kontrolna grupa (n=14)	Grupa vaterpolistkinja (n=15)	Grupa fudbalerki (n=19)
LE ( $\times 10^9/L$ )	5.24±0.90	4.84±0.98	6.0±1.56
ER ( $\times 10^{12}/L$ )	4.29±0.29	4.18±0.38	4.34±0.30
HGB (g/L)	121.82±9.28	125.18±7.71	131.92±7.73***##
HCT (l/L)	0.37±0.02	0.36±0.03	0.37±0.02
MCV (fL)	86.52±3.11	87.02±4.29	86.34±3.69
MCH (pg)	29.62±1.92	30.36±1.78	30.43±1.58
MCHC (g/L)	340.75±17.12	348.47±12.27	352.27±5.48
PLT ( $\times 10^9/L$ )	242.25±30.86	243.38±31.26	242.84±42.05
SE	4.00±1.89	4.12±1.36	4.84±1.08

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , # $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.

#### 4.2.1. Biohemijski parametri seruma

Biohemijski parametri određivani su u serumu neposredno nakon vađenja krvi. Rezultati su pokazali da je bilo značajnih razlika u većini merenih parametara između ispitivanih grupa, ali i da su se koncentracije svih parametara nalazile u okvirima referentnih vrednosti (tabela 6).

Tabela 6. Vrednosti biohemijskih parametara krvi ispitivanih grupa

	<b>Kontrolna grupa (n=14)</b>	<b>Grupa vaterpolistkinja (n=15)</b>	<b>Grupa fudbalerki (n=19)</b>
<b>Glukoza (mmol/l)</b>	<b>4.17±0.32</b>	<b>4.82±0.82</b>	<b>4.07±0.27</b>
<b>TG (mmol/l)</b>	<b>0.82±0.29</b>	<b>0.73±0.37</b>	<b>0.58±.20*</b>
<b>HOL (mmol/l)</b>	<b>4.35±0.67</b>	<b>4.53±0.91*</b>	<b>3.94±0.60***#</b>
<b>HDL holesterol (mmol/l)</b>	<b>1.61±0.21</b>	<b>1.66±0.36</b>	<b>1.52±0.06</b>
<b>LDL holesterol (mmol/l)</b>	<b>3.10±0.93</b>	<b>2.56±0.72*</b>	<b>2.16±0.56***#</b>
<b>LDL/HDL</b>	<b>2.02±0.72</b>	<b>1.55±0.38**</b>	<b>1.43±0.38***</b>
<b>HOL/HDL</b>	<b>1.72±0.28</b>	<b>1.81±0.20</b>	<b>1.88±0.26</b>

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, #p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001. Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.*

#### 4.2.2. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida plazme ispitivanih grupa

Određivanjem masnokiselinskog profila u fosfolipidima plazme detektovano je prisustvo 13 masnih kiselina. One su podeljene u 3 grupe: zasićene masne kiseline, mononezasićene masne kiseline i polinezasićene masne kiseline.

##### 4.2.2.1. Zastupljenost zasićenih masnih kiselina u fosfolipidima plazme

Masnokiselinski profil zasićenih masnih kiselina fosfolipida plazme ispitivanih grupa prikazan je u Tabeli 7. Procenat palmitinske kiseline (16:0) bio je gotovo isti u svim grupama. Udeo stearinske kiseline (18:0) u grupi fudbalerki bio je značajno viši kako u odnosu na vaterpolistkinje ( $p < 0.01$ ) tako i u odnosu na kontrolu grupu ( $p < 0.05$ ). Takođe, grupa fudbalerki je imala i najviši udeo ukupnih zasićenih masnih kiselina koji je bio značajno viši samo u odnosu na grupu vaterpolistkinja ( $p < 0.05$ ).

Tabela 7. Procentualna zastupljenost zasićenih masnih kiselina fosfolipida plazme ispitivanih grupa

Masne kiseline (mol %)	Kontrolna grupa (n=14)	Grupa vaterpolistkinja (n=15)	Grupa fudbalerki (n=19)
16:0	27.72±1.60	27.67±1.83	27.72±1.59
18:0	15.31±1.42	15.22±1.07	16.47±1.12*##
SFA	43.03±1.47	42.88±1.90	44.19±1.52#

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \* $p < 0.05$ , # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.

#### 4.2.2.2. Zastupljenost mononezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima plazme

U fosfolipidima plazme detektovane su 3 mononezasićene masne kiseline: palmitoleinska (16:1n-7), oleinska (18:1n-9) i vakcenska (18:1n-7). U poređenju sa kontrolnom grupom i grupom vaterpolistkinja, fudbalerke su imale značajno viši ( $p < 0.001$ ) udeo oleinske kiseline i ukupnih mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) ( $p < 0.001$  i  $p < 0.01$ , redom) (tabela 8). Osim toga, grupa vaterpolistkinja je imala viši udeo ( $p < 0.05$ ) palmitoleinske kiseline u odnosu na kontrolnu grupu.

Tabela 8. Procentualna zastupljenost mononezasićenih masnih kiselina fosfolipida plazme ispitivanih grupa

Masne kiseline (mol %)	Kontrolna grupa (n=14)	Grupa vaterpolistkinja (n=15)	Grupa fudbalerki (n=19)
16:1 n-7	0.42±0.13	0.59±0.18*	0.52±0.18
18:1 n-9	9.03±1.03	8.85±1.56	10.42±1.21***###
18:1 n-7	1.23±0.21	1.45±0.22	1.46±0.26
MUFA	10.68±1.17	10.89±0.70	12.40±1.44***###

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ### $p < 0.01$ , #### $p < 0.001$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.

#### 4.2.2.3. Zastupljenost polinezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima plazme

Polinezasićene masne kiseline su zbog različite hemijske strukture podeljene u dve grupe: n-3 i n-6 PUFA, koje imaju veoma različito fiziološko dejstvo u organizmu. Iako su uočene razlike u sadržaju n-3 PUFA između kontrolne grupe i grupa sportistkinja, razlike

nisu bile statistički značajne. Sa druge strane, PUFA n-6 serije su se značajno razlikovale (tabela 9). Najniža procentualna zastupljenost LA (18:2 n-6), ukupnih i n-6 PUFA, pokazana je kod fudbalerki. Tako je udeo LA bio značajno niži ( $p < 0.01$ ) u odnosu na kontrolnu grupu, a udeo n-6 PUFA i u odnosu na kontrolnu ( $p < 0.01$ ) i grupu vaterpolistkinja ( $p < 0.05$ ). Udeo ukupnih PUFA bio je značajno niži ( $p < 0.001$ ) kod fudbalerki u odnosu na druge dve grupe ispitanica. Međutim, procenat AA (20:4 n-6) bio je viši kod obe grupe sportistkinja, ali značajno samo u grupi vaterpolistkinja u poređenju sa kontrolnom grupom ( $p < 0.05$ ).

Tabela 9. Procentualna zastupljenost polinezasićenih masnih kiselina fosfolipida plazme ispitivanih grupa

<b>Masne kiseline (mol %)</b>	<b>Kontrolna grupa (n=14)</b>	<b>Grupa vaterpolistkinja (n=15)</b>	<b>Grupa fudbalerki (n=19)</b>
<b>18:2 n-6</b>	<b>27.89±2.48</b>	<b>25.60±3.02</b>	<b>25.06±2.04**</b>
<b>20:3 n-6</b>	<b>2.66±0.68</b>	<b>2.76±0.78</b>	<b>2.46±0.65</b>
<b>20:4 n-6</b>	<b>10.96±1.60</b>	<b>12.44±1.89*</b>	<b>11.50±1.25</b>
<b>22:4 n-6</b>	<b>0.56±0.15</b>	<b>0.71±0.25</b>	<b>0.61±0.24</b>
<b>n-6</b>	<b>42.06±1.78</b>	<b>41.51±2.47</b>	<b>39.63±1.90**#</b>
<b>18:3 n-3</b>	<b>0.11±0.10</b>	<b>0.15±0.12</b>	<b>0.14±0.10</b>
<b>20:5 n-3</b>	<b>0.28±0.21</b>	<b>0.36±0.26</b>	<b>0.30±0.20</b>
<b>22:5 n-3</b>	<b>0.59±0.19</b>	<b>0.77±0.30</b>	<b>0.66±0.19</b>
<b>22:6 n-3</b>	<b>3.26±1.33</b>	<b>3.30±1.34</b>	<b>2.68±0.73</b>
<b>n-3</b>	<b>4.23±1.70</b>	<b>4.58±1.88</b>	<b>3.78±0.98</b>
<b>n-6/n-3</b>	<b>11.27±4.11</b>	<b>10.76±4.89</b>	<b>11.13±2.78</b>
<b>PUFA</b>	<b>46.29±1.72</b>	<b>46.10±2.23</b>	<b>43.41±1.78***###</b>

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , # $p < 0.05$ , ### $p < 0.001$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.*

#### 4.2.2.4. Procenjena aktivnost desaturaza i elongaza u plazmi

Aktivnost sistema desaturaza i elongaza u plazmi nije direktno merena već je procenjena kao odnos pojedinih masnih kiselina (tabela 10). Procenjene aktivnosti ovih enzima nisu se značajno razlikovale između 3 ispitivane grupe.

Tabela 10. Procenjena aktivnost desaturaza i elongaza plazme ispitivanih grupa

<b>Desaturaze i elongaze u plazmi</b>	<b>Kontrolna grupa (n=14)</b>	<b>Grupa vaterpolistkinja (n=15)</b>	<b>Grupa fudbalerki (n=19)</b>
<b>Δ 9 desaturaza (18:1n-9/18:0)</b>	<b>0.59±0.13</b>	<b>0.57±0.07</b>	<b>0.63±0.09</b>
<b>Δ 6 desaturaza i elongaza (20:3n-6/18:2n-6)</b>	<b>0.10±0.03</b>	<b>0.11±0.04</b>	<b>0.10±0.03</b>
<b>Δ 5 desaturaza (20:4n-6/20:3n-6)</b>	<b>4.33±1.14</b>	<b>4.78±1.40</b>	<b>5.00±1.39</b>
<b>elongaza (18:0/16:0)</b>	<b>0.56±0.07</b>	<b>0.55±0.06</b>	<b>0.60±0.06</b>

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija.*

### 4.2.3. Analiza masnokiselinskog profila fosfolipida eritrocita ispitivanih grupa

#### 4.2.3.1. Zastupljenost zasićenih masnih kiselina u fosfolipidima eritrocita

Procentualna zastupljenost zasićenih masnih kiselina fosfolipida eritrocita u ispitivanim grupama prikazana je u Tabeli 11. Grupa vaterpolistkinja je imala značajno viši procenat palmitinske kiseline u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.001$ ) i grupu fudbalerki ( $p < 0.01$ ) i značajno niži ( $p < 0.01$ ) procenat stearinske kiseline u odnosu na druge dve grupe ispitanica. Takođe, procenat 16:0 razlikovao se značajno ( $p < 0.05$ ) i između grupe fudbalerki i kontrolne grupe u kojoj je bio najniži.

Tabela 11. Procentualna zastupljenost zasićenih masnih kiselina fosfolipida eritrocita ispitivanih grupa

Masne kiseline (mol %)	Kontrolna grupa (n=14)	Grupa vaterpolistkinja (n=15)	Grupa fudbalerki (n=19)
16:0	23.39±0.40	26.46±0.56***	24.77±1.61*##
18:0	18.73±1.38	17.14±0.63**	18.68±0.82##
SFA	42.12±1.31	43.60±1.01	43.44±1.73

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , ## $p < 0.01$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.

#### 4.2.3.2. Zastupljenost mononezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima eritrocita

Rezultati analize masnokiselinskog profila mononezasićenih masnih kiselina fosfolipida eritrocita ispitivanih grupa, pokazali su da su najviši udeo oleinske kiseline i ukupnih MUFA, imale fudbalerke, ali da je njihov udeo značajno viši samo u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$ ) (tabela 12). Sa druge strane najviši udeo palmitoleinske



kiseline (16:1 n-7) imala je grupa vaterpolistinja, koji je bio značajno viši kako u poređenju sa kontrolnom grupom ( $p < 0.01$ ) tako i u poređenju sa grupom fudbalerki ( $p < 0.001$ ). Zastupljenost vakuenske kiseline (18:1n-7) nije se značajno razlikovala u eritrocitima različitih grupa.

Tabela 12. Procentualna zastupljenost mononezasićenih masnih kiselina fosfolipida eritrocita ispitivanih grupa

Masne kiseline (mol %)	Kontrolna grupa (n=14)	Grupa vaterpolistkinja (n=15)	Grupa fudbalerki (n=19)
16:1 n-7	0.33±0.10	0.50±0.09**	0.23±0.07###
18:1 n-9	14.08±0.70	14.84±0.48	15.60±1.36**
18:1 n-7	1.52±0.16	1.64±0.28	1.60±0.21
MUFA	15.97±0.72	16.98±0.45	17.42±1.44*

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.

#### 4.2.3.3. Zastupljenost polinezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima eritrocita

Analiza polinezasićenih masnih kiselina fosfolipida eritrocita pokazala je značajno nižu ( $p < 0.05$ ) zastupljenost n-6 PUFA i ukupnih PUFA u obe grupe sportistkinja u odnosu na kontrolnu grupu (tabela 13). Međutim, od pojedinačnih n-6 PUFA, jedino je udeo dihomog- $\gamma$ -linolenske kiseline (DGLA, 20:3 n-6) bio značajno niži kod sportistkinja nego u eritrocitima kontrolne grupe, dok je zastupljenost ostalih n-6 PUFA (LA, AA i DTA) bila slična kod sve tri ispitivane grupe. Što se tiče n-3 PUFA udeo i ukupnih i pojedinačnih n-3 PUFA u eritrocitima nije se značajno razlikovao po grupama. Izuzetak je bila  $\alpha$ -linolenska kiselina

(ALA, 18:3 n-3) čiji je procenat kod fudbalerki bio značajno viši ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa kontrolom.

Tabela 13. Procentualna zastupljenost polinezasićenih masnih kiselina fosfolipida eritrocita ispitivanih grupa

<b>Masne kiseline (mol %)</b>	<b>Kontrolna grupa (n=14)</b>	<b>Grupa vaterpolistkinja (n=15)</b>	<b>Grupa fudbalerki (n=19)</b>
<b>18:2 n-6</b>	<b>14.22±0.87</b>	<b>14.27±0.75</b>	<b>14.74±1.09</b>
<b>20:3 n-6</b>	<b>2.57±0.78</b>	<b>1.98±0.24*</b>	<b>1.46±0.32***#</b>
<b>20:4 n-6</b>	<b>15.32±0.68</b>	<b>14.47±0.68</b>	<b>14.54±1.75</b>
<b>22:4 n-6</b>	<b>4.00±0.78</b>	<b>3.64±0.13</b>	<b>3.50±0.71</b>
<b>n-6</b>	<b>36.12±1.12</b>	<b>34.36±0.83*</b>	<b>34.14±2.35*</b>
<b>18:3 n-3</b>	<b>0.11±0.09</b>	<b>0.13±0.06</b>	<b>0.26±0.19*</b>
<b>20:5 n-3</b>	<b>0.25±0.10</b>	<b>0.20±0.05</b>	<b>0.32±0.18</b>
<b>22:5 n-3</b>	<b>1.45±0.26</b>	<b>1.17±0.16</b>	<b>1.35±0.36</b>
<b>22:6 n-3</b>	<b>4.01±0.89</b>	<b>3.54±0.64</b>	<b>3.11±0.83</b>
<b>n-3</b>	<b>5.81±1.09</b>	<b>5.06±0.58</b>	<b>5.04±1.25</b>
<b>n-6/n-3</b>	<b>6.49±1.77</b>	<b>6.89±0.89</b>	<b>7.09±1.55</b>
<b>PUFA</b>	<b>41.93±1.02</b>	<b>39.42±0.88*</b>	<b>39.18±3.00*</b>

*Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija. \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , # $p < 0.05$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.*

#### 4.2.3.4. Procenjena aktivnost desaturaza i elongaza u eritrocitima

U Tabeli 14. je prikazana procenjena aktivnost desaturaza i elongaza u eritrocitima ispitivanih grupa. Procenjena aktivnost  $\Delta 5$ -desaturase (koja se izračunava se kao odnos 20:4n-6/20:3n-6) u eritrocitima je bila značajno viša kod fudbalerki nego u dve ostale grupe. Takođe, obe grupe sportiskinja pokazale su nižu procenjenu aktivnost  $\Delta 6$ -desaturase (20:3n-6/18:2n-6) i elongaze u eritrocitima u odnosu na kontrolnu grupu, pri čemu je aktivnost  $\Delta 6$ -desaturase i elongaze bila niža kod fudbalerki i u poređenju sa vaterpolistkinjama ( $p < 0.05$ ). Odnos 18:1 / 18:0 u eritrocitima, kao mera aktivnosti  $\Delta 9$ -desaturaze, bio je značajno viši u grupi vaterpolistkinja u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.05$ ), dok je aktivnost elongaze bila je niža kod vaterpolistkinja u poređenju sa druge dve grupe ispitanica ( $p < 0.05$ ).

Table 14. Procenjena aktivnost desaturaza i elongaza u eritrocitima ispitanica

Desaturaze i elongaze u eritrocitima	Kontrolna grupa (n=14)	Grupa vaterpolistkinja (n=15)	Grupa fudbalerki (n=19)
$\Delta 9$ desaturaza (18:1n-9/18:0)	0.84±0.09	0.96±0.05*	0.92±0.10
$\Delta 6$ desaturaza i elongaza (20:3n-6/18:2n-6)	0.18±0.05	0.14±0.02*	0.10±0.02***#
$\Delta 5$ desaturaza (20:4n-6/20:3n-6) elongaza (18:0/16:0)	6.48±2.17	7.40±0.92	10.15±1.48***##
	0.80±0.06	0.65±0.02*	0.76±0.06#

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.

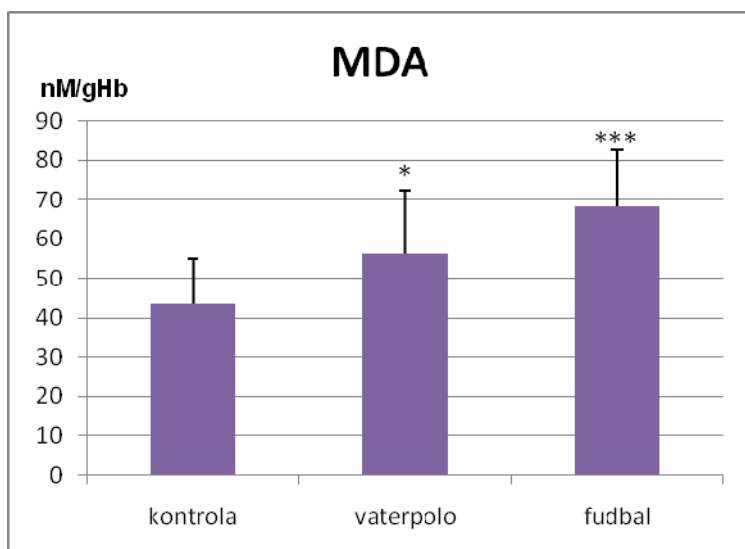
### **4.3. Redoks promene u plazmi i eritrocitima kod aktivnih sportistkinja i kontrolne grupe**

#### **4.3.1. Parametri oksidativnog stresa**

Poznato je da intenzivna fizička aktivnost dovodi do veće produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  i  $\cdot OH$ ) kao i do povećane produkcije azot oksida u organizmu. ROS mogu reagovati sa proteinima, lipidima i DNK i dovesti do oštećenja ćelija. Zbog toga je jedan od ciljeva našeg istraživanja bio odrediti koncentraciju  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , nitrita ( $NO_2^-$ ) kao meru proizvodnje NO, kao i TAS koji predstavlja ukupnu koncentraciju antioksidativnih jedinjenja u organizmu, u plazmi. Osim toga, određivali smo i MDA kao stepen lipidne peroksidacije u eritrocitima.

##### **4.3.1.1. Lipidna peroksidacija**

Koncentracija malondialdehida, krajnjeg proizvoda lipidne peroksidacije, određivana je u eritrocitima ispitanica i rezultati su prikazani na grafiku 1. Dobijeni rezultati su pokazali značajno veću koncentraciju MDA kod vaterpolistkinja ( $p < 0.05$ ) i fudbalerki ( $p < 0.001$ ) u odnosu na kontrolnu grupu. Takođe, nisu nađene značajne razlike u koncentracijama MDA između vaterpolistinja i fudbalerki.

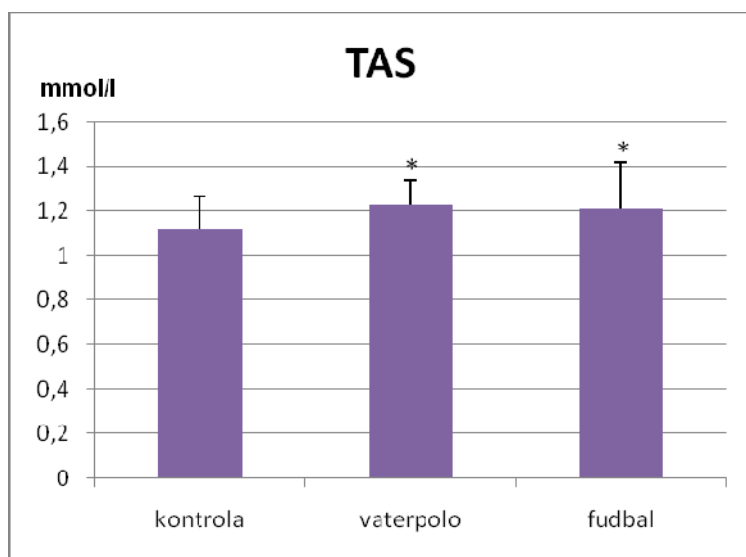


Grafik 1. Koncentracija malondialdehida u eritrocitima.

Vrednosti su predstavljene kao  $X \pm SD$ . \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu.  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom

#### 4.3.1.2. Ukupni antioksidativni status

Merenjem ukupnog antioksidativnog statusa u plazmi pokazano je da obe grupe sportistkinja imaju značajno viši ( $p < 0.05$ ) nivo TAS u odnosu na kontrolnu grupu, kao i da ne postoje značajne razlike u nivou TAS između dve grupe sportistkinja (grafik 2).

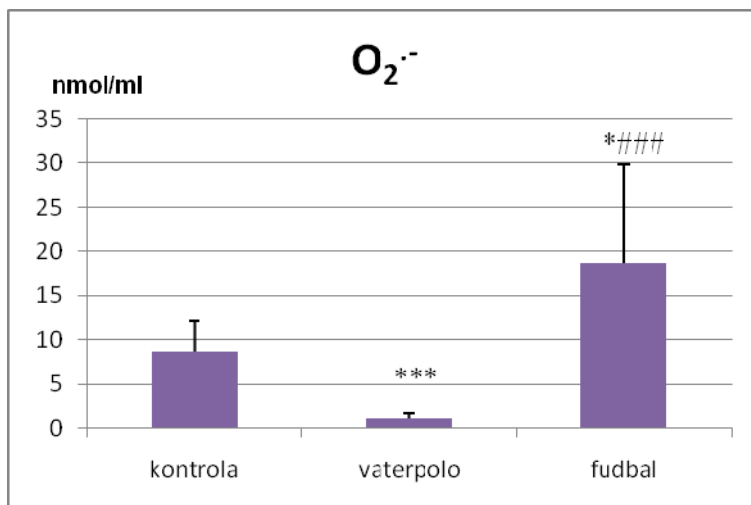


Grafik 2. Koncentracija TAS u plazmi

Vrednosti su predstavljene kao  $X \pm SD$ . \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja.  $*p < 0.05$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.

#### 4.3.1.3. Superoksid anjon radikal

Koncentracija superoksid anjon radikala u plazmi sportistkinja i kontrolne grupe prikazana je na grafiku 3. Dok je grupa fudbalerki imala viši nivo  $O_2^-$  kako u odnosu na kontrolnu ( $p < 0.05$ ) tako i u odnosu na grupu vaterpolistkinja ( $p < 0.001$ ), vaterpolistkinje su imale najniži nivo  $O_2^-$ , koji je bio značajno niži ( $p < 0.05$ ) i u odnosu na kontrolnu grupu.

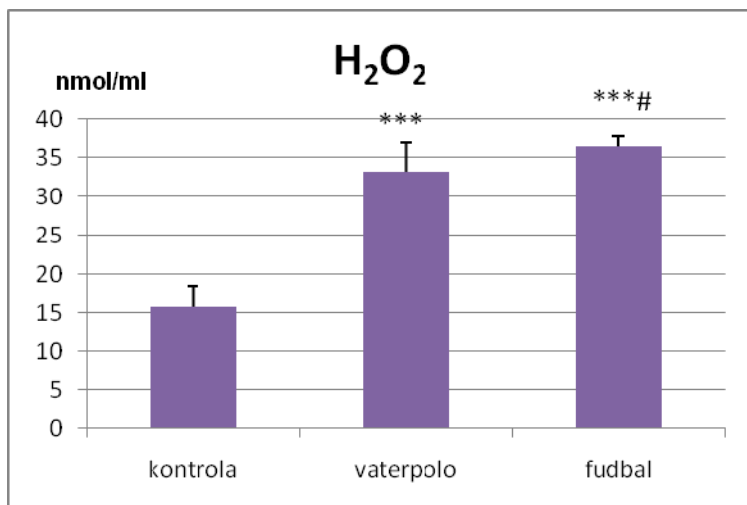


Grafik 3. Koncentracija superoksid anjon radikala u plazmi ispitivanih grupa

Vrednosti su predstavljene kao  $X \pm SD$ . \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , #####  $p < 0.001$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.

#### 4.3.1.4. Vodonik peroksid

Za razliku od  $O_2^{\cdot-}$ , koncentracija  $H_2O_2$  u plazmi bila je značajno viša ( $p < 0.001$ ) kod obe grupe sportistkinja u odnosu na kontrolnu grupu (grafik 4). Poredeći rezultate između grupa sportistkinja, koncentracija  $H_2O_2$  bila je značajno viša kod fudbalerki ( $p < 0.05$ ) nego kod vaterpolistkinja.



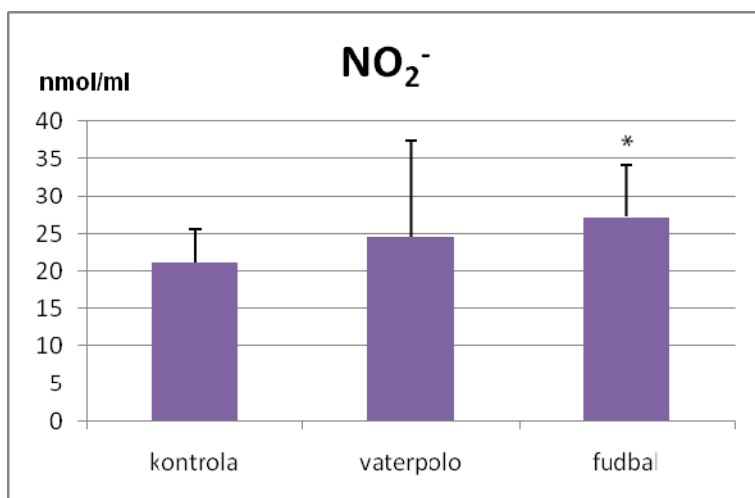
Grafik 4. Koncentracija vodonik-peroksida u plazmi ispitivanih grupa.

Vrednosti su predstavljene kao  $X \pm SD$ . \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \*  $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ , ###  $p < 0.001$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.

#### 4.3.1.5. Nitriti

Redovna fizička aktivnost dovodi do povećanja bazalne proizvodnje azot monoksida u endotelnim ćelijama. U ovom radu je koncentracija nitrita u plazmi merena kao stepen produkcije NO u endotelijalnim ćelijama. Najviša koncentracija NO<sub>2</sub><sup>-</sup> izmerena je u grupi fudbalerki, ali je statistički značajno bila viša samo u odnosu na kontrolnu grupu ( $p < 0.05$ ) (grafik 5).





Grafik 5. Koncentracija nitrita u plazmi sportistkinja i kontrolne grupe

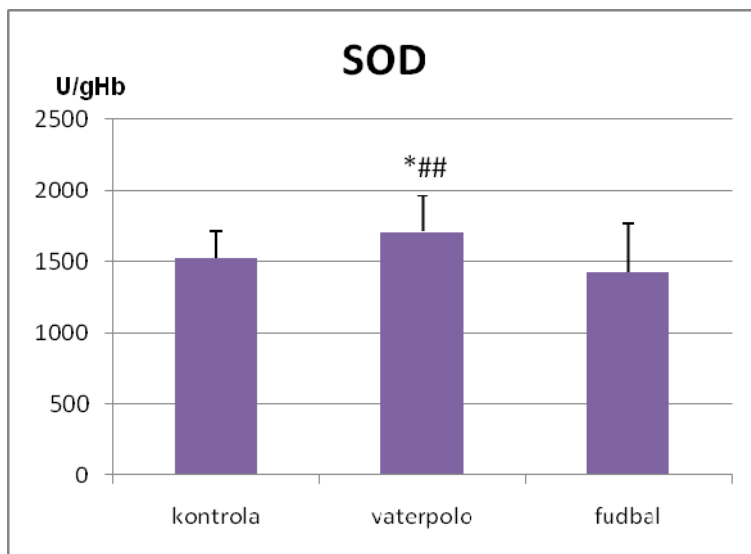
Vrednosti su predstavljene kao  $X \pm SD$ . \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \* $p < 0.05$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.

#### 4.3.2. Aktivnost enzima antioksidativne odbrane u eritrocitima sportistkinja i kontrolne grupe

Enzimi antioksidativne odbrane (SOD, CAT i GSH-Px) koji predstavljaju prvu liniju odbrane od ROS, prisutni su u gotovo svim ćelijama a u eritrocitima je njihova aktivnost veća i do 2 puta nego u ostalim ćelijama. Njihova uloga je da redukuju ROS do vode i kiseonika i tako štite organizam od mogućeg štetnog dejstva slobodnih radikala.

##### 4.3.2.1. Aktivnost superoksid dismutase

Aktivnost superoksid dismutaze u eritrocitima bila je značajno veća kod vaterpolistkinja u poređenju kako sa kontrolnom grupom ( $p < 0.05$ ) tako i sa grupom fudbalerki ( $p < 0.01$ ) (grafik 6).

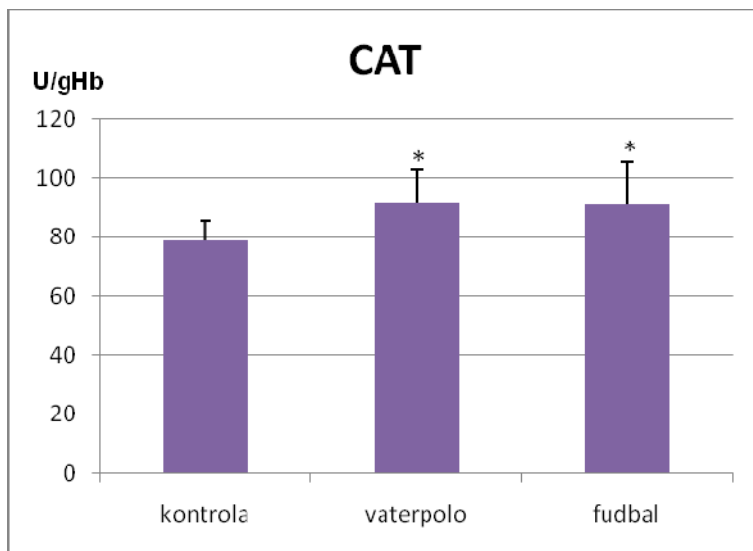


Grafik 6. Aktivnost superoksid dismutaze u eritrocitima

Vrednosti su predstavljene kao  $X \pm SD$ . \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \* $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.

#### 4.3.2.2. Aktivnost katalaze

Rezultati određivanja aktivnosti katalaze (grafik 7) u eritrocitima ispitivanih grupa, pokazali su značajno veću aktivnost CAT u obe grupe sportistkinja ( $p < 0.05$ ) u poređenju sa kontrolnom grupom, dok se među sportistkinjama nije razlikovala.

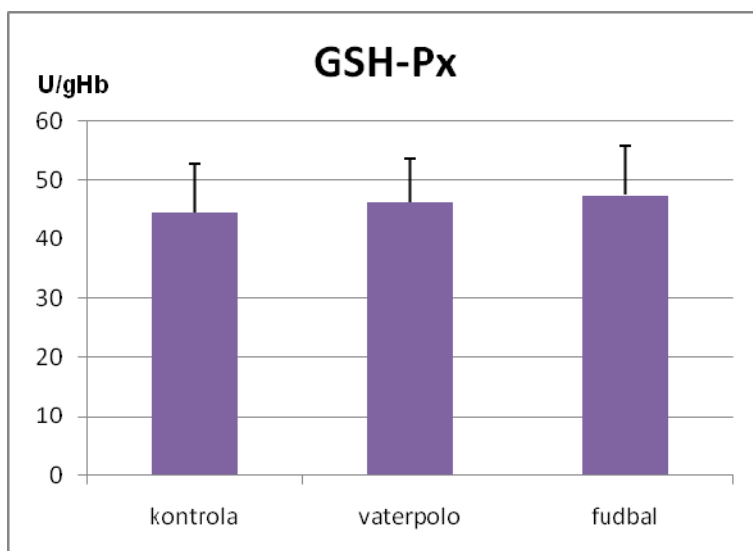


Grafik 7. Aktivnost katalaze u eritrocitima ispitivanih grupa

Vrednosti su predstavljene kao  $X \pm SD$ . \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja.  $*p < 0.05$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.

#### 4.3.2.3. Aktivnost glutathion peroksidaze

Za razliku od aktivnosti drugih enzima antioksidativne odbrane u eritrocitima, aktivnost glutathion peroksidaze (grafik 8) nije se značajno razlikovala između ispitivanih grupa.



Grafik 8. Aktivnost glutation peroksidaze u eritrocitima ispitivanih grupa  
*Vrednosti su predstavljene kao  $X \pm SD$ .*

#### **4.4. Efekat fizičke aktivnosti na aktivnost mononuklearnih ćelija periferne krvi i produkciju $O_2^-$ i NO u njima kod ispitanica ženskog pola**

Jedan od ciljeva našeg istraživanja je bio da utvrdimo da li aktivno bavljenje sportom kod žena povećava produkciju  $O_2^-$  u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, obzirom da je pokazano da neki stimulus koji nastaju tokom vežbanja dovode do povećane aktivnosti NADPH-oksidaze koja redukuje kiseonik do  $O_2^-$ . Osim toga, mononuklearne ćelije (MNC) proizvode i NO kao odgovor na infekciju, ali i kao odgovor na različite inflamatorne citokine, a mi smo takođe ispitivali da li do povećane produkcije NO u MNC dolazi i usled dugotrajne fizičke aktivnosti.

##### **4.4.1. Aktivnost mononuklearnih ćelija periferne krvi ispitivanih grupa**

Analiza aktivnosti mononuklearnih ćelija periferne krvi, pomoću MTT testa, pokazala je značajno veću aktivnost na početku eksperimenta kod vaterpolistkinja u odnosu na kontrolnu grupu ( $p=0.014$ ) (tabela 15). Inicijalna metabolička aktivnost u MTT testu bila je

2,5 puta viša kod vaterpolistkinja u odnosu na kontrolnu grupu. Nakon 24 časovne inkubacije aktivnost/broj ćelija vaterpolistkinja u MTT je pala na 62% od inicijalne vrednosti. Iako je aktivnost kontrolne grupe pala za svega 15% ona je u apsolutnim vrednostima bila 2 puta manja od vrednosti koje su imale ćelije sportistkinja.

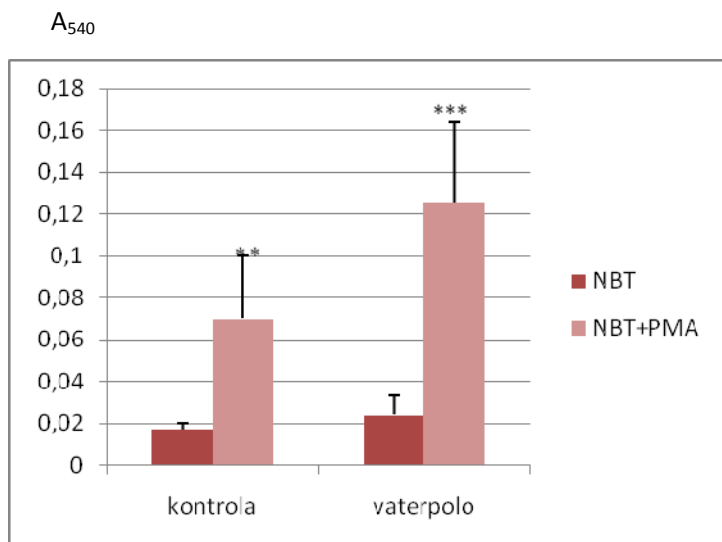
Tabela 15. Metabolička aktivnost mononuklearnih ćelija ispitivanih grupa nakon 24 h inkubacije sa i bez stimulatora (LPS)

t	Kontrolna grupa (n=14)	Grupa vaterpolistkinja (n=15)	P
t <sub>0</sub>	0.62 (0.48-0.96)	1.61 (1.08-2.27)	0.014
t 24h	0.55 (0.46-0.73)	1.06 (0.48-1.55)	0.048
t 24h+LPS	0.55 (0.34-0.56)	1.03 (0.61-1.56)	0.005

Vrednosti  $A_{540}$  su predstavljene kao medijana. Korišćen je neparametrski Mann Whitney U-test.

#### 4.4.2. Produkcija superoksid anjon radikala u mononuklearnim ćelijama periferne krvi ispitivanih grupa

Respiratorni prasak mononuklearnih ćelija periferne krvi određivan je citohemijskim testom za respiratorni prasak na osnovu sposobnosti ćelija da redukuju NBT do formazana. Do redukcije NBT dolazi u reakciji boje i  $O_2^-$  koji nastaje u ćelijama redukcijom  $O_2$  pod dejstvom NADPH-oksidade. Isti broj ćelija sportistkinja i devojaka koje se ne bave sportom je zasejano u bunarčice. Rezultati merenja respiratornog praska pokazali su da nije bilo značajnih razlika u nivou  $O_2^-$  između kontrolne grupe i grupe vaterpolistkinja (grafik 9). Povećanje produkcije  $O_2^-$  sa PMA bilo je na isti način stimulirano kod kontrole i sportistkinja, ali je kod nekoliko sportistkinja bilo čak 30 puta veće.



Grafik 9. Produkcija superoksid anjon radikala u mononuklearnim ćelijama ispitivanih grupa sa i bez stimulatora (PMA)

Vrednosti su predstavljene kao  $X \pm SD$ . \*predstavlja značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu, # predstavlja značajnu razliku u odnosu na grupu vaterpolistkinja. \* $p < 0.05$ . Korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom.

#### 4.4.3. Produkcija azot monoksida u mononuklearnim ćelijama periferne krvi ispitivanih grupa

Poznato je da inflamatorni citokini mogu stimulisati leukocite, pre svega mononuklearne fagocite i neutrofile da proizvode NO. Da li i u kojoj meri višegodišnja fizička aktivnost utiče na produkciju NO u leukocitima nije sasvim jasno. Mi smo određivali NO produkciju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, određujući akumulaciju nitrita u 24 časovnoj kulturi supernatanta ćelija. Naši rezultati su pokazali da se proizvodnja NO nije značajno razlikovala između ispitivanih grupa, ali su na stimulaciju LPS-om ćelije kontrolne grupe odgovorile smanjenom produkcijom. LPS stimulacija nije uticala na proizvodnju NO u ćelijama sportistkinja (tabela 16).

Tabela 16. Produkcija nitrita u monocitima ispitivanih grupa sa i bez stimulatora (LPS)

	<b>Kontrolna grupa (n=14)</b>	<b>Grupa vaterpolistkinja (n=15)</b>	<b>P</b>
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>(μM)</b>	<b>5.5 (3.3-4.5)</b>	<b>3.2 (1.2-6.1)</b>	<b>0.09</b>
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+LPS (μM)</b>	<b>2.2 (0.3-3.0)</b>	<b>4.5 (1.2-8.6)</b>	<b>0.026</b>

*Vrednosti su predstavljene kao medijana. Korišćen je neparametriski Mann Whitney U-test.*

## 5. DISKUSIJA

Intenzivna fizička aktivnost utiče na metabolizam lipida, dovodi do promena u iskorišćenju MK kao energetskog supstrata, do mobilizacije masnokiselinskih rezervi iz masnog tkiva i do prometa lipida između organa i tkiva. Dugotrajno intenzivno vežbanje dovodi do povećanja nivoa polinezasićenih masnih kiselina u masnom tkivu i povećava kapacitet skeletnih i srčanog mišića da oksiduju MK (Ney i sar., 2009).

Tokom intenzivnog vežbanja dolazi do povećanja potrošnje kiseonika u mišićima, srcu, jetri i drugim tkivima, i produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) koji mogu dovesti do oštećenja svih ćelijskih makromolekula uključujući lipide, proteine i nukleinske kiseline. Antioksidativni enzimi mogu biti aktivirani selektivno tokom akutnog vežbanja, u zavisnosti od izloženosti tkiva oksidativnom stresu kao i od unutrašnjeg sistema antioksidativne zaštite (Powers i Jackson, 2008). Superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza, predstavljaju primarnu odbranu organizma od oksidativnog stresa tokom vežbanja (Dékány i sar., 2006).

Eritrociti su posebno osetljivi na oksidativni stres zbog stalne izloženosti dejstvu ROS koji se konstantno generišu u samim eritrocitima i u cirkulaciji u normalnim fiziološkim uslovima, a u velikoj meri mogu biti meta oksidativnog oštećenja tokom intenzivnog vežbanja. Oni sadrže Cu-Zn-SOD, CAT i Se zavisnu GSH-Px, tj. veoma visoki sistem antioksidativne zaštite, čija aktivnost može biti veća u odnosu na mnoga druga tkiva u organizmu (Nikolić-Kokić i sar., 2006). Osim toga, dosadašnja saznanja govore da fizička aktivnost izaziva značajne fiziološke promene u imunom sistemu, u zavisnosti od tipa, intenziteta i trajanja vežbanja (Wang i sar., 2006). Glavni izvor imuno inflamatornih medijatora su monociti koji predstavljaju i prvu liniju odbrane protiv napada patogena (Wang i sar., 2006). Naporno akutno vežbanje može izazvati monocitozu i sistemsku endotoksemiju a pokazano je da su aktivirani monociti tokom intenzivnog vežbanja izvor povećane koncentracije proinflamatornih citokina (Rhind i sar., 2001).

U ovom radu je ispitivano kako sportovi sa različitim uticajem na aerobni i anaerobni metabolizam mišića utiču na metabolizam masnih kiselina, parametre oksidativnog stresa i funkciju imunog sistema kod aktivnih sportistkinja.



Sve učesnice u našoj studiji bile su sličnih opštih i antropometrijskih karakteristika. Međutim, procenat masti i masa masnog tkiva su značajno niži a procenat vode i mišićnog tkiva su značajno viši kod sportistkinja nego kod kontrolne grupe, što je posledica intenzivne, dugogodišnje fizičke aktivnosti.

Analiza dijetarnog upitnika je pokazala veoma sličan unos energije i makronutrijenata, mada bi se očekivalo da je taj unos značajno veći kod sportistkinja s obzirom na znatno veću potrošnju. Sve ispitanice se hrane na način tipičan za naše podneblje, gde je unos masti preko 30% ukupnog energetskeg unosa.

S obzirom da su sve ispitanice bile zdrave, svi ispitivani biohemijski parametri su u granicama referentnih vrednosti. Međutim, značajne razlike u većini parametara ipak postoje. Sportistkinje imaju bolji lipidni profil, tj. niže vrednosti triglicerida, holesterola i LDL-holesterola, što je direktna posledica fizičke aktivnosti. HDL-holesterol je isti u svim grupama, iako prema podacima iz literature fizička aktivnost i vežbanje povećavaju nivo HDL (Durstine i sar., 2001). Ipak naši rezultati nisu pokazali značajan porast HDL kod vrhunskih sportistkinja.

Postoje vrlo ograničeni podaci o masnokiselinskom profilu fosfolipida seruma i eritrocita kod aktivnih sportista oba pola, tako da naši podaci mogu doprineti razumevanju kako su profesionalne sportistkinje prilagođene redovnom i dugotrajnom treningu. Osim toga, studija o masnokiselinskom sastavu FL plazme i eritrocita može doprineti razumevanju u kolikoj meri vrsta fizičke aktivnosti, ali i nutritivni činioci, mogu uticati na svojstva bioloških membrana a time i na fizičke performanse sportistkinja.

Rezultati našeg istraživanja pokazali su slične MK profile FL plazme između vaterpolistkinja i kontrolne grupe, ali znatno različit MK profil u plazmi fudbalerki. Dok je procenat palmitinske kiseline bilo sličan u svim ispitivanim grupama, fudbalerke su imale značajno više nivoa stearinske kiseline i ukupnih SFA u fosfolipidima plazme u odnosu na vaterpolo i kontrolnu grupu. Malo studija je pokazalo značajne razlike između masnokiselinskog profila fosfolipida plazme elitnih sportista i kontrolne-neaktivne grupe. Ipak naša ranija studija (Tepšić i sar., 2009) u kojoj smo ispitivali uticaj hroničnog vežbanja na MK profil fosfolipida plazme kod muškaraca, pokazala je razlike u ukupnim SFA između sportista i kontrolne grupe, dok su Anderson i saradnici (2000) pokazali niži nivo palmitinske kiseline (16:0) u fosfolipidima seruma i estara holesterola kod sportista.

Međutim, oni su takođe otkrili veći procenat stearinske kiseline u FL mišića sportista u poređenju sa muškarcima koji nisu bili fizički aktivni a bili su na osmonedeljnom tretmanu ishrane sa sličnim sadržajem MK. Ti rezultati sugerišu da je intenzivni trening doveo do povećane endogene sinteze stearinske kiseline u mišićima. Animalni modeli takođe su pokazali razliku između treniranih i netreniranih pacova (Nikolaidis i sar., 2004). Ipak, do sada nije bilo studija koje su ispitivale MK profil FL plazme kod vrhunskih sportistkinja, tako da se gore navedeni podaci ne mogu u potpunosti koristiti za poređenje sa našim rezultatima. Naime na MK profil osim fizičke aktivnosti utiču i nutritivni i hormonski činioci. Status zasićenih masnih kiselina u plazmi zavisi od endogene sinteze i unosa hranom. Međutim, naši rezultati pokazuju da metabolizam MK zavisi i od tipa sporta tj. da različiti sportovi mogu uticati na endogenu sintezu različitih MK. Iako je povećana relativna koncentracija SFA pozitivno povezana s razvojem dijabetesa (Ristić-Medić i sar., 2006), kardiovaskularnim bolestima (Skidmore i sar., 2010) i kancerom (Cvetković i sar., 2010), ovaj efekat se može pripisati palmitinskoj kiselini pre nego stearinskoj kiselini, koja čak ima i kardioprotektivni efekat (Kelly i sar., 2001) i smanjuje rizik od nastanka kancera (Evans i sar., 2009). Zbog toga ne možemo reći da viši nivo SFA kod fudbalerki može imati negativan uticaj na opšte zdravstveno stanje ovih sportistkinja, s obzirom da je kod njih povećan udeo protektivne stearinske kiseline.

Nadalje, utvrdili smo značajno viši nivo oleinske kiseline i ukupnih MUFA u fosfolipidima plazme kod fudbalerki u poređenju sa vaterpolistkinjama i kontrolnom grupom. Za razliku od naših rezultata, literaturni podaci govore da nema značajnih promena u nivou MUFA u PL plazme između sportista i neaktivnih muškaraca (Tepšić i sar., 2009; Andersson i sar., 2000; Andersson i sar., 1998). Veći procenat oleinske kiseline i MUFA ima protektivni efekat na bolesti srca i koronarnih arterija (Haug i sar., 2007). Da li je treniranje fudbala i u kolikoj meri uticalo na sintezu mononezasićenih masnih kiselina ne možemo sa sigurnošću tvrditi, ali naši rezultati, obzirom da nismo pokazali razliku u unosu ovih MK između ispitivanih grupa, idu u prilog ovakvoj tvrdnji. Imajući u vidu povećanje i njenog prekursora 18:0, moguće je da je i konverzija 18:0 u 18:1 značajno povećana kod fudbalerki. Takođe, studije sa kojima smo poredili naše rezultate odnose se na muškarce, tako da se razlike među polovima i uticaj estrogena na MK profil ne može zanemariti.

U skladu s povećanim nivoima SFA i MUFA u FL plazme, fudbalerke su u našem istraživanju imale značajno nižu procentualnu zastupljenost ukupnih PUFA ali i linolne kiseline (18:2 n-6) i n-6 PUFA u odnosu na vaterpolo i kontrolnu grupu. Za razliku od naših rezultata, Andersson i saradnici (2000) nisu pronašli nikakav uticaj hroničnog aerobnog vežbanja na PUFA sadržaj u FL plazme, a Tepsic i sar. (2009) su pokazali povećanje DGLA (20:3n-6) kod profesionalnih fudbalera i ukupnih PUFA, DTA (22:4 n-6) i AA kod košarkaša. Analiza PUFA u plazmi kod vaterpolistkinja pokazala je veći procenat AA u odnosu na fudbalerke i kontrolnu grupu. Uloga AA u organizmu je višestruka a između ostalog AA i eikozanopentaenska kiselina (EPA, 20:5 n-3) su prekursori eikozanoida. EPA je prekursor antiinflamatornih eikozanoida: PGE<sub>3</sub> i LTB<sub>5</sub>. Derivati AA su PGE<sub>2</sub> i LTB<sub>4</sub> i oni mogu uticati na produkciju proinflamatornih (TNF- $\alpha$ , IL-1b, a posebno IL-6) i imunomodulatornih citokina, i time utiču na funkcionisanje imunog sistema (Kogteva i Bezuglov, 1998). Tako imuni odgovor kome posreduju PUFA, može biti promenjen usled promena u proizvodnji citokina i drugih imunoloških medijatora (James i sar., 2000). Međutim, pokazano je da su aktivni sportisti osetljiviji na infekcije od fizički neaktivne populacije usled supresije imunog sistema (Gleeson i sar., 1995). Dakle MK profil plazme i sinteza eikozanoida mogu biti odgovorne za promenjen imuni odgovor kod vrhunskih sportista (James i sar., 2000).

Masnokiselinski profil eritrocita znatno utiče na fluidnost bioloških membrana. Nekoliko studija je potvrdilo povećanu fluidnost membrane eritrocita kod aktivnih sportista (Ney i sar., 2009; Kamada i sar., 1993; Smith i sar., 1999). Za razliku od MK profila plazme vaterpolistkinja koji se nije razlikovao u nivoima zasićenih masnih kiselina u poređenju sa kontrolnom grupom, MK profil eritrocita je pokazao viši udeo palmitinske kiseline i niži udeo stearinske kiseline kod vaterpolistkinja ne samo u odnosu na kontrolnu grupu, već i u odnosu na grupu fudbalerki. Takođe je i druga grupa sportistkinja, fudbalerke, imala viši udeo 16:0 u odnosu na kontrolnu grupu. To ukazuje na povećanu stabilnost membrane eritrocita kod sportistkinja u našoj studiji. Rezultati MK profila eritrocita vaterpolistkinja se razlikuju od rezultata studije Andersson i saradnici (2000) koja je pokazala manji procenat palmitinske kiseline i veći procenat stearinske kiseline u mišićima kod sportista u odnosu na muškarce koji nisu trenirali, ukazujući na povećanu endogenu sintezu stearinske kiseline u mišićima. Ipak, ovi rezultati se odnose na mišiće i rađeni su na muškarcima, tako da

rezultati nisu direkto poredivi, iako eritrociti generalno odslikavaju i stanje MK u mišićima. Takođe, prethodna studija iz naše laboratorije (Tepšić i sar., 2009) pokazala je viši nivo 18:0 i niži nivo 16:0 kod sportista u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, u ovom radu je pokazano da je nivo stearinske kiseline u plazmi i u eritrocitima fudbalerki bio značajno viši nego kod vaterpolistkinja, sugerišući da je kod fudbalerki došlo do povećane endogene sinteze stearinske kiseline pod uticajem određenog tipa fizičke aktivnosti. Dakle, status MK u eritrocitima se menja u zavisnosti od tipa sporta.

Slično rezultatima u plazmi, fudbalerke su imale veći nivo oleinske kiseline i ukupnih MUFA u eritrocitima, u odnosu na kontrolnu grupu, što takođe potkrepljuje činjenicu da je kod fudbalerki pojačana endogena sinteza mononezasićenih MK, kao i u FL plazme. Smanjene procentualne zastupljenosti DGLA, ukupnih PUFA i n-6 PUFA, pronađene su u obe grupe sportistkinja u odnosu na kontrolnu grupu. Zanimljivo je da, uprkos malim razlikama u n-3 sadržaju između tri ispitivane grupe u FL plazme i eritrocita, znatno veći procenat nađen je samo u esencijalnoj,  $\alpha$ -linolenskoj kiselini u FL eritrocitima kod fudbalerki. Pošto udeo ALA u eritrocitima zavisi od višemesečnog unosa i metaboličke aktivnosti, verovatan razlog višeg procenat ALA je niža konverzija u ostale n-3 PUFA, što potvrđuje i niži procenat DHA kod fudbalerki u odnosu na ostale 2 grupe. Relativni sadržaj n-3 i n-6 PUFA utiče na stabilnost membrana obzirom da n-3 PUFA povećavaju stabilnost eritrocita i drugih ćelijskih membrana, dok ukupne n-6 PUFA negativno utiču na stabilnost membrane tj. u pozitivnoj su korelaciji sa osmotskom fragilnošću (Ney i sar., 2009). Nekoliko grupa istraživača je pokazalo da redovna fizička aktivnost utiče na sadržaj n-6 i n-3 PUFA na različite načine, smanjuje n-6 PUFA s tendencijom smanjenja odnosa n-6/n-3 PUFA u FL skeletnih mišića (Ney i sar., 2009; Andersson i sar., 1998). Međutim, Nakano i sar. (2001) su pokazali sličan MK profil FL eritrocita kod maratonaca i neaktivnih pojedinaca, dok su Kamada i sar. (1993) pronašli nešto niži udeo MUFA i viši PUFA u eritrocitima kod muških sprintera i maratonaca nego kod muškaraca koji se ne bave sportom. Iako smo pronašli značajno smanjenje procenta n-6 PUFA kod sportistkinja u odnosu na kontrolnu grupu, sve tri ispitivane grupe su imale nizak status n-3 PUFA i visok nivo n-6 PUFA i zbog toga nepovoljan odnos n-6/n-3. Sličan n-6/n-3 odnos ima i kontrolna grupa, koji je znatno viši od preporuka Svetske zdravstvene organizacije. To se može pripisati niskom dijetarnom unosu ribe i morskih plodova i visokom unosu suncokretovog ulja u

našem podneblju. Zbog toga promene navika u ishrani u celoj populaciji, pogotovu kod vrhunskih sportistkinja, mogu poboljšati njihov masnokiselinski status i blagotvorno uticati na fizičke performanse i opšte zdravlje.

Značajne razlike u nivoima MK u FL plazme i eritrocita između tri ispitivane grupe, dovele su do promene procenjene aktivnosti enzimskog sistema desaturaza i elongaza. Aktivnost ovih enzima procenjena je prema odnosu pojedinačnih masnih kiselina. Iako nismo pronašli razlike u aktivnosti desaturaza u plazmi između ispitivanih grupa, aktivnost ovih enzima u eritrocitima se značajno razlikuje između ispitivanih grupa. Tako je odnos 20:4(n-6)/20:3(n-6) koji odražava aktivnost  $\Delta 5$ -desaturaze, za koji je pokazano da je u pozitivnoj korelaciji sa insulinom kod ljudi (Borkman i sar., 1993; Pan i sar., 1995), bio značajno veći kod fudbalerki u odnosu na kontrolnu i vaterpolo grupu. Odnos 20:3 n-6 i 18:2 n-6, koji odražava aktivnost  $\Delta 6$ -desaturase i elongaze, smanjen je kod obe grupe sportistkinja u poređenju sa kontrolnom grupom. Takođe, bilo je razlika u aktivnosti ovog enzima i između samih sportistkinja, tj. kod fudbalerki je bio smanjen u odnosu na vaterpolistkinje. Iako se ovi rezultati razlikuju od rezultata kod profesionalnih sportista (Tepšić i sar., 2009; Andersson i sar., 2000), aktivnost  $\Delta 5$  i  $\Delta 6$ -desaturaza zavisi i od dijetarnih i hormonskih faktora. Nadalje, povišena aktivnost  $\Delta 9$ -desaturase, izračunata odnosom 18:1/18:0, otkrivena je u vaterpolo grupi u odnosu na kontrolnu grupu. Ovi rezultati se slažu sa rezultatima na animalnom modelu (Szabo i sar., 2002), gde je pronađena viša aktivnost  $\Delta 9$ -desaturaze u mišićima kunića nakon hroničnog trčanja, ali se razlikuju od naših prethodnih rezultata kod muškaraca gde smo pokazali nižu aktivnost  $\Delta 9$ -desaturaze kod elitnih košarkaša (Tepšić i sar., 2009).

Uočenu razliku između MK profila i aktivnosti desaturaza kod aktivnih vaterpolistkinja i fudbalerki je teško objasniti u ovom trenutku, a jedan od mogućih razloga je razlika u vrsti sporta kojim se ispitanice bave. Iako obe vrste sportova spadaju u sportove sa aerobno-anaerobnim metabolizmom, u fudbalu dominira aerobni metabolizam sa svega 20% učešća anaerobnog metabolizma u vreme intenzivnog razdoblja igre (Bangsbo i sar., 2006; Bradley i sar., 2009; Krustup i sar., 2010; Mohr i sar., 2005). Za razliku od fudbala vaterpolo je sport sa značajno većim udelom anaerobnog metabolizma (Pyne i sar., 2001). Studije su pokazale da redovno aerobno vežbanje ima blagotvoran uticaj na lipidni metabolizam, ali da anaerobni trening dovodi do smanjenja vrednosti lipidnih parametara u serumu (Aellen i sar.,

1993). Osim toga, različiti MK profili dobijeni u ovoj studiji u odnosu na studije u kojima su uključeni muškarci, su verovatno barem delimično posledica hormonskih faktora koji utiču na endogenu sintezu i promene u sastavu MK fosfolipida plazme i eritrocita.

Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji pokazuju da hronični, intenzivan trening izrazito utiče na MK profil FL u plazmi i eritrocitima. Primećena razlika između vaterpolistkinja i fudbalerki pokazuje da i tip redovnog vežbanja može uticati na metabolizam masnih kiselina. Dakle, ovo istraživanje ukazuje na potrebu za specifičnim dijetarnim intervencijama, zavisno od vrste sporta, kod aktivnih sportistkinja.

Polinezasićene masne kiseline kao integralni delovi ćelijskih membrana mogu reagovati sa ROS, pri čemu dolazi do stvaranja lipidnih peroksida i oštećenja lipida. Prekomerna količina ROS koja nastaje tokom vežbanja i zavisi od vrste i intenziteta vežbanja, može savladati odbrambeni mehanizam ćelije i uzrokovati lipidnu peroksidaciju, kod sportista. Tokom raspada lipidnih hidroksiperoksida nastaje trikarbonski aldehid-malondialdehid. U ovom radu nivo MDA, kao indeks lipidne peroksidacije, bio je značajno veći kod sportistkinja u odnosu na kontrolnu grupu, dok se među sportovima nije značajno razlikovao. Postoji veoma mali broj studija koji se bavi uticajem hroničnog sporta na nivo MDA u eritrocitima kod žena. Mnoge studije baziraju se na određivanju parametara oksidativnog stresa pre i neposredno nakon utakmica, dok se mali broj radova bazira na ispitivanju stepena lipidne peroksidacije kod dugogodišnjeg, intenzivnog treninga, kako kod muškaraca, tako i kod žena. Tako Cavas (2005), koji je proučavao oksidativni stres pre i posle utakmice kod sportista koji se bave podvodnim ragbijem, navodi da nema značajnih promena u nivou lipidne peroksidacije u eritrocitima pre i posle utakmice kod žena, ali da raste kod muškaraca, sugerišući da estrogen ima protektivnu ulogu na produkciju ROS. Drugi autori su pokazali da nema promena u nivou MDA u plazmi kod fudbalerki što je objašnjeno ili poboljšanom zaštitom od oksidativnog stresa koja postoji kod dobro utreniranih sportista (Brites i sar., 1999; Cazzola i sar., 2003) ili zaštitnom ulogom estrogena (Kendall i Eston, 2002). To ukazuje da postoje razlike u odgovoru na oksidativni stres i nivo antioksidanasa kod muškaraca i žena fudbalera. Takođe, postoje različiti podaci o stepenu lipidne peroksidacije u različitim tipovima sportova (Duthie i sar., 1990; Cavas, 2005). Razlika u dobijenim rezultatima može poticati od: (1) intenziteta i vremena vežbanja, (2) vrste uzorka i / ili ispitanika, i (3) metode kojom se određuje lipidna peroksidacija (Miyazaki

i sar., 2001). Naši rezultati pokazuju da kod aktivnih sportistkinja koje treniraju svakodnevno, postoji hronično viši nivo lipidne peroksidacije nego kod žena koje nisu fizički aktivne. Osim toga nivo PUFA i eritrocitima fudbalerki takođe je bio najniži, što nedvosmisleno ukazuje na činjenicu da se određeni procenat ovih MK oksidovao, te da fudbal dovodi do povećanja lipidne peroksidacije, a samim tim utiče kako na fluidnost membrane tako i na njenu funkciju.

Superoksid anjon radikal nastaje u mitohondrijama redukcijom kiseonika jednim elektronom. Za razliku od fudbalerki kod kojih je koncentracija  $O_2^-$  bila najviša, grupa vaterpolistkinja je imala najnižu koncentraciju superoksid anjon radikala u plazmi. Nasuprot tome, aktivnost SOD je bila najviša baš u grupi vaterpolistkinja. Martinović i saradnici (2009) koji su pratili aktivnost SOD i koncentraciju  $O_2^-$  kod profesionalnih odbojkašica, pokazali su da je viša aktivnost SOD praćena smanjenjem superoksid anjon radikala u plazmi i da zavisi od dužine bavljenja sportom, tj. da je ova razlika veća što bavljenje sportom traje duže (Martinović i sar., 2009). Dakle, aktivnost superoksid dismutaze i koncentracija superoksidnog anjona može biti korisna za praćenje adaptacije sportista na trening. Isti autori smatraju da se na osnovu ovih rezultata može predvideti razvoj antioksidativnog odbrambenog sistema i u skladu s tim prilagoditi intenzitet treninga radi postizanja optimalnih rezultata. Visoka aktivnost SOD u ovoj disertaciji, može se povezati sa činjenicom da aktivnost SOD raste tek pri veoma visokoj koncentraciji  $O_2^-$ , te da je koncentracija  $O_2^-$  u jednom trenutku bila dovoljno velika da stimuliše aktivnost SOD. SOD je svojim delovanjem preveo  $O_2^-$  do  $H_2O_2$  i tako se smanjila koncentracija superoksid anjon radikala. Iako je koncentracija  $O_2^-$  bila značajno viša kod fudbalerki nego kod ostale 2 grupe, aktivnost SOD kod fudbalerki je bila značajno niža u odnosu na grupu vaterpolistkinja. Nižu aktivnost SOD u grupi fudbalerki možemo povezati sa činjenicom da koncentracija  $O_2^-$  nije bila dovoljno visoka da poveća aktivnost SOD. Vatepolistkinje su imale veću aktivnost SOD što ukazuje da je kod njih  $O_2^-$  bio znatno povišen, što je uticalo na porast aktivnosti SOD i dovelo do konverzije  $O_2^-$  u  $H_2O_2$  a samim tim i do smanjenja koncentracije  $O_2^-$ . Povišena aktivnost SOD-a u poređenju sa osobama koje se ne bave aktivno sportom, nađena je i u drugim studijama uključujući fudbalere (Cazzola i sar., 2003; Brites i sar., 1999) i ragbiste (Evelson i sar., 2002). Međutim nekoliko autora je pokazalo da se aktivnost SOD kod osoba koje se bave fudbalom ne razlikuje značajno od kontrolne grupe (Buczynski i sar., 1991;

Elosua i sar., 2003; ). Takođe treba naglasiti da najveći broj ovih studija ispituje parametre oksidativnog stresa kod muškaraca, dok je podataka koji se odnose na žene, a posebno one koje se bave fudbalom i vaterpolom veoma malo.

Dok je niska koncentracija  $O_2^-$  u plazmi praćena visokom aktivnošću SOD u eritrocitima vaterpolistkinja, viša koncentracija  $H_2O_2$  u plazmi praćena je većom aktivnošću katalaze u eritrocitima u odnosu na kontrolnu grupu. Jedno od mogućih objašnjenja nižeg nivoa  $O_2^-$  i višeg nivoa  $H_2O_2$  uz povećanu aktivnost oba enzima nalazi se u brzini hemijskih reakcija u kojima se ovi slobodni radikali razgrađuju. Brzina enzimske reakcije u kojoj SOD katalizuje dismutaciju  $O_2^-$  u molekularni kiseonik i  $H_2O_2$  iznosi  $2 \times 10^9$  1/molsec, dok se reakcija koju katalizuje katalaza odvija brzinom  $10^7$  1/molsec, pri čemu dolazi do razgradnje  $H_2O_2$  u vodu i molekularni kiseonik. Dakle,  $O_2^-$  se razgrađuje znatno brže od  $H_2O_2$  i zbog toga je aktivnost SOD viša a koncentracija  $O_2^-$  niža, dok su  $H_2O_2$  i katalaze u direktnoj srazmeri.  $H_2O_2$  nastaje redukcijom dva atoma kiseonika sa dva elektrona uz dodatak 2 protona. Mnoge oksidaze upotrebljavaju ovaj mehanizam da direktno redukuju  $O_2$  do  $H_2O_2$ .

Za razliku od SOD koji se razlikovao između grupa sportistkinja, aktivnost katalaze je kod sportistkinja bila veća u odnosu na kontrolnu grupu, dok se među sportovima nije razlikovala. Međutim, rezultati ispitivanja aktivnosti katalaze nisu konzistentni u već publikovanim radovima. Na primer, Djordjevic i saradnici (2011) su pokazali nižu aktivnost katalaze u eritrocitima kod mladih rukometaša u odnosu na kontrolnu grupu. Druge studije su našle da nema promena u aktivnosti katalaze, kao posledica intenzivnog treninga (Miyazaki i sar., 2001; Lekhi i sar., 2007; Metin i sar., 2003; Ortenblad i sar., 1997). Sve navedene studije ispituju aktivnost katalaze kod muškaraca, dok se veoma mali broj studija bavi analizom oksidativnog statusa kod žena. Porast nivoa  $H_2O_2$ , u ovom radu praćen je porastom aktivnosti katalaze kod sportistkinja. Ovaj podatak ukazuje da je kod vrhunskih sportistkinja koje su u dugogodišnjem, intenzivnom treningu, došlo do veoma dobrog razvoja enzimskog antioksidativnog sistema kao zaštite od potencijalnog oksidativnog oštećenja ćelija izazvanog fizičkim opterećenjem, a pogotovu do povećanja aktivnosti katalaze koja predstavljaju drugi nivo antioksidativne zaštite u eritrocitima u kaskadi  $O_2^-$  /SOD/ $H_2O_2$ /CAT.



Iako je aktivnost katalaze bila veća kod sportiskinja u odnosu na kontrolnu grupu, aktivnost GSH-Px se nije razlikovala između ispitivanih grupa. GSH-Px ima veći afinitet za vodonik-peroksidom od katalaze kada je  $H_2O_2$  prisutan u ćeliji ili u plazmi u malim koncentracijama. Međutim, kada je koncentracija  $H_2O_2$  u ćeliji ili plazmi visoka, kao što je u uslovima intenzivnog treninga, katalaza je znatno efikasnija u njenoj detoksikaciji. U takvim okolnostima, kao odgovor organizma na intenzivno vežbanje, dolazi do povećanja aktivnosti katalaze koja pomaže u konverziji  $H_2O_2$  do  $H_2O$  i  $O_2$ . Obzirom da je GSH-Px je Se-zavisan enzim, a da je na teritoriji Srbije pokazan deficit Se (Djujic i sar., 2004), kao i smanjena aktivnost GSH-Px u populaciji (Nikolić-Kokić i sar., 2006), moglo bi se pretpostaviti da je i to jedan od razloga zbog koga ne postoje razlike u aktivnosti GSH-Px između ispitivanih grupa. Slično našim rezultatima, Ortenblad i saradnici (1997) opisuju da nema razlike u aktivnosti GSH-Px ili GR u eritrocitima između treniranih i osoba koje ne treniraju nakon kratkih maksimalnih vežbi u eritrocitima, ali da postoje razlike u aktivnosti ovih enzima u mišićima između dve ispitivane grupe (Urso i Clarkson, 2003).

Osim enzima antioksidativne odbrane, određivan je i ukupni antioksidativni status kod sve tri grupe ispitanica. TAS je bio značajno veći kod sportistkinja, u odnosu na kontrolnu grupu, ali se među sportovima nije značajno razlikovao, tako da ne možemo govoriti o različitom nivou antioksidanasa iz hrane između sportiskinja, koji bi kupirao oslobađanje  $O_2^-$  izazvano fizičkim opterećenjem.

Tokom napornog vežbanja dolazi do povećanja potrošnje kiseonika i do nekoliko puta, pri čemu se uz ROS povećava i produkcija reaktivnih azotovih vrsta, preteći da naruši redoks ravnotežu i dovede do oksidativnog stresa. Iako većina istraživača povezuje povećanu produkciju RNS, tokom intenzivnog vežbanja, sa nepovoljnim fiziološkim uticajem, novije studije istražuju alternativnu ulogu RNS kao adaptaciju na dugogodišnje vežbanje. Koncentracija nitrita u ovom radu, kao mera produkcije NO, u plazmi bila je viša kod sportistkinja u odnosu na kontrolnu grupu, ali značajno samo kod fudbalerki. Još su ranije studije pokazale da redovna fizička aktivnost povećava bioraspoloživost NO (Kingwell i sar., 1997; Jungersten i sar., 1997). Ipak, Djordjevic i sar. (2011) nisu našli značajne razlike u koncentraciji NO između rukometaša i kontrolne grupe, kao ni između sportista sa različitim aerobnom snagom. Oni navode da ponavljanje vežbi dovodi do povećane produkcije NO koji povoljno deluje na vaskularni sistem (Jungersten i sar., 1997). Takođe je

pokazano da ljudi koji se redovno bave fizičkom aktivnošću imaju veću bazalnu proizvodnju NO od ljudi koji nisu fizički aktivni (Poveda i sar., 1997; Banfi i sar., 2006). Međutim, bioraspoloživost NO koja je povećana kao posledica vežbanja, je prolazna i zbog toga može biti izgubljena za vreme neaktivnog perioda (Maiorana i sar., 2003). Rezultati ove teze se slažu sa rezultatima brojnih studija koje pokazuju da je bioraspoloživost NO povećana kod sportista (Rassaf i sar., 2007; Allen i sar. 2006; Hambrecht i sar., 1998) u odnosu na ljude koji se ne bave sportom. Razloge veće produkcije NO kod fudbalerki u odnosu na vaterpolistkinje, možda možemo povezati sa time da je u fudbalu aerobna aktivnost znatno veća nego kod vaterpola, te da je NO u direktnoj korelaciji sa aerobnim metabolizmom.

Dosadašnji rezultati su pokazali da dugotrajno intenzivno bavljenje sportom može da promeni profil MK u fosfolipidima plazme i eritrocita, kao i da dovede do pojave oksidativnog stresa i povećanja aktivnosti enzima antioksidativne odbrane. Osim toga, fizičko vežbanje utiče i na funkcionisanje imunog sistema. Redovno vežbanje umerenog intenziteta je obično povezano sa povećanjem otpornosti organizma na infekcije (Matthews i sar., 2002). Sa druge strane naporno vežbanje može biti povezano sa prolaznom imunosupresijom, i potencijalno može da poveća osetljivost na infekcije (Nieman i Pedersen, 1999), pogotovu gornjih disajnih puteva (Friman i Wesslen 2000).

Monociti su fagocitujuće ćelije i čine deo i urođenog i stečenog imunog sistema. Njihov broj se značajno povećava tokom ili neposredno nakon vežbanja (Shephard i Shek, 1994) i održava se tokom 72 h. Međutim, efekat vežbanja na monocite i makrofage zavisi od mogo faktora, između ostalog i od vremena kada je uzeta krv u odnosu na vreme treninga, izvora tkivnih makrofaga, intenziteta i dužine vežbanja (Shephard i Shek, 1994). Zbog toga je jedan od ciljeva bio da se utvrdi efekat dugogodišnjeg bavljenje vaterpolom kod žena na aktivnost mononuklearnih ćelija, u periodu od 18 h nakon treninga. Nivo redukovanog MTT direktno koreliše sa brojem aktivnih ćelija u ćelijskoj kulturi (Mosmann, 1983; Carmichael i sar., 1987). Prema dobijenim rezultatima intenzivna fizička aktivnost dovodi do značajno veće aktivnosti tj. znatno većeg broja vijabilnih ćelija sportistkinja u odnosu na osobe koje nisu fizički aktivne. Osim toga, rezultati su pokazali da je održivost mononuklearnih ćelija smanjena tokom vremena, tj. nakon 24 h, u obe ispitivane grupe ali ne značajno što je u skladu sa rezultatima drugih autora (Vlaški i sar., 2010). Takođe je pokazano da je i nakon 24-časovne inkubacije aktivnost nestimuliranih i stimuliranih monocita bila značajno veća u

grupi vaterpolistkinja u poređenju sa kontrolnom grupom. To ukazuje na povećanu sposobnost i adaptivnost monocita sportistkinja da reaguju na spoljne stimulse.

Kada se mononuklearne ćelije periferne krvi aktiviraju različitim neinfektivnim ili infektivnim agensima kakav je LPS ili endotoksid, oni oslobađaju proinflamatorne citokine kao što su IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 i antagonist IL-1 receptora (Rhind i sar., 2001). Osim toga, sve fagocitujuće ćelije (monociti, makrofage i neutrofilii) u kontaktu sa mikrobnim agensima proizvode i oslobađaju veliku količinu reaktivnih kiseoničnih i azotovih vrsta. NADPH-oksidaza, koja se nalazi u membrani ćelija, je neaktivna i aktivira se pod dejstvom različitih citokina ili mikrobnih agenasa kao što su LPS i PMA. Zato je ispitivano da li fizička aktivnost i neki stimuli koji se oslobađaju prilikom aktivnog vežbanja mogu da dovedu do povećanog respiratornog praska u mononuklearnim ćelijama, obzirom da je njihova aktivnost veća u grupi sportistkinja u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati su pokazali da nije bilo značajnih razlika u nivou O<sub>2</sub><sup>-</sup> između grupe sportistkinja i kontrolne grupe. Značajnih razlika je bilo, prema očekivanju, u PMA stimulisanoj u odnosu na spontanu redukciju NBT u obe ispitivane grupe, ali ne i između grupa. Neki autori pokazuju da je kod sportista neposredno nakon vežbanja smanjen respiratorni prasak i smanjena stimulacija LPS (Pyne, 1994; Robson i sar., 1999). Međutim, ima autora koji pokazuju povećanje bakteriocitne aktivnosti i povećanje u produkciji O<sub>2</sub><sup>-</sup> kod profesionalnih košarkaša tokom sezone (Benoni i sar., 1995).

Proizvodnja NO pomoću inducibilne NO sintaze takođe je regulisana različitim inflamatornim citokinima (TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL-18, IL-1  $\alpha\beta$ ) i bakterijskim agensima (npr. LPS) na transkripcionom i posttranskripcionom nivou (Bogdan, 2000). Ali osim ovih stimulusa pokazano je i da i fizička aktivnost može pokrenuti proizvodnju NO posredovanu inducibilnom NOS. Mada su neki autori pokazali da se produkcija NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, kao mera produkcije NO, povećava u makrofagama nakon fizičke aktivnosti (Woods i sar., 2000), u ovoj studiji nije bilo razlika kako u spontanoj produkciji nitrita, tako ni u LPS stimulisanoj produkciji nitrita u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, između ispitivanih grupa.

Dobijeni rezultati pokazuju da je dugogodišnje bavljenje sportom dovelo do veće aktivnosti monocita kod žena koje treniraju vaterpolo u odnosu na ispitanice slične životne dobi koje nisu fizički aktivne. Međutim analizom produkcije O<sub>2</sub><sup>-</sup> i NO nisu dobijene značajne razlike između ispitivanih grupa, što ukazuje da fizička aktivnost nije dovela do

pojačane aktivnosti NADPH-oksidaze i NOS u mononuklearnim ćelijama. Treniranje vaterpola ne dovodi do promena u funkciji mononuklearnih ćelija, kod osoba ženskog pola.

## 6. ZAKLJUČAK

Shodno postavljenih ciljevima, rezultati dobijeni u ovom radu upućuju na sledeće zaključke:

1. Dugogodišnje treniranje fudbala i vaterpola pozitivno deluje na biohemijske, hematološke i antropometrijske parametre, o čemu svedoče:
  - viši nivo hemoglobina kod fudbalerki u odnosu na vaterpolistkinja i kontrolnu grupu;
  - niža koncentracija holesterola, TG i LDL-holesterola kod sportistkinja u poređenju sa kontrolnom grupom;
  - niži procenat masti i veća bezmasna masa tela kod sportistkinja u odnosu na kontrolnu grupu.
2. Treniranje fudbala utiče na metabolizam masnih kiselina u FL plazme, dovodeći do povećanja udela stearinske kiseline, oleinske kiseline i MUFA što može imati protektivni efekat na bolesti srca i koronarnih arterija.
3. Niža procentualna zastupljenost linolne kiseline, n-6 PUFA i ukupnih PUFA u FL plazme i eritrocita fudbalerki kao i eritrocita vaterpolistkinja, može biti posledica oksidacije ovih MK na šta ukazuje i visok nivo lipidne peroksidacije u eritrocitima sportistkinja.
4. Veći procenat arahidonske kiseline u FL plazme kod vaterpolistkinja može imati negativne efekte na zdravlje, obzirom da je AA prekursor proinflamatornih i imunomodulatornih citokina i može uticati na funkciju imunog sistema.
5. Treniranje vaterpola menja MK profil eritrocita, povećavajući procenat zastupljenosti palmitinske kiseline i smanjući procenat stearinske u FL eritrocita, što može negativno uticati na zdravlje zbog poznatog aterogenog i trombogenog efekta palmitinske kiseline.
6. Razlike u MK profilu FL plazme i eritrocita između grupa sportistkinja ukazuju da metabolizam MK u velikoj meri zavisi i od tipa fizičke aktivnosti.
7. Iako nije bilo značajnih razlika u n-3 PUFA statusu između ispitanica, sve tri ispitivane grupe imale su niži n-3 status u odnosu na preporuke Svetske zdravstvene organizacije. S obzirom da povećani unos n-3 MK suprimira dejstvo enzima koji generišu slobodne

radikale, naša preporuka je povećanje unosa n-3 MK kod sportista, što može imati blagotvoran efekat na fizičke performanse i opšte zdravlje.

8. Redovna, intenzivna fizička aktivnost indukuje promene u parametrima oksidativnog stresa i aktivnosti enzima antioksidativne odbrane, kroz povećanje:
  - nivoa TAS i  $H_2O_2$  u plazmi sportistkinja;
  - aktivnosti katalaze u eritrocitima sportistkinja;
  - vrednosti  $O_2^-$  i  $NO_2^-$  u plazmi kod fudbalerki.
9. Niža koncentracija  $O_2^-$  i viša aktivnost SOD u grupi vaterpolistkinja u odnosu na grupu fudbalerki, ukazuje da adaptivni mehanizmi antioksidativne odbrane zavise od tipa sporta i to da su bolje razvijeni kod vaterpolistkinja u odnosu na fudbalerke.
10. Dugogodišnje bavljenje sportom dovelo je do promena u aktivnosti mononuklearnih ćelija periferne krvi kod sportistkinja u odnosu na kontrolnu grupu. Istovremeno, iako je oksidativni status sportistkinja u cirkulaciji promenjen u odnosu na žene koje nisu fizički aktivne, produkcija superoksid anjon radikala i azot oksida u mononuklearnim ćelijama se ne menja kao odgovor organizma na fizičku aktivnost.

## 7. LITERATURA

- **Aebi H.** Catalase in vitro. In: *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 1984, 479-500.
- **Aellen R, Hollmann W, Boutellier U.** Effects of aerobic and anaerobic training on plasma lipoproteins. *Int J Sports Med*, 1993; 14: 396–400.
- **Aguiló A, Tauler P, Fuentespina E, Tur J, Córdova A, Pons A.** Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav*, 2005; 84:1-7.
- **Aikens J, Dix TA.** Peroxyl radical (HOO<sup>•</sup>) Initiated lipid-peroxidation—The role of fatty-acid hydroperoxides. *J Biol Chem*, 1991; 266:15091–15098.
- **Akova B, Sürmen-Gür E, Gür H, Dirican M, Sarandöl E, Küçükoglu S.** Exercise-induced oxidative stress and muscle performance in healthy women: role of vitamin E supplementation and endogenous oestradiol. *Eur J Appl Physiol*, 2001; 84: 141-147.
- **Allard C, Alteresco M, Ferguson RJ, Chaniotis L, Choquette G, Skinner J.** Changes in adipose tissue and increased serum cholesterol of coronary patients following training. *Can Med Assoc J*, 1973; 109: 194-197.
- **Allen JD, Cobb FR, Kraus WE, Gow AJ.** Total nitrogen oxide following exercise testing reflects endothelial function and discriminates health status. *Free Radic Biol Med* 2006; 41:740–747.
- **Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM.** Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90:7915–7922.
- **Andersson A, Sjodin A, Hedman A, Olsson R, Vessby B.** Fatty acid profile of skeletal muscle phospholipids in trained and untrained young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279:E744–E751.
- **Andersson A, Sjodin A, Hedman A, Vessby B.** Effects of physical exercise on phospholipid fatty acid composition in skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1998; 274:E432–E438.
- **Arner P, Kriegholm E, Engfeldt P, Bolinder J.** Adrenergic regulation of lipolysis in situ at rest and during exercise. *J Clin Invest* 1990; 85:893–898.

- **Auclair C, Voisin E.** Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RE, editor. CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical research. Boca Raton: CRC Press; FL 1985; pp. 123–132.
- **Banfi G, Malavazos A, Iorio E, Dolci A, Doneda L, Verna R, Corsi MM.** Plasma oxidative stress biomarkers, nitric oxide and heat shock protein 70 in trained elite soccer players. *Eur J Appl Physiol*, 2006; 96:483–486.
- **Bangsbo J, Mohr M, Krstrup P.** Physical and metabolic demands of training and match-play in the elite football player. *J Sports Sci*, 2006; 24:665–674.
- **Benatti P, Peluso G, Nicolai R, Calvani M.** Polyunsaturated Fatty Acids: Biochemical, Nutritional and Epigenetic Properties. *J Am Coll Nutr*, 2004; 23:281–302.
- **Benoni G, Bellavite P, Adami A, Chirumbolo S, Lippi G, Brocco G, Giulini GM, Cuzzolin L.** Changes in several neutrophil functions in basketball players before, during and after the sports season. *Int J Sports Med*, 1995; 16:34-37.
- **Bergman BC, Butterfield GE, Wolfel EE, Casazza GA, Lopaschuk GD, Brooks GA.** Evaluation of exercise and training on muscle lipid metabolism. *Am J Physiol*, 1999; 276:E106–E117.
- **Bernard SF, Reidy SP, Zwingelstein G, Weber J.** Glycerol and fatty acid kinetics in rainbow trout: effects of endurance swimming. *Exp Biol* 1999; 202: 279-288.
- **Bloomer, R., Falvo, M., Fry, A., Schilling, B., Smith, W. & Moore, C.** Oxidative stress response in trained men following repeated squats or sprints. *Med Sci Sports Exerc*, 2006; 38:1436-1442.
- **Bogdan C, Rollingshoff M, Diefenbach A.** The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev*, 2000; 173:17-26.
- **Børsheim E, Knardahl S, Høstmark AT.** Short-term effects of exercise on plasma very low density lipoproteins (VLDL) and fatty acids. *Med Sci Sports Exerc*, 1999; 31:522-530.
- **Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV.** The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *N Engl J Med*, 1993; 328:238–244.



- **Bradley PS, Sheldon W, Wooster B, Olsen PD, Boanas P, Krstrup P.** High-intensity running in English FA Premier League soccer matches. *J Sports Sci*, 2009; 27:159–168.
- **Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG, Nicol MF, Basilico MJ, Wilkinski RW, Llesuy SF.** Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clin Sci*, 1999; 96:381-385.
- **Buczynski A, Kedziora J, Tkaczewski W, Wachowicz B.** Effect of submaximal physical exercise on antioxidative protection of human blood platelets. *Int J Sports Med*, 1991; 12:52–54.
- **Burton GW, Ingold KU.** Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 1984; 224:569-573.
- **Bury T, Marechal R, Mahieu P, Pirnay F.** Immunological status of competitive football players during the training season. *Int J Sports Med*, 1998; 19:364–368.
- **Cadenas E.** Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med*, 2004; 25:17-26.
- **Calder PC.** N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids*, 2003; 38:343-352.
- **Calder PC, Yaqoob P.** Omega-3 polyunsaturated fatty acids and human health outcomes. *Biofactors*, 2009;35:266-272.
- **Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AE, Minna JD, Mitchell JB.** Evaluation of a tetrazoliumbased semiautomated colorimetric assay assessment of chemisensitivity testing. *Cancer Res*, 1987; 17:936-942.
- **Carnam MA, Beare-Rogers JL.** Influence of diet on (n-3) and (n-6) fatty acids in monkey erythrocytes. *Lipids*, 1988; 23:501-503.
- **Cavas L.** Does underwater rugby stimulate the over-production of reactive oxygen species? *Cell Biochem Funct*, 2005; 23:59-63.
- **Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G, Cestaro B.** Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur J Clin Investig*, 2003; 33:924–930.

- **Ceder O, Bardón A, Kollberg H, Stanghelle JK, Maehlum S, Skyberg D, Custance J, Dodge J.** Fatty acids in cystic fibrosis in response to a marathon race. *Int J Sports Med* 1988; 9:51-55.
- **Clementi E, Nisoli E.** Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2005; 142:102-110.
- **Close GL, Ashton T, McArdle A, Maclaren DP.** The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2005; 142:257-266.
- **Conquer JA, Roelfsema H, Zecevic J, Graham TE, Holub BJ.** Effect of exercise on FA profiles in n-3 FA-supplemented and –nonsupplemented premenopausal women. *Lipids*, 2002; 37:947-951.
- **Cook H, McMaster CR.** Fatty acid desaturation and chain elongation in eucaryotes. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*. 2002, 4th Edn. chapter 7
- **Cristopherson SM, Glass RZ.** Preparation of milk fat methylester by alcoholysis in an essentially non alcoholic solution. *J Dairy Sci* 1969, 52: 1289-1290.
- **Cvetković Z, Vucić V, Cvetković B, Petrović M, Ristić-Medić D, Tepsić J, Glibetić M.** Abnormal fatty acid distribution of the serum phospholipids of patients with non-Hodgkin lymphoma. *Ann Hematol*, 2010; 89:775-782.
- **Cynamon HA, Isenberg JN, Nguyen CH.** Erythrocyte malondialdehyde release in vitro: a functional measure of vitamin E status. *Clin Chim Acta*, 1985; 151:169-176.
- **Dargel R.** Lipid peroxidation—a common pathogenetic mechanism? *Exp Toxicol Pathol*, 1992; 44:169–181.
- **Davies KJ, Quintanilha A, Brooks G, Packer L.** Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochim Biophys Res Commun*, 1982; 107:1198-1205.
- **Dekany M, Nemeskeri V, Gyore I, Harbula I, Malomsoki J, Pucsok J.** Antioxidant Status of Interval-Trained Athletes in Various Sports. *Int J Sports Med*, 2006; 27:112–116.
- **Di Mascio P, Kaiser S, Sies H.** Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*, 1989; 274,:532-538.

- **Dong J, Chen P, Wang R, Yu D, Zhang Y, Xiao W.** NADPH Oxidase: a Target for the Modulation of the Excessive Oxidase Damage Induced by Overtraining in Rat Neutrophils. *Int J Biol Sci*, 2011; 7:881-891.
- **Dowhan W, Bogdanov M.** Functional roles of lipids in membranes. In: *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (4th Edition)*, (edited by D.E. Vance and J.E. Vance, Elsevier Science), 2002; pp. 1-35.
- **Djordjevic, V.** Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol*, 2004; 237:57-89.
- **Djordjevic D, Cubrilo D, Macura M, Barudzic N, Djuric D, Jakovljevic V.** The influence of training status on oxidative stress in young male handball players. *Mol Cell Biochem*, 2011; 351:251-259.
- **Djujic I, Jozanov-Stankov O, Demajo M.** Oxidative stress and antioxidant defense markers in the population of Serbia and Montenegro. *Physiol Pharmacol Acta*, 2004; 39:121–128.
- **Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ, Morrice PC.** Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys*, 1990; 282:78-83.
- **Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A.** *Nature*, 1998; 391:393-397.
- **Elayan IM, Winder WW.** Effect of glucose infusion on muscle malonyl-CoA during exercise. *J Appl Physiol*, 1991;70:1495–1499.
- **Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, Ordonez-Llanos J, Marrugat J.** Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis*, 2003;167:327–334.
- **Endres M, Gertz K, Lindauer U, Katchanov J, Schultze J, Schröck H, Nickenig G, Kuschinsky W, Dirnagl U, Laufs U.** Mechanisms of stroke protection by physical activity. *Ann Neurol*, 2003; 54:582-590.
- **Evans LM, Cowey SL, Siegal GP, Hardy RW.** Stearate preferentially induces apoptoses in human breast cancer cells. *Nutr Cancer*, 2009; 61:746-753.

- **Evelson P, Gambino G, Travacio M, Jaita G, Verona J, Maroncelli C, Wikinski R, Llesuy S, Brites F.** Higher antioxidant defences in plasma and low density lipoproteins from rugby players. *Eur J Clin Investig*, 2002; 32:818–825.
- **Fahlman MM, Engels HJ.** Mucosal IgA and URTI in American college football players: a year longitudinal study. *Med Sci Sports Exerc*, 2005; 37:374–380.
- **Fatouros IG, Chatzinikolaou A, Douroudos II, Nikolaidis MG, Kyparos A, Margonis K, Michailidis Y, Vantarakis A, Taxildaris K, Katrabasas I, Mandalidis D, Kouretas D, Jamurtas AZ.** Time-course of changes in oxidative stress and antioxidant status responses following a soccer game. *J Strength Cond Res*, 2010; 24:3278-3286.
- **Fernandes G, Venkatraman JT.** Role of omega-3-fatty acids in health and disease. *Nutr Res*, 1993;13(S):19-45.
- **Finstad HS, Kolset SO, Holme JA, Wiger R, Farrants AK, Blomhoff R, Drevon CA.** Effect of n-3 and n-6 fatty acids on proliferation and differentiation of promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Blood*, 1994; 84: 3799-3809.
- **Friman G, Wesslén L.** Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: infections and exercise in high-performance athletes. *Immunol Cell Biol*, 2000;78:510-522.
- **Garrow JS, Webster J.** Quetelet's index (W/H<sup>2</sup>) as a measure of fatness. *Int J Obes*, 1985;9:147-153.
- **German JB.** Butyric acid: a role in cancer prevention. *Nurt Bull*, 1999; 24:293-299.
- **Ghafourifar P, Cadenas E.** Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci*, 2005; 26:190–195.
- **Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A.** Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem*, 1998; 273:11038-11043.
- **Gleeson M.** Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* 103:693-699, 2007.
- **Gleeson M, McDonald WA, Cripps AW, Pyne DB, Clancy RL, Fricker PA.** The effect on immunity of long-term intensive training in elite swimmers. *Clin Exp Immunol*, 1995; 102:210–216.

- **Goldstein S, Michel C, Boors A, Saran M, Czapsky G.** A critical re-evaluation of some assay methods for superoxide dismutase activity. *Free Radical Biol Med*, 1988; 4:295–303.
- **Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Viña J.** Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr*, 2008; 87:142–149.
- **González J, Periago JL, Gil A, Cabré E, Abad-Lacruz A, Gassull MA, Sánchez de Medina F.** Malnutrition-related polyunsaturated fatty acid changes in plasma lipid fractions of cirrhotic patients. *Metabolism*, 1992; 41:954-960.
- **Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Whishnok JS, Tannenbaum SR.** Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982; 126:131-138.
- **Grundy SM.** Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am J Clin Nutr*, 1994; 60: 986S-990S.
- **Hambrecht R, Fiehn E, Weigl C, Gielen S, Hamann C, Kaiser R, Yu J, Adams V, Niebauer J, Schuler G.** Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation*, 1998; 98:2709–2715.
- **Hastings N, Agaba M, Tocher DR, Leaver MJ, Dick JR, Sargent JR, Teale AJ.** A vertebrate fatty acid desaturase with  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  activities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98:14304-14309.
- **Haug A, Hallaq H, Leaf A.** Potential antiatherogenic effect of omega-3 fatty acids In: Neri Serneri SS, Gensini GF, Abbate R, Prisco D, editors, *Thrombosis, an update*, Scientific press, Florence, 1992; 361-372.
- **Haug A, Hostmark AT, Harstad OM.** Bovine milk of human nutrition - a review. *Lipids Health Dis*, 2007; 6:25-41.
- **Helge JW, Ayre KJ, Hulbert AJ, Kiens B, Storlien LH.** Regular exercise modulates muscle membrane phospholipid profile in rats. *J Nutr*, 1999; 129:1636–1642.

- **Helge JW, Wu BJ, Willer M, Daugaard JR, Storlien LH, Kiens B.** Training affects muscle phospholipid fatty acid composition in humans. *J Appl Physiol*, 2001; 90:670-677.
- **Hellsten Y, Tullson P, Richter E, Bangsbo J.** Oxidation of urate in human skeletal muscle during exercise. *Free Radic Biol Med*, 1997; 22:169-174.
- **Herrocks LA, Yeo YK.** Health benefits of docosahexanoic acid. *Pharmacol Res*, 1999; 40:211-225.
- **Hodgetts V, Coppack SW, Frayn KN, Hockaday TDR.** Factors controlling fat mobilization from human subcutaneous adipose tissue during exercise. *J Appl Physiol*, 1991;71:445-451.
- **Hollander J, Fiebig R, Gore M, Bejma J, Ookawara T, Ohno H, Ji LL.** Superoxide dismutase gene expression in skeletal muscle: fiber-specific adaptation to endurance training. *Am J Physiol*, 1999; 277:R856-R862.
- **Horowitz JF, Klein S.** Lipid metabolism during endurance exercise. *Am J Clin Nutr*. 2000; 72:558S-563S.
- **Hubner-Wozniak E, Panczenko-Kresowka B, Lerczak K, Posnik J.** Effects of graded treadmill exercise on the activity of blood antioxidant enzymes, lipid peroxides and nonenzymatic anti-oxidants in long-distance skiers. *Biol Sport*,1994; 11:217-226.
- **Ip C.** Review of the effect of trans fatty acids, oleic acids,n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *Am J Clin Nutr*, 1997; 66:1523S-1529S.
- **Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS.** Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 1992; 298:446-451.
- **Jackson MJ.** Free radicals generated by contracting muscle: by-products of metabolism or key regulators of muscle function? *Free Radic Biol Med*, 2008; 44:132-141.
- **James MJ, Gibson RA, Cleland LG.** Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am J Clin Nutr*, 2000; 71:343S-348S.
- **JenkisRR.** Free radical chemistry: Relationship to exercise. *Sport Med*, 1988; 5:156-170.

- **Ji LL.** Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exerc Sport Sci Rev*, 1995; 23:135-166.
- **Ji LL.** Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999; 222: 283–292.
- **Ji LL.** Free Radicals and Antioxidants in Exercise and Sports. In: Garrett, W., Kirkendall, D. (eds) *Exercise and Sport Science*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, pp. 299-317.
- **Jokic N, Dimic M, Pavlica M.** Tablice hemijskog sastava prehrambenih proizvoda (Chemical composition tables of nutrition products). Kulin Art, Zavod za ekonomiku domacinstva Srbije, Beograd, Srbija (in Serbian) 1999.
- **Josyla S, Schut HAJ.** Dietary omega-3 fatty acid as potential inhibitors of carcinogenesis-Effects on DNA adduct formation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-B)pyridine (Phip) in mice and rats. *Food Chem Toxicol*, 1999; 37: 287-296.
- **Jungersten L, Ambring A, Wall B, Wennmalm A.** Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *J Appl Physiol*, 1997; 82:760–764.
- **Kamada T, Tokuda S, Aozaki S, Otsuji S.** Higher levels of erythrocyte membrane fluidity in sprinters and long-distance runners. *J Appl Physiol*, 1993;74: 354-348.
- **Kendall B, Eston R.** Exercise-induced muscle damage and the potential protective role of estrogen. *Sports Med*, 2002;32:103-123.
- **Kelly FD, Sinclair AJ, Mann NJ, Turner AH, Abedin L, Li D.** A stearic acid-rich improves thrombogenic and atherogenic risk factor profiles in healthy males. *Eur J Clin Nutr*, 2001; 55: 88-96.
- **Kent C.** Eukaryotic phospholipid biosynthesis. [Annu Rev Biochem 1995](#), 64: 315-343
- Kerner J, Hoppel C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 2000; 1486:1-17.
- **Kiens B, Richter EA.** Utilization of skeletal muscle triacylglycerol during postexercise recovery in humans. *Am J Physiol* 1998;275: E332–7.
- **Kim YC, Ntambi JM.** Regulation of steroyl CoA desaturase genes- role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 266: 1-4.

- **Kingwell BA, Sherrard B, Jennings GL, Dart AM.** Four weeks of cycle training increases basal production of nitric oxide from the forearm. *Am J Physiol*, 1997; 272:H1070–H1077.
- **Klein S, Coyle EF, Wolfe RR.** Fat metabolism during low-intensity exercise in endurance-trained and untrained men. *Am J Physiol*, 1994; 267:E934-940.
- **Klein S, Peters EJ, Holland OB, Wolfe RR.** Effect of short- and long-term beta-adrenergic blockade on lipolysis during fasting in humans. *Am J Physiol*, 1989; 257:E65–73.
- **Kogteva GS, Bezuglov VV.** Unsaturated fatty acids as endogenous bioregulators. *Biochemistry*, 1998; 63:4–12.
- **Kris-Etherton PM.** AHA Science advisory: Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. *J Nutr*, 1999; 125:2280-2284.
- **Krustrup P, Zebis M, Jensen JM, Mohr M.** Game-induced fatigue patterns in elite female soccer. *J Strength Cond Res*, 2010; 24:437–441.
- **Lancaster GI, Halson SL, Khan Q, Drysdale P, Jeukendrup AE, Drayson MT, Gleeson M.** The effects of acute exhaustive exercise and intensified training on type 1/type 2 T cell distribution and cytokine production. *Exerc Immunol Rev*, 2004; 10:91–106.
- **Landis GN, Tower J.** Superoxide dismutase evolution and lifespan regulation. *Mech Ageing Dev*, 2005; 126:365–379.
- **Laposata M.** Fatty acids- Biochemistry to clinical significance. *Am J Clin Pathol*, 1995; 104:172-179.
- **Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK, Korthuis RJ.** Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *J Appl Physiol.*, 1990; 68:2337-2343.
- **Lee CD, Folsom AR, Blair SN.** Physical activity and stroke risk: a meta-analysis. *Stroke*, 2003; 34:2475-2481.
- **Lee WN, Lim S, Bassilian S, Bergner EA, Edmond J.** Fatty acid cycling in human hepatoma cells and the effect of troglitazone. *J Biol Chem*, 1998; 273:20929-20934.



- **Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R, Ji LL.** Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol*, 1994; 267:R439-R445.
- **Leeuwenburgh C, Heinecke J.** Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise. *Curr Med Chem*, 2001; 8:829-838.
- **Lekhi C, Gupta PH, Singh B.** Influence of exercise on oxidant stress products in elite Indian cyclists. *Br J Sports Med*, 2007; 41:691–693.
- **Liu G, Bibus DM, Bode AM, Ma WY, Holman RT, Dong Z.** Omega-3 but not omega-6 fatty acids inhibit activity and cell transformation in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98:7510-7515.
- **Macfarlane DP, Forbes S, Walker BR.** Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *J Endocrinol*, 2008; 197:189-204.
- **Maiorana A, O’Driscoll G, Taylor R, Green D.** Exercise and the nitric oxide vasodilator system. *Sports Med*, 2003; 33:1013–1035.
- **Martin WH, Dalsky GP, Hurley BF, Matthews DE, Bier DM, Hagberg JM, Rogers MA, King DS, Holloszy JO.** Effect of endurance training on plasma free fatty acid turnover and oxidation during exercise. *Am J Physiol*, 1993; 265:E708–E714.
- **Martinovic J, Dopsaj V, Dopsaj MJ, Kotur-Stevuljevic J, Vujovic A, Stefanovic A, Nestic G.** Long-term Effects of Oxidative Stress in Volleyball Players. *Int J Sports Med*, 2009; 30:851– 856.
- **Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L, Della Valle G.** Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness*, 1997; 37:235-239.
- **Marzo I, Alava MA, Pineiro A, Naval J.** Biosynthesis of docosahexaenoic acid in human cells: evidence that two different delta 6-desaturase activities may exist. *Biochim Biophys Acta*, 1996; 1301:263-272.
- **Marzo I, Pineiro A, Naval J.** Loss of delta-6-desaturase activity leads to impaired docosahexaenoic acid synthesis in Y-79 retinoblastoma cells. *Prostaglandin Leuk Essent Fatty*, 1999; 59:293-299.

- **Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN.** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 1999; 32:595–603.
- **Matthews CE, Ockene I, Freedson PS, Rosal MC, Merriam PA, Hebert JR.** Moderate to vigorous physical activity and risk of upperrespiratory tract infection. *Med Sci Sports Exerc*, 2002; 34:1242–1248.
- **McClelland GB, Hochachka PW, Weber JM.** Effect of high altitude acclimation on NEFA turnover and lipid utilization during exercise in rats. *Am J Physiol*, 1999; 277: E1095-E1102.
- **McClelland G, Zwingelstein G, Taylor CR, Weber JM.** Effect of exercise on the plasma nonesterified fatty acid composition of dogs and goats: species with different aerobic capacities and diets. *Lipids*, 1995; 30:147-153.
- **McNaughton SA, Hughes MC, Marks GC.** Validation of a FFQ to estimate the intake of PUFA using plasma phospholipid fatty acids and weighed foods records. *Br J Nutr*, 2007; 97:561–568.
- **Mensink RP, Katan MB.** Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med*, 1990; 323:439-445.
- **Mensink RP, Zock PL, Kester AD, Katan MB.** Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr*, 2003; 77:1146-1155.
- **Metin G, Gümüştas MK, Uslu E, Belce A, Kayserilioglu A.** Effect of regular training on plasma thiols, malondialdehyde and carnitine concentrations in young soccer players. *Chin J Physiol*, 2003; 46:35–39.
- **Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A.** A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, 1993; 84:407–412.
- **Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, Haga S, Ji LL, Ohno H.** Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol*, 2001; 84:1–6.

- **Mohr M, Krstrup P, Bangsbo J.** Fatigue in soccer: a brief review. *J Sports Sci*, 2005; 23:593–599.
- **Mohr M, Krstrup P, Bangsbo J.** Match performance of high-standard soccer players with special reference to development of fatigue. *J Sports Sci*, 2003; 21:519-528.
- **Morgado JM, Rama L, Inácio SMJ, Henriques A, Laranjeira P, Pedreiro S, Rosado F, Alves F, Gleeson M, Pais ML, Paiva A, Teixeira AM.** Cytokine production by monocytes, neutrophils, and dendritic cells is hampered by long-term intensive training in elite swimmers. *Eur J Appl Physiol*, 2012; 112:471–482.
- **Mosmann T.** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*, 1983; 65:55-63.
- **Mougios V, Kotzamanidis C, Koutsari C, Atsopardis S.** Exercise-induced changes in the concentration of individual fatty acids and triacylglycerols of human plasma. *Metabolism*, 1995; 44:681-688.
- **Mougios V, Kouidi E, Kyparos A, Deligiannis A.** Effect of exercise on the proportion of unsaturated fatty acids in serum of untrained middle aged individuals. *Br J Sports Med*, 1998; 32:58-62.
- **Mougios V, Ring S, Petridou A, Nikolaidis MG.** Duration of coffee- and exercise-induced changes in the fatty acid profile of human serum. *J Appl Physiol*, 2003; 94:476-984.
- **Mukutmoni-Norris M, Hubbard NE, Erickson KL.** Modulation of murine tumor vasculature by dietary omega-3 fatty acids in fish oils. *Cancer Lett*, 2000; 150:101-109.
- **Nair SS, Leitch JW, Falconer J, Garg M.** Prevention of cardiac arrhythmia by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr*, 1997; 127:383-393.
- **Nakano T, Wada Y, Matsumura S.** Membrane lipid components associated with increased filterability of erythrocytes from long-distance runners. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2001; 24:85-92.
- **Nelson DL, Cox MM.** Lipids. In: *Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company, 2005; pp. 343-363.
- **Ney JG, Koury JC, Azeredo VB, Casimiro-Lopes G, Trugo NMF, Torres AG.** Associations of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids and tocopherols with proxies of

membrane stability and subcutaneous fat sites in male elite swimmers. *Nutr Res*, 2009; 29:623–630.

- **Nielsen HG, Skjøsberg OH, Lyberg T.** Effect of antioxidant supplementation on leucocyte expression of reactive oxygen species in athletes. *Scand J Clin Lab Invest*, 2008; 68:526-533.
- **Nieman DC, Pedersen BK.** Exercise and immune function. Recent developments. *Sports Med*, 1999; 27:73-80.
- **Nijs J, Meeus M, McGregor NR, Meeusen R, de Schutter G, van Hoof E, de Meirleir K.** Chronic Fatigue Syndrome: Exercise Performance Related to Immune Dysfunction. *Med Sci Sports Exerc*, 2005; 37:1647-1654.
- **Nikolaidis GM, Mougios V.** Effects of exercise on the fatty-acid composition of blood and tissue lipids. *Sports Med*, 2004; 34:1051-1076.
- **Nikolaidis MG, Petridou A, Matsakas A, Schulz T, Michna H, Mougios V.** Effect of chronic wheel running on the fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerols in rat serum, skeletal muscle and heart. *Acta Physiol Scand*, 2004; 181: 199–208.
- **Nikolić-Kokić A, Stević Z, Blagojević D, Davidović B, Jones DR, and Spasić MB.** Alterations in anti-oxidative defence enzymes in erythrocytes from sporadic amyotrophic lateral sclerosis (SALS) and familial ALS patients. *Clin Chem Lab Med*, 2006; 44:589–593.
- **Northoff H, Berg A, Weinstock C.** Similarities and differences of the immune response to exercise and trauma: the IFN- $\gamma$  concept. *Can J Physiol Pharmacol*, 1998; 76:497–504.
- **Oh-ishi S, Kizaki T, Ookawara T, Sakurai T, Izawa T, Nagata N, Ohno H.** Endurance training improves the resistance of rat diaphragm to exercise-induced oxidative stress. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 156:1579-1585.
- **Ohno H, Yahata T, Sato Y, Yamamura K, Taniguchi N.** Physical training and fasting erythrocyte activities of free radical scavenging enzyme systems in sedentary men. *Eur J Appl Physiol*, 1988; 57:173-176.

- **Ortenblad NS, Madsen K, Djurhuus MS.** Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *Am J Physiol*, 1997; 272:R1258-R1263.
- **Packer J, Slater T, Willson R.** Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature*, 1979; 278:737-738.
- **Paglia DE, Valentine WN.** Studies on the quantitative and qualitative characterisation of glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 1967; 70:158–163.
- **Pan DA, Hulbert AJ, Storlien LH.** Dietary fats, membrane phospholipids and obesity. *J Nutr* 1994; 124: 1555-65
- **Pan DA, Lillioja S, Milner MR, Kriketos AD, Baur LA, Bogardus C, Storlien LH.** Skeletal muscle membrane lipid composition is related to adiposity and insulin action. *J Clin Invest*, 1995; 96:2802–2808.
- **Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M.** A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP–DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequencespecific binding. *J Mol Biol*, 2000; 304:55–68.
- **Petrović-Oggiano G, Damjanov V, Gurinović M, Glibetić M.** Fizička aktivnost u prevenciji i redukciji kardiovaskularnog rizika *Med Pregl*, 2010; 63:200-207.
- **Pešić S, Jakovljević V, Čubrilo D, Živković V, Jorga V, Mujović V, Stojimirović B.** Evaluacija oksidativnog statusa kod vrhunskih sportista-karatista u procesu treninga. *Vojnosanit Pregl*, 2009; 66:551–555.
- **Phillips SM, Green HJ, Tarnopolsky MA, Heigenhauser GJ, Grant SM.** Progressive effect of endurance training on metabolic adaptations in working skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1996; 270:E265–E272.
- **Pick E, Keisari Y.** A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods*, 1980; 38:161–170.
- **Porter BO, Malek TR.** Prostaglandin E-2 inhibits T-cell activation-induced apoptosis and Fas-mediated cellular cytotoxicity of fas-ligand induction. *Eur J Immunol*, 1999; 29: 2360-2365.
- **Poveda JJ, Riestra A, Salas E, Cagigas ML, Lo'pez-Somoza C, Amado JA, Berrazueta JR.** Contribution of nitric oxide to exercise-induced changes in healthy

volunteers: effects of acute exercise and long-term physical training. *Eur J Clin Invest*, 1997; 27:967–971.

- **Powers SK, Jackson MJ.** Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Rev*, 2008; 88:1243–1276.
- **Powers SK, Lennon SL.** Analysis of cellular response to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*, 1999; 58:1025-1033.
- **Powers S, DeRuisseau K, Quindry J, Hamilton K.** Dietary antioxidants and exercise. *J Sport Sci*, 2004; 22:81-94.
- **Pyne DB.** Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med*, 1994; 17:245–258.
- **Pyne DB, Lee H, Swanwick KM.** Monitoring the lactate threshold in world-ranked swimmers. *Med Sci Sports Exerc*, 2001; 33:291–297.
- **Rebello AN, Candeias JR, Fraga MM, Duarte JA, Soares JM, Magalhaes C, Torrinha JA.** The impact of soccer training on the immune system. *J Sports Med Phys Fitness*, 1998; 38:258–261.
- **Radovanović D, Okičić T, Ignjatović A.** Fiziološki profil vrhunskih vaterpolistkinja. *Acta Medica Medianae* 2007; 46:48-51
- **Rassaf T, Lauer T, Heiss C, Balzer J, Mangold S, Leyendecker T, Rottler J, Drexhage C, Meyer C, Kelm M.** Nitric oxide synthase derived plasma nitrite predicts exercise capacity. *Br J Sports Med*, 2007; 41:669–673.
- **Reid MB.** Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc*. 2001; 33:371-376.
- **Rhind SG, Castellani JW, Brenner IKM, Shephard RJ, Zamecnik J, Montain SJ, Young AJ, Shek PN.** Intracellular monocyte and serum cytokine expression is modulated by exhausting exercise and cold exposure. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 2001; 281:R66–R75.
- **Ristić Medić D, Ristić V, Arsić A, Postić M, Ristić G, Blazencić Mladenović V, Tepsić J.** Effects of soybean D-LeciVita product on serum lipids and fatty acid composition in type 2 diabetic patients with hyperlipidemia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2006; 16:395-404.

- **Robertson JD, Maughan RJ, Duthie GG, Morrice PC.** Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clin Sci*, 1991; 80:611-618.
- **Robson PJ, Blannin AK, Walsh NP, Castell LM, Gleeson M.** Effects of exercise intensity, duration and recovery on in vitro neutrophil function in male athletes. *Int J Sports Med*, 1999; 20:128–135.
- **Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E, Wolfe RR.** Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol*, 1993; 265:E380–E391.
- **Saddik M, Gamble J, Witters LA, Lopaschuk GD.** Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart. *J Biol Chem* 1993;268:25836–25845.
- **Sastre J, Asensi M, Gascó E, Pallardó FV, Ferrero JA, Furukawa T, Viña J.** Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol*, 1992; 263:R992-R995.
- **Schuster GS, Dirksen TR, Ciarlone AE, Burnett GW, Reynolds MT, Lankford MT.** Anticaries and antiplaque potential of free-fatty acids in vitro and in vivo. *Pharmacol Ther Dent*, 1980; 5:25-33.
- **Secco HD, Paffenberger RS, Lee IM.** Physical activity and coronary heart disease in men: The Harvard Alumni Health Study: *Circulation*, 2000; 102:975-980.
- **Sen CK, Packer L.** Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr*, 2000; 72: 653-669.
- **Siddiqui RA, Jensi LJ, Neff K, Harvey K, Kovacs RJ, Stillwell W.** Docosahexanoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase mediated protein. *Biochim Biophys Acta*, 2001; 1499:265-275.
- **Sidossis LS, Gastaldelli A, Klein S, Wolfe RR.** Regulation of plasma fatty acid oxidation during low- and high-intensity exercise. *Am J Physiol*, 1997; 272:E1065–E1070.
- **Sies H.** *Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants*, New York, Academic Press, 1991.
- **Simopoulos AP.** Omega-3 fatty acid in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 1991, 54: 438-63.

- **Simopoulos AP.** Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1999; 60:421-429.
- **Simopoulos AP.** Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J Am Coll Nutr*, 2002; 21:495-505.
- **Shephard RJ, Shek PN.** Potential impact of physical activity and sport on the immune system a brief review. *Br J Sp Med*, 1994; 28:247-255.
- **Skidmore PM, Woodside JV, Mc Master C, Bingham A, Mercer C, Evans A, Young IS, Yarnell JW.** Plasma free fatty acid patterns and their relationship with CVD risk in a male middle-aged population. *Eur J Clin Nutr*, 2010; 64:239-244.
- **Smith HK.** Applied physiology of water polo. *Sports Med*, 1998; 26:317–334.
- **Smith JA, Martin DT, Telford RD, Ballas SK.** Greater erythrocyte deformability in world-class endurance athletes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1999; 276:H2188–H2193.
- **Starkie RL, Rolland J, Angus DJ, Anderson MJ, Febbraio M.** Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF- $\alpha$  levels after prolonged running. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001; 280:C769–C774.
- **Starling RD, Trappe TA, Parcel AC, Kerr CG, Fink WJ, Costill DL.** Effects of diet on muscle triglyceride and endurance performance. *J Appl Physiol*, 1997; 82:1185–1189.
- **Stubbs CD, Smith AD.** The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochem Biophys Acta*, 1984; 779:89-137.
- **Stump DD, Fan X, Berk PD.** Oleic acid uptake and binding by rat adipocytes define dual pathways for cellular fatty acid uptake. *J Lipid Res*, 2001; 42:509-520.
- **Sumikawa K, Mu Z, Inoue T, Okochi T, Yoshida T, Adachi K.** Changes in erythrocyte membrane phospholipid composition induced by physical training and physical exercise. *Eur J Appl Physiol*, 1993; 67:132-137.
- **Sun CQ, O'Connor CJ, Robertson AM.** The antimicrobial properties of milk fat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase. *Chem Biol Interact*, 2002; 140:185-198.
- **Szabo A, Romvari R, Febel H, Bogner P, Szendrő Z.** Training induced alterations of the fatty acid profile of rabbit muscles. *Acta Vet Hung*, 2002; 50:357–364.



- **Šentija D.** Fiziologija sporta 4. 2004, 45-93.
- **Tauler P, Aguiló A, Guix P, Jiménez F, Villa G, Tur JA, Córdova A, Pons A.** Pre-exercise antioxidant enzyme activities determine the antioxidant enzyme erythrocyte response to exercise. *J Sports Sci*, 2005; 23:5-13.
- **Tauler P, Gimeno I, Aguiló A, Guix MP, Pons A.** Regulation of erythrocyte antioxidant enzyme activity during competition and short-term recovery. *Pflugers Arch*, 1999; 438:782-787.
- **Tepsic J, Vucic V, Arsic A, Blazencic-Mladenovic V, Mazic S, Glibetic M.** Plasma and erythrocyte phospholipid fatty acid profile in professional basketball and football player. *Eur J Appl Physiol*, 2009; 107:359–365.
- **Tepsic J, Vucic V, Arsic A, Mazic S, Djelic M, Glibetic M.** Unfavourable plasma and erythrocyte phospholipid fatty acid profile in elite amateur boxers. *Eur J Sport Sci*, 2011; 1-8, DOI:10.1080/17461391.2011.630105
- **Thomas TR, Londeree BR, Gerhardt KO, Gehrke CW.** Fatty acid profile and cholesterol in skeletal muscle of trained and untrained men. *J Appl Physiol*, 1977; 43: 709-713.
- **Thormar H, Isaacs CE, Kim KS, Brown HR.** Inactivation of visna virus and other enveloped viruses by free fatty acids and monoglycerides. *Ann N Y Acad Sci*, 1994; 724:465-471.
- **Tiidus PM, Pushkarenko J, Houston ME.** Lack of antioxidant adaptation to short-term aerobic training in human muscle. *Am J Physiol*, 1996; 271:R832-R836.
- **Turcotte LP, Kiens B, Richter EA.** Saturation kinetics of palmitate uptake in perfused skeletal muscle. *FEBS Lett*, 1991; 279:327–329.
- **Turcotte LP, Richter EA, Kiens B.** Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs. untrained humans. *Am J Physiol*, 1992; 262:E791–E799.
- **Turcotte LP, Swenberger JR, Tucker MZ, Yee AJ.** Training-induced elevation in FABPpm is associated with increased palmitate use in contracting muscle. *J Appl Physiol*, 1999; 87:285–293.
- **Urso M, Clarkson P.** Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 2003; 189:41-54.

- **US Department of Agriculture Agricultural Research Service.** USDA national nutrient database for standard reference, release 18. Nutrient data laboratory home page. Available from [http:// www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl](http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl). 2005. [Accessed 18 June 2006.]
- **Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MTD, Mazura M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007; 39:44–84.
- **Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazura M.** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006; 160:1–40.
- **Van Houwelingen AC, Foreman V, Dronglen MMHP, Nicolini U, Nikolaides KH, Al MDM, Kester ADM, Hornstra G.** Essential fatty acids status of fetal plasma phospholipids: Similar to postnatal values obtained at comparable gestational age. *Early Human Dev*, 1996; 46:141-152.
- **Verde TJ, Thomas SG, Moore RW, Shek P, Shephard RJ.** Immune responses and increased training of the elite athlete. *J Appl Physiol*, 1992; 73:1494–1499.
- **Vincent R, Brackenbury JH.** Plasma free fatty acid profile in male and female domestic fowl at rest and after exercise. *Poult Sci*, 1987; 66:368-372.
- **Vlaški M, Krstić A, Jovčić G, Bugarski D, Petakov M, Stojanović N, Milenković P.** Effects of IL-17 on functional activity of peripheral blood cells. *Acta veterinaria*, 2004; 54:249-261
- **Vučić V, Arsić A, Gurinović M, Glibetić M.** Oleic acid content in cow's milk and vegetable oils on Serbian market. 6<sup>th</sup> Central European Congress on Food, CEFood, 2012, 231-234.
- **Wang JS, Lee T, Chow SE.** Role of exercise intensities in oxidized low-density lipoprotein-mediated redox status of monocyte in men. *J Appl Physiol*, 2006; 101:740–744.
- **Wannamethee SG, Schaper AG.** Physical activity in the prevention of cardiovascular disease: an epidemiological perspective. *Sports Med*, 2001; 31:101-114.
- **Wendling PS, Peters SJ, Heigenhauser GJF, Spriet LL.** Variability of triacylglycerol content in human skeletal muscle biopsy samples. *J Appl Physiol*, 1996; 81:1150–1155.

- **Weneger FA, Jacobi CA, Kilian M, Zieren J, Muller JM.** Does Dietary Alpha-linolenic acid promote liver metastases in Pancreatic carcinoma initiated y BOP in Syrian-Hamster. *Ann Nutr Metab*, 1999; 43:121-126.
- **Williams MA, Fleg JL, Ades PA, Chaitman BR, Miller NH, Mohiuddin SM, Ockene IS, Taylor CB, Wenger NK.** Secondary prevention of coronary heart disease in the elderly (with emphasis on patients  $\geq 75$  years of age): an American Heart Association scientific statement from the Council on Clinical Cardiology Subcommittee on Exercise, Cardiac Rehabilitation, and Prevention. *Circulation*, 2002; 105:1735-1743.
- **Wolfe RR, Klein S, Carraro F, Weber JM.** Role of triglyceride-fatty acid cycle in controlling fat metabolism in humans during and after exercise. *Am J Physiol*, 1990; 258:E382–E389.
- **Wolk A, Furuheim M, Vessby B.** Fatty acid composition of adipose tissue and serum lipids are valid biological markers of dairy fat intake in men. *J Nutr*, 2001; 131:828-833.
- **Woods J, Lu Q, Ceddia MA, Lowder T.** Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: exercise-induced modulation of macrophage function. *Immunol Cell Biol*, 2000; 78:545–553.
- **Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC.** The effect of dietary-lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. *Immunology*, 1994; 82:603-610.
- **Young AJ, Lowe GM.** Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Arch Biochem Biophys*, 2001; 385: 20-27.

## **BIOGRAFIJA AUTORA**

Aleksandra Č. Arsić rođena je 1971. godine u Surdulici. Osnovnu u srednju skolu završila je u Vladičinom Hanu. Hemijski fakultet u Beogradu, smer biohemija upisala je školske 1990/1991. godine, a diplomirala 2000. Godine. Školske 2000/2001. godine upisala je poslediplomske studije na biohemiji istog fakulteta. Magistrirala je 2009. na Hemijskom fakultetu.

Od 1.11.2000. godine zaposlena je na Institutu za medicinska istraživanja kao istraživač pripravnik u laboratoriji za ishranu i metabolizam. U periodu od 2001-2005. godine učestvovala je na projektu 1244 „Ishrana kao faktor rizika, profilaktički i terapijski faktor za zdravlje i masovne nezarazne bolesti populacije“. Od januara 2006. godine učestvovala je na projektu 145071 „Razvoj novih terapijskih postupaka u prevenciji i lečenju bolesti jetre- uloga i mehanizam delovanja polinezasićenih masnih kiselina“. Od januara 2011. učestvuje na projektu III41030 "Biološki mehanizmi, nutritivni unos i status polinezasićenih masnih kiselina i folata: unapređenje ishrane u Srbiji." Projekte je finansiralo i finansira Ministarstvo za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ мр Александра Арсић \_\_\_\_\_

број уписа \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

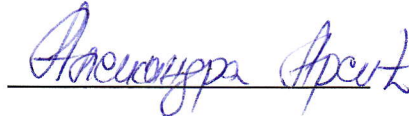
„Утицај хроничног интензивног тренинга на параметре оксидативног стреса и

маснокиселински профил плазме и еритроцита код спортисткиња“

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

Потпис докторанда

У Београду, 3.9.2012.

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ мр Александра Арсић \_\_\_\_\_

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ биологија \_\_\_\_\_

Наслов рада „Утицај хроничног интензивног тренинга на параметре оксидативног стреса и  
маснокиселински профил плазме и еритроцита код спортисткиња“  
\_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ проф др Бато Кораћ, др Весна Вучић \_\_\_\_\_

Потписани \_\_\_\_\_ мр Александра Арсић \_\_\_\_\_

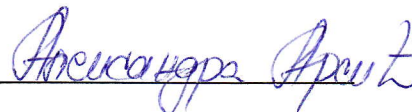
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_ 3.9.2012. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

„Утицај хроничног интензивног тренинга на параметре оксидативног стреса и

---

маснокиселински профил плазме и еритроцита код спортисткиња“

---

која је моје ауторско дело.

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

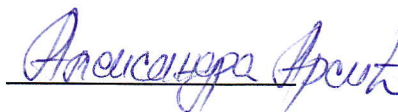
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 3.9.2012.



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