

Učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na koncentraciju F2t-izoprostana

Marijančević, Domagoj

Doctoral thesis / Disertacija

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:888391>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

DOMAGOJ MARIJANČEVIĆ

**UČINCI TRENAŽNOG PROTOKOLA PONAVLJANIH
SPRINTOVA NA KONCENTRACIJU F_{2t}-IZOPROSTANA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

DOMAGOJ MARIJANČEVIĆ

**THE EFFECTS OF REPEATED SPRINT TRAINING
PROTOCOL ON F_{2t}-ISOPROSTANE CONCENTRATION**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2020



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

DOMAGOJ MARIJANČEVIĆ

**UČINCI TRENAŽNOG PROTOKOLA PONAVLJANIH
SPRINTOVA NA KONCENTRACIJU F_{2t}-IZOPROSTANA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

izv. prof. dr. sc. Nada Vrkić

doc. dr. sc. Vlatko Vučetić

Zagreb, 2020.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

DOMAGOJ MARIJANČEVIĆ

**THE EFFECTS OF REPEATED SPRINT TRAINING
PROTOCOL ON F_{2t}-ISOPROSTANE CONCENTRATION**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Associate Professor Nada Vrkić, Ph.D.

Assist. Professor Vlatko Vučetić, Ph.D.

Zagreb, 2020

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Endokrinološkom laboratoriju Klinike za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu i na Zavodu za kineziologiju sporta Kineziološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

mentorima prof. dr. sc. Nadi Vrkić i doc. dr. sc. Vlatku Vučetiću na mudrim savjetima i podršci tijekom izrade doktorskog rada,

suradniku doc. dr. sc. Danielu Boku na znanstvenom poticanju,

svim kolegama koji su uvijek imali motivirajuće rješenje za istraživačke nedoumice, organizacijska kolebanja, analitičke izazove, moralna padanja, za sve prepreke koje je bilo teško samostalno preskočiti i

mojoj obitelji jer je kompas koji me vodi, trajno nadahnuće i snaga.

SAŽETAK

Trening ponavljanih sprintova (RST, engl. *repeated sprint training*) jest format visokointenzivnog intervalnog treninga koji se sve učestalije koristi kao učinkovita trenažna strategija. Programirano tjelesno vježbanje može rezultirati nekontroliranim i prekomjernim stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, engl. *reactive oxygen species*), međutim ROS također predstavljaju sekundarne glasnike čije stvaranje ima važnu ulogu u regulaciji stanične signalizacije na nivou skeletnih mišića. Cilj istraživanja bio je ispitati biokemijski odgovor na RST analizom biljega oksidacijskog/antioksidacijskog statusa, mišićnog oštećenja i imunosnog odgovora te ispitivanjem njihove međusobne povezanosti.

U istraživanje je uključeno 15 studenata prve godine Kineziološkog fakulteta, muškog spola, raspona životne dobi od 18 do 22 godine. Razine 15-F_{2t}-izoprostana (15-F_{2t}-IsoP) u plazmi i 24h mokraći, superoksid-dismutaze, glutation-peroksidaze i glutation-reduktaze (GR) u eritrocitima, urata, ukupnog bilirubina, albumina, transferina i prolaktina u serumu, slobodnog kortizola i katekolamina u 24h mokraći, kreatin-kinaze (CK), aspartat-aminotransferaze, laktat-dehidrogenaze i mioglobina u serumu; interleukina-6 (IL-6) i C-reaktivnog proteina (CRP) u serumu te kompletne krvne slike, određene su u tri vremenske točke: nakon inicijalnog mjerenja (T₀), nakon finalnog mjerenja (T₁) i mjesec dana nakon finalnog mjerenja (T₂).

Protokol RST uzrokovao je statistički značajno povećanje koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u plazmi u odnosu na 24h mokraću. Finalno mjerenje, karakterizirano 60%-tnim povećanjem opterećenja, rezultiralo je značajnim smanjenjem aktivnosti GR i koncentracije albumina. Premda je ustanovljen zamjetan porast aktivnosti CK, razlike nisu bile statistički značajne. Program RST rezultirao je statistički značajnim povećanjem koncentracije IL-6 i nepromijenjenim CRP. Mjesec dana nakon RST, zabilježen je statistički značajan pad koncentracije IL-6, broja leukocita i neutrofilnih granulocita. Povećanje koncentracije 15-F_{2t}-IsoP nije bilo povezano s pokazateljima oštećenja mišića i imunosnog odgovora.

Ovo istraživanje pokazalo je da prateći ispitanike kroz vrijeme u kojem je sukcesivno povećavan volumen treninga, nije dokazan proporcionalan porast lipidne peroksidacije kao ni porast biljega oštećenja mišića što upućuje na zaključak da se u ovoj vrsti trenažnog protokola vremenom postiže uspješna adaptacija i zaštita od daljnjih oksidacijskih oštećenja.

Ključne riječi: trenažni protokol ponavljanih sprintova, redoks homeostaza, 15-F_{2t}-izoprostani, antioksidansi, mišićno oštećenje, imunosni odgovor

SUMMARY

Background: Regular physical exercise is recognized as an important contributor to health. Repeated sprint training (RST) is a form of high-intensity interval training (HIIT) in which short-duration all-out sprints are interspersed with short recovery periods. This type of training is often used by team sports players since, during a game, they are required to perform repeated bursts of intensive activities interspersed with very short recovery periods. RST has shown to be effective in improving power, speed, repeated sprint ability and endurance which may transfer positively on players' game performance. Although HIIT has been recognized and accepted as an effective training modality for fitness and health improvement, there is very little information about the effects of RST, on health in general and, especially, on alterations in redox homeostasis (ARH). Namely, a great anaerobic demand, stemming from repeating all-out sprints, and increasing aerobic contribution throughout a bout, as sprints are done with very little recovery in-between, may increase production of reactive oxygen species (ROS) which may lead to oxidative stress (OS). The level of F_{2t}-isoprostanes in blood or urine is widely regarded as the "gold standard" marker for the assessment of redox homeostasis. Isoprostanes, are a novel group of prostaglandin-like compounds that are biosynthesized from esterified polyunsaturated fatty acid through a nonenzymatic free radical-catalyzed reaction. The production of ROS is dependent on exercise intensity and volume and it can vary considerably depending on the athletes' fitness level, training phase, and environmental conditions. Besides being responsible for cellular damage, ROS are also important molecules serving as secondary messengers in skeletal muscle signaling cascades, so their role is essential for muscle adaptation after training. Generally, exercise training of any kind is recommended to all populations because it may protect them from OS by reinforcing their antioxidant defenses. This type of training also induces great metabolic stress and may lead to acute attainment of maximal O₂ uptake. Due to much greater intensity at which RST is executed in comparison to moderate and high-intensity aerobic training and due to much greater eccentric muscle contractions elicited while sprinting as opposed to running or jogging, leading to a greater level of subsequent muscle damage, this type of training may provide a stimulus for greater anti-inflammatory adaptations. As short-duration high-intensity activities became very popular even among general population as a time-efficient strategy for health improvement, it is of utmost importance to investigate its potential for inducing positive adaptations of the immune system.

Aim: The main aim of this study was to investigate the effects of running RST on alterations in redox homeostasis by monitoring 15-F_{2t}-isoprostane (15-F_{2t}-IsoP) concentration, widely

regarded as the “gold standard” marker for the assessment of *in vivo* lipid peroxidation. Additionally, the study investigated whether muscle and inflammatory status serve as the contributing factor in ARH after a training period. Finally, the specific aim was to examine the association between ARH and maximal O₂ uptake (aerobic fitness).

Participants and methods: Fifteen male physical education students (aged 20.0±1.0 years; body weight 77.7±6.0 kg; height 181.0±4.4 cm; %body fat 8.7±3.0 %), familiar with intermittent activities, volunteered to participate in the study. All participants were screened for cardiovascular diseases, muscle injuries or ongoing medical treatment with the Physical Activity Readiness Questionnaire before their inclusion into the experimental protocol. Basic inclusion criteria included nonparticipation in any organized physical activity program or sport for three months before and throughout the study. Participants were instructed to refrain from alcohol and cigarette as well as antioxidant supplementation consumption throughout the study. The experimental training program consisted of 2-3 sets of 6-10 straight-line or shuttle 20-meter repeated sprints with departures every 25 seconds and 2-minute inter-set passive recovery. The training intervention lasted for six weeks during which 18 training sessions were performed. The levels of 15-F_{2t}-IsoP were measured in plasma and 24-hour urine, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) in erythrocytes; uric acid (UA), total bilirubin, albumin, transferrin and prolactin in serum; free cortisol and catecholamines in 24-hour urine; creatine kinase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase and myoglobin in serum; interleukin 6, C-reactive protein as well as complete blood counts were determined at three-time points: after an initial training session (T₀), after the final training session (T₁) and one month after the final training session (T₂). Blood was collected within 20 minutes post-exercise, while a 24-hour urine sample was collected four days post-exercise, following each experiment phase at the same time at each stage to control for diurnal variation in analytes concentrations.

Results: The statistically significant changes were observed in repeated measures of plasma 15-F_{2t}-IsoP concentration and GR activity. While the median plasma 15-F_{2t}-IsoP increased by 75% (from 0,32 to 0,56 ng/mL; p=0,026), the median GR decreased by 56% (from 7,7 to 3,4 U/g Hb; p<0,001). In 24-hour urine samples, 15-F_{2t}-IsoP levels were 25% greater in post-training (from 1,02 to 1,31 ng/24h; p=0,121), although these increases did not reach statistical significance. Following RST erythrocyte SOD and GPx activities were 11% (from 372,3 to 354,2 U/g Hb; p=0,489) and 27% (from 16,6 to 13,2 U/g Hb; p=0,119) lower, although these decreases were nonsignificant. The concentration of extracellular antioxidants, except albumin,

remained close to the baseline values throughout the training program. The level of muscle damage following the repeated sprint exercise was not significantly altered since there were no significant post-training differences in CK activities (402 to 496 U/L; $p=0,151$) and had no significant associations with the changes in markers depicting redox homeostasis. Interleukin-6 was significantly increased (1,83 to 4,31 pg/mL; $p=0,002$), while total leukocyte and neutrophil count also increased although the results were not statistically significant. Interleukin-6, as well as total leukocyte and neutrophil count was significantly decreased one-month post-RST (1,83 to 0,68 pg/mL, $p=0,030$; $7,1$ to $5,4 \times 10^9/L$, $p<0,0001$ and $57,8$ to $54,2\%$, $p=0,042$, respectively). There were no significant correlations between pre-to-post change in inflammation markers and pre-to-post change in any marker of redox homeostasis. Changes in relative maximal O_2 uptake were positively associated with changes in the concentration of 15-F_{2t}-IsoP in 24-hour urine ($r=0,546$; $p=0,035$) and serum UA ($r=0,568$; $p=0,027$).

Conclusions: Greater levels of plasma and urinary 15-F_{2t}-IsoP obtained at post-training are probably the result of a combination of inadequate recovery, resulting from constantly increasing 6-week training volume, and a higher acute OS response due to the 60% greater workload of post-training RS exercise. Assuming that significant correlation between training volume and post-training 15-F_{2t}-IsoP levels exist and that greater exercise workload elicits greater OS response, the fact that the increase in urinary 15-F_{2t}-IsoP level was much lower than the increase of total training volume from first to the final week and the increase of exercise workload (60%) suggests that RST may cause attenuation of OS. The main ROS generating mechanism during repeated sprint exercise is probably ischemia-reperfusion process as intensive, anaerobic exercises are associated with transient muscle hypoxia when oxygen supply cannot match the energy demands. This is probably the reason why reduction was registered in SOD, GPx, and GR, all involved in the ischemia-reperfusion process, while a non-significant increase was reported in UA, which is an end-product of purine metabolism with a rather fast upregulating acute response to exercise via the activity of xanthine oxidase. Therefore, this significant reduction of GR, probably stimulated with a significant increase of OS post-training, might suggest that the participants were developing antioxidant protection necessary to attenuate oxidative damage of their erythrocytes being imposed by an extremely stressful anaerobic exercise. The level of muscle damage following RS exercise was not changed after the RST program and showed not to be associated with changes in markers representing ARH. It appears that this 6-week RST program is suitable for athletes of a similar fitness level as were the participants in this study, to maintain, or even alleviate, the level of

muscle damage during the period of the increasing training load implementation, which is common for the preseason training in team sports. In conclusion, we showed for the first time the potential of RST to stimulate the balance in redox homeostasis and reduce levels of systemic basal inflammation.

Keywords: repeated sprint training protocol, alterations in redox homeostasis, 15-F_{2t}-isoprostanes, antioxidant status, muscle damage, inflammation

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Trening ponavljanih sprintova.....	2
1.1.1. Energetsko-metaboličke promjene uvjetovane sprintom.....	4
1.1.2. Mišićno oštećenje.....	7
1.1.3. Imunosni odgovor.....	13
1.2. Sprint i promjene u redoks homeostazi.....	15
1.2.1. Stvaranje reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva.....	16
1.2.2. Oksidacijski stres.....	19
1.2.3. Antioksidacijski status.....	21
1.3. F _{2t} -izoprostani.....	24
1.3.1. Lipidna peroksidacija.....	24
1.3.2. Sinteza i pojavnost.....	24
1.3.3. Metabolizam.....	26
1.3.4. Analitička razmatranja.....	27
1.3.5. Učinci programiranog tjelesnog vježbanja.....	28
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA	30
3. ISPITANICI I METODE	32
3.1. Ispitanici.....	33
3.2. Ustroj istraživanja.....	34
3.2.1. Eksperimentalni program treninga ponavljanih sprintova.....	34
3.2.2. Mjerni instrumenti za procjenu morfoloških karakteristika i kondicijske pripremljenosti ispitanika.....	36
3.3. Uzorci.....	37
3.3.1. Uzimanje uzoraka krvi.....	37
3.3.2. Priprema plazme i hemolizata eritrocita.....	37
3.3.3. Uzimanje uzoraka 24-satne mokraće.....	38

3.4.	Metode	38
3.4.1.	Materijali	38
3.4.2.	Metode određivanja biljega oksidacijskog stresa	40
3.4.3.	Metode određivanja biljega antioksidacijskog statusa	42
3.4.4.	Metode određivanja hormona induciranih stresom	45
3.4.5.	Metode određivanja biljega oštećenja mišića.....	48
3.4.6.	Metode određivanja biljega imunosnog odgovora	49
3.5.	Statistička analiza	50
4.	REZULTATI	52
4.1.	Učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na status redoks homeostaze	53
4.2.	Učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na mišićni status	56
4.3.	Učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na imunosni odgovor.....	58
4.4.	Povezanost statusa redoks homeostaze s biljezima oštećenja mišića te imunosnog odgovora kod trenažnog protokola ponavljanih sprintova	61
4.5.	Dugoročni učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na status redoks homeostaze	63
4.6.	Povezanost statusa redoks homeostaze s razinama aerobne izdržljivosti.....	66
5.	RASPRAVA	68
6.	ZAKLJUČCI	84
7.	POPIS LITERATURE.....	86
8.	POPIS KRATICA	103
9.	ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA	107

1. UVOD

Redovita tjelesna aktivnost važna je odrednica zdravlja, potpunog tjelesnoga, duševnoga i socijalnog blagostanja (1). Programiranim tjelesnim vježbanjem može se unaprijediti rad i uravnotežiti funkcija organskih sustava, stoga trenažni podražaji čine proaktivne pristupe kojima se prevenira razvoj kroničnih nezaraznih bolesti i poboljšava opći zdravstveni status populacije (2). S ciljem promicanja zdravlja, u posljednje vrijeme iznimno su popularizirani visokointenzivni intervalni treninzi (VIIT), radi veće učinkovitosti u unapređenju kardiorespiratornog fitnesa, manjeg subjektivnog osjećaja napora, veće razine ugone i realizacije većeg volumena treninga u odnosu na umjerenointenzivne kontinuirane treninge. Slijedom istaknutih dobrobiti, opravdano se promoviraju kao vrlo učinkovite trenažne strategije za unapređenje zdravlja, budući da se nedostatak vremena najčešće ističe kao vodeća zapreka redovitom tjelesnom vježbanju (3).

Međutim, akutni odgovor na tjelesnu aktivnost može rezultirati povećanim stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, engl. *reactive oxygen species*) čime oksidacijska oštećenja unutar staničnih struktura postaju vjerojatnija (4). Nekontrolirano i prekomjerno nastajanje ROS-a može pridonijeti pomaku redoks ravnoteže u prooksidacijskom smjeru, potičući kroničnu upalu povezanu s razvojem bolesti (5) i naglašenim procesom starenja (6). S druge strane, ROS su sekundarni glasnici i njihovo stvaranje ima važnu ulogu u regulaciji stanične signalizacije na nivou skeletnih mišića, stoga je njihovo djelovanje ključno u mišićnoj adaptaciji na trenažni podražaj (7). Razina nastajanja ROS-a ovisi o intenzitetu i volumenu tjelesne aktivnosti (8), a u skladu s time može se značajno razlikovati ovisno o razini kondicijske pripremljenosti, fazi trenažnog programa i okolišnim uvjetima (7). Negativni učinci treningom potaknutih oksidacijskih oštećenja donekle se mogu suzbiti posljedičnom aktivacijom antioksidacijske obrane (4). Općenito, tjelesna aktivnost bilo koje vrste preporučuje se svim populacijskim skupinama, kako bi se prevenirao nastanak oksidacijskih oštećenja, jačanjem vlastitih antioksidacijskih zaštitnih mehanizama.

1.1. Trening ponavljanih sprintova

Sportske igre čine jedan od najatraktivnijih segmenata sporta današnjice. Struktura aktivnosti većine sportskih igara uključuje stalno ponavljanje visokointenzivnih (submaksimalnih) ili maksimalnih aktivnosti ispresijecanih kratkim periodima niskointenzivnih aktivnosti ili odmora koji se kontinuirano ponavljanju tijekom cijele utakmice ili susreta (9). Analizama je utvrđeno kako sprint predstavlja jednu od ključnih kategorija

kretanja u sportskim igrama (10) te da se odmicanjem susreta ili natjecanja količina sprinta smanjuje kao rezultat umora (11). Sposobnost odupiranja umoru i zadržavanja maksimalnog intenziteta aktivnosti tijekom cijele utakmice ili susreta pokazala se kao iznimno važna sposobnost za sportaše iz sportskih igara. Opisana sposobnost nazvana je sposobnost ponavljanja sprintova (SPS) (RSA, engl. *repeated sprint ability*).

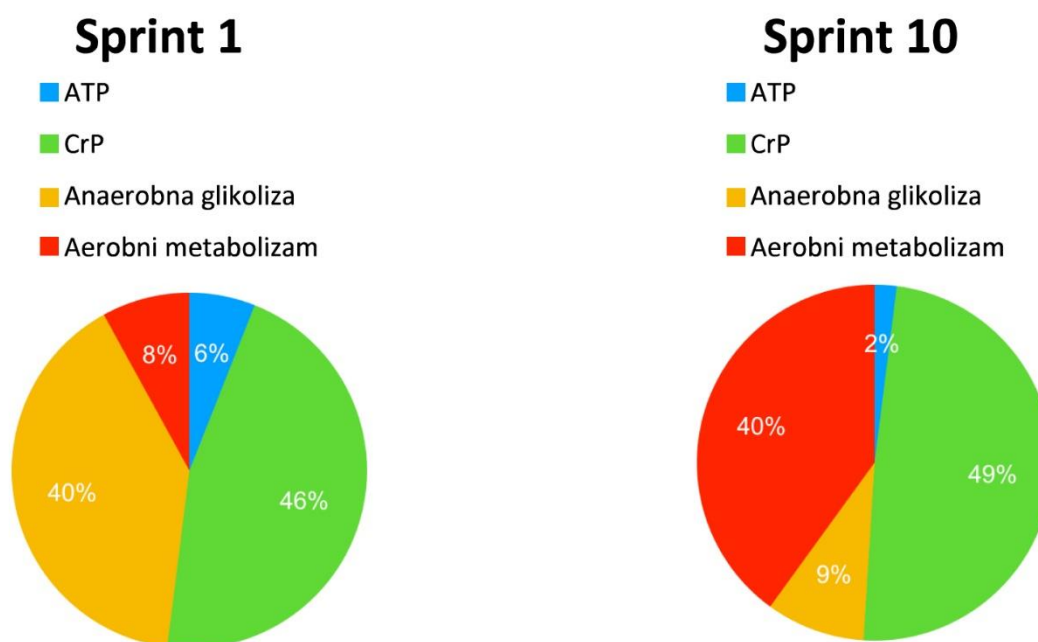
Primjenom notacijske analize i sve prisutnijeg GPS-a (engl. *global positioning system*) u sportskim igrama (nogomet, košarka, ragbi i hokej) utvrđene su karakteristike kretnih struktura, pa tako i značajke pojavnosti sprintova kao zasebne cjeline. Sprint je definiran kao trčanje brzinom preko 25 km/h. Varijable koje opisuju sprint kao izoliranu kategoriju kretanja vrlo su slične u većini sportskih igara. Sprintovi kao kategorija kretanja izvode se u relativno malom postotku ukupnog vremena igre (oko 1 do 2%), pri čemu se na razini utakmice ponavljaju u prosjeku 20 do 40 puta. Serije ponavljanih sprintova u utakmici najčešće se realiziraju s minimalnim brojem sprintova (dva sprinta), dok maksimalan broj sprintova po seriji nije veći od sedam. Jednako analizi sprinterskih performansi, tako i broj serija ponavljanih sprintova evidentno opada tijekom utakmice.

Trening ponavljanih sprintova (RST, engl. *repeated sprint training*) je format VIIT-a koji je posljednjih godina postao učestalo korištena metoda treninga za unapređenje sposobnosti ponavljanja sprintova (12). Doista, trening ponavljanih sprintova pokazao se učinkovitom strategijom u poboljšanju snage, brzine, sposobnosti ponavljanja sprintova te izdržljivosti koji se potom mogu uspješno projicirati na sportske performanse igrača na terenu (13). Sve više se primjenjuje u procesu kondicijske pripreme tijekom natjecateljskog perioda zbog relativno malog volumena rada i pozitivnog učinka na veliki broj poželjnih kondicijskih sposobnosti u sportaša. Protokoli treninga ponavljanih sprintova uključuju ponavljanja pravocrtnih ili povratnih sprintova u trajanju od 3 do 7 sekundi na kratkoj dionici (25 metara) isprepletenih s periodima kratkotrajnog aktivnog ili pasivnog odmora (≤ 60 sekundi) (9,14).

1.1.1. Energetsko-metaboličke promjene uvjetovane sprintom

1.1.1.1. Fosfageni sustav

Promatrano evolucijski, sposobnost realizacije sprinta bila je od presudne važnosti za opstanak mnogih vrsta tijekom lova na plijen, ili izbjegavanja ulova. Čovjek tijekom izvedbe sprinta u trajanju od 30 sekundi može za nekoliko sekundi postići vrijednosti vršne snage veće od 3 000 W (15) te održati prosječnu snagu iznad 1 000 W (16). To zahtijeva iznimnu količinu energije mobiliziranu u kratkom vremenu, međutim skeletni mišići idealnom građom osiguravaju potrebe koristeći lako dostupne izvore kao što su adenzin-trifosfat (ATP) i kreatin-fosfat (CrP), koji mogu pružiti ~50% energije potrebne za realizaciju sprinta u trajanju 6 sekundi, dok se ostatak energije osigurava uglavnom visokim udjelom anaerobne glikolize (17) (Slika 1.). Dakle, za izvedbu maksimalno intenzivnih i kratkotrajnih aktivnosti poput sprintova primarno su odgovorni fosfageni kapaciteti, odnosno ATP i CrP koji omogućuju izrazito brzu opskrbu energijom.



Slika 1. Metaboličke promjene praćene prvim i desetim sprintom tijekom provedbe ponavljanih sprintova.

ATP – adenzin-trifosfat; CrP – kreatin-fosfat. Prilagođeno prema Girard O i suradnicima (11).

Tijekom prvih 5 do 10 sekundi sprinta, brzo smanjivanje rezervi CrP-a dovodi do povećanja koncentracije slobodnog adenzin-difosfata (ADP), stimulirajući reakciju adenilat kinaze kojom se sprječava prekomjerno nakupljanje ADP-a te inhibiraju miozinske ATP-aze. Inače, potonje čine nepovoljne strukture koje se povezuju sa smanjenom trenažnom

izdržljivosti. Reakcijom adenilat kinaze nastaje adenozin-monofosfat (AMP), koji se zatim deaminira u inozin-monofosfat (IMP), a on posljedično akumulira u mišićima, mehanizmom potaknutim padom intramuskularnog pH. Frakcija IMP-a stvorena tijekom sprinta pretvara se u inozin djelovanjem citoplazmatske 5'-nukleotidaze. Inozin se potom, djelovanjem purin nukleotid fosforilaze i ksantin-oksidge preko ksantina do krajnjeg produkta, urata (18).

Premda je pad koncentracije CrP-a u mišićima evidentniji svakim sljedećim sprintom, razine se mogu smanjiti i doseći 27% početnih vrijednosti već nakon pet sprintova u trajanju od 6 sekundi. Brzina resinteze CrP-a ovisi o razini oksidativnog metabolizma (odnosno VO_{2max} , maksimalnog primitka kisika) što je indirektno potvrđeno izvrsnom povezanosti promjene koncentracija CrP-a i aktivnosti oksidativnih enzima pri ponavljanim sprintovima (19). Resinteza CrP-a odvija se kroz jednu ili dvije faze, ovisno o intenzitetu aktivnosti. Prva i brža faza resinteze odvija se uz pomoć ATP-a dobivenog iz oksidacijske fosforilacije te je ovisna o VO_{2max} . Druga, sporija faza vrši se ovisno o unutarstaničnoj koncentraciji H^+ iona nakon tjelesne aktivnosti, odnosno ukoliko je izraženija acidoza utoliko je resinteza CrP-a sporija (20).

1.1.1.2. Anaerobna glikoliza

Za vrijeme prvih 5 do 10 sekundi sprinta većinu potrebnog ATP-a osiguravaju anaerobni izvori energije, no s produžavanjem sprinta, aerobni metabolički putevi sve više doprinose ukupnoj energetskej opskrbi. Unutar prvih 6 sekundi sprinta, glikoliza dostiže svoj najveći mogući doprinos. Udio anaerobne glikolize u pojedinačnom sprintu na biciklu u trajanju od 6 sekundi iznosi oko 40% ukupne energetske opskrbe (Slika 1.). Unatoč tome što je aktivnost kratkotrajna, udio anaerobne glikolize je prilično velik te ima značajnu ulogu u postizanju maksimalnog intenziteta tijekom sprinta. Doduše, u narednim sprintovima udio anaerobne glikolize u ukupno stvorenom ATP-u značajno se smanjuje zbog povećane mišićne acidoza uzrokovane opsežnom razgradnjom glikogena tijekom prvih sprintova (12).

Povećanje udjela anaerobne glikolize, odnosno sposobnosti većeg stvaranja ATP-a kroz procese anaerobne glikolize i glikogenolize moguće je ostvariti povećanjem anaerobnog kapaciteta. Trenažni podražaji koji će rezultirati visokom koncentracijom laktata (>10 mmol/L), naglašenom acidozom mišića (niska pH vrijednost) i povećanom aktivnošću glikolitičkih enzima (fosforilaze, fosfofruktokinaze, heksokinaze i laktat-dehidrogenaze) omogućuju povećanje anaerobnog kapaciteta. Preporuka je korištenje maksimalno-intenzivnih

aktivnosti u trajanju od 30-ak sekundi s produženim intervalima odmora (~10 minuta) kako bi se unaprijedio anaerobni kapacitet sportaša iz sportskih igara (12,21).

Dominantno oslanjanje na anaerobne izvore energije objašnjava mehanizam zašto snažna mišićna hipoksija ne utječe na vršnu i prosječnu snagu tijekom provedbe sprinta. Očigledno se smanjenje opskrbe kisikom nadoknađuje povećanjem energije stvorene glikolizom na uštrb veće zakiseljenosti mišića (22). Akumulacija H^+ iona uzrokuje snižavanje mišićnog pH što u konačnici rezultira smanjenjem jakosti mišićne kontrakcije (23). Snižena pH vrijednost također dovodi do smanjenja resinteze CrP-a, tijekom druge, spore faze (20). Za vrijeme intenzivne aktivnosti važni regulatori pH jesu monokarbonsilni prijenosnici (MCT, engl. *monocarboxylate transporters*) (24) i proteinski izmjenjivači Na^+/H^+ izoforme 1 (NHE1) (25) koji pomažu puferima u otklanjanju H^+ iona iz mišića i povećanju ukupnog mišićnog pH. Niži intenzitet rada i kratki intervali odmora osiguravaju manje nakupljanje H^+ iona u mišiću i omogućuju kontrakciju mišića u uvjetima blage acidoze (12).

1.1.1.3. Aerobni metabolizam

Sustavi aerobne glikolize, koji podrazumijevaju razgradnju glikogena (glikogenoliza) i aerobne lipolize jesu odgovorni za stvaranje energije pri srednje trajnim i dugotrajnim tjelesnim aktivnostima niskog ili srednjeg intenziteta. Aerobno oslobađanje energije za mišićni rad sporije je od anaerobnog, ali je znatno ekonomičnije. Isto tako, konačni produkti aerobne razgradnje hranjivih tvari (voda i ugljični dioksid) ne narušavaju značajno pH vrijednost i homeostazu organskih sustava.

Općeprihvaćeni parametri za procjenu aerobnoga kapaciteta, odnosno dugotrajne izdržljivosti su; maksimalni primitak kisika (VO_{2max}), koji označava količinu kisika koju organizam može potrošiti u jednoj minuti, te anaerobni prag, koji označava maksimalni intenzitet radnog opterećenja pri kojemu su akumulacija mliječne kiseline i njena razgradnja u ravnoteži. Prema tome, što je veća mogućnost primitka kisika (plućni i srčani kapaciteti, te kapaciteti krvnih transportnih mehanizama za kisik) to je veća aerobna izdržljivost (26).

Tijekom realizacije ponavljanih sprintova udio aerobnog metabolizma u pojedinačnom sprintu povećava se u kontinuitetu te on pri posljednjim ponavljanjima može iznositi i do 40% ukupne energetske potrebe (11,17). Ako se protokoli ponavljanih sprintova izvode u nekoliko serija, ukupno vrijeme provedeno na VO_{2max} dodatno se povećava (14). Za unapređenje

sposobnosti ponavljanja sprintova potrebno je unaprijediti VO_{2max} , pritom je važno orijentirati se kako na povećanje centralnog parametara aerobnog kapaciteta (minutni volumen srca), tako i na unapređenje njegove periferne komponente. Veća mišićna apsorpcija kisika i veća mitohondrijalna aktivnost poboljšat će oporavak, čime će omogućiti kvalitetniju realizaciju serije ponavljanih sprintova. Osim toga, blago povećanje intenziteta rada dovodi do smanjenja razine kisika u mišićima, a posljedična potreba za povećanjem kisika potiče fiziološke adaptacije koje rezultiraju povećanjem VO_{2max} . Dakle, prilično je jasno da intenzitet trenažnog podražaja predstavlja ključnu varijablu pri kreiranju programa aerobnog treninga.

1.1.2. Mišićno oštećenje

Trening ponavljanih sprintova dominantno prate ekscentrične mišićne kontrakcije neophodne za ubrzavanje i usporavanje tjelesne mase, koje posljedično uzrokuju opsežna mehanička naprezanja unutar koštanog-mišićnog sustava, posebice kvadricepsa i hamstringsa (27). Ozljeda mišića nastupa zbog akumulacije mikroskopskih mišićnih oštećenja (mikrotrauma) ili kao posljedica jednog akutnog traumatskog događaja koji mehanički opterećuje mišić iznad njegovih granica (28). Nadalje, mišićno-tetivne strukture izdužuju se iznad svog elastičnog kapaciteta i dolazi do njihova oštećenja (29). Ekscentrična kontrakcija uzrokuje nastanak mikrooštećenja mišića. Uslijed ekscentrične kontrakcije dolazi do pretjeranog izduživanja pojedinih sarkomera, dovodeći do njihova oštećenja u trenutku opuštanja mišića. Kod ponovljenih kontrakcija, područje oštećenja sarkomera raste, vremenom dolazi do oštećenja membrane (mikrooštećenja) i narušavanja homeostaze kalcija čime se aktiviraju procesi karakterizirani kao sekundarni upalni odgovor (30). Nusprodukti mikrooštećenja mišićnih vlakana podražuju periferne bolne receptore (nociceptore) mišića uzrokujući pojavu odgođenog mišićnog zamora (DOMS, engl. *delayed onset muscle soreness*) (31) koji se manifestira mišićnom boli i oslabljenom funkcijom. Kada se sarkomere izduže iznad svoje optimalne duljine dolazi do smanjene sposobnosti proizvodnje sile (32). Smanjena sposobnost mišića u stvaranju sile rezultira smanjenom sposobnosti mišića u apsorpciji energije, što mišić i mišićno-tetivnu spojnicu izlaže povećanom riziku od nastanka ozljede (33). Zaključno, dosadašnja istraživanja potkrjepljuju tezu kako je najvjerojatniji mehanizam mišićnog oštećenja tijekom provedbe ponavljanih sprintova, ekscentrična kontrakcija kvadricepsa i hamstringsa u završnoj fazi zamaha i prvom dijelu faze oslonca, za vrijeme kojih je kuk flektiran i koljeno ekstenirano (29,34).

U protektivnom kontekstu, kontrolirano oštećenje mišića nastalo trenažnim podražajima nužno je za normalno funkcioniranje mišića i njihovu dugoročnu prilagodbu (35). Kao što je već ranije istaknuto, ekscentrične kontrakcije potaknute sprintom uzrokuju oštećenje mišića. Suprotno tome, oštećenje može rezultirati olakšanim popravkom i adaptacijom mišića, što ih čini mnogo otpornijim za daljnje trenažne izazove. Isto tako, pretpostavljena adaptacija čini snažan poticaj porastu mišićne mase, znatno više u odnosu na porast dobiven koncentričnim ili izometričkim tjelesnim aktivnostima. Primijećeno je kako ponavljaju izvedbu istog trenažnog podražaja karakterizira značajno manja razina mišićnog oštećenja od onih koje izaziva početni podražaj (36). Zaštitna prilagodba u literaturi se definira kao „*repeated-bout effect*“, a o mehanizmu adaptacije postoje različita tumačenja. Moguće pojašnjenje leži u eliminaciji slabijih vlakana nekrozom, prilagodbi regrutiranih motornih jedinica, te promjenama unutar citoskeleta i ekstracelularnog matriksa (36-37).

1.1.2.1. Biljezi mišićnog oštećenja

Serumske razine mišićno-specifičnih enzima i/ili proteina čine pokazatelje funkcionalnog statusa mišićnog tkiva. Budući da pojedinačno analizirani biljezi daju potpuno različite informacije o mehanizmima mišićnog oštećenja nakon trenažnog podražaja, laboratorijska dijagnostika kao imperativ promovira multimarkerski pristup radi cjelovitije procijene općeg mišićnog status (Tablica 1).

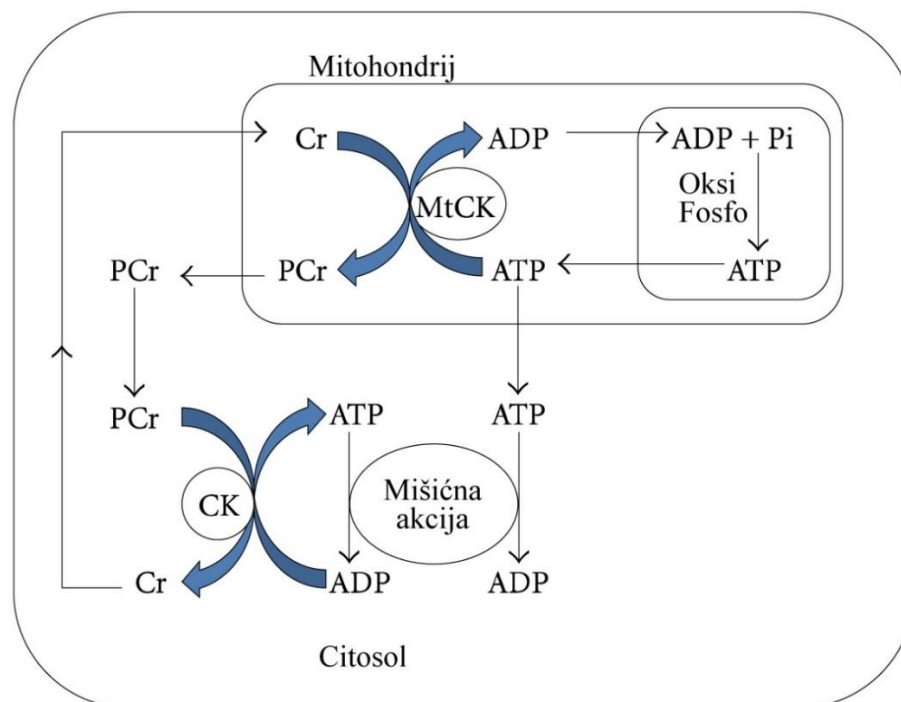
Tablica 1. Opseg povećanja biljega mišićnog oštećenja nakon ekscentričnih tjelesnih aktivnosti

Biljeg	CK	AST	LD	Mioglobin
Opseg porasta	↑ do 4 puta	↑ do 2 puta	↑ do 2 puta	↑ do 4 puta

CK – kreatin-kinaza; *AST* – aspartat-aminotransferaza; *LD* – laktat-dehidrogenaza.

Kreatin-kinaza

Kreatin-kinaza (CK) je dimerni globularni protein koji se sastoji od dvije podjedinice molekularne mase 43–45 kDa. Nalazi se u citosolu i mitohondrijama tkiva karakteriziranih visokim energetske potrebama. Tijekom mišićne kontrakcije, CK katalizira reverzibilnu izmjenu visokoenergetskog fosfata između CrP-a i ADP-a čime se puferira stanični ATP i ADP. Svi oblici enzima CK čine osnovu zajedničke energetske mreže poznate kao fosfageni energetske sustav (Slika 2.). Unutar složenog sustava, citoplazmatski izoenzimi usko su povezani s reakcijama glikolize i stvaranjem ATP-a nužnog za mišićnu aktivnost. Mitohondrijski enzim uključen je u transportni lanac elektrona tijekom oksidacijske fosforilacije, pri tome koristeći ATP za obnavljanje CrP. Stoga je opravdan mišićni sastav s iznimno visokim razinama CK koje mogu činiti čak 20% topljivih sarkoplazmatskih proteina skeletnih mišića. Nadalje, određivanjem forme enzima lokaliziranog u mitohondrijima, sarkomerne mitohondrijske kreatin-kinaze (MtCK), može se dobiti informacija o funkcionalnom statusu mitohondrija, koji su posebno osjetljivi na oštećenje mišića te imaju središnju ulogu u staničnoj regulaciji kroz modulaciju iona kalcija i apoptozu (38).



Slika 2. Fosfageni energetske sustav. *Cr* – kreatin; *PCr* – kreatin-fosfat; *MtCK* – mitohondrijska kreatin-kinaza; *ADP* – adenzin-difosfat; *ATP* – adenzin-trifosfat; *Pi* – anorganski fosfat; *Oksi Fosfo* – oksidacijska fosforilacija; *CK* – kreatin-kinaza. Preuzeto i prilagođeno prema Baird MF i suradnicima (39).

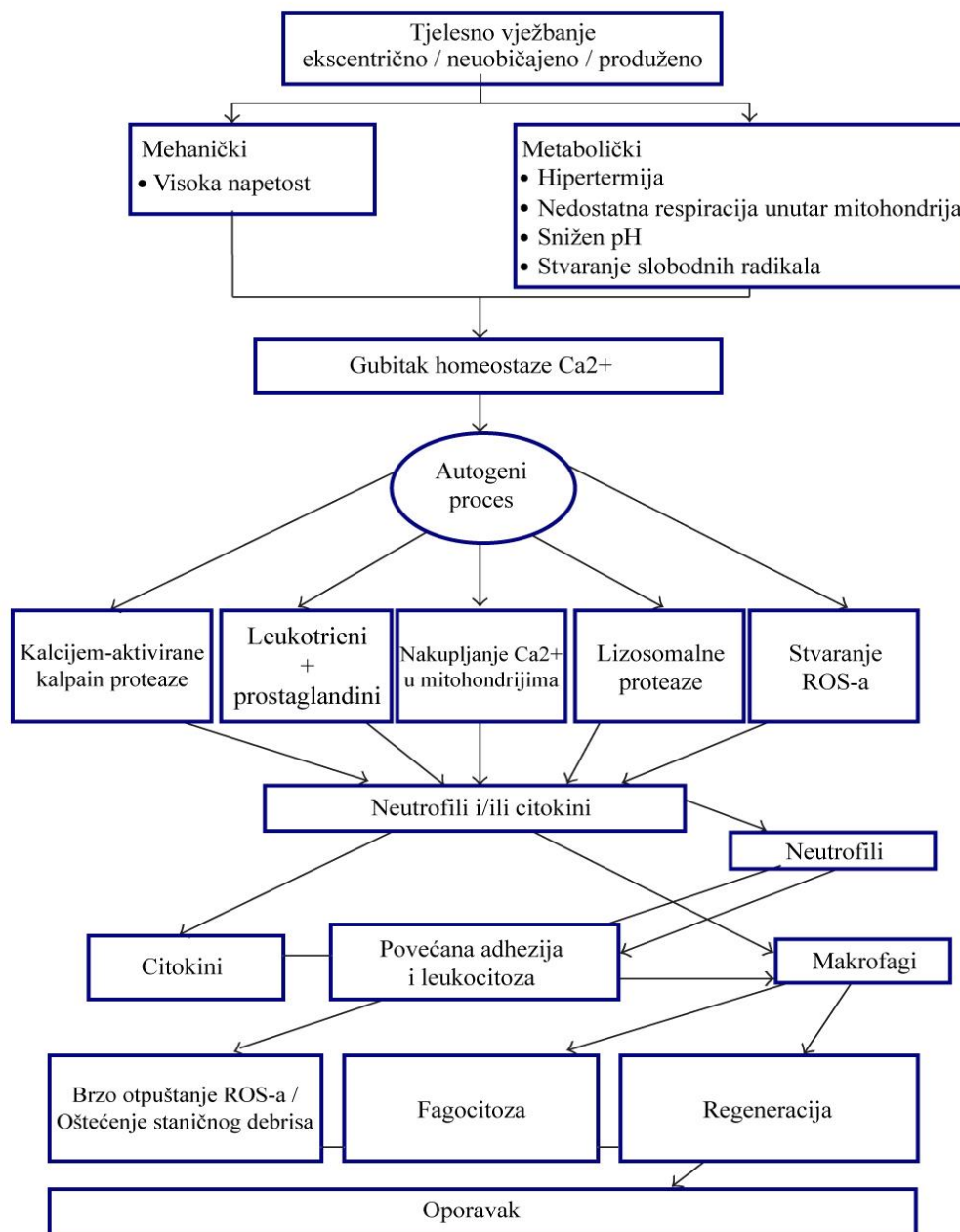
Intenzivna tjelesna aktivnost, praćena oštećenjem stanićnih struktura na razini sarkolema i Z-diskova, rezultira povećanjem aktivnosti ukupnog CK. Preciznije, dolazi do oslobađanja CK-MM izoforme, citoplazmatskog enzima specifićno vezanog za miofibrilarne M-linije unutar sarkomera. Kada intenzitet tjelesne aktivnosti premašuje kapacitet metabolizma, mijenja se propusnosti membrana i enzimi se pojavljuju u cirkulaciji. Metabolićka disregulacija rezultira oslobađanjem stanićnih komponenti kaskadnim nizom reakcija, poćevši s iscrpljivanjem ATP-a i oslobađanjem izvanstanićnog kalcija, do kojih dolazi zbog disfunkcije pumpe Na^+/K^+ ATP-aze i Ca^{2+} ATP-aze. Nadalje, povećava se koncentracija unutarstanićnih proteolitićkih enzima koji potiću razgradnju mišićnih proteina i povećavaju permeabilnost stanica. Inicijacija procesa mehanićkog i metabolićkog oštećenja mišića sastoji se od složenog niza događaja koji ukljućuju povećanje oksidacijskih oštećenja, te specifićni imunوسي odgovor (Slika 3.) (39).

Porast aktivnosti CK ponajprije ovisi o formatu, intenzitetu i volumenu trenaćnog podražaja, preciznije rećeno, povezuje ih pozitivna korelacija. Intervalni trenaćni programi velikog volumena kojima dominira aktivacija gornjeg dijela tijela, s kratkim intervalima odmora između serija, rezultiraju najvećim porastom aktivnosti CK. Identificirano je nekoliko polimorfizama gena ukljućenih u metabolizam CK, stoga je vaćno naglasiti kako promjene aktivnosti CK takoaer ovisе o interindividualnim varijacijama (40). Programi treninga s prevladavajućim ekscentrićnim kontrakcijama kakve nalazimo u ponavljanim sprintovima, praćeni su vršnim aktivnostima CK koje nastupaju 24 sata do 4 dana nakon trenaćnog podražaja, obimom ćetverostrukog porasta u odnosu na bazalne vrijednosti, a znaćajni porast moće se manifestirati tijekom dva do sedam dana (38). Uobićajeno je detektabilan iskljućivo izoenzim CK-MM, međutim kod trenaćnog podražaja većeg intenziteta i volumena, povećavaju se aktivnosti sva tri izoenzima CK. Normalizacija serumskih aktivnosti ovisi o duljini oporavka, budući da se tijekom odmora smanjuje limfni protok i oslobađanje CK iz mišićnih vlakana. Mnoga istraćivanja pokazala su kako je tijelo sposobno eliminirati osloboćene mišićne komponente i uravnotećiti pripadajuće enzime na razine poćetnih vrijednosti u roku od sedam do devet dana (41).

Aspartat-aminotransferaza

Aspartat-aminotransferaza (AST) je enzim molekularne mase 90 kDa koji katalizira reverzibilnu transaminaciju između L-asparaginske i 2-okso-glutarne kiseline. Najviše

aktivnosti zabilježene su u srcu, jetri, skeletnim mišićima i eritrocitima, te se primarno diferencijalno-dijagnostički koristi kao biljeg bolesti jetre.



Slika 3. Teoretski model mišićnog oštećenja i ciklusa oporavka. *Preuzeto i prilagođeno prema Baird MF i suradnicima (39).*

Na staničnom nivou, AST može biti prisutan u citoplazmi (AST1, 40%) i mitohondrijima (AST2, 60%). Aktivnost AST-a značajno se povećava odmah nakon trenažnog podražaja i ostaje na toj razini sljedeća 24 sata. Obim porasta ovisi o volumenu treninga, dok je umjereno povezan s indeksom tjelesne mase. Kod kronične ozljede mišića, istovremeno

dolazi do porasta aktivnosti AST-a i ALT-a, iako AST rijetko raste u osoba bez kliničkih znakova bolesti s urednim aktivnostima CK, što može ukazivati na prisutnost makroenzima AST-a (38,42).

Laktat-dehidrogenaza

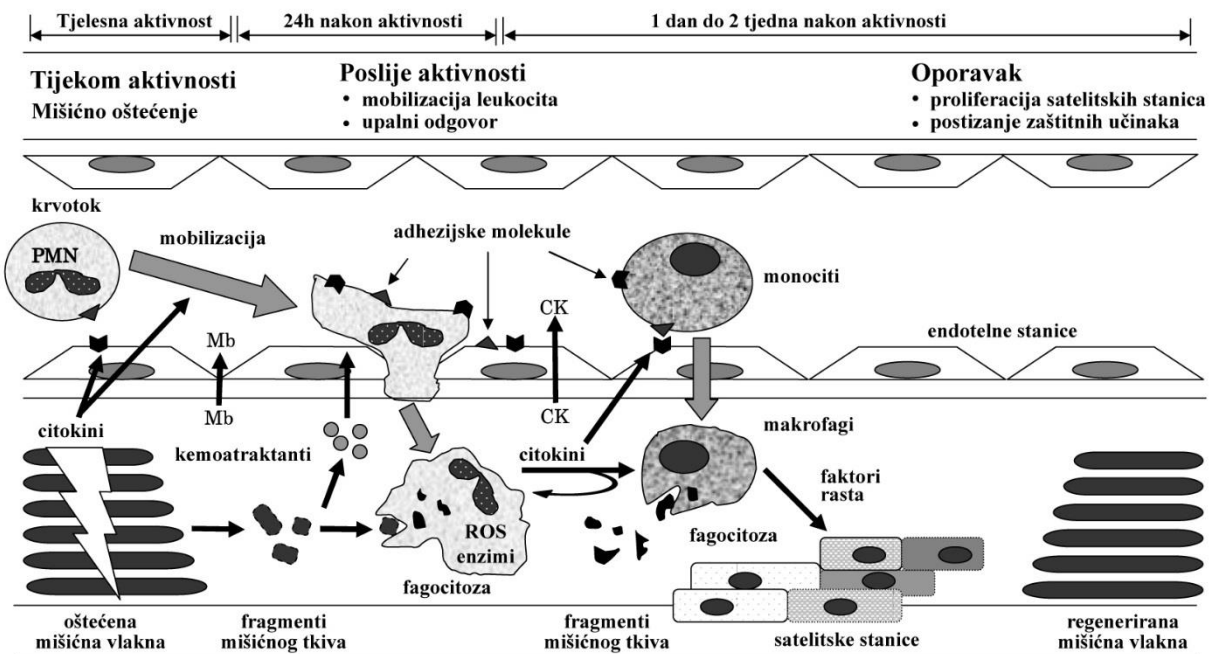
Laktat-dehidrogenaza (LD) je citoplazmatski enzim koji katalizira pretvorbu L-laktata u piruvat te oksidaciju drugih L-2 hidroksimonokarbonskih kiselina. U krvi se nalazi kao tetramer koji sadržava kombinaciju dvije podjedinice, LD-H i LD-M, molekularne mase od 134 kDa. M-podjedinica katalizira pretvorbu piruvata u laktat, dok H-podjedinica potiče aerobnu oksidaciju piruvata. Dakle, ako se unutar LD-a poveća udio M-podjedinice, potiče se anaerobni metabolizam specifičan za skeletne mišiće, suprotno tome ako se poveća udio H-podjedinice odvijaju se aerobni metabolički procesi jedinstveni za srčano mišićje (38). Tjelesna aktivnost uzrokuje značajan porast aktivnosti LD-a, pri čemu stupanj povećanja ovisi o intenzitetu i volumenu trenažne intervencije (43). Programi treninga s prevladavajućim ekscentričnim mišićnim kontrakcijama rezultiraju naglašenijim porastom LD-a. Vršne aktivnosti postižu se između trećeg i petog dana nakon trenažnog podražaja, ponekad čak i sedmog dana. Porast se odnosi na ukupnu aktivnost LD-a, dok frakcije izoenzima ostaju nepromijenjene, bez promjene omjera LD1/LD2 (44).

Mioglobin

Mioglobin je monomerni protein male molekularne mase (18 kDa) sačinjen od 153 aminokiseline. Pojavljuje se u tri izoforme koje su uobičajeno izražene u mišićima. Sudjeluje u transportu i skladištenju kisika te regulaciji dušikovog-oksida, kako na mikrovaskularnoj tako i na tkivnoj razini, dovodeći do oslobađanja željeza iz hema, čime se potiče peroksidacija mitohondrijskih membrana (45). Nakon intenzivnih tjelesnih aktivnosti, mioglobin se oslobađa kao rezultat razgradnje proteinskih struktura unutar mišića, zbog čega suplementacija proteinima može uzrokovati umanjivanje porasta. Trenažni podražaji rezultiraju porastom koncentracije mioglobina unutar 30 minuta, nakon čega porast može perzistirati kroz pet dana, vjerojatno zbog dodatnog doprinosa blage imunodne reakcije (38). Razine CK i mioglobina koreliraju s opsegom neutrofilne reakcije potaknute trenažnom intervencijom, zbog čega jesu važni biljezi u praćenju učinkovitosti trenažnog opterećenja (46).

1.1.3. Imunosni odgovor

Pojam „upala“ često se koristi prilično neodređeno bez definicije i vrednovanja radili li se o, kolokvijalno rečeno „dobrom“ ili „lošem“ procesu. U kontekstu sportske medicine, upala obuhvaća precizno regulirane dinamične procese koji čine osnovu degeneracije i regeneracije mišićnih vlakana i okolnog vezivnog tkiva nakon oštećenja mišića izazvanog programiranim tjelesnim vježbanjem (47). Oštećenje mišića izazvano trenažnim podražajem praćeno je složenim imunskim odgovorom prikazanim na Slici 4.



Slika 4. Imunosni odgovor na mišićno oštećenje uzrokovano tjelesnom aktivnosti. *PMN* – polimorfonuklearni leukociti; *Mb* – mioglobin; *CK* – kreatin-kinaza; *ROS* – reaktivni kisikovi spojevi. Preuzeto i prilagođeno prema Peake J i suradnicima (37).

1.1.3.1. Lokalni imunski odgovor

Mišićno oštećenje koje nastaju uslijed ekscentričnih kontrakcija privlači leukocite na mjesto ozljede. Neutrofilni granulociti invadiraju u skeletni mišić nekoliko sati nakon trenažnog podražaja i tamo ostaju približno 24 sata. Potom se u mišićima pojavljuju makrofagi koji se tamo mogu zadržati 14 dana nakon tjelesne aktivnosti. Neutrofili i makrofagi zajedno doprinose permanentnoj degradaciji oštećenog mišićnog tkiva oslobađanjem ROS-a, a u daljnjim koracima potiču stvaranje proupalnih citokina (48-49). Interleukin 1 β (IL-1 β) i čimbenik nekroze tumora alfa (TNF- α) izraženi su unutar mišića pet dana nakon tjelesne aktivnosti gdje

imaju važnu ulogu u pokretanju fragmentacije oštećenog mišićnog tkiva. Ostali citokini, kao što su IL-6, transformirajući čimbenik rasta beta (TGF- β), inhibicijski čimbenik leukemije (LIF) i čimbenik 1 β induciran hipoksijom (HIF-1 β) također su izraženi u skeletnim mišićima u danima nakon ekscentrične mišićne aktivnosti. Lokalni imunosni odgovor unutar mišića većinski je proupalnog karaktera. Manje se zna o lokalnom mišićnom izražaju protuupalnih citokina poput IL-1ra, IL-4 i IL-10 nakon tjelesne aktivnosti. Istaknute protuupalne citokine ne mogu stvarati mišićne, već isključivo stanice imunološkog sustava (37,50).

1.1.3.2. Sistemska imunosna odgovor

Obim porasta leukocita u krvi ovisi o upotrijebljenim mišićnim skupinama i količini mišićne mase koja je korištena tijekom ekscentrične tjelesne aktivnosti. Manje izraženo povećanje leukocita susreće se nakon ekscentričnih kontrakcija kvadricepsa i fleksora lakta (51). Razlike u leukocitnom odgovoru među programima treninga mogu se obrazložiti izraženijim utjecajem hormona stresa na mobilizaciju leukocita nakon dinamičnog treninga sačinjenog od sistemskih mišićnih kontrakcija naspram onog koji je praćen isključivo lokalnim kontrakcijama. Pored mobilizacije leukocita, mišićno oštećenje može utjecati na izražaj i funkcionalnu aktivnost površinskih biljega na leukocitima. Promjene u izražaju površinskih biljega posreduju u infiltraciji neutrofila i monocita u oštećeno mišićno tkivo, oslobađajući proteolitičke enzime i ROS koji potiču daljnju razgradnju tkivnih fragmenata (52). Limfociti i NK stanice također se mobiliziraju, a protuupalni citokini oslobađaju u sistemsku cirkulaciju tijekom i neposredno nakon ekscentričnih tjelesnih aktivnosti. Promptni imunosni odgovor važan je za regulaciju reakcije akutne faze i regeneraciju fragmenata oštećenih mišića. Suprotno lokalnom imunosnom odgovoru, sistemski karakterizira prevladavajući protuupalni karakter, na što ukazuju povišene razine IL-1ra, IL-10 i TNF- α . Ostali protuupalni citokini, poput IL-4 i IL-13, ostaju nepromijenjeni ili ispod granica detekcije (37,53). Dakle, iako na lokalnoj mišićnoj razini dominira proupalni odgovor, oslobađanjem proupalnih citokina u cirkulaciju očito se razvija sistemski inhibitorni učinak. Pretpostavlja se kako je IL-6 ključan citokin u regulaciji fenomena inhibicije. Stiliziranim rječnikom je nazvan „miokinom - osjetljivim na upalu“. Iako nastaje u skeletnim mišićima, ne dovodi do direktne supresije imunosnog odgovora. Istraživanja potvrđuju da IL-6 djeluje indirektno na ograničavanje upalnog odgovara potičući stvaranje protuupalnih citokina IL-1ra, IL-10, kortizola i topljivih receptora za TNF- α (54). Citokini IL-1ra, IL-10 i topljivi receptor za TNF- α pokazuju svoje protuupalne učinke inhibicijom transdukcije signala preko IL-1 receptora, potom inhibicijom izražaja gena za

citokine i njihovog stvaranja u mononuklearnim stanicama i najzad neutralizacijom TNF- α , kako cirkulirajućeg tako i vezanog na membranu. Sistemski porast koncentracije IL-6 najčešće se normalizira tijekom 24 sata od ekscentričnih kontrakcija mišića nogu. Razlike u dinamici porasta među različitim trenažnim programima vjerojatno su povezane s intenzitetom i volumenom treninga, te eventualno povećanjem tjelesne temperature (37). Uopćeno, nakon ekscentrične tjelesne aktivnosti, cirkulirajući protuupalni citokini neutraliziraju stvaranje proupalnih citokina na lokalnoj razini i time ograničavaju sistemski upalni odgovor.

Učinci opetovanih ekscentričnih mišićnih aktivnosti, kakve nalazimo kod trenažnog protokola ponavljanih sprintova, jasno su utvrđeni u dosadašnjim istraživanjima. Nakon što se izvede prvi sprint, skeletni mišić se izlaže procesu prilagodbe nakon kojeg je manje osjetljiv na oštećenja koja sa sobom donose sljedeći sprintovi (55). Nakon uzastopnog ponavljanja ekscentričnih tjelesnih aktivnosti, broj neutrofila značajno se smanjuje za 10 do 45% u odnosu na početne vrijednosti. Zaključno, objavljena istraživanja pružaju dokaz da se višekratnim ponavljanjem trenažnih formata smanjuje izražaj leukocitnih biljega, slijedom toga prepoznatljiva imunosna adaptacija nastaje kao sekundarni odgovor na niži stupanj mišićnog oštećenja (37).

1.2. Sprint i promjene u redoks homeostazi

U novijoj epohi redoks biologije, Sies i Jones, autori zaslužni za definiranje pojma „oksidacijskog stresa“ udružila su ranije predložene definicije u zajedničku koja glasi „poremećaj ravnoteže prooksidansa/antioksidansa u korist oksidansa, koji može dovesti do poremećene redoks signalizacije i/ili oksidacijskog oštećenja makromolekula“ (56). Prema tome, aktualna definicija oksidacijskog stresa stavlja naglasak na dva različita mehanicistička ishoda - makromolekularno oštećenje i poremećaj redoks ravnoteže – koji rezultiraju aberantnom staničnom signalizacijom i nefunkcionalnom redoks kontrolom.

Očito je kako pojmovi „poremećaj“ i „oštećenje“ sadržani u trenutnoj definiciji oksidacijskog stresa podrazumijevaju prekid i/ili gubitak normalne funkcije, što nije u skladu s već prihvaćenim stavom kako su oksidacijske modifikacije i promjene u redoks signalizaciji povezane kako sa „štetnim“, tako i s „korisnim“ biološkim učincima (57). Iz tih razloga, prihvaćajući aktualnu definiciju, termin „oksidacijski stres“ razumno je koristiti samo kada se interpretiraju jednosmjerne promjene u razinama svih analiziranih biljega oksidacijskog/antioksidacijskog statusa. Alternativni pojam oksidacijskom stresu, „promjene u

redoks homeostazi“, koji će se koristiti u ovom radu, predložili su Nikolaidis i suradnici (58). Ovaj pristup je vjerodostojniji za karakterizaciju promjena koje zahvaćaju redoks-vezane molekule u slučajevima kada se promjene ne mogu izravno pripisati stvaranju reaktivnih spojeva. Isti model osobito je primjenjiv u slučajevima kada su tijekom istraživanja zabilježene dvosmjernje promjene unutar spektra određivanih biljega, konkretno kada promjene nekih biljega ukazuju na povećan oksidacijski stres, a promjene drugih biljega na smanjen oksidacijski stres (odnosno povećan reduktivni stres) ili pak ukazuju na stanje bez oksidacijskog stresa.

1.2.1. Stvaranje reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva

Reaktivni kisikovi spojevi (ROS), kao i reaktivni dušikovi spojevi (RNS, engl. *reactive nitrogen species*) djelomično su reducirani i veoma reaktivni metaboliti koji nastaju uslijed prijenosa elektrona na molekulu kisika/dušika. Predstavljaju heterogenu skupina spojeva koja obuhvaća slobodne radikale s jednim ili više nesparenih elektrona, ali i reaktivne intermedijere koji su visoko reaktivni i lako stupaju u reakcije međusobno ili s drugim molekulama (Tablica 2.). Izrazita nestabilnost i kratko vrijeme poluživota, potiče ih na reakcije oksidacije s elektronima molekularnih supstrata iz najbliže okoline (59).

Tijekom sprinta u mitohondrijama može doći do stvaranja superoksidnog radikala brzinom manjom od 0,15%-tnog primitka kisika. Zapanjuje podatak da je tijekom aerobne tjelesne aktivnosti, kada se najveći dio energije osigurava mitohondrijskom oksidacijom, malen doprinos superoksida u ukupno stvorenom ROS-u jer su mitohondriji skeletnih mišića pretežno u stadiju III (ADP-stimulirani). Dakle, stvaranje superoksidnog radikala može biti manje izraženo tijekom provedbe sprinta nego u mirovanju, obzirom da su eksperimenti *in vitro* pokazali manje stvaranje H₂O₂ u stadiju III u usporedbi s stadijem IV sa sukcinatom ili piruvat/malatom kao supstratima (60).

Superoksidni radikal također može nastati u sarkoplazmatskom retikulumu, poprečnim tubulima ili membrani enzima NAD(P)H oksidaze (61). Postoje dokazi koji ukazuju na to da kontrahirani mišić može sudjelovati u prijenosu elektrona iz citoplazmatskog NAD(P)H do membrane pomoću NADH-citokrom b5 oksidoreduktaze ili NAD(P)H-kinon oksidoreduktaze (NQO1), dovodeći do stvaranja superoksida na površini stanice. Ksantin oksidaza također može doprinijeti stvaranju superoksidnog radikala, međutim u mišićima je zastupljena u vrlo niskim razinama, dok je zamjetnije prisutna u endotelnim stanicama (62). Budući da se koncentracija

hipoksantina, supstrata ksantin oksidaze, povećava za vrijeme a posebice nakon provedbe sprinta, ova reakcija može biti itekako važan izvor superoksidnog radikala (Slika 5.).

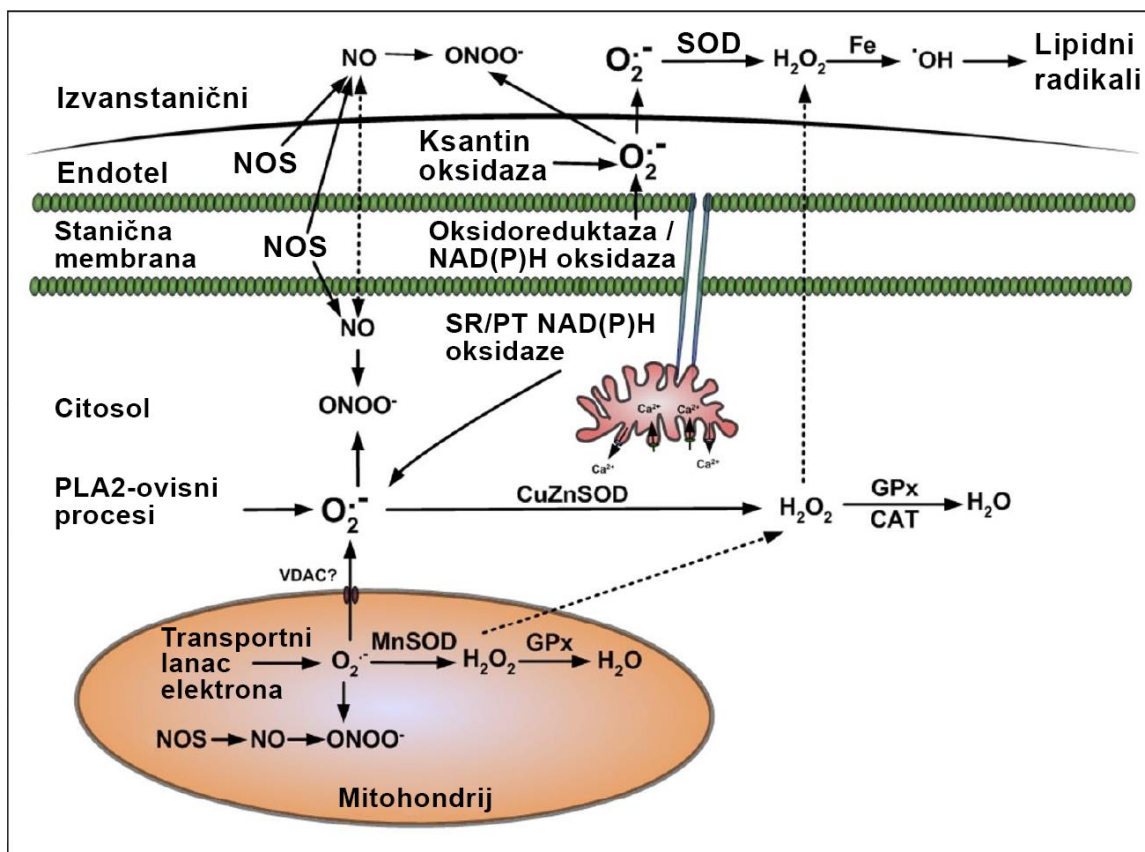
Tablica 2. Vrste reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva

Slobodni radikali		Reaktivni intermedijeri	
Superoksidni	$O_2^{\cdot-}$	Vodikov peroksid	H_2O_2
Hidroksilni	HO^{\cdot}	Hipokloritna kiselina	$HOCl$
Peroksilni	RO_2^{\cdot}	Hipobromna kiselina	$HOBr$
Alkoksilni	RO^{\cdot}	Ozon	O_3
Hidroperoksilni	HO_2^{\cdot}	Singletni kisik	1O_2
<hr/>			
Dušikov (II) oksid	NO^{\cdot}	Nitritna kiselina	$HN0_2$
Dušikov (IV) oksid	NO_2^{\cdot}	Peroksinitrit	ONO_2^{\cdot}
		Nitrozilni kation	NO^+
		Nitroksilni anion	$NO^{\cdot-}$
		Dinitrogen trioksid	N_2O_3
		Dinitrogen tetraoksid	N_2O_4
		Nitril klorid	NO_2Cl

Povećanje unutarstaničnog kalcija tijekom mišićne kontrakcije aktivira fosfolipazu A2 ovisnu o kalciju (cPLA2), koja potiče stvaranje unutarstaničnog ROS-a. Unatoč tome, inhibitorni ciklooksigenaze ne sprečavaju oslobađanje superoksidnog radikala iz kontrahiranog mišića i ostaje nepoznato kakvu ulogu, ako ona uopće postoji, cPLA2 igra u nastajanju ROS-a tijekom sprinta (Slika 5.) (63).

Dušikov oksid (NO) nastaje pretvorbom L-arginina u L-citrulin pomoću tri izoenzima NO sintetaze (NOS), koji se nalaze u mišićima. Neuronska (nNOS ili NOS-1) i endotelna (eNOS ili NOS-3) izoforma NOS-a izražene su u mišićima, te regulirane interakcijom kalcija s kalmodulinom. Inducibilna izoforma NOS-a (iNOS ili NOS-2) izražena je tijekom imunskih reakcija (64). Kao odgovor na sprint, kalcij/kalmodulin ovisne protein kinaze II (CaMKII) bivaju fosforilirane, nakon čega mogu potaknuti transkripciju nNOS-a. Fiziološka važnost ovog sustava naglašena je kroz pojačani izražaj nNOS-a i eNOS-a kao odgovor na visokointenzivne

trenažne podražaje. Aktivnost nNOS-a regulirana je fosforilacijom. Iako je utvrđeno da sprint izaziva fosforilaciju (aktivaciju) CaMKII, ostaje nepoznato kakav je učinak CaMKII na nNOS za vrijeme izvedbe i sljedećih nekoliko minuta nakon sprinta (65) (Slika 5.).



Slika 5. Potencijalni izvori stvaranja superoksidnog radikala i dušikovog oksida u mišićima. *NO* – dušikov oksid; *ONOO⁻* – peroksinitrit; *O₂⁻* – superoksidni radikal; *SOD* – superoksid-dismutaza; *H₂O₂* – vodikov peroksid; *Fe* – željezo; *·OH* – hidroksilni radikal; *NOS* – NO sintetaza; *NAD(P)H* – nikotinamid-adenin-dinukleotid-(fosfat); *SR* – sarkoplazmatski retikulum; *PT* – poprečni tubuli; *PLA2* – fosfolipaza A2; *Cu* – bakar; *Zn* – cink; *GPx* – glutation-peroksidaza; *CAT* – katalaza; *H₂O* – voda; *VDAC?* – anionski kanal ovisan o naponu; *Mn* – mangan. Preuzeto i prilagođeno prema Powers SK i suradnicima (61).

Ostali potencijalni izvori u podlozi nastajanja ROS-a i RNS-a tijekom sprinta uključuju pojačan metabolizam katekolamina (66), tijekom kojeg dolazi do njihove autooksidacije uz pomoć monoaminooksidaza, čime se stvaraju visoko reaktivni deaminirani katekol-aldehidi (67).

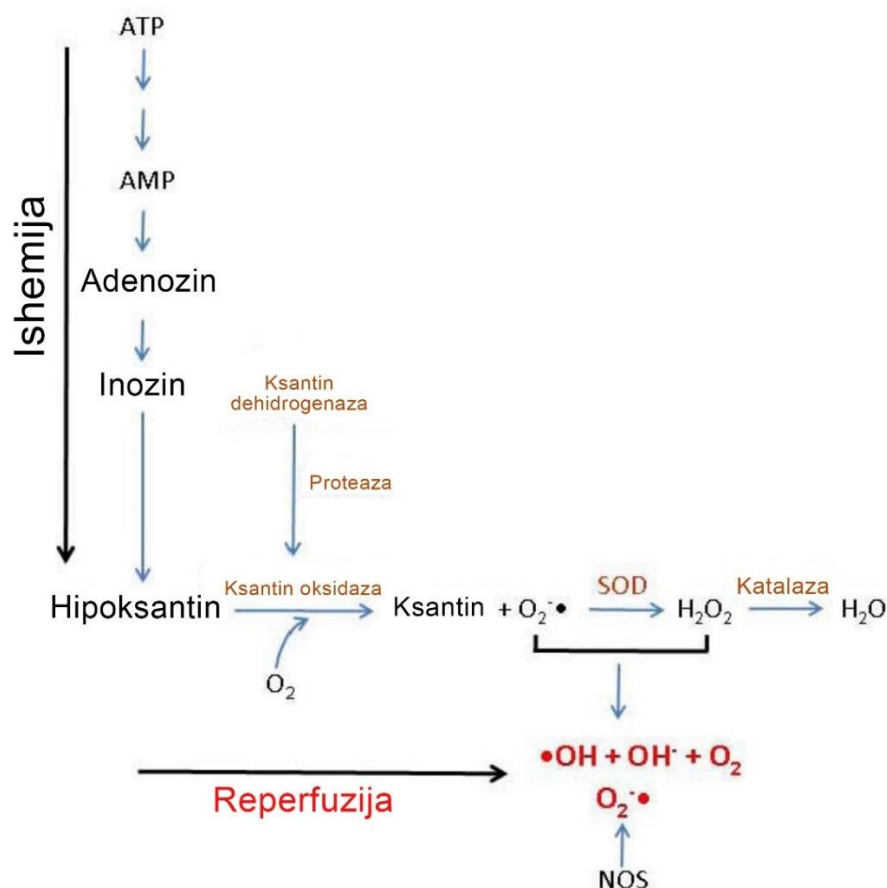
1.2.2. Oksidacijski stres

Tijekom ponavljanih sprintova, acidoza i hipoksija jesu ključni posrednici u razvoju oksidacijskog stresa. Inače, provedbom sprinta potaknuta je reakcija glikolize u najvećoj mogućoj mjeri, uzrokujući naglašeno stvaranje piruvata i laktata (68). Pri fiziološkom pH, laktat djeluje kao dobar antioksidans, iskazujući veliki eliminacijski potencijal prema superoksidnom i hidroksilnom radikal. Međutim, u uvjetima acidoze, laktat se stvara ekvimolarno s vodikovim ionima, čime se ubrzava dismutacija superoksidnog radikala u vodikov peroksid, koji potom može reagirati sa željezom i stvoriti hidroksilni radikal. Acidoza dodatno potiče pretvorbu superoksidnog u hidroperoksilni radikal koji je reaktivniji i topljiviji u mastima, što olakšava disocijaciju jakog oksidansa, proteinski vezanog željeza (18).

Tijekom mišićne ishemije smanjuje se opskrba kisikom i supstratima za oksidacijsku fosforilaciju, posljedično se stanice oslanjaju na ograničene anaerobne izvore energije. Nakon što mišići određeno vrijeme provedu u ishemiji, stvaranje ATP-a iz anaerobnih izvora nedovoljno je da bi se zadovoljile energetske potrebe, što dovodi do smanjenja aktivnosti Na^+/K^+ i Ca^{2+} pumpe te povećanja unutarstaničnog natrija i kalcija. Istovremeno, dolazi do nakupljanja ortofosfata, gubitka adenina i nakupljanja masnih kiselina, mliječne kiseline i vodikovih iona unutar stanice. Nakon reperfuzije, mitohondrijski dišni lanac stvara mnoštvo reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva, pretežno superoksidne radikale koji nastaju iz kompleksa I i III. Superoksidni radikal oštećuje Fe-S-proteine akonitaze oslobađajući dvovalentno željezo te se dismutira u vodikov peroksid, koji potom reagira s dvovalentnim željezom stvarajući hidroksilni radikal, dok u reakciji superoksida i dušikovog oksida nastaje peroksinitrit¹⁸. Eksplozija hidroksilnog radikala i peroksinitrita oštećuje većinu staničnih sastojaka mitohondrija, posebno fosfolipide, mijenjajući komplekse I, II, III i IV te povećavajući propusnost membrana (69). Posljedično dolazi do trenutne depolarizacije membranskog potencijala, oticanja matriksa, rupture vanjske membrane mitohondrija i oslobađanja proapoptotskih molekula, poput citokroma c, čime se aktivira stanična apoptoza (70).

Važan izvor superoksida tijekom ishemije-reperfuzije jest reakcija posredovana ksantin-oksidadom. U stanicama bez ishemije enzim je u formi NAD^+ -ovisne dehidrogenaze, međutim uslijed stanične ishemije dolazi do ireverzibilne pretvorbe u ksantin-oksidadu djelovanjem aktiviranih proteaza posredovanih kalcijem (Slika 6.). Kod ishemije dolazi do povećanog stvaranje hipoksantina, koji za daljnju pretvorbu u ksantin zahtjeva prisustvo kisika (manjkavog

u izoliranoj ishemiji). Tek se nakon reperfuzije osigurava potrebni kisik i nastaje superoksidni radikal u reakciji posredovanoj ksantin-oksidadom. U protektivnim reakcijama koje slijede, superoksid-dismutaza predstavlja prvu liniju obrane pretvarajući visoko reaktivni superoksidni radikal u manje reaktivan vodikov peroksid i kisik. Nadalje, presudnu ulogu u uklanjanju peroksida imaju enzimi glutation-peroksidaza i katalaza (71) (Slika 6.).



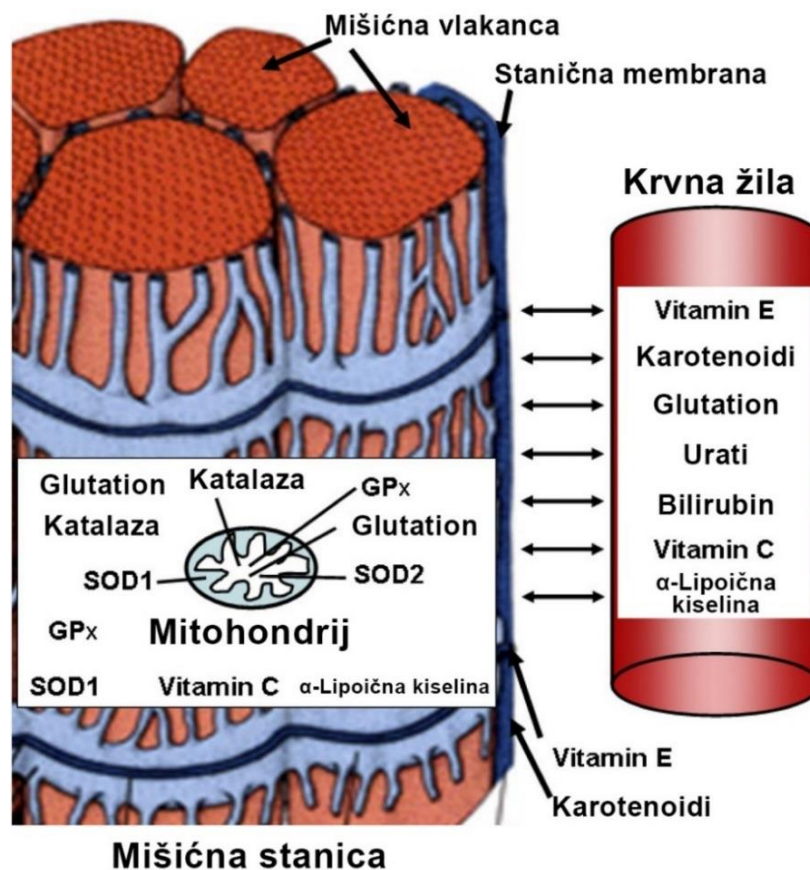
Slika 6. Mehanizam nastanka reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva uslijed ishemije-reperfuzije. *ATP* – adenozin-trifosfat; *AMP* – adenozin-monofosfat; *O₂* – kisik; *O₂^{•-}* – superoksidni radikal; *SOD* – superoksid-dismutaza; *H₂O₂* – vodikov-peroksid; *H₂O* – voda; *•OH* – hidroksilni radikal; *NOS* – NO sintetaza. Preuzeto i prilagođeno prema Morales-Alamo D i suradnicima (18).

Program treninga ponavljanih sprintova dovodi do isprekidanog protoka krvi, doduše ključno jest da protok nije posve prekinut. Zbog toga u mišićima ne dolazi do potpunog gubitka rezervi kisika, ireverzibilne inhibicije oksidacijske fosforilacije i apsolutnog poremećaja mitohondrijskog disanja (72). Nakon opetovane izvedbe istih trenažnih podražaja visokog intenziteta, sposobnost postizanja $\dot{V}O_{2\max}$ je sačuvana (73). Međutim, ako se trenažni protokol ponavljanih sprintova provodi nekontrolirano, odnosno u uvjetima teške hipoksije, aktivna

hiperemija može potaknuti stvaranje superoksida djelovanjem ksantin oksidaze u fazi normoksičnog oporavka.

1.2.3. Antioksidacijski status

S obzirom na važnost održavanja redoks homeostaze na razini mišićnih vlakana, nije iznenađujuće da miociti sadrže raskošnu mrežu antioksidacijskih obrambenih mehanizama kojima se smanjuje rizik od oksidacijskih oštećenja tijekom razdoblja povećanog stvaranja ROS-a. Antioksidans jest svaki mehanizam, struktura i/ili tvar koja odgađa, prevenira ili uklanja oksidacijske modifikacije ciljne molekule (74). Heterogeni sustav obrane obuhvaća enzimske (endogene) i neenzimske (uglavnom se unose u organizam hranom ili dodacima prehrani), stanične ili izvanstanične antioksidanse (Slika 7.).



Slika 7. Lokalizacija izvanstaničnih i staničnih antioksidanasa. *GPx* – glutation-peroksidaza; *SOD 1/2* – superoksid-dismutaza 1/2. Preuzeto i prilagođeno prema Powers SK i suradnicima (61).

Superoksid-dismutaza

Superoksid-dismutaza (SOD) je metaloenzim koji katalizira dismutaciju (disproporcioniranje) visoko reaktivnog superoksidnog radikala u manje reaktivan vodikov peroksid i molekularni kisik. U sisavaca postoji nekoliko izoformi SOD-a koje se razlikuju prema vrsti metalnog kofaktora i lokalizaciji. Kako SOD predstavlja prvu liniju obrane, lokalizirana je na mjestima najvećeg nastajanja superoksidnog radikala; u citosolu (Cu/Zn-SOD, SOD1), u mitohondrijima (Mn-SOD, SOD2) te u izvanstaničnom prostoru (Ec-SOD, SOD3). Konstanta reakcije citosolne i mitohondrijske SOD je iznimno visoka, što upućuje na veliku aktivnost te izuzetnu važnost u obrani od superoksidnog radikala, premda im aktivnost bazično ovisi o zalihama metalnih iona u stanici, odnosno mišićnom tkivu (75). Aktivnost SOD-a u skeletnim mišićima nije konstantna, već je ovisna o formatu tjelesne aktivnosti. Nadalje, opseg promjena aktivnosti SOD-a izazvanih trenažnim podražajima razmjernan je intenzitetu i volumenu treninga. Konačno, najizraženije povećanje aktivnosti SOD-a opaža se u mišićnim tkivima sastavljenim od vlakna oksidativnog tipa (tip I i IIa), koja se aktivnije uključuju u antioksidacijsku zaštitu u odnosu na vlakna glikolitičkog tipa (tip IIb) (61).

Glutation-peroksidaza

Glutation-peroksidaza (GPx) je selenoenzim koji kataliziraju razgradnju vodikovog peroksida i organskih hidroperoksida uz istodobnu oksidaciju glutaciona, pri čemu se stvaraju oksidirani glutation i voda, odnosno pripadajući alkohol. Do sada je poznato 8 izoformi GPx-a, a nalaze se ponajprije u jetri i bubrezima te srcu, plućima i mozgu (76). Smatra se da GPx ima važnu ulogu u održavanju fiziološke razine vodikovog peroksida, nužne za osiguravanje stanične signalizacije i opće funkcionalnosti (77). Istovjetno SOD-u, visoko oksidativna vlakna (tip I) sadrže najveće razine GPx-a. Povećanje enzimske aktivnosti ovisi o intenzitetu i volumenu trenažne intervencije (61).

Glutation-reduktaza

Glutation-reduktaza (GR) je enzim koji katalizira redukciju oksidiranog u reducirani glutation uz utrošak koenzima NADPH, stoga je nužan za održavanje stalne koncentracije reduciranog glutaciona. Inače, GR ima tendenciju akumuliranja u staničnim odjeljcima izraženijeg elektronskog toka, gdje nastaju ROS (78).

Urati

Urati su izvanstanični antioksidansi karakterizirani osobito izraženim elektron-donorskim svojstvima zbog čega su učinkoviti u neutralizaciji superoksidnog i hidroksilnog radikala te singlet kisika, uz to mogu kelirati prijelazne metale (79). Imaju osobito važnu ulogu u inhibiciji reakcije kojom reaktivni peroksinitrit veže i nitrozilira tirozinske ostatke na proteinskim strukturama. Nadalje, dokazano je da urati sprječavaju razgradnju izvanstaničnog SOD3, enzima koji je ključan za pretvorbu superoksidnog radikala u vodikov peroksid, čime priječe inaktivaciju dušikovog oksida djelovanjem superoksidnog radikala (80). Međutim, pri povišenim koncentracijama koje prate mišićnu hipoksiju i acidozu, naročito ako su razine ostalih staničnih antioksidansa niske, urati imaju prooksidacijski učinak. Inhibicija je posredovana djelovanjem ROS-a koji nastaju u reakciji ksantina i ksantin oksidaze, pri čemu nastaju urati i superoksidni radikal. Stoga se urati smatraju pokazateljem razine oksidacijskog stresa povezanog s visokom aktivnošću ksantin oksidaze (81).

Ukupni bilirubin

Bilirubin se strukturno sastoji od niza konjugiranih dvostrukih veza i nekoliko reaktivnih vodikovih atoma koji su prijenosom vodika izravno uključeni u neutralizaciju stvorenih ROS-a. Antioksidacijsko djelovanje bilirubina temelji se i na direktnoj reakciji s ROS, pri čemu se bilirubin oksidira u biliverdin. Krasi ga izrazita lipofilnost čime je osigurano sprječavanje lipidne peroksidacije. Budući da bilirubin potiskuje djelovanje mitohondrijske NADPH-oksidaze, snažan je inhibitor nastajanja superoksidnog radikala, čime se suzbijaju moguća oksidacijska oštećenja (82).

Albumin

Antioksidacijska uloga albumina ostvaruje se vezanjem iona prijelaznih metala, čime se ograničava njihovo sudjelovanje u oksidacijskim reakcijama, a stvoreni ROS se usmjeravaju na proteinsku strukturu albumina, čime se štite važnije molekule. Albumin također veže nezasićene masne kiseline te ih štiti od oksidacijskih oštećenja, i to u sprezi s albuminom vezanim na bilirubin koji djeluje kao inhibitor peroksidacije lipida. Nadalje, antioksidacijska funkcija albumina proizlazi iz disulfidnog oblika, zahvaljujući tome albumin djeluje kao čistač ROS-a, primjerice vodikovog peroksida, peroksinitrita, superoksidnog radikala i hipokloritne kiseline (83).

1.3. F_{2t}-izoprostani

F_{2t}-izoprostani (F_{2t}-IsoP, engl. *F_{2t}-isoprostanes*) predstavljaju skupinu spojeva sličnih prostaglandinima koji se sintetiziraju iz višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA, engl. *polyunsaturated fatty acid*) mehanizmom neenzimskih reakcija kataliziranih pomoću ROS-a. Smatraju se autentičnim biljezima lipidne peroksidacije *in vivo* zbog čega se njihova analiza apostrofira kao temeljni pristup u pouzdanoj procjeni statusa redoks homeostaze.

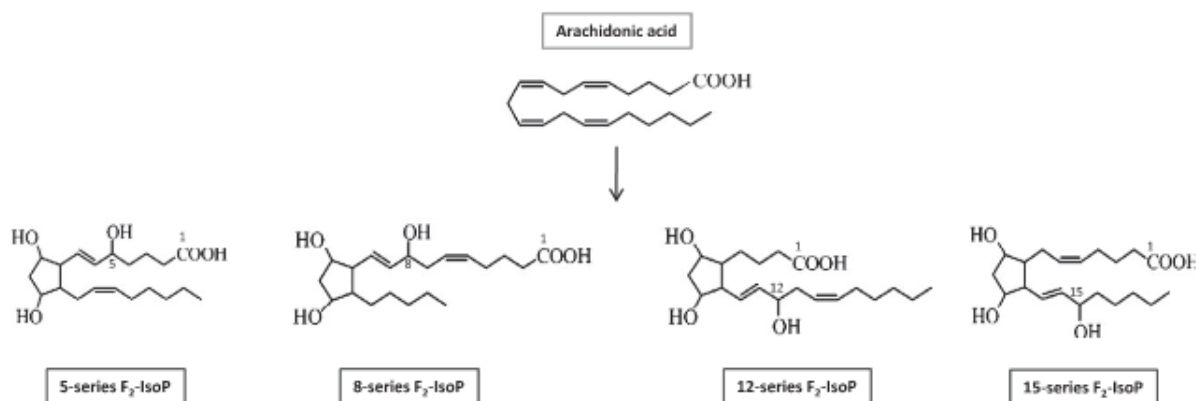
1.3.1. Lipidna peroksidacija

Oksidacijsko oštećenje lipida može promijeniti fluidnost i cjelovitost membrana, a time i njihove funkcije. Reakcijom ROS-a s lipidima započinje proces lipidne peroksidacije koji se odvija kroz tri stadija: inicijaciju, propagaciju i terminaciju. Peroksidacija je ostvariva mehanizmom kojim se premošćuje spinska prepreka između kisika i PUFA. Reaktivni kisikovi spojevi koji mogu oksidirati PUFA jesu; hidroksilni, hidroperoksilni, alkoksilni i peroksilni radikal, dok je superoksidni radikal nedovoljno reaktivan za eliminaciju vodika. Peroksidacijski niz započinjanje napadom ROS-a koji su sposobni izdvojiti atom vodika iz metilenske skupine PUFA. Prisutnost visoko reaktivnih dvostrukih veza unutar strukture masnih kiselina oslabljuje metilenske veze na atomu ugljika, stoga se premještanje vodika čini kao jednostavna operacija za ROS. Posljedično iz PUFA nastaju slobodni lipidni radikali. Nadalje, ugljikovi radikali nastoje se stabilizirati reorganizacijom molekula, oblikujući konjugirane diene. U aerobnim uvjetima oni se mogu udruživati s kisikom, te stvarati peroksilne radikale koji zatim mogu eliminirati vodik iz ostalih organskih molekula, uključujući PUFA, pri čemu dolazi do stvaranja lipidnih hidroperoksida, te reaktivnih ugljikovih radikala (faza propagacije). Tijekom propagacije, lipidni hidroperoksid u prisutnosti željeza disocira u lipidni alkoksilni i lipidni peroksilni radikal koji dovode do reinicijalizacije peroksidacije. Disocijacijom lipidnih hidroperoksida tijekom faze terminacije dolazi do nakupljanja kratkolančanih aldehida i ugljikovodika, koji čine konačne produkte lipidne peroksidacije (84-85).

1.3.2. Sinteza i pojavnost

Identifikacija izoprostana, spojeva sličnih prostaglandinima, stvorenih *in vivo* neenzimskom peroksidacijom arahidonske kiseline posredstvom ROS-a, pokrenula je novu eru otkrivanja neenzimskih produkata lipidne peroksidacije i prepoznala njihov dijagnostički

potencijal. Reaktivne spojeve uključujući hidroksilni, alkoksilni, peroksilni i eventualno hidroperoksilni radikal, označava visoka reaktivnost s karboksilnom skupinom arahidonske kiseline na tri različita mjesta, pri čemu dolazi do izdvajanja nestabilnog bis-alilnog vodika i nastajanja pentadienilnog radikala. Nakon toga, dolazi do reakcije s kisikom i stvaranja peroksilnog radikala koji su zajednički podvrgnuti reakcijama ciklizacije, uz vezanje još jednog kisika, kako bi u konačnici nastali nestabilni biciklički endoperoksidi. Međuprodukti se potom reduciraju prisustvom glutaciona u F_{2t} -izoprostane ili preuređuju u E_2 - i D_2 -regioizomere prostaglandina (86). Mogu nastati četiri različita regioizomera F_{2t} -IsoP (5-, 8-, 12- i 15-regioizomeri, ovisno o ugljikovom atomu na koji je vezani alilni hidroksil), a svaki od regioizomera teoretski se sastoji od 8 racemičnih diastereomera (Slika 8.) (87). Za razliku od ishodišnih prostaglandina posredovanih ciklooksigenazama, izoprostani se formiraju *in situ* u esterificiranom obliku na mjestu tkivnih fosfolipida, a zatim se nakon deesterifikacije oslobađaju u slobodnoj kiseloj formi, uglavnom djelovanjem fosfolipaza (88). Najistraživaniji izoprostan predstavnik je serije-15, nazvan 15- F_{2t} -IsoP, u osnovi zbog njegove široke komercijalne dostupnosti. Iako se za izoprostane često naglašava kako nastaju neenzimskim djelovanjem ROS-a, nekoliko novijih istraživanja utvrdilo je mogućnost nastajanja izoprostana mehanizmima neovisnim o ROS (87).



Slika 8. Kemijska struktura arahidonske kiseline i četiri regioizomera F_{2t} -izoprostana. Preuzeto iz Nikolaidis MG i suradnici (87).

Izoprostani se mogu identificirati u raznim tkivima, uključujući pluća, jetru, bubrege, srce, krvožilje, masna tkiva, mišiće, mozak i želudac. Pronađeni su u mjerljivim koncentracijama u većini analiziranih bioloških tekućina, uključujući plazmu, mokraću, žuč, limfu, sinovijalnu, bronhoalveolarnu, amnijsku, perikardijalnu i sjemenu tekućinu. Međutim, bazalne koncentracije u plazmi i mokraći uvelike variraju među ispitanicima kao posljedica

različite brzine nastajanja i/ili metabolizma, što ukazuje na različiti opseg lipidne peroksidacije. Koncentracija IsoP u mokraći zdravih ispitanika ~ 30 do 40 puta je veća u odnosu na razine u plazmi (89).

1.3.3. Metabolizam

F_{2t}-izoprostani koji nastaju *in situ* ponajprije se nalaze u esterificiranom obliku, a zatim se hidroliziraju u slobodne kisele oblike djelovanjem enzima fosfolipaze A₂ (PLA₂) i acetilhidrolaze čimbenika aktivacije trombocita (PAF-AH, engl. *platelet-activating factor acetylhydrolase*). U plazmi, potonji enzim smatra se važnijim jer kod bolesnika kojima nedostaje PAF-AH, ne dolazi do hidrolize esterificiranih prekursora F_{2t}-IsoP (90). Skeletni mišići i plazma sadrže enzim PLA₂ koji specifično hidrolizira S_N2 estersku vezu fosfolipida. Ovaj korak brze deesterifikacije ističe se kao jedan od ključnih čimbenika koji utječu na brzinu disocijacije slobodnih F_{2t}-IsoP u mišićima, a kasnije u perifernoj krvi i mokraći. Stoga, povećana koncentracija slobodnih F_{2t}-IsoP nakon tjelesne aktivnosti djelomično je uvjetovana povećanom aktivnosti PLA₂ u mišićima, a ne isključivo povećanim stvaranjem ROS-a (87).

Često se pretpostavlja kako je brz metabolizam jednako specifičan za mokraću i plazmu, odnosno da se F_{2t}-IsoP mogu naizmjenično određivati u oba matriksa ravnomjerno ukazujući na oksidacijski stres. Međutim, dostupna istraživanja ukazuju na drugačija razmatranja kako proces hidrolize može trajati nekoliko sati i da na njezinu brzinu utječe aktivnost PAF-AH. Aktivnost PAF-AH uglavnom je povezana (~70%) s razinama lipoproteina niske gustoće (LDL, engl. *low-density lipoprotein*), zbog čega je metabolizam F_{2t}-IsoP lipoprotein-ovisan. Neki autori dodatno sugeriraju da pri interpretaciji razine ukupnih endogenih F_{2t}-IsoP koji se izlučuju mokraćom treba uzeti u obzir potencijalni doprinos F_{2t}-IsoP lokalno stvorenih u bubrezima. Dakle, jednokratnim uzorkovanjem plazme ili mokraće može se dobiti samo parcijalan i nepotpun uvid u razmjere lipidne peroksidacije temeljem utvrđene koncentracije F_{2t}-IsoP (87,89-90).

Prvi korak metabolizma slobodnih F_{2t}-IsoP uključuje β-oksidaciju hidroksilne skupine na poziciji C15 pomoću 15-hidroksid prostaglandin dehidrogenaze (15-PGDH). Redukcija dvostruke veze na C13 i C14 pomoću Δ¹³-reduktaze odvija se u sljedećem koraku. Glavni metaboliti koji se potom izlučuju mokraćom su 2,3-dinor-5,6-dihidro-15-F_{2t}-IsoP i 2,3-dinor-15-F_{2t}-IsoP. Budući da je utvrđena jaka povezanost između koncentracije 15-F_{2t}-IsoP i njegovih vodećih metabolita, nameće se zaključak kako se pripadajući metaboliti također mogu koristiti

kao dodatni biljezi lipidne peroksidacije. Slobodne F_{2t}-IsoP koji se izlučuju mokraćom karakterizira vrlo kratko poluvrijeme života (87,90). Nakon što se aplicira infuzija slobodnog F_{2t}-IsoP obilježenog [³H], u mokraći se već nakon četiri sata detektira 75% početne radioaktivnosti (91).

1.3.4. Analitička razmatranja

Ciljem identifikacije i kvantifikacije F_{2t}-IsoP razvijene su različite analitičke tehnike uključujući plinsku (GC, engl. *gas chromatography*) ili tekućinsku (LC, engl. *liquid chromatography*) kromatografiju spregnutu s masenom spektrometrijom (MS, engl. *mass spectrometry*) te imunokemijske metode s radioaktivnim izotopima (RIA, engl. *radioimmunoassay*) ili enzimima (EIA, engl. *enzyme immunoassay*) kao obilježivačima (89). Metode temeljene na masenoj spektrometriji složenije su zbog prisustva mnogobrojnih izomera F_{2t}-IsoP koji zahtijevaju opsežno kromatografsko pročišćavanje uzoraka prije analize. Nadalje, iziskuju derivatizaciju uzorka, visoku osjetljivost u otkrivanju niskih koncentracija, iskusno osposobljene operatere i respektabilan financijski budžet za provedbu cjelokupne analize. S druge strane, imunokemijske metode su manje specifične, osim u slučaju kada su proizvođači komercijalnih EIA kompleta opsežno testirali karakteristike korištenih protutijela i ona pokazuju minimalnu križnu reaktivnost s drugim IsoP izomerima ili kemijski sličnim spojevima. Prednost imunokemijskih metoda leži u robusnosti analize i puno prihvatljivijim troškovima u odnosu na kromatografske metode. Koncentracije F_{2t}-IsoP razlikuju se s obzirom na odabran analitički pristup, dodatno nekim metodama se identificiraju ukupni (esterificirani i slobodni), a drugima samo slobodni F_{2t}-IsoP, zbog čega je uistinu kompleksno međusobno uspoređivati rezultate istraživanja u ovom području dijagnostike (92-93).

Ključna dilema analitike F_{2t}-IsoP je odluka koji izomer određivati među 192 različita IsoP koji mogu nastati iz arahidonske kiseline. Unatoč činjenici da je 15-F_{2t}-IsoP daleko najistraživaniji izomer, što jamči bolju usporedivost dobivenih rezultata i odražava njegovu komercijalnu dostupnost, istovremenim određivanjem više izomera dobiva se integriranija procjena lipidne peroksidacije (94). Esterificirani F_{2t}-IsoP su biljezi dugotrajnosti lipidne peroksidacije koji omogućuju prepoznavanje mjesta endogenih oksidacijskih oštećenja. S druge strane, slobodni F_{2t}-IsoP pouzdanije označavaju sistemski odgovor na lipidnu peroksidaciju (87). Budući da je poluvrijeme života F_{2t}-IsoP u cirkulaciji vrlo kratko, manje od 20 minuta (95), analiza uzorka plazme može biti ispravniji odabir u ocjeni lipidne peroksidacije tijekom i

nakon akutnog trenažnog podražaja. Tome u prilog idu nejasni učinci akutne reakcije izazvane tjelesnom aktivnosti na koncentracije F_{2t} -IsoP u mokraći, što je u potpunoj suprotnosti s jasnim povećanjima koja su zabilježena u plazmi. Suprotno tome, istraživanja koja su ispitivala dugoročne učinke tjelesnog vježbanja na razine F_{2t} -IsoP, predlažu uzorke mokraće sakupljene tijekom 24 sata ili ujutro kao preporučene za dobivanje cjelovitije procjene lipidne peroksidacije (90).

1.3.5. Učinci programiranog tjelesnog vježbanja

Trend sve učestalijeg praćenja koncentracije F_{2t} -IsoP kao pokazatelja oksidacijskih oštećenja primjetan je u redoks biologiji tjelesnog vježbanja. Naime, razina prevladavajućeg IsoP stereoizomera, 15- F_{2t} -IsoP u krvi ili mokraći, smatra se općeprihvaćenim biljekom „zlatnog standarda“ u procjeni oksidativnih oštećenja tipa lipidne peroksidacije (96).

Arahidonska kiselina, ishodišni lipid iz kojeg nastaju F_{2t} -IsoP, nalazi se značajno zastupljena u fosfolipidima i neutralnim lipidima skeletnih mišića i plazme; doduše u različitom stupnju esterifikacije. Kao rezultat toga, arahidonska kiselina dobivena iz fosfolipidnih izvora može doprinijeti izraženijem stvaranju F_{2t} -IsoP u plazmi nego u mišićima. Teoretski, skeletni mišići i plazma mogu neovisno stvarati F_{2t} -IsoP, stoga nema sumnje da razina arahidonske kiseline direktno utječe na brzinu nastajanja F_{2t} -IsoP (97).

Većina relevantnih istraživanja izvijestila je o značajnom povećanju koncentracije F_{2t} -IsoP u plazmi opsegom 13 do 181% (prosječno 59%) kao rezultat akutnog odgovora na programirano tjelesno vježbanje. Sudeći prema istraživanjima koja su utvrđivala razine F_{2t} -IsoP neposredno nakon vježbanja i barem u jednoj kasnijoj vremenskoj točki (1 sat do 5 dana), proizlazi zaključak kako se koncentracije F_{2t} -IsoP vraćaju bazalnim vrijednostima unutar jednog sata nakon završetka tjelesnog vježbanja. Dakle, čini se kako je akutni učinak tjelesnog vježbanja na razine F_{2t} -IsoP u plazmi obično kratkotrajan (87). Tome u prilog ide i relativno kratko poluvrijeme života 15- F_{2t} -IsoP u plazmi, koje iznosi od 4 do 20 minuta, ovisno o literaturnom izvoru (95).

Kronični odgovor koji prati programirano tjelesno vježbanje označen je trendom smanjenja koncentracije F_{2t} -IsoP u plazmi. Neizravna potpora ovim zapažanjima je smanjena razina arahidonske kiseline primijećena u fosfolipidnoj frakciji plazme (98). Budući da se F_{2t} -IsoP vrlo brzo eliminira iz cirkulacije, određivanje F_{2t} -IsoP u plazmi ne može pouzdano

odražavati kronični odgovor izazvan dugotrajnim trenažnim podražajima. Stoga, koncentracije F_{2t} -IsoP u mokraći vjerodostojnije označavaju kronični odgovor na trenažnu intervenciju, ukazujući na trend smanjenja razine, iako su istraživanja u kojima je volumen treninga bio izuzetno visok, ukazala na povećanu razinu F_{2t} -IsoP u mokraći (99).

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj istraživanja jest ispitati učinke trenažnog protokola ponavljanih sprintova na status redoks homeostaze temeljem koncentracije F_{2t} -izoprostana, biljega zlatnog standarda u procjeni *in vivo* lipidne peroksidacije izazvane trenažnim podražajem. Specifični biokemijski ciljevi obuhvaćali su analizu utjecaja trenažnog protokola ponavljanih sprintova na oksidacijski/antioksidacijski status, mišićno oštećenje i imunosni odgovor te utvrđivanje njihove međusobne povezanosti. Specifični biokemijsko-kineziološki cilj jest dodatno ispitati povezanost statusa redoks homeostaze s razinama aerobne pripremljenosti ispitanika.

Na temeljem istaknutih ciljeva postavljene su istraživačke hipoteze.

- Unutar područja redoks homeostaze postavljena je sljedeća hipoteza:

H₁: Trenažni protokol ponavljanih sprintova rezultirat će statistički značajno izraženijim odgovorom na oksidacijska oštećenja.

- Unutar područja mišićnog statusa postavljena je sljedeća hipoteza:

H₂: Trenažni protokol ponavljanih sprintova uzrokovat će statistički značajno povećanje biljega mišićnog oštećenja.

- Unutar područja imunosnog odgovora postavljena je sljedeća hipoteza:

H₃: Trenažni protokol ponavljanih sprintova izazvat će statistički značajno povećanje biljega imunosnog odgovora.

- Unutar biokemijskog područja kojeg čini trijas status redoks homeostaze-mišićno oštećenje-imunosni odgovor postavljene su sljedeće dvije hipoteze:

H₄: Ispitanici koji imaju veću razinu oštećenja mišića pri provođenju trenažnog protokola ponavljanih sprintova pokazuju statistički značajno veća oksidacijska oštećenja.

H₅: Ispitanici koji imaju izraženiji imunosni odgovor pri provođenju trenažnog protokola ponavljanih sprintova pokazuju statistički značajno veća oksidacijska oštećenja.

- Unutar biokemijsko-kineziološkog područja postavljena je sljedeća hipoteza:

H₆: Ispitanici koji imaju veću razinu aerobne izdržljivosti pri provođenju trenažnog protokola ponavljanih sprintova pokazuju statistički značajno niže razine oksidacijskih oštećenja.

Kako bi se uspješno prevenirale ozljede, pretreniranost i mogući nepovoljni učinci na zdravlje, od presudnog je značaja razumijevanje, kako štetnih tako i protektivnih učinaka ROS-a stvorenih tijekom treninga ponavljanih sprintova. Istraživanje (pato)fiziološkog odgovora na trening ponavljanih sprintova može imati ključnu ulogu u vrednovanju i daljnjem razvoju učinkovitijih trenažnih strategija.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Uzorak ispitanika činilo je 15 studenata prve godine Kineziološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, muškog spola, prosječne dobi 19 (18-22) godina. Antropometrijski podaci ispitanika obuhvaćali su; visinu: $181,0 \pm 4,4$ cm, težinu: $77,7 \pm 6,0$ kg i postotak potkožnog masnog tkiva: $8,7 \pm 3,0\%$. Pomoću statističkog programa *MedCalc Software* (<https://www.medcalc.org;2019>) temeljem podataka ranije objavljenog istraživanja (99) utvrđen je broj ispitanika potreban za ovo istraživanje. Prema načinjenoj analizi u istraživanje je trebalo uključiti najmanje 12 ispitanika, budući da se zaključivalo uz pogrešku prvog reda od 5% ($p < 0,05$) za postizanje snage istraživanja od 90% ($\beta = 0,1$). Istraživanje je provedeno u skladu s primjenljivim smjernicama čiji je cilj osigurati sigurnost ispitanika koje sudjeluju u znanstvenom istraživanju, uključujući Osnove dobre laboratorijske prakse, Helsinšku deklaraciju i zakonsku regulativu Republike Hrvatske. Ispitanici su bili upoznati s ciljevima istraživanja, zdravstvenim rizicima i dobrobitima sudjelovanja, detaljno im je pojašnjen eksperimentalni program te su svoj pristanak potvrdili potpisivanjem informiranog pristanka. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice (broj odobrenja EP-5992/17/10 od 6. travnja 2017.) i Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja 643-03/17-01/01 od 3. svibnja 2017.).

Svi ispitanici bili su zdravi, bez akutnih bolesti i ozljeda lokomotornog sustava što je bilo procijenjeno *Physical Activity Readiness Questionnaire* (PAR-Q) testom prije uključivanja u eksperimentalni program. Studentima prve godine Kineziološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, zdravstveni status opsežno je ispitan od strane liječnika specijaliste medicine rada ili liječnika specijaliste sportske medicine što je dokumentirano zdravstvenim listom i detaljnim anamnestičkim upitnikom. Osnovni kriterij odabira ispitanika uključivao je izbjegavanje bilo kakvog organiziranog sustava treninga tri mjeseca prije, tijekom perioda provedbe i mjesec dana nakon eksperimentalnog protokola. Osim eksperimentalnog programa treninga ukupna tjelesna aktivnost ispitanika uključivala je samo realizaciju praktične nastave prvog semestra. Tijekom eksperimentalnog programa ispitanici su također morali izbjegavati bilo kakvu dodatnu rekreativnu aktivnost. Ispitanike su činili isključivo oni studenti koji su trenirali neku od sportskih igara i koji su bili upoznati s intermitentnim aktivnostima. Prije uključivanja u istraživanje ispitanici su bili suzdržani; 2 mjeseca od uzimanja antioksidacijske suplementacije i dodataka prehrani, 7 dana od uzimanja lijekova te 48 sati od konzumacije alkohola i cigareta. Jednake mjere vrijedile su tijekom provedbe kompletnog istraživanja.

3.2. Ustroj istraživanja

3.2.1. Eksperimentalni program treninga ponavljanih sprintova

Cjelokupni eksperimentalni program trajao je devet tjedana. Antropometrijska mjerenja provedena su tijekom prvog i posljednjeg tjedna, zajedno s testovima za procjenu kondicijske pripremljenosti koji su provedeni jer je ovo istraživanje činilo dio opsežnije studije iz područja fiziologije sporta. Ispitanici su redovito pohađali praktičnu nastavu iz kolegija Atletika (hodanja i trčanja), Osnovne kineziološke transformacije, Odbojka i Hrvanje te im je navedena praktična nastava predstavljala jedini dodatni oblik tjelesnog vježbanja tijekom provedbe istraživanja te u razdoblju mjesec dana nakon finalnog mjerenja. Kako bi se ispitanici upoznali s programom treninga, za vrijeme drugog tjedna organizirana su dva 60-minutna upoznavajuća treninga.

Eksperimentalni program treninga ponavljanih sprintova (Tablica 3.) započeo je treći tjedan i trajao je šest tjedana tijekom kojih je izvedeno 18 treninga. Svi treninzi izvođeni su u isto doba dana (od 16 do 18 sati), tri puta tjedno, s 48-satnim intervalom odmora. Treninzi su provedeni u rukometnoj dvorani Kineziološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na drvenoj podlozi uz nadzor glavnog istraživača-kineziologa. Svaki trening započinjao je standardnim protokolom zagrijavanja koji je bio identičan tijekom eksperimentalnog programa rada, a sastojao se od trčanja niskog intenziteta, dinamičnog istezanja i progresivnih ubrzanja na kratkim dionicama u ukupnom trajanju od 18 minuta. Dvije minute nakon zagrijavanja započinjao je glavni dio treninga koji je uključivao izvedbu 2 do 3 serije 6 do 10 sprintova na 20 metara sa startom svakih 25 sekundi. Ispitanici su nakon zvučnog signala krenuli u maksimalni sprint na dionici od 20 metara. Odmor između sprintova bio je aktivnog karaktera jer su ispitanici morali trčati i zauzeti poziciju visokog starta iza startne linije tri sekunde prije zvučnog signala za realizaciju sljedećeg sprinta. Cjelokupni protokol treninga bio je snimljen kao zvučni zapis koji se reproducirao na osobnom računalu kako bi se u potpunosti nadziralo vrijeme početka svakog sprinta i trajanja intervala odmora. Odmor između serija iznosio je dvije minute i bio je pasivnog karaktera. Tijekom istraživanja ispitanici su izveli 338 sprintova i ukupno pretrčali 6760 metara. S obzirom na činjenicu da je ovo istraživanje provedeno kao dio veće studije koju su činile dvije eksperimentalne skupine, 12 ispitanika izvodilo je program treninga ponavljanih pravocrtnih sprintova, dok su ostala 3 ispitanika provodila trening ponavljanih povratnih sprintova. Ukupni volumen treninga bio je identičan za obje eksperimentalne skupine zbog čega se razlika između dva protokola nije trebala odraziti na rezultate ovog istraživanja.

Tablica 3. Eksperimentalni program treninga

	1. tjedan	2. tjedan	3. tjedan	4. tjedan	5. tjedan	6. tjedan	7. tjedan	8. tjedan	9. tjedan
Ponedjeljak	Inicijalno mjerjenje	Upoznavajući trening	2×6×20 m 12 sprintova	3×6×20 m 18 sprintova	2×8×20 m 16 sprintova	3×8×20 m 24 sprinta	2×10×20 m 20 sprintova	3×10×20 m 30 sprintova	Finalno mjerjenje
Srijeda		Upoznavajući trening	2×6×20 m 12 sprintova	3×6×20 m 18 sprintova	2×8×20 m 16 sprintova	3×8×20 m 24 sprinta	2×10×20 m 20 sprintova	3×10×20 m 30 sprintova	
Petak		Odmor	2×6×20 m 12 sprintova	3×6×20 m 18 sprintova	2×6×20 m 12 sprintova	3×8×20 m 24 sprinta	2×10×20 m 20 sprintova	2×6×20 m 12 sprintova	
Ukupni tjedni trening			36 sprintova 720 m	54 sprinta 1080 m	44 sprinta 880 m	72 sprinta 1440 m	60 sprintova 1200 m	72 sprinta 1440 m	
Ukupno: 338 sprintova, 6760 m									

3.2.2. Mjerni instrumenti za procjenu morfoloških karakteristika i kondicijske pripremljenosti ispitanika (3)

Antropometrijska mjerenja provedena su u Dijagnostičkom centru Kineziološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prenosivi antropometar (Holtain, Instruments Ltd., Crosswell, UK) korišten je za mjerenje visine tijela (cm), dok se za procjenu težine (mase) tijela (kg) i postotka potkožnog masnog tkiva (%) koristio analizator za sastav tijela (BC-418, Tanita Corporation, Tokio, Japan).

Za procjenu funkcionalnih sposobnosti korišten je progresivni test opterećenja na pokretnom sagu (KF1) i test izdržaja u trčanju na maksimalnoj brzini postignutoj na progresivnom testu opterećenja (t_{lim}). Testovi za procjenu funkcionalnih sposobnosti također su provedeni u Dijagnostičkom centru Kineziološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Progresivni test opterećenja (KF1) proveden je na pokretnom sagu Run Race Competition HC1200 (Technogym, Italija) pri stalnom nagibu od 1,5%. Test je započeo hodanjem pri brzini od 3 km/h u trajanju od 2 minute, nakon čega se brzina povećavala za 0,5 km/h svakih 30 sekundi. Progresivno povećanje brzine pokretnog sagra odvijalo se do otkaza, odnosno do trenutka kada ispitanik više nije mogao nastaviti test. Nakon završetka testa ispitanik je nastavio hodati dodatnih pet minuta pri brzini sagra od 5 km/h. Za kontinuirano (*breath by breath*) prikupljanje ventilacijskih, metaboličkih i ergometrijskih parametara tijekom provedbe spiroergometrijskog testa korišten je kompjuterizirani sustav Quark b² (Cosmed, Italija). Za praćenje frekvencije srca tijekom testa korišten je telemetrijski sustav Polar Vantage NV (Polar ElecrtoOi, Finska). Funkcionalne varijable izmjerene tijekom progresivnog testa opterećenja na pokretnom sagu uključivale su:

- apsolutni maksimalni primitak kisika (VO_{2max}) (lO_2/min)
- relativni maksimalni primitak kisika (RVO_{2max}) ($mlO_2/kg/min$)
- maksimalna postignuta brzina trčanja (v_{max}) (km/h)
- maksimalna frekvencija srca (FS_{max}) (o/min)
- brzina trčanja pri maksimalnom primitku kisika (vVO_{2max}) (km/h)
- frekvencija srca pri maksimalnom primitku kisika ($FSVO_{2max}$)
- koncentracija laktata u krvi u trećoj minuti oporavka (La) (mmol/L)

Testiranja funkcionalnih sposobnosti provedena su u stabilnim mikroklimatskim uvjetima adekvatno ventiliranog prostora dijagnostičkog laboratorija koji su podrazumijevali temperaturu od 20-22 °C te relativnu vlažnost zraka do 60%.

3.3. Uzorci

Uzimanje uzoraka krvi i mokraće bilo je longitudinalno provedeno u tri vremenske točke:

- nakon inicijalnog mjerenja - najmanje intenzivnog treninga (T_0)
- nakon finalnog mjerenja - najintenzivnijeg treninga (T_1)
- mjesec dana nakon finalnog mjerenja (T_2)

3.3.1. Uzimanje uzoraka krvi

Terensko uzimanje krvi organizirano je u Dijagnostičkom centru Kineziološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, 20 minuta nakon treninga u svakoj vremenskoj točki, uvijek u isto vrijeme kako bi se kontrolirale cirkadijane varijacije u koncentracijama određivanih laboratorijskih biljega. Nakon 15 minuta mirovanja, vađenje krvi provedeno je u sjedećem položaju od strane stručnog laboratorijskog osoblja prema Nacionalnim preporukama za uzorkovanje venske krvi, Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (100). Uzorci krvi uzeti su iz površinske antekubitalne vene pomoću ravne igle promjera 20-G (BD, Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, SAD), izravno u vakuum epruvete s K_2EDTA kao antikoagulansom (1 x 2 mL; BD, Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, SAD) i serumske vakuum epruvete s aktivatorom zgrušavanja (1 x 10 mL; BD, Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, SAD). Svi uzorci krvi dopremljeni su na daljnju obradu u Endokrinološki laboratorij KBC Sestre milosrdnice unutar 45 minuta od vađenja krvi. Uzorci seruma su potom centrifugirani 10 minuta pri 1370 g korištenjem Rotina 35 R Hettich centrifuge (Tuttlingen, Njemačka). Nakon odvajanja od taloga, serumu su aspirirani u seriju od dva alikvota (1 mL) i pohranjeni na -80 °C do trenutka analize.

3.3.2. Priprema plazme i hemolizata eritrocita

Ispitanicima je najprije rutinski odrađena analiza kompletne krvne slike iz pune krvi. Potom su K_2EDTA epruvete centrifugirane 10 minuta pri 1370 g. Izdvojena plazma vizualno je pregledana i odmah pohranjena u dva alikvota (1 mL) na -80 °C. U niti jednom uzorku nije

zabilježena hemoliza, niti lipemija. Preostali talog krvnih stanica ispiran je tri puta dodavanjem fiziološke otopine i centrifugiranjem 10 minuta pri 1370 g. Pročišćeni eritrociti su rekonstituirani i hemolizirani ledenom destiliranom vodom u istom volumenu kao što su se nalazili u plazmi. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije hemoglobina u lizatima eritrocita rađeno je na hematološkom brojaču ADVIA 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Njemačka), a zatim je lizat eritrocita podijeljen u dva alikvota i pohranjen na -80 °C do trenutka analize.

3.3.3. Uzimanje uzoraka 24-satne mokraće

Uzorci 24-satne mokraće sakupljani su 4 dana nakon odabrane točke eksperimentalnog programa treninga, korištenjem plastičnog spremnika (1 x 3000 mL; Vacutest Kima, PD, Italija). Ispitanici su bili detaljno informirani na koji način pravilno sakupiti uzorak 24-satne mokraće te su dobili pisane upute o istom. Nakon preuzimanja i transporta uzoraka, volumen 24-satne mokraće izmjeren je po dolasku u Endokrinološki laboratorij. Ukupni volumen 24-satne mokraće potom se miješao radi dobivanja homogenih alikvota mokraće od 10 mL koji su se pohranjivali na -80 °C do konačnog laboratorijskog određivanja.

3.4. Metode

3.4.1. Materijali

U radu su korišteni sljedeći materijali:

Kemikalije

- Acetonitril, CH₃CN (Merck, Njemačka)
- Aluminijev oksid, Al₂O₃ (Merck, Njemačka)
- L(+)-Askorbinska kiselina, C₆H₈O₆ (Merck, Njemačka)
- Diklormetan, CH₂Cl₂ (Merck, Njemačka)
- Etilen-diamin-tetraoctena kiselina, EDTA (Merck, Njemačka)
- Etil-acetat, CH₃COOC₂H₅ (Merck, Njemačka)
- Fiziološka otopina (Braun, Njemačka)
- orto-Fosforna kiselina, H₃PO₄, min. 85%-tna (Kemika, Hrvatska)
- Heksan, C₆H₁₄ (Merck, Njemačka)

- Kalibrator (-)-Epinephrine (Sigma, SAD)
- Kalibrator (-)-Norepinephrine (Sigma, SAD)
- Kloridna kiselina, HCl, min. 36,5%-tna (Kemika, Hrvatska)
- Metanol, CH₃OH (Merck, Njemačka)
- Mononatrijev fosfat, NaH₂PO₄•H₂O (Merck, Njemačka)
- Natrijev disulfit, Na₂S₂O₅ (Merck, Njemačka)
- Natrijev barbital, C₈H₁₁N₂NaO (BUFA, Mađarska)
- Natrijev klorid, NaCl (Merck, Njemačka)
- Octena kiselina, C₂H₄O₂, min. 99,5%-tna (Kemika, Hrvatska)
- Oktansulfonska kiselina, OSA (Merck, Njemačka)
- Puferske otopine za baždarenje pH metra: pH 4 i pH 7 (Standard Instruments Gmb, Njemačka)
- Standard adrenalina hidroklorida, C₉H₁₃NO₃•HCl (Sigma, SAD)
- Standard 3,4-dihidroksibenzilamin hidrobromida, C₇H₉NO₂•HBr (Sigma, SAD)
- Standard noradrenalin hidroklorida, C₈H₁₁NO₃•HCl (Sigma, SAD)
- Tris hidroksimetilamino metan (TRIS), H₂NC(CH₂OH)₃ (Merck, Njemačka)

Komercijalni reagensi i kompleti („kitovi“)

- Albumin (Beckman Coulter, SAD)
- Aspartate aminotransferase, AST (Beckman Coulter, SAD)
- Creatine kinase, CK-Nac (Beckman Coulter, SAD)
- CRP Latex (Beckman Coulter, SAD)
- Diluent Universal (Roche Diagnostics, Švicarska)
- Elecsys Cortisol (Roche Diagnostics, Švicarska)
- Elecsys Prolactin II (Roche Diagnostics, Švicarska)
- β-Glucuronidase (Oxford Biomedical Research, SAD)
- GLUT RED antioxidant kit (Randox Laboratories Limited, UK)
- Interleukin-6, High Sensitivity kit (BioVendor Laboratory Medicine, Češka)
- 15-Isoprostane F_{2t} ELISA kit (Oxford Biomedical Research, SAD)
- Lactate dehydrogenase, LD (Beckman Coulter, SAD)
- Myoglobin (Beckman Coulter, SAD)

- Oasis HLB 10 mg kit (Waters Corporation, SAD)
- RANSEL antioxidant kit (Randox Laboratories Limited, UK)
- RANSOD antioxidant kit (Randox Laboratories Limited, UK)
- Total Bilirubin (Beckman Coulter, SAD)
- Transferrin (Beckman Coulter, SAD)
- Uric acid (Beckman Coulter, SAD)
- Urinary Isoprostane ELISA Kit (Oxford Biomedical Research, SAD)

3.4.2. Metode određivanja biljega oksidacijskog stresa

3.4.2.1. Određivanje koncentracije slobodnih 15-F_{2t}-IsoP u plazmi

Priprava uzoraka plazme ekstrakcijom na čvrstoj fazi

Biološki uzorci plazme često sadrže visoku koncentraciju proteina i drugih tvari koje interferiraju u imunokemijskim metodama. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE, engl. *solid-phase extraction*) odabrana je separacijska metoda kod koje se odvajanje 15-F_{2t}-IsoP od matriksa plazme temelji na selektivnom vezanju analita na sorbens (smješten u maloj koloni), nakon čega slijedi desorpcija ispiranjem s odgovarajućom smjesom otapala. Primjenom SPE osigurava se ukoncentriravanje i pročišćavanje uzoraka prije konačnog određivanja slobodnih 15-F_{2t}-IsoP metodom ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Postupak ekstrakcije izveden je na sljedeći način:

1. Pripremljeni su alikvoti plazme volumena 100 µL
2. Plazme su potom razrijeđene deioniziranom vodom do ukupnog volumena od 5 mL i zakiseljene s 1M HCl (5 µL) do pH=3
3. Oasis HLB kit (10 mg) sačinjen od 30 µm SPE kolona (Waters, Milford, MA, SAD) prekondicioniran je s 0,5 mL metanola i 0,5 mL 1 mM HCl
4. Stanica za ekstrakciju i vakuumska aparatura postavljene su prema uputama proizvođača s odgovarajućim epruvetama za prikupljanje otpada ispod svakog stupca kolone
5. Uzorci plazme pipetirani su na kolone Oasis HLB kit-a i pušteni da prođu brzinom protoka od 1 mL u minuti
6. Kolone su zatim isprane s 0,5 mL 1mM HCl, a potom s 0,5 mL heksana

7. Uklonjene su epruvete za prikupljanje otpadnih materijala i umetnute epruvete za prikupljanje konačnih uzoraka
8. Uzorci su eluirani s kolone korištenjem otopine 1 mL etil-acetata koja sadrži 1% metanol sve dok se kolona nije potpuno osušila
9. Eluirani uzorci su nakon toga evaporirani primjenom struje tekućeg dušika, a osušeni uzorak pojavljivao se kao uljni ostatak na dnu epruvete
10. Pripremljeni uzorci za ELISA rekonstituirani su u 100 μ L 5x pufera za razrjeđenje (koji čini ELISA kit-a)

ELISA

Koncentracija slobodnih 15-F_{2t}-IsoP u plazmi određena je kompetitivnom ELISA metodom sukladno uputama proizvođača (Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, SAD). Metoda se temelji na kompeticiji 15-F_{2t}-IsoP iz uzorka plazme ili kalibratora s 15-F_{2t}-IsoP konjugiranim s HRP za vezna mjesta poliklonskih protutijela visoko specifična za 15-F_{2t}-IsoP kojim je obložena mikrotitarska pločica. Nakon dodavanja TMB supstrata, aktivnost HRP rezultirala je razvojem obojenja čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji HRP-vezanih 15-F_{2t}-IsoP; ili obrnuto proporcionalan koncentraciji nekonjugiranih 15-F_{2t}-IsoP u uzorcima plazme (ili kalibratora). Reakcija se zaustavlja dodatkom sumporne kiseline i mjeri se apsorbancija na 450 nm s referentnom valnom duljinom od 650 nm. Za izradu kalibracijske krivulje korištena su razrjeđenja standarda 15-F_{2t}-IsoP koji je dio ELISA kita. Originalni standard od 1 μ g/mL korišten je za izradu sedam uzastopnih razrjeđenja, stoga je kalibracijska krivulja sadržavala 7 kalibracijskih točaka (100 ng/mL, 50 ng/mL, 10 ng/mL, 5 ng/mL, 1 ng/mL, 0,1 ng/mL i 0,05 ng/mL). Svako razrjeđenje testirano je u duplikatu te je kalibracijska krivulja izrađena nanošenjem koncentracije kalibratora na apscisu i srednjih vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju kalibratora (podijeljenih s apsorbancijom nultog kalibratora koji sadrži pufer za razrjeđivanje) na ordinatu grafa. Prema podacima proizvođača, korištena protutijela pokazuju slabu križnu reaktivnost s 9 α ,11 β -prostaglandin-F_{2 α} (4,1%) i 13,14-dihidro-15-keto-F_{2 α} (3%). Međulaboratorijska preciznost koju deklarira proizvođač (ispitana na uzorcima kalibratora u triplikatu tijekom pet dana) iznosila je manje od 20%.

3.4.2.2. Određivanje koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u 24-satnoj mokraći

Kako je 24-satna mokraća korištena kao uzorak izbora, nije bilo potrebno normalizirati koncentraciju izoprostana prema koncentraciji kreatinina, što je standardna procedura u analizi uzoraka jednokratne mokraće.

Priprava uzoraka 24-satne mokraće s β-glukuronidazom

Približno 50% 15-F_{2t}-IsoP koji se izlučuju mokraćom konjugirano je s glukuronskom kiselinom. Razine glukuronidacije variraju interindividualno od 28 do 80%. Stoga su uzorci 24-satne mokraće prethodno obrađeni enzimom β-glukuronidazom kako bi se u daljnjem koraku što točnije kvantificirala razina 15-F_{2t}-IsoP. Postupak je izveden na sljedeći način:

1. Na svakih 40 μL uzorka 24-satne mokraće dodano je 2 μL glukuronidaze, ukupni volumen zatim je vorteksiran
2. Dobivena mješavina potom je inkubirana 2 sata na 37 °C
3. Pripremljeni uzorci razrijeđeni su 1:4 s *Enhanced Dilution Bufferom* (koji čini ELISA kit-a) s ciljem eliminacije interferencija koje mogu biti uzrokom nespecifičnog vezanja tijekom provedbe ELISA postupka

ELISA

Koncentracija 15-F_{2t}-IsoP u 24-satnoj mokraći određena je kompetitivnom ELISA metodom sukladno uputama proizvođača (Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, SAD). Metoda se temelji na istom načelu i specifikacijama opisanim prethodno za postupak određivanja koncentracije slobodnih 15-F_{2t}-IsoP u plazmi.

3.4.3. Metode određivanja biljega antioksidacijskog statusa

3.4.3.1. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze

Katalitička aktivnost SOD-a u lizatu eritrocita određena je spektrofotometrijski korištenjem komercijalnog reagensa RANSOD (Randox Laboratories Limited, Crumlin, UK) koji je postavljen na automatskom analizatoru Architect c4000 (Abbott Park, IL, SAD), prema uputama proizvođača. Pripremljeni lizati eritrocita razrijeđeni su 50 puta s Ransod-ovim diluentom i potom analizirani. Određivanje aktivnosti SOD-a temelji se na činjenici da je SOD

enzim koji katalizira reakciju disproporcioniranja superoksidnog radikala u kojoj se on istodobno oksidira i reducira. Metoda koristi sustav ksantin/ksantin oksidaza za nastajanje superoksidnih radikala koji reduciraju kompleksni spoj 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijev klorid (INT). SOD iz uzorka posljedično usporava redukciju INT-a stvarajući crveno obojeni spoj formazan, stoga je promjena apsorbancije pri valnoj duljini od 505 nm obrnuto proporcionalna aktivnosti SOD-a u uzorku. Jedinica katalitičke aktivnosti SOD-a predstavlja aktivnost SOD-a kojom se postiže 50%-tna inhibicija redukcije INT-a u reakcijskoj smjesi. Katalitička aktivnost SOD-a izražena je kao aktivnost enzima u jedinicama U/g Hb. Međulaboratorijska preciznost koju deklarira proizvođač (ispitana na kontrolnim uzorcima u triplikatu tijekom pet dana) iznosila je 6,5%.

3.4.3.2. Određivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze

Katalitička aktivnost GPx-a u lizatu eritrocita određena je spektrofotometrijski korištenjem komercijalnog reagensa RANSEL (Randox Laboratories Limited, Crumlin, UK) koji je postavljen na automatskom analizatoru Architect c4000 (Abbott Park, IL, SAD), prema uputama proizvođača. Pripremljeni lizati eritrocita razrijeđeni su 5 puta s Ranselovim diluentom i zatim analizirani. Metoda za određivanje aktivnosti GPx u eritrocitima temelji se na redukciji kumenovog hidroperoksida posredstvom GPx-a iz uzorka, uz istodobnu oksidaciju glutationa. Oksidirani glutacion se reducira posredstvom glutacion reduktaze uz istodobnu oksidaciju koenzima NADPH u NADP⁺. Pad apsorbancije pri valnoj duljini od 340 nm proporcionalan je katalitičkoj aktivnosti GPx-a. Jedinica katalitičke aktivnosti GPx-a definirana je kao aktivnost enzima koja uzrokuje oksidaciju 1 nmol/L NADPH-a u minuti u prisustvu supstrata. Katalitička aktivnost GPx-a izražena je kao aktivnost enzima u jedinicama U/g Hb. Međulaboratorijska preciznost koju deklarira proizvođač (ispitana na kontrolnim uzorcima u triplikatu tijekom pet dana) iznosila je 5,8%.

3.4.3.3. Određivanje aktivnosti glutacion-reduktaze

Katalitička aktivnost GR-a u lizatu eritrocita određena je spektrofotometrijski korištenjem komercijalnog reagensa GLUT RED (Randox Laboratories Limited, Crumlin, SAD) koji je postavljen na automatskom analizatoru Architect c4000 (Abbott Park, IL, SAD), prema uputama proizvođača. Pripremljeni lizati eritrocita razrijeđeni su 10 puta s Glutred diluentom i zatim analizirani. Metoda za određivanje katalitičke aktivnosti GR-a temelji se na

redukciji oksidiranog glutationa posredstvom GR iz uzorka pri čemu se koenzim NADPH oksidira u NADP^+ . Pad apsorbancije pri valnoj duljini od 340 nm proporcionalan je katalitičkoj aktivnosti GR-a. Katalitička aktivnost GR-a izražena je kao aktivnost enzima u jedinicama U/g Hb. Međulaboratorijska preciznost koju deklarira proizvođač (ispitana na kontrolnim uzorcima u triplikatu tijekom pet dana) iznosila je 5,4%.

3.4.3.4. Određivanje koncentracije urata

Koncentracija urata određena je fotometrijsko-enzimskom metodom s urikazom i askorbat-oksidadom na automatskom analizatoru AU2700 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), prema specifikacijama proizvođača. Urikaza katalizira pretvorbu urata u alantoin i vodikov peroksid (H_2O_2). Trinderova reakcija koristi se za mjerenje H_2O_2 . Stvoreni H_2O_2 reagira s N,N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilanilinom, dinatrijevom soli (MADB) i 4-aminofenazonom u prisustvu peroksidaze da bi se stvorio kromofor, koji se očitava bikromatski pri valnoj duljini od 660/800 nm. Količina obojenja koja nastaje proporcionalna je koncentraciji urata u uzorku.

3.4.3.5. Određivanje koncentracije ukupnog bilirubina

Koncentracija ukupnog bilirubina određena je fotometrijskom metodom s 3,5-diklorfenil-diazoniumtetrafluoroboratom (DPD) na automatskom analizatoru AU2700 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), prema specifikacijama proizvođača. Stabilizirana diazonijeva sol (DPD) s kofeinom i površinskim aktivnim agensom, u reakciji s konjugiranim bilirubinom izravno, a s nekonjugiranim bilirubinom u prisutnosti akceleratora stvara azobilirubin. Apsorpcija na valnoj duljini od 540 nm proporcionalna je koncentraciji ukupnog bilirubina. Da bi se smanjile endogene interferencije provodi se zasebni test slijepe probe.

3.4.3.6. Određivanje koncentracije albumina

Koncentracija albumina određena je fotometrijskom metodom s bromkrezol-zelenilom (BCG, engl. *bromocresol green*) na automatskom analizatoru AU2700 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), prema specifikacijama proizvođača. Apsorpcija albumin-BCG kompleksa mjeri se bikromatski (600/800 nm), te je proporcionalna koncentraciji albumina u uzorku.

3.4.3.7. Određivanje koncentracije transferina

Koncentracija transferina određena je imunoturbidimetrijskom metodom na automatskom analizatoru AU2700 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), prema specifikacijama proizvođača. Kada se uzorak seruma pomiješa s puferom, transferin iz uzorka specifično reagira s protutijelima na humani transferin dajući netopljive agregate. Apsorpcija stvorenih agregata proporcionalna je koncentraciji transferina u uzorku seruma.

3.4.4. Metode određivanja hormona induciranih stresom

3.4.4.1. Određivanje koncentracije katekolamina u 24-satnoj mokraći

Adrenalin i noradrenalin su aktivni amini koji sadrže benzolski prsten s dvije hidroksilne kupine, zajednički ih nazivamo katekolamini.

Priprava uzoraka

Uzorci 24-satne mokraće prethodno su pročišćeni ekstrakcijom na aluminijskom oksidu pri pH 8,6 te eluirani s octenom kiselinom. U plastičnim epruvetama pripravljeno je 2 mL mokraće (ili 1 mL kontrolnog uzorka), 100 µL unutarnjeg standarda 3,4-dihidroksibenzilamina koncentracije 400 ng/mL, 100 µL otopine A (1,9 g metabisulfita i 1,76 g askorbinske kiseline otopljeno u 100 mL vode), 200 mg Al₂O₃ i 2 mL 2 M TRIS pufera pH 8,6. Uzorci su postavljeni na rotirajuću miješalicu kroz 20 minuta i zatim centrifugirani 5 minuta pri 1250 g. Nakon toga, dodano je 2 mL barbiturnog pufera pH 8,5 u prvom koraku, 2 mL redestilirane vode u drugom koraku ekstrakcije, te je zaključno izvedeno eluiranje s 1 mL 0,5 M octene kiseline. 400 µL nadsloja pipetirano je u staklene epruvete spremne za kromatografsku analizu. Najprije je analiziran radni standard dobiven miješanjem 100 µL visokog standarda u 1000 µL 0,5 M octene kiseline. Koncentracije radnih standarda iznosile su kako slijedi: 25 ng/mL (122 nmol/L) noradrenalina, 10 ng/mL (54,6 nmol/L) adrenalina i 40 ng/mL (181,6 nmol/L) unutarnjeg standarda. Potom su analizirani kontrolni uzorci *Urine Endocrine Control* (Chromsystems).

UPLC metoda

Katekolamini su određivani metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UPLC, engl. *ultra-high performance liquid chromatography*) na instrumentu UFLC-NEXERA LC-30AD (Shimadzu GmbH, Kyoto, Japan) s fluorescentnim detektorom

(RF-20A XS, Shimadzu GmbH, Kyoto, Japan), uz programsku podršku *LabSolutions Version 5.42 SP5* (Shimadzu GmbH, Kyoto, Japan). Za kromatografiju katekolamina koristila se *InterSustain C18* kolona, dimenzija 250 x 4,6 mm, punjena česticama veličine 5 µm (GL Science, Tokyo, Japan). Pokretnu hidrofilnu fazu činili su fosfatni pufer s dodatkom oktansulfonske kiseline i acetonitril u omjeru 93 : 7 v/v, pri pH 3,05. Za vrijeme analize koristio se binarni gradijent acetonitrila od 7% s brzinom protoka od 1 mL/min, tijekom 22 minute, s temperaturom kolone od 30 °C i volumenom pipetiranja od 40 µL. Sustav je bio umjeren korištenjem kalibratora; (-)-*Norepinephrine* za kalibraciju noradrenalina i (-)-*Epinephrine* za kalibraciju adrenalina. Kalibrator za noradrenalin bio je sljediv prema 98% *Crystalline* (Sigma), dok je kalibrator za adrenalin bio sljedivi prema *European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard Y0000882*. Tijekom kromatografskog određivanja, molekule uzorka natjecale su se za adsorpcijska mjesta na nepokretnoj fazi. Hidrofobnije molekule zadržavale su se na koloni dulje od hidrofilnih. Nakon izlaska iz kolone razdvojene komponente identificirane su pomoću fluorescentnog detektora, te se uz programsku podršku izračunavala koncentracija temeljem poznatih koncentracija standarda. Kromatogrami su inicijalno obrađeni automatskom metodom integriranja, nakon čega je svaki kromatogram ručno ispravljen kako bi svi uzorci bili jednako integrirani.

3.4.4.2. Određivanje koncentracije slobodnog kortizola u 24-satnoj mokraći

Najveći dio kortizola u krvi (90%) cirkulira vezan za transkortin, 7% je vezano za albumine, a samo je mali dio slobodan i biološki aktivan. Slobodni kortizol izlučuje se mokraćom. Osim toga, vađenje krvi izaziva stres i dovodi do lažno povišenih koncentracija kortizola, što predstavlja dodatan razlog zašto je pouzdanije određivati slobodni kortizol u 24-satnoj mokraći.

Priprava uzoraka

1. Uzorci su otopljeni na sobnoj temperaturi neposredno pred izvođenje analize, zatim su dobro promiješani i centrifugirani 10 minuta pri 1875 g
2. Otpipetirano je 600 µL uzorka u odgovarajuće označene staklene epruvete, te je u svaku epruvetu dodano 3 mL diklometana
3. Epruvete su postavljene na miješalicu 7 minuta
4. Nakon miješanja, centrifugirane su 5 minuta pri 2500 g
5. Vakuum sisaljkom uklonjen je gornji vodeni sloj

6. U drugi set označenih staklenih epruveta prebačeno je 1,5 mL donjeg sloja tekućine i ostavljeno u digestoru do sljedećeg radnog dana
7. Nakon otparavanja, ostatni talog je otopljen u 300 μ L *Diluent Universal-a*
8. Talog se otapao 30 minuta uz povremeno miješanje na Vortex miješalici
9. Nakon otapanja taloga, uzorak se pipetirao u odgovarajuće epruvete za daljnju analizu

Koncentracija slobodnog kortizola u 24-satnoj mokraći određena je elektrokemiluminiscentnom metodom načelom kompeticije na automatskom analizatoru Roche cobas e601 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka), prema specifikacijama proizvođača. U postupku određivanja kortizola koristilo se specifično poliklonsko protutijelo za kortizol na koje je vezan biotin i egzogeni derivat kortizola obilježen rutenijem. Ovisno o koncentraciji kortizola u uzorku i stvaranju odgovarajućih imuno kompleksa, vezna mjesta označenog protutijela dijelom se vežu na analit, a dijelom na rutenijem označen hapten. Nakon dodavanja mikročestica obilježenih streptavidinom, kompleks se veže na čvrstu fazu interakcijom biotina i streptavidina. Reakcijska smjesa aspirira se u mjerne posudice gdje se mikročestice magnetski vežu na površinu elektrode i pod naponom potiču emisiju kemiluminiscencije koju mjeri fotomultiplikator. Jačina emitirane svjetlosti indirektno je proporcionalna koncentraciji slobodnog kortizola u uzorku. Metoda je sljedeća prema *Enzymun-Test-Cortisol* metodi koja je pak standardizirana prema metodi izotopne dilucije spregnute s masenom spektrometrijom. Granica detekcije metode iznosila je 8,5 nmol/L.

3.4.4.3. Određivanje koncentracije prolaktina

Koncentracija prolaktina određena je elektrokemiluminiscentnom metodom sa sendvič principom na automatskom analizatoru Roche cobas e601 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka), prema specifikacijama proizvođača. U prvoj inkubaciji, nastaje kompleks prolaktina s protutijelima obilježenim rutenijevim kompleksom i protutijelima obilježenim biotinom. U drugoj inkubaciji kompleks se preko biotina veže za paramagnetske čestice obložene streptavidinom. Primjenom napona odvija se kemiluminiscentna reakcija između rutenijevog kompleksa i tripropilamina. Emisija fotona je proporcionalna koncentraciji prolaktina u uzorku. Metoda je sljedeća prema trećem IR WHO (engl. *international standard World Health Organization*) referentnom standardu 84/500. Granica detekcije metode iznosila je 1,0 mIU/L.

3.4.5. Metode određivanja biljega oštećenja mišića

3.4.5.1. Određivanje aktivnosti kreatin-kinaze

Katalitička aktivnost CK određena je fotometrijskom UV metodom uz aktivaciju N-acetilcisteinom (IFCC metoda, engl. *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) na automatskom analizatoru AU2700 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), prema specifikacijama proizvođača. Kreatin-kinaza katalizira reverzibilan prijenos fosfatne grupe iz kreatin-fosfata na adenzin-difosfat (ADP) i kao produkti nastaju kreatin i adenzin trifosfat (ATP). Adenzin trifosfat se koristi za stvaranje glukoza-6-fosfata i ADP iz glukoze. Ova reakcija se katalizira heksokinazom koja za maksimalnu aktivnost zahtijeva ione magnezija. Glukoza-6-fosfat se oksidira aktivnošću enzima glukoze-6-fosfata dehidrogenaze uz istodobnu redukciju koenzima NADP^+ i stvaranje NADPH i 6-fosfoglukonata. Porast apsorpcije pri 340/660 nm uslijed formiranja NADPH direktno je proporcionalno aktivnosti CK u uzorku seruma.

3.4.5.2. Određivanje aktivnosti aspartat-aminotransferaze

Katalitička aktivnost AST-a određena je fotometrijskom UV metodom bez piridoksal-fosfata (IFCC metoda) na automatskom analizatoru AU2700 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), prema specifikacijama proizvođača. Enzim AST katalizira transaminaciju aspartata i 2-oksoglutarata stvarajući L-glutamat i oksalacetat. Malat-dehidrogenaza reducira oksalacetat u L-malat, a NADH se istovremeno pretvara u NAD^+ . Smanjenje apsorpcije zbog potrošnje NADH mjeri se pri 340 nm i proporcionalno je aktivnosti AST-a u uzorku seruma. Endogeni piruvat uklanja se LDH-reakcijom tijekom razdoblja inkubacije.

3.4.5.3. Određivanje aktivnosti laktat-dehidrogenaze

Katalitička aktivnost LD određena je fotometrijskom UV metodom (IFCC metoda) na automatskom analizatoru AU2700 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), prema specifikacijama proizvođača. Enzim LD katalizira oksidaciju laktata u piruvat koju prati redukcija NAD^+ u NADH. Porast apsorpcije NADH mjeri se na 340 nm i izravno je proporcionalan aktivnosti LD u uzorku seruma.

3.4.5.4. Određivanje koncentracije mioglobina

Koncentracija mioglobina određena je imunoturbidimetrijskom metodom na automatskom analizatoru AU2700 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), prema specifikacijama proizvođača. Kada se uzorak seruma pomiješa s puferom i otopinom lateksa, mioglobin iz uzorka specifično reagira s protutijelima na humani mioglobin vezan za čestice lateksa dajući netopljive agregate. Apsorpcija stvorenih agregata proporcionalna je koncentraciji mioglobina u uzorku seruma. Vrijednosti kalibratora za mioglobin sljedive su prema visoko pročišćenom humanom srčanom mioglobinu, dodijeljene pomoću komercijalno dostupne radioimunološke metode. Granica detekcije metode iznosila je 3,14 µg/L.

3.4.6. Metode određivanja biljega imunskog odgovora

3.4.6.1. Određivanje koncentracije visokoosjetljivog IL-6

Koncentracija IL-6 određena je visokoosjetljivom sendvič ELISA metodom sukladno uputama proizvođača (BioVendor Laboratory Medicine, Inc., Brno, Češka). Metoda se zasniva na reakciji monoklonskog protutijela visoko specifičnog za IL-6 kojim je obložena mikrotitarska pločica. Nakon inkubacije s uzorcima plazme ili kalibratorima koji u sebi sadrže određenu koncentraciju IL-6 te ispiranja, dodaje se konjugat u vidu poliklonskog protutijela na IL-6 obilježen streptavidinom i vezan na peroksidazu iz hrena (HRP). Nakon ispiranja nevezanog konjugata, detekcija IL-6 odvija se korištenjem 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) kao supstrata za HRP enzim. On reagira s otopinom supstrata i stvara se obojeni produkt koji nastaje proporcionalno s koncentracijom IL-6 prisutnog u kalibratoru ili uzorku plazme. Reakcija se zaustavlja dodatkom sumporne kiseline i mjeri se apsorbancija na 450 nm s referentnom valnom duljinom od 620 nm. Za izradu kalibracijske krivulje korištena su razrjeđenja standarda IL-6 koji je dio ELISA kita. Originalni standard od 50 pg/mL korišten je za izradu pet uzastopnih razrjeđenja, stoga je kalibracijska krivulja sadržavala 6 kalibracijskih točaka (50 pg/mL, 25 pg/mL, 12,5 pg/mL, 6,25 pg/mL, 3,12 pg/mL i 1,56 pg/mL). Svako razrjeđenje testirano je u duplikatu te je kalibracijska krivulja izrađena nanošenjem koncentracija kalibratora na apscisu i srednjih vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju kalibratora na ordinatu grafa. Prema podacima proizvođača, granica detekcije definirana je kao koncentracija analita koja rezultira apsorbancijom koja je značajno viša od srednje vrijednosti

apsorbancije slijepe probe (srednja vrijednost + 3 standarde devijacije) i iznosi 0,81 pg/mL. Izračunata laboratorijska međupreciznost iznosila je 4,4%, a ukupna preciznost 9,1%.

3.4.6.2. Određivanje koncentracije visokoosjetljivog C-reaktivnog protein

Razina CRP-a u području vrlo niskih koncentracija određena je imunoturbidimetrijskom metodom korištenjem CRP Latex reagensa postavljenog na automatskom analizatoru AU2700 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), prema specifikacijama proizvođača. Metoda se zasniva na specifičnoj imunološkoj reakciji antigena CRP-a u uzorku plazme i zečjih anti-CRP-protutijela obloženih česticama lateksa kojom nastaju netopivi agregati. Jačina apsorpcije stvorenih agregata proporcionalna je koncentraciji CRP-a u uzorku plazme. Vrijednosti CRP Latex visokoosjetljivog kalibratora sljede su prema IFCC standardu CRM470. Granica detekcije metode iznosila je 0,07 mg/L.

3.4.6.3. Određivanje parametara kompletne krvne slike

U kontekstu imunosnog odgovora određeni su sljedeći hematološki parametri: broj leukocita, segmentiranih neutrofilnih granulocita i limfocita načelom protočne citometrije na hematološkom brojaču ADVIA 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Njemačka). Protočna citometrija na hematološkom brojaču ADVIA 2120i kombinira princip rasapa svjetlosti s metodom mjerenja aktivnosti mijeloperoksidaze u leukocitima te ih razvrstava na osnovi njihove pojedinačne specifičnosti. S reagensom koji sadrži vodikov peroksid i elektron kao akceptor kromogena stvara se tamno obojeni talog pri endogenoj aktivnosti peroksidaze u granulama granulocita. Normalni neutrofili imaju znatnu peroksidaznu aktivnost kao odgovor zrelosti stanice. Suspenzija stanica prolazi kroz optičku protočnicu, gdje se svaka stanica obasja laserskom zrakom te se mjeri skretanje zraka svjetlosti pod malim kutom (odgovara veličini stanice) i apsorpcija svjetla (obojenost peroksidazom). Optički signali elektronički se umnožavaju i prikazuju kao histogrami i citogrami.

3.5. Statistička analiza

S obzirom na mali broj ispitanika, vodeći se preporukama koje se odnose na veličinu uzorka (101), statistički značajna razlika između uzastopnih kvantitativnih, zavisnih mjerenja procijenjena je neparametarskim Wilcoxon signed-rank testom, a podaci su prikazani kao

medijan i interkvartil raspon (IQR). Dob je, bez obzira na raspodjelu, prikazana medijanom i rasponom (minimum - maksimum). Statistički značajna razlika između dvije skupine kvantitativnih, nezavisnih mjerenja ispitana je neparametrijskim Mann-Whitneyevim testom.

Moguća povezanost varijabli ispitana je Spearmanovom korelacijom. Koeficijent korelacije (r) tumačen je na razini $P < 0,05$, a jačina povezanosti interpretirana je sukladno Coltonovu kriteriju prikazanom u Tablici 4. (102). Za utvrđivanje povezanosti izračunate su srednje razlike (%) između mjerenja u dvije vremenske točke, za svaki analit i za svakog ispitanika, prema formuli: srednja razlika, Δ (%) = $((T_1 - T_0) / T_0) \times 100$, gdje je T_1 vrijednost nakon finalnog mjerenja, a T_0 vrijednost nakon inicijalnog mjerenja.

Tablica 4. Interpretacija koeficijenta korelacije

Interpretacija	r
Nema povezanosti	0 – 0,25
Slaba povezanost	0,26 – 0,50
Umjerena do dobra povezanost	0,51 – 0,75
Vrlo dobra do izvrsna povezanost	0,76 – 1,00

Statistička obrada podataka učinjena je koristeći programski paket MedCal, verzija 19.1 (MedCalc Software bv, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019). Razina statističke značajnosti postavljena je na $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na status redoks homeostaze

Kako bi se ispitaio utjecaj trenažnog protokola ponavljanih sprintova na status redoks homeostaze, utvrđivane su razlike u razinama biljega oksidacijskog stresa, antioksidacijskog statusa i hormona induciranih stresom, između inicijalnog i finalnog mjerenja (Tablica 5.).

Program treninga rezultirao je promijenjenim razinama biljega lipidne peroksidacije. Preciznije, trenažni protokol uzrokovao je statistički značajno povećanje koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u plazmi za 75% u odnosu na inicijalne koncentracije (od 0,32 do 0,56 ng/mL, P=0,026; Slika 9. A). Obradom uzoraka 24-satne mokraće statistički značajne promjene u koncentracijama 15-F_{2t}-IsoP nisu zapažene, iako se radilo o 28%-tnom povećanju.

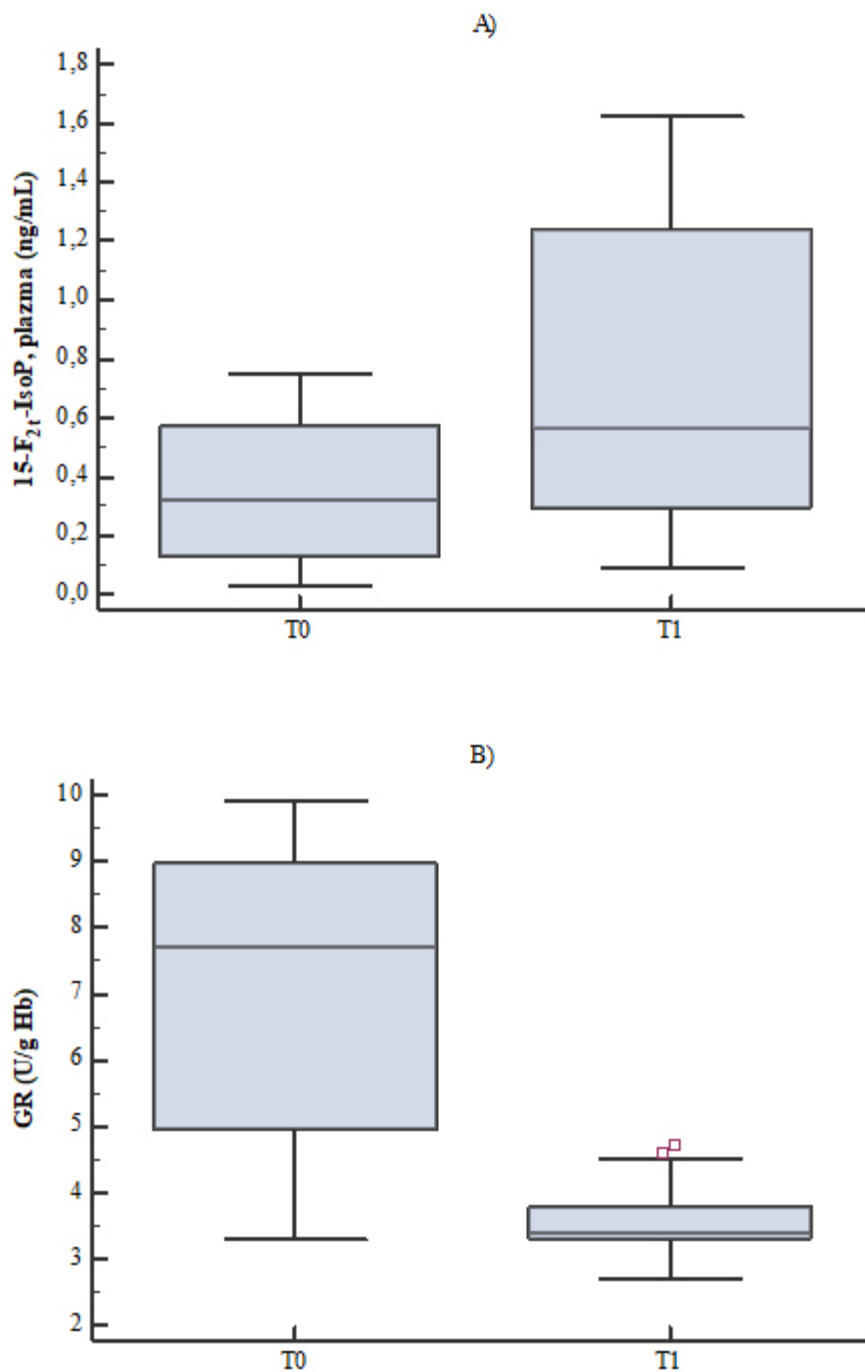
Učinak trenažnog programa na antioksidacijsku obranu ponajprije je ispitan mjerenjem katalitičke aktivnosti enzima SOD, GPx i GR u hemolizatima eritrocita. Finalno mjerenje karakterizirano je 60%-tnim povećanjem opterećenja u odnosu na inicijalno, što je statistički značajno utjecalo na GR, dosegnuvši 56%-tno sniženje aktivnosti u usporedbi s početnim vrijednostima (od 7,7 do 3,4 U/g Hb, P<0,001; Slika 9. B). Premda su promjene aktivnosti SOD i GPx praćene jednakim obrascem sniženja aktivnosti za 11% i 27%, statistički značaj nije bio zabilježen. Potom je uslijedilo određivanje biološki važnih izvanstaničnih antioksidanasa. Serumske koncentracije urata, ukupnog bilirubina i transferina ostale su nepromijenjene, odnosno na razini vrijednosti zabilježenih kod inicijalnog mjerenja, ne pokazujući nikakve značajne vremenske obrasce potaknute trenažnim protokolom. Nasuprot tome, koncentracije albumina poslije finalnog mjerenja bile su statistički značajno niže u odnosu na inicijalne vrijednosti (P=0,018).

Utjecaj trenažnog protokola na hormone stresa procijenjen je određivanjem koncentracija adrenalina, noradrenalina i kortizola u uzorcima 24-satne mokraće te razine serumskog prolaktina. Hormonski status karakteriziran je trendom porasta koncentracija izazvan eksperimentalnim protokolom, međutim zabilježene promjene nisu bile statistički značajne (Tablica 5.).

Tablica 5. Učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na status redoks homeostaze

Analit (jedinica)	T ₀	T ₁	P
Biljezi oksidacijskog stresa			
15-F_{2t}-IsoP u plazmi (ng/mL)	0,32 (0,13-0,57)	0,56 (0,30-1,24)	0,026*
15-F_{2t}-IsoP u 24h mokraći (ng/24h)	1,02 (0,77-1,72)	1,31 (0,91-1,99)	0,121
Biljezi antioksidacijskog statusa			
SOD (U/g Hb)	372,3 (300,8-431,4)	354,2 (310,2-392,0)	0,489
GPx (U/g Hb)	16,6 (12,5-28,1)	13,2 (11,9-17,0)	0,119
GR (U/g Hb)	7,7 (5,0-9,0)	3,4 (3,3-3,8)	<0,001*
Urati (μmol/L)	300 (275-338)	325 (290- 347)	0,229
Ukupni bilirubin (μmol/L)	9,5 (8,3-12,5)	11,0 (8,8-14,8)	0,064
Albumin (g/L)	51 (48-54)	50 (48-51)	0,018*
Transferin (g/L)	2,7 (2,5-3,0)	2,8 (2,3-2,9)	0,765
Hormoni inducirani stresom			
Adrenalin (nmol/24h)	30 (22-51)	40 (19-53)	0,600
Noradrenalin (nmol/24h)	168 (154-215)	210 (137-272)	0,561
Kortizol u 24h mokraći (nmol/24h)	187 (156-299)	241 (174-255)	0,804
Prolaktin (mIU/L)	203,8 (170,3-405,8)	301,5 (234,7-371,4)	0,169

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. T₀ – vremenska točka uzorkovanja nakon inicijalnog mjerenja; T₁ – vremenska točka uzorkovanja nakon finalnog mjerenja; * - Statistički značajna razlika u odnosu na T₀; 15-F_{2t}-IsoP – 15-F_{2t}-izoprostani; SOD – superoksid-dismutaza; GPx – glutation-peroksidaza; GR – glutation-reduktaza.



Slika 9. Učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na razine: A) 15-F_{2t}-IsoP u plazmi i B) GR u hemolizatu eritrocita. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Bijeli kvadratići iznad ručica predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta. **T0** – vremenska točka uzorkovanja nakon inicijalnog mjerenja; **T1** – vremenska točka uzorkovanja nakon finalnog mjerenja; **15-F_{2t}-IsoP** – 15-F_{2t}-izoprostani; **GR** – glutathion-reduktaza.

4.2. Učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na mišićni status

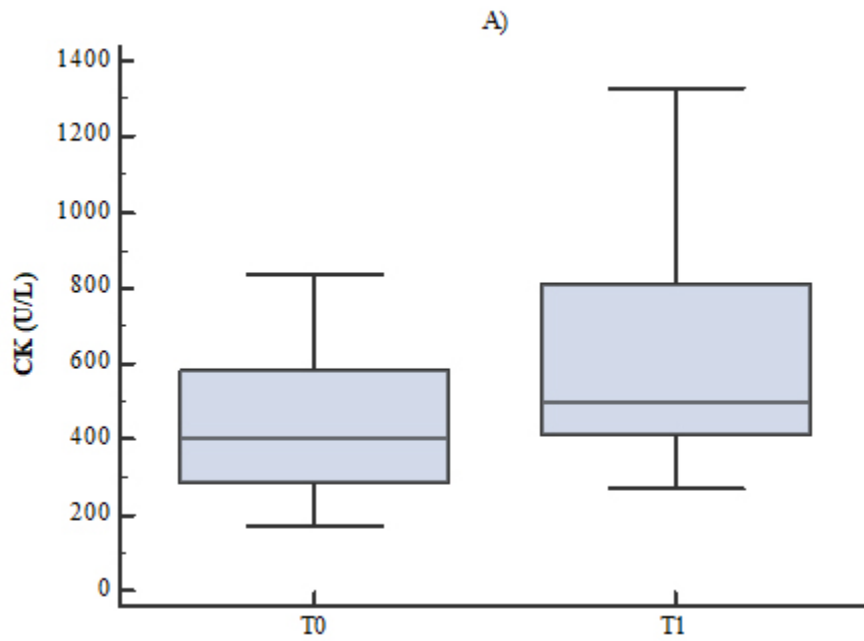
Radi istraživanja utjecaja trenažnog protokola ponavljanih sprintova na mišićni sustav, utvrđivane su razlike u razinama biljega oštećenja mišića, između inicijalnog i finalnog mjerenja (Tablica 6.).

Premda je zamjetan porast aktivnosti CK od 23% izazvan trenažnim programom, sugerirajući kako je došlo do oštećenja mišića, razlike u aktivnostima CK ipak nisu statistički značajne ($P=0,151$; Slika 10.). Razine ostalih biljega oštećenja mišića – AST, LD i mioglobina nisu se statistički značajno razlikovale između dvije vremenske točke određivanja.

Tablica 6. Učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na mišićni status

Analit (jedinica)	T ₀	T ₁	P
CK (U/L)	402 (288-579)	496 (414-812)	0,151
AST (U/L)	31 (24-37)	31 (29-48)	0,058
LD (U/L)	237 (203-244)	229 (204-254)	0,903
Mioglobin ($\mu\text{g/L}$)	156 (102-173)	155 (111-222)	0,389

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. T₀ - vremenska točka uzorkovanja nakon inicijalnog mjerenja; T₁ - vremenska točka uzorkovanja nakon finalnog mjerenja; **CK** – kreatin-kinaza; **AST** – aspartat-aminotransferaza; **LD** – laktat-dehidrogenaza.



Slika 10. Učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na aktivnost CK. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. **T0** - vremenska točka uzorkovanja nakon inicijalnog mjerenja; **T1** - vremenska točka uzorkovanja nakon finalnog mjerenja; **CK** – kreatin-kinaza.

4.3. Učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na imunski odgovor

Kako bi se razjasnio mehanizam imunskog odgovora na trening ponavljanih sprintova, analizirale su se razlike u razinama tradicionalnih pokazatelja upale, između inicijalnog i finalnog mjerenja (Tablica 7.).

Program treninga ponavljanih sprintova rezultirao je statistički značajnim povećanjem koncentracije hs-IL-6 za 136% (od 1,83 do 4,31 pg/mL, $P=0,002$; Slika 11. A). Uspoređujući ih s početnim vrijednostima, koncentracije hs-CRP-a praćene trenažnim protokolom ostale su gotovo nepromijenjene.

Zamjetan je umjeren porast broja leukocita uzrokovao trenažnim protokolom (~7%), čemu su najviše pridonijeli segmentirani neutrofilni granulociti koji su porasli za ~11%, na uštrb jednakog pada limfocita (~11%), međutim opisane promjene unutar leukograma nisu bile statistički značajne.

Mjesec dana nakon završetka eksperimentalnog programa ponavljanih sprintova, zabilježen je statistički značajni pad koncentracije hs-IL-6 za 68% (od 1,83 do 0,68 pg/mL, $P=0,030$; Slika 11. B). Osim toga, utvrđeno je statistički značajno smanjenje broja leukocita od 24%, praćeno obrascem pada unutar vodećih subpopulacija gdje su neutrofilni granulocita bilježili značajan pad u odnosu na limfocite. Trend smanjenja razine biljega upalnog odgovora potvrdio je hs-CRP, doduše radilo se o blagom smanjenju koje nije bilo statistički značajno (Tablica 8.).

Tablica 7. Učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na biljege imunskog odgovora

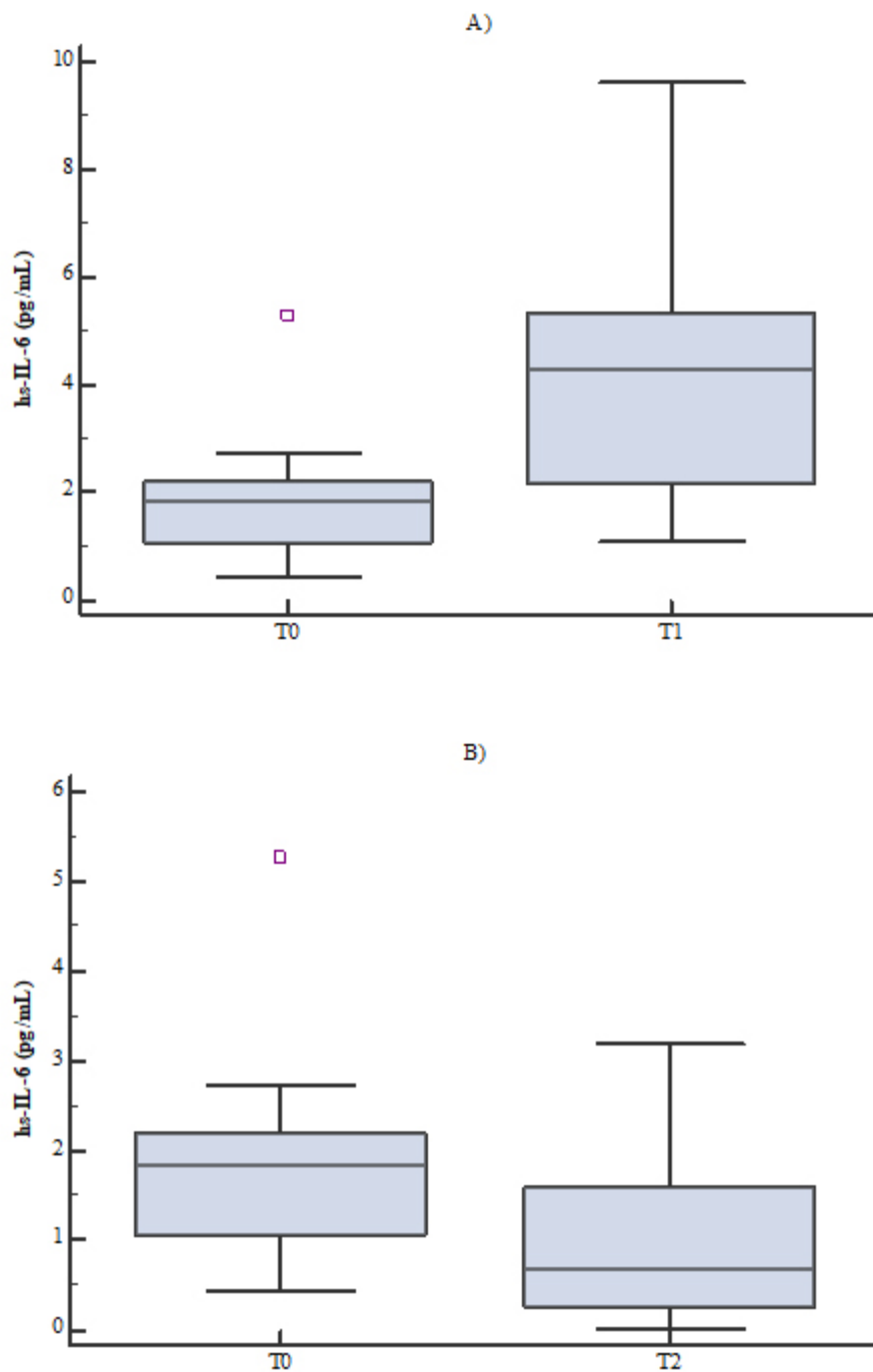
Analit (jedinica)	T ₀	T ₁	P
hs-IL-6 (pg/mL)	1,83 (1,06-2,20)	4,31 (2,19-5,30)	0,002*
hs-CRP (mg/L)	0,42 (0,21-1,16)	0,41 (0,21-0,68)	0,952
Leukociti (x10 ⁹ /L)	7,1 (6,7-8,8)	7,6 (6,3-8,7)	0,762
Neutrofilni granulociti (%)	57,8 (55,0-61,5)	64,1 (61,1-68,3)	0,277
Limfociti (%)	30,0 (27,7-33,2)	26,7 (21,4-30,1)	0,303

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. T₀ - vremenska točka uzorkovanja nakon inicijalnog mjerenja; T₁ - vremenska točka uzorkovanja nakon finalnog mjerenja; * - Statistički značajna razlika u odnosu na T₀; **hs-IL-6** – visokoosjetljivi interleukin-6; **hs-CRP** – visokoosjetljivi C-reaktivni protein.

Tablica 8. Dugoročni učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na biljege imunskog odgovora

Analit (jedinica)	T ₀	T ₂	P
hs-IL-6 (pg/mL)	1,83 (1,06-2,20)	0,68 (0,27-3,19)	0,030*
hs-CRP (mg/L)	0,42 (0,21-1,16)	0,37 (0,23-1,03)	0,934
Leukociti (x10 ⁹ /L)	7,1 (6,7-8,8)	5,4 (4,2-5,7)	<0,001*
Neutrofilni granulociti (%)	57,8 (55,0-61,5)	54,2 (49,3-60,4)	0,042*
Limfociti (%)	30,0 (27,7-33,2)	34,0 (28,2-37,2)	0,055

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. T₀ - vremenska točka uzorkovanja nakon inicijalnog mjerenja; T₂ - vremenska točka uzorkovanja mjesec dana nakon finalnog mjerenja; * - Statistički značajna razlika u odnosu na T₀; **hs-IL-6** – visokoosjetljivi interleukin-6; **hs-CRP** – visokoosjetljivi C-reaktivni protein.



Slika 11. Učinci trenajnog protokola ponavljanih sprintova na koncentraciju hs-IL-6: A) odmah nakon finalnog mjerenja B) mjesec dana nakon finalnog mjerenja. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Bijeli kvadratić iznad ručica predstavlja vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta. **T0** - vremenska točka uzorkovanja nakon inicijalnog mjerenja; **T1** - vremenska točka uzorkovanja nakon finalnog mjerenja; **T2** - vremenska točka uzorkovanja mjesec dana nakon finalnog mjerenja; **hs-IL-6** – visokoosjetljivi interleukin-6.

4.4. Povezanost statusa redoks homeostaze s biljezima oštećenja mišića te imunskog odgovora kod trenažnog protokola ponavljanih sprintova

Radi jasnijeg razumijevanja biokemijskog odgovora na trening ponavljanih sprintova i uloge 15-F_{2t}-IsoP u redoks ravnoteži, analizirana je povezanost izoprostana s pokazateljima oštećenja mišića te imunskog odgovora, ali samo za one biljege kod kojih su uočene značajne razlike izvedbom trenažnog protokola.

Korelacijskom analizom ispitano je slijedi li izraženije oštećenja mišića te izraženiji imunski odgovor statistički značajna promjena u razinama pro-oksidacijskih pokazatelja te postoji li statistički značajna povezanost pripadajućih biljega. Kako bi se procijenila značajnost uočenih promjena nastalih trenažnim protokolom, za svakog ispitanika i za svaki analit od interesa, izračunat je postotak srednje razlike (delta, Δ) finalnog u odnosu na inicijalno mjerenje. Rezultati povezanosti ispitanih biljega oštećenja mišića te imunskog odgovora s mjerama redoks homeostaze (biljezi oksidacijskog stresa i antioksidacijskog statusa) prikazani su u Tablicama 9. i 10.

Nisu utvrđene statistički značajne povezanosti u promjenama razina CK i hs-IL-6 s dinamikom promjena 15-F_{2t}-IsoP u plazmi, GR i albumina. Budući da dobiveni koeficijent korelacije ukazuje na slabu povezanost Δ CK s Δ 15-F_{2t}-IsoP u plazmi ($r = 0,350$), općenito se može zaključiti kako nije nađena povezanost između statusa redoks homeostaze i biljega oštećenja mišića te imunskog odgovora kod trenažnog protokola ponavljanih sprintova.

Isto tako, promjene u aktivnostima biljega oštećenja mišića (Δ CK) nisu pokazale statistički značajnu povezanost niti s jednim biljekom imunskog odgovora (Δ hs-IL-6, Δ leukociti, Δ neutrofilni granulociti i Δ limfociti), što je vidljivo u Tablici 11.

Tablica 9. Povezanost statusa redoks homeostaze s biljezima mišićnog oštećenja kod trenažnog protokola ponavljanih sprintova

Analit	Δ CK	
	r	P
Δ 15-F _{2t} -IsoP u plazmi	0,350	0,201
Δ 15-F _{2t} -IsoP u 24h mokraći	0,039	0,889
Δ GR	-0,089	0,752
Δ Albumin	0,165	0,558

Δ - srednja razlika između mjerenja u vremenskim točkama T_0 vs. T_1 izražena u %; CK – kreatin-kinaza; r - koeficijent korelacije; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostani; GR – glutation-reduktaza.

Tablica 10. Povezanost statusa redoks homeostaze s biljezima imunskog odgovora kod trenažnog protokola ponavljanih sprintova

Analit	Δ hs-IL-6	
	r	P
Δ 15-F _{2t} -IsoP u plazmi	0,164	0,559
Δ 15-F _{2t} -IsoP u 24h mokraći	-0,150	0,594
Δ GR	0,057	0,840
Δ Albumin	0,379	0,163

Δ - srednja razlika između mjerenja u vremenskim točkama T_0 vs. T_1 izražena u %; hs-IL-6 - visokoosjetljivi interleukin-6; r - koeficijent korelacije; 15-F_{2t}-IsoP - 15-F_{2t}-izoprostani; GR – glutation-reduktaza.

Tablica 11. Povezanost čimbenika imunskog odgovora s biljezima mišićnog oštećenja kod trenažnog protokola ponavljanih sprintova

Analit	Δ CK	
	r	P
Δ hs-IL-6	0,143	0,603
Δ Leukociti	0,182	0,516
Δ Neutrofilni granulociti	0,289	0,300
Δ Limfociti	-0,334	0,223

Δ - srednja razlika između mjerenja u vremenskim točkama T_0 vs. T_1 izražena u %; CK – kreatin-kinaza; r - koeficijent korelacije; hs-IL-6 - visokoosjetljivi Interleukin-6.

4.5. Dugoročni učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na status redoks homeostaze

Kako bi se ispitao dugoročni utjecaj trenažnog protokola ponavljanih sprintova na status redoks homeostaze, utvrđivane su razlike u razinama biljega oksidacijskog stresa, antioksidacijskog statusa i hormona induciranih stresom, određivanih inicijalno i mjesec dana nakon finalnog mjerenja (Tablica 12.).

Mjesec dana nakon trenažnog protokola uočeno je statistički značajno povećanje koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u plazmi za 116% u odnosu na početne koncentracije (od 0,32 do 0,69 ng/mL, P=0,030; Slika 12. A). Analizom uzoraka 24-satne mokraće statistički značajne promjene u koncentracijama 15-F_{2t}-IsoP nisu zapažene, iako se radilo o 15%-tnom povećanju.

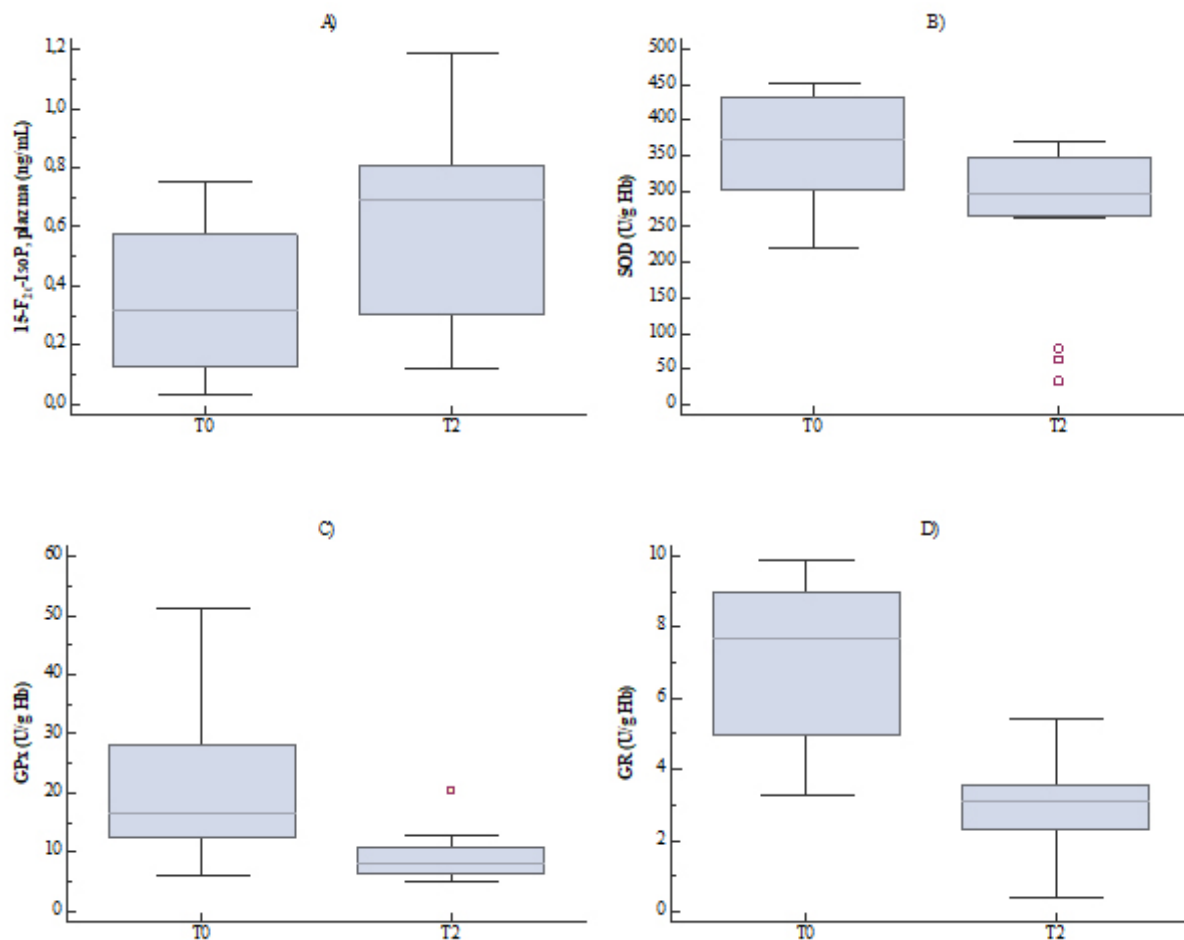
Dugoročni učinci trenažnog programa na antioksidacijsku obranu primarno su ispitani mjerenjem katalitičke aktivnosti staničnih antioksidansa SOD, GPx i GR. Zamijećen je istovjetan obrazac sniženja aktivnosti svih antioksidativnih enzima, mjesec dana nakon završetka trenažnog programa. Detaljnije, SOD je dosegla 20%-tno sniženje aktivnosti u usporedbi s početnim vrijednostima (od 372,3 do 296,3 U/g Hb, P=0,007; Slika 12. B), GPx 52%-tno sniženje aktivnosti (od 16,6 do 8,0 U/g Hb, P=0,003; Slika 12. C), a GR 60%-tno sniženje aktivnosti (od 7,7 do 3,1 U/g Hb, P<0,001; Slika 12. D). Dodatno su određivane serumske koncentracije izvanstaničnih antioksidanasa urata, albumina i transferina koje su ostale na razini početnih vrijednosti, ne pokazujući nikakve značajne vremenske obrasce mjesec dana nakon trenažnog protokola. Suprotno tome, koncentracije ukupnog bilirubina mjesec dana po završetku programa bile su statistički značajno više za 41% u odnosu na početne vrijednosti (P=0,007).

Hormone inducirane stresom označio je trend porasta koncentracija mjesec dana nakon završetka eksperimentalnog programa, međutim spomenute promjene nisu bile statistički značajne (Tablica 12.).

Tablica 12. Dugoročni učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na status redoks homeostaze

Analit (jedinica)	T ₀	T ₂	P
Biljezi oksidacijskog stresa			
15-F_{2t}-IsoP u plazmi (ng/mL)	0,32 (0,13-0,57)	0,69 (0,31-0,81)	0,030*
15-F_{2t}-IsoP u 24h mokraći (ng/24h)	1,02 (0,77-1,72)	1,17 (0,69-1,72)	0,720
Biljezi antioksidacijskog statusa			
SOD (U/g Hb)	372,3 (300,8-431,4)	296,3 (265,2-348,6)	0,007*
GPx (U/g Hb)	16,6 (12,5-28,1)	8,0 (6,4-10,8)	0,003*
GR (U/g Hb)	7,7 (5,0-9,0)	3,1 (2,3-3,6)	<0,001*
Urati (μmol/L)	300 (275-338)	295 (273-335)	0,600
Ukupni bilirubin (μmol/L)	9,5 (8,3-12,5)	13,4 (12,7-15,2)	0,007*
Albumin (g/L)	51 (48-54)	50 (48-51)	0,077
Transferin (g/L)	2,7 (2,5-3,0)	2,7 (2,4-2,8)	0,583
Hormoni inducirani stresom			
Adrenalin (nmol/24h)	30 (22-51)	36 (25-44)	0,762
Noradrenalin (nmol/24h)	168 (154-215)	180 (135-249)	0,978
Kortizol u 24h mokraći (nmol/24h)	187 (156-299)	197 (151-264)	0,720
Prolaktin (mIU/L)	203,8 (170,3-405,8)	232,6 (185,2-248,2)	0,679

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom. T₀ - vremenska točka uzorkovanja nakon inicijalnog mjerenja; T₂ - vremenska točka uzorkovanja mjesec dana nakon finalnog mjerenja; * - Statistički značajna razlika u odnosu na T₀; **15-F_{2t}-IsoP** - 15-F_{2t}-izoprostani; **SOD** – superoksid-dismutaza; **GPx** – glutation-peroksidaza; **GR** – glutation-reduktaza.



Slika 12. Dugoročni učinci trenažnog protokola ponavljanih sprintova na razine: A) 15-F_{2t}-IsoP u plazmi, B) SOD, C) GPx i D) GR u hemolizatu eritrocita. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Bijeli kvadratići iznad ručica predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta. **T0** - vremenska točka uzorkovanja nakon inicijalnog mjerenja; **T2** - vremenska točka uzorkovanja mjesec dana nakon finalnog mjerenja; **15-F_{2t}-IsoP** - 15-F_{2t}-izoprostani; **SOD** – superoksid-dismutaza; **GPx** – glutathion-peroksidaza; **GR** – glutathion-reduktaza.

4.6. Povezanost statusa redoks homeostaze s razinama aerobne izdržljivosti

Radi boljeg razumijevanja uloge redoks homeostaze u unaprjeđenju aerobne izdržljivosti, ispitivana je povezanost biljega oksidacijskog stresa, antioksidacijskog statusa i hormona induciranih stresom s parametrom temeljem kojeg se procjenjuje aerobni kapacitet. Promjene u relativnom maksimalnom primitku kisika (RVO_{2max}) predstavljale su mjeru aerobne izdržljivosti.

Korelacijskom analizom ispitano je slijede li aerobno pripremljeniji ispitanici statistički značajno niže razine pro-oksidacijskih pokazatelja redoks homeostaze te postoji li statistički značajna povezanost pripadajućih pokazatelja. Rezultati povezanosti parametra aerobne izdržljivosti s mjerama redoks homeostaze (biljezi oksidacijskog stresa, antioksidacijskog statusa i hormoni inducirani stresom) prikazani su u Tablici 13.

Nakon inicijalnog mjerenja, nije utvrđena statistički značajna povezanosti aerobne izdržljivosti i biljega oksidacijskog stresa, antioksidacijskog statusa te hormona induciranih stresom. S druge strane, promjene relativnog maksimalnog primitka kisika bile su umjereno pozitivno povezane s promjenama koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u 24-satnoj mokraći ($r=0,546$, $P=0,035$) te urata u serumu ($r=0,568$, $P=0,027$) izazvanih treningom ponavljanih sprintova, vidljivo u Tablici 13. Zajedno s navedenim promjenama, zamijećena je umjerena negativna povezanost s promjenama aktivnosti SOD ($r=-0,500$, $P=0,058$).

Tablica 13. Povezanost razine aerobne izdržljivosti s biljezima oksidacijskog stresa/antioksidacijskog statusa kod trenažnog protokola ponavljanih sprintova

Analit	RVO _{2max} (In)		RVO _{2max} (Fin)	
	r	P	r	P
15-F_{2t}-IsoP u plazmi	-0,091	0,746	0,379	0,164
15-F_{2t}-IsoP u 24h mokraći	0,313	0,256	0,546	0,035*
SOD	0,104	0,713	-0,500	0,058
GPx	0,193	0,491	0,082	0,771
GR	0,148	0,598	0,085	0,764
Urati	-0,054	0,850	0,568	0,027*
Ukupni bilirubin	0,021	0,940	0,244	0,381
Albumin	0,050	0,868	0,253	0,362
Transferin	0,020	0,949	-0,029	0,919
Adrenalin	-0,055	0,845	-0,122	0,666
Noradrenalin	0,193	0,491	0,454	0,090
Kortizol u 24h mokraći	0,390	0,151	0,154	0,585
Prolaktin	-0,193	0,483	0,275	0,321

RVO_{2max} - relativni maksimalni primitak kisika u mL O₂/kg/min; **In** – inicijalno mjerenje; **Fin** - finalno mjerenje; *r* - koeficijent korelacije; * - statistički značajno; **15-F_{2t}-IsoP** - 15-F_{2t}-izoprostani; **SOD** – superoksid-dismutaza; **GPx** – glutation-peroksidaza; **GR** – glutation-reduktaza.

5. RASPRAVA

Postoji vrlo malo istraživanja o učincima treninga ponavljanih sprintova, specifičnog formata VIIT-a, na zdravlje, posebice na promjene redoks statusa. Naime, velika anaerobna potražnja, proizašla iz ponavljanih sprintova izvođenih do otkaza i sve veći aerobni doprinos praćen nastavkom treninga, jer se sprintovi izvode s vrlo kratkim oporavkom između serija, mogu pridonijeti povećanom stvaranju ROS-a i uzrokovati oksidacijski stres. Ranije provedena istraživanja pokazala su neujednačena zapažanja praćena povećanjem (27,103-105), bez promjene (27,106-108), pa čak i smanjenjem (109) razine biljega oksidacijskog stresa uslijed akutne reakcije na trening ponavljanih sprintova. Slično tome, primijećeno je povećanje (103-104), bez promjene (105) i smanjenje (107) razine biljega antioksidacijskog statusa izazvano akutnim odgovorom na trening ponavljanih sprintova. Neusklađenost među akutnim odgovorima može se pripisati različitim formatima i protokolima treninga ponavljanih sprintova korištenim u spomenutim istraživanjima, razlikama u razini kondicijske pripremljenosti ispitanika, različitim biljezima oksidacijskog stresa i/ili antioksidacijskog statusa korištenim u procjeni učinaka, kao i odabranim vremenskim točkama mjerenja. Istaknuta oprečnost u akutnim odgovorima čini predviđanje kronične adaptacije na trening ponavljanih sprintova gotovo nemogućom misijom.

Jedino istraživanje (110) koje je analiziralo učinke treninga ponavljanih sprintova provedenih biciklom na antioksidacijsku aktivnost, izvijestilo je kako šest tjedana trenažnog programa, sastavljenog od tri treninga tjedno, nije dovelo do povećanja aktivnosti antioksidansa, dok je mnogo intenzivniji tjedan treninga, koncipiran od dva treninga dnevno tijekom sedam uzastopnih dana, izazvao značajan porast aktivnosti GPx i GR. Rezultati predstavljenog istraživanja sugeriraju da je razina mišićne antioksidacijske zaštite povezana s volumenom treninga. Budući da većina trenažnih strategija korištenih u praksi slijedi postepeno i progresivno povećanje volumena treninga kako bi potaknuli procese prilagodbe na optimalan stres, bilo je važno istražiti može li permanentni porast trenažnog volumena optimizirati mehanizme redoks ravnoteže smjerom antioksidacijskih procesa, time pružajući primjerenu zaštitu tijekom intenzivnijih treninga koji čine krajnju fazu trenažnog programa. Osim toga, trčanje je, a osobito sprint, aktivnost u kojoj su najvećim dijelom zastupljene ekscentrične mišićne akcije. Budući da ekscentrične akcije ponajviše uzrokuju mišićno oštećenje (111), a ono je apostrofirano kao jedan od važnih čimbenika koji doprinosi nastanku oksidacijskog stresa (112), ključno je bilo istražiti učinke treninga ponavljanih sprintova provedenih trčanjem na promjene u redoks homeostazi.

Trening ponavljanih sprintova rezultirao je porastom razine biljega oksidacijskog stresa, pritom je povećanje koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u plazmi bilo statistički značajno. Pregledni radovi pokazuju specifični obrazac pada razine prooksidansa nakon tjelesnog vježbanja, stoga su dobiveni rezultati oprečni početnim pretpostavkama (113). Pored toga, nekoliko istraživanja kojima je ispitivan učinak različitih formata VIIT-a na promjene redoks statusa, izvijestila su o istom fenomenu. Bogdanis i suradnici (5) zabilježili su značajno smanjenje koncentracije proteinskih karbonila (PC) i pad razine tiobarbituratnih reaktivnih supstanci (TBARS) koji nije bio statistički značajan, određivanih 3 tjedna nakon intervalnog sprint treninga (SIT, engl. *sprint interval training*) sastavljenog od 4-6 × 30 s sprintova provedenih do otkaza. Nadalje, značajno smanjenje koncentracije TBARS, ali ne i PC, zabilježeno je u trkača veterana 8 tjedana nakon VIIT-a, formiranog od 18 x 1 min na 120-140% VO_{2peak} razdvojenog intervalima odmora od 2 min na 65% VO_{2peak} (114). Konačno, nakon 3 etape VIIT-a strukturiranog od četiri biciklistička sprinta u trajanju 30 s, izvedena na 90% maksimalne anaerobne snage uz 4-minutne intervale aktivnog odmora, Fisher i suradnici (115) primijetili su smanjeni akutni odgovor slijedom promjena u koncentracijama TBARS, čime zaključuju da kraći trenažni program isto rezultira smanjenjem oksidacijskog stresa. Općenito, svi dosad proučavani formati VIIT-a potaknuli su identični obrazac kronične adaptacije na trening, praćen padom razine oksidacijskog stresa. Nažalost, jedino istraživanje (110) koje je utvrđivalo promjene redoks statusa nakon treninga ponavljanih sprintova, doduše provedeno na biciklu, nije analiziralo biljege oksidacijskog stresa, već samo biljege antioksidacijskog statusa, stoga se ne može napraviti usporedba s ovim istraživanjem.

Za razliku od prethodno spomenutih istraživanja, oksidacijski stres u ovom istraživanju procijenjen je temeljem promjena u koncentracijama 15-F_{2t}-IsoP određivanih u plazmi i 24-satnoj mokraći, budući da 15-F_{2t}-IsoP predstavljaju "zlatni standard" u dijagnostici lipidne peroksidacije *in vivo* i danas su najčešće određivan biljeg oksidacijskog stresa (87,89-90,116). Nikolaidis i suradnici u preglednom radu (87) analizirali su rezultate istraživanja koja su se bavila ispitivanjem utjecaja tjelesnog vježbanja na razine 15-F_{2t}-IsoP u plazmi te zaključili kako je u 7 od 9 istraživanja zabilježen porast koncentracija u širokom rasponu od 3 do 150% (prosječno 54%), doduše utvrđene promjene nisu bile statistički značajne. Pretpostavljaju da bi u slučaju veće snage istraživanja, u većine njih zasigurno bila otkrivena značajno veća razina lipidne peroksidacije nakon tjelesnog vježbanja. Isti autori zaključili su kako postoje snažni dokazi, premda nisu statistički potvrđeni u svim ključnim istraživanjima, da povećana koncentracija 15-F_{2t}-IsoP u plazmi ukazuje na akutni prooksidacijski učinak tjelesnog

vježbanja. Sudeći prema istraživanjima koja su određivala koncentraciju 15-F_{2t}-IsoP odmah nakon tjelesnog vježbanja (117-119), izvjesno je da se koncentracija 15-F_{2t}-IsoP u plazmi vraća na razine bazalnih vrijednosti za manje od jednog sata nakon prestanka tjelesnog vježbanja. U većine relevantnih istraživanja koja su izvještavala o značajnim učincima tjelesnog vježbanja na koncentraciju 15-F_{2t}-IsoP, krv je uzorkovana neposredno, preciznije od 1. do 30. minute nakon vježbanja. U prilog tome ide i relativno kratko vrijeme poluživota, koje za 15-F_{2t}-IsoP iznosi 20 minuta (120).

S obzirom na činjenicu da je većina sličnih istraživanja koristila potpuno različite metode u analizi 15-F_{2t}-IsoP (109,121), kao i zbog izostanka globalne standardizacije predmetnih metoda, bilo je nemoguće učiniti bilo kakvu usporedivost s razinama oksidacijskog stresa koje su utvrđene ovim istraživanjem. Trening ponavljanih sprintova uzrokovao je povećanje koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u plazmi za 75%, odnosno u 24-satnoj mokraći za 25%, pri čemu je porast u plazmi bio statistički značajan. Leeder i suradnici (106) utvrdili su dinamikom slično povećanje koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u plazmi za 49%, iako promjene nisu bile značajne u kontekstu oksidacijskog stresa, nakon opterećenja intermitentnim treningom (LIST, engl. *Loughborough intermittent shuttle test*) kojim su imitirali opterećenje do kojeg dolazi tijekom nogometne igre. Stoga je jedno od ključnih zapažanja ovog istraživanja da se provedbom intenzivnog trenažnog protokola ponavljanih sprintova, znatno veći prooksidacijski pomak manifestira na plazmatskim 15-F_{2t}-IsoP, vjerojatno zbog toga što je trenažno opterećenje na kraju protokola bilo 60% veće u usporedbi s inicijalnim. Povrh toga, primijećeno je da trening ponavljanih sprintova nije praćen značajnim povećanjem koncentracija 15-F_{2t}-IsoP u 24-satnoj mokraći, iz čega se nameće zaključak kako je trenažni protokol pružio izvjesni oblik zaštite od oksidativnih oštećenja. Naime, Knez i suradnici (8) pokazali su u istraživanju koje je uključivalo vožnju biciklom 30 km, da konstantno tjedno povećanje volumena treninga dovodi do znatnog porasta oksidacijskog stresa. Volumen treninga bio je značajno pozitivno povezan s razinama oksidacijskog stresa ($r=0,71$; $p<0,001$). Isti autori su zaključili kako je njihovo zapažanje objašnjivo manjkavim oporavkom nakon treninga, jer su se razine oksidacijskog stresa u mirovanju kontinuirano povećavale tijekom 8-tjednog trenažnog programa. Nadalje, još jednim istraživanjem (122) primijećeno je da akutni odgovor na oksidacijski stres ovisi o intenzitetu i volumenu trenažnog opterećenja, zato što su značajno veće koncentracije lipidnih hidroperoksida (LOOH) u plazmi pratile visokointenzivni intervalni trening niskog volumena u odnosu na razine potaknute biciklizmom umjerenog intenziteta. Sukladno tome, uvidjeli smo kako je trenažni protokol ponavljanih sprintova izazvao povećanje koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u

plazmi i 24-satnoj mokraći vjerojatno kao rezultat sinergije neadekvatnog oporavka, uslijed stalnog povećanja volumena treninga kroz 6 tjedana trenažnog protokola i jačeg akutnog odgovora na oksidacijski stresa, nastalog kao posljedica 60% većeg intenziteta treninga na kraju protokola.

Pod pretpostavkom da postoji značajna povezanost između volumena treninga i razine 15-F_{2t}-IsoP nakon trenažnog programa (8) i da veće trenažno opterećenje rezultira izraženijim odgovorom prooksidansa (122), uz činjenicu da je porast koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u mokraći bio mnogo niži (25%) od porasta ukupnog volumena treninga (100%), a povećano trenažno opterećenje (60%) signalizira da trening ponavljanih sprintova očito uravnotežuje redoks status, naposljetku navodi na zaključak kako su rezultati ovog istraživanja podudarni s rezultatima ostalih istraživanja koja su ispitivala učinke trenažnih programa na status redoks homeostaze (5).

Istovremenim određivanjem više enzima koji imaju ključnu ulogu u kontroli redoks ravnoteže, može se dobiti pouzdaniji uvid u stanični antioksidacijski status. Trenažni protokol ponavljanih sprintova rezultirao je padom katalitičkih aktivnosti SOD, GPx i GR, a samo je GR dostigla statističku značajnost, što ukazuje na smanjenu antioksidacijsku aktivnost. S druge strane, serumske koncentracije urata i ukupnog bilirubina pokazale su neznatan porast. Iznova, rezultati su bili proturječni zaključcima meta-analize (5) koja je pokazala da trenažne intervencije općenito potiču povećanje antioksidacijske zaštite. Opažanja istaknuta ovim istraživanjem nisu bila usklađena s rezultatima istraživanja kojima su programi intervalnih treninga ocijenjeni kao stimulansi značajnog povećanja aktivnosti GPx, katalaze (CAT) i ukupnog antioksidacijskog statusa (TAC) nakon 3 tjedna provedbe VIIT programa (113). S druge strane, nisu pronađene značajne promjene u aktivnostima CAT, SOD i GPx nakon VIIT programa sastavljenog od samo tri sprinterske dionice izvođene na biciklu do otkaza (115), kao i u razinama TAC-a određivanih u fazi oporavka nakon 4. i 8. tjedana VIIT-a (114).

Nisu zabilježene značajne promjene u aktivnostima SOD, GPx i GR nakon 6 tjedana treninga u jedinom istraživanju koje je analiziralo učinke treninga ponavljanih sprintova na mišićne enzime s funkcijom antioksidansa. Međutim, u istom istraživanju utvrđeno je značajno povećanje aktivnosti GPx i GR, ali ne i SOD, tjedan dana nakon intenzivnijeg oblika trenažnog programa ponavljanih sprintova, što upućuje na zaključak da povećanje aktivnosti staničnih antioksidanasa ovisi o volumenu treninga. Budući da nije opaženo izraženije oštećenje mišića, autori su pretpostavili kako je povećanje antioksidacijske aktivnosti nakon treninga najvećim

djelom rezultat metabolički potaknutog bržeg stvaranja ROS-a zbog toga što se sprint na biciklu izvodio intenzitetom koji odgovara oko 300-400%-tnom intenzitetu maksimalnog primitka kisika (110).

U istraživanju Jówko i suradnika (104) analiziran je antioksidacijski status nakon dva testa ponavljanih sprintova na biciklu (4 x 15 s uz interval odmora od 1 min) i utvrđeno je značajno povećanje aktivnosti SOD, dok promjene u aktivnostima GPx nisu bile statistički značajne. Kako se ovim istraživanjem bazično ispitivala učinkovitost suplementacije zelenim čajem, ono se iz ustrojstvenih razloga nije moglo uspoređivati s rezultatima ovog istraživanja. Nadalje, Miyazaki i suradnici (123) pokazali su istraživanjem u kojim su se ispitivali učinci visokointenzivnog treninga izdržljivosti na promjene redoks statusa, kako enzim SOD iziskuje znatno veće trenažno opterećenje da bi se značajno smanjila njegova katalitička aktivnost.

Knez i suradnici (8) također su primijetili značajno povećanje aktivnosti CAT nakon 8 tjedana trenažne intervencije biciklom uz kontinuirano povećanje intenziteta treninga. Porast aktivnosti CAT-a bio je rezultat pojačane regulacije antioksidacijskog sustava kako bi se spriječila prekomjerna oksidacijska oštećenja, jer je istovremeno primijećeno značajno povećanje razine biljega oksidacijskog stresa. Premda je kronična adaptacija na trenažni program obično praćena porastom antioksidacijske aktivnosti, akutna reakcija na trening visokog intenziteta ipak može dovesti do smanjenja aktivnosti antioksidanasa, razmjerno intenzitetu treninga. Naime, Farney i suradnici (18) izvijestili su o značajnom smanjenju aktivnosti CAT neposredno nakon provedbe deset sprintova u trajanju od 15 s, dok smanjenje aktivnosti CAT nakon 60 min aerobika umjerenog intenziteta nije bilo statistički značajno. Primijećeno je neznatno smanjenje aktivnosti CAT nakon treninga ponavljanih sprintova na biciklu u istraživanju Peart i suradnika (124). Međutim, oba spomenuta istraživanja izvijestila su o porastu aktivnosti antioksidansa u periodu od jednog do dva sata neposredno nakon početnog pada aktivnosti, ukazujući na temeljni mehanizam karakterističan za kroničnu regulaciju antioksidacijskog statusa (18,124). Stoga se čini kako je opravdano zaključiti da je značajno smanjenje aktivnosti GR utvrđeno ovim istraživanjem, vjerojatno rezultat potrebe za intenzivnijom antioksidacijskim zaštitom potaknutom većim oksidacijskim stresom, poglavito zbog 60% stresnijih treninga koji su se izvodili tijekom završne faze protokola ponavljanih sprintova. Povrh toga, ispitanici su pokazali uredne bazalne vrijednosti enzimskih aktivnosti, stoga su prooksidacijski učinci nastali tijekom eksperimentalnog protokola bili nesumnjivo uspješno neutralizirani.

Pretpostavljeni mehanizam nastanka ROS-a tijekom treninga ponavljanih sprintova vjerojatno je proces tkivne ishemije-reperfuzije (107), obzirom da se visokointenzivni, anaerobni podražaji rada povezuju s prolaznom mišićnom hipoksijom kod koje opskrba kisikom ne može odgovoriti stvarnim energetske potrebama (105). Prethodno objašnjen mehanizam predstavlja dodatni argument zašto je u ovom istraživanju zabilježeno smanjenje aktivnosti SOD, GPx i GR, enzima koji su uključeni u proces tkivne ishemije-reperfuzije, dok je s druge strane primijećen neznatan porast koncentracije urata, krajnjeg produkta metabolizma purina (4), koji vrlo brzo posredstvom enzima ksantin oksidaze sudjeluje u regulaciji akutne reakcije izazvane trenažnim programom (107). Istraživanja u kojima je koncentracija urata evaluirana tijekom ragbi (125) i skijaške sezone (126), zabilježila su značajno povećanje razina na kraju sezone u odnosu na početna mjerenja. Zapažanja se mogu objasniti pretpostavkom kako je intenzitet trenažnog programa presudan čimbenik u modeliranju odgovora urata na oksidacijski stres (127). Značajno smanjenje aktivnosti GR potaknuto porastom oksidacijskog stresa sugerira da su ispitanici razvili staničnu antioksidacijsku obranu nužnu za ublažavanje oksidacijskih oštećenja nastalih uslijed izuzetno stresnog oblika anaerobnog treninga.

Istraživanja kojima je ispitivana uloga bilirubina i koncentracijske razine nakon različitih oblika tjelesnog vježbanja uistinu su rijetka. Nekoliko dana aerobnog programa treninga ili treninga snage rezultiralo je povišenom koncentracijom ukupnog bilirubina, koja je i dalje bila u granicama normale (128). Trenažni program u ovom istraživanju izazvao je zanemariv porast koncentracije ukupnog bilirubina. Naime, u zdravih sportaša povišena koncentracija ukupnog bilirubin može ukazivati na ubranu hematopoezu (129) potaknutu mišićnim kontrakcijama, udarcima i hiperoksijom. Suprotno tome, program treninga ponavljanih sprintova uzrokovao je značajno sniženje koncentracije albumina u skladu s početnim očekivanjima zbog toga što je 60%-tno povećanje trenažnog opterećenja potaknulo povećano izlučivanje albumina, a kako su ispitanici morali biti suzdržani od unosa proteina suplementacijom, u konačnici se smanjila brzina sinteze albumina (130).

Učinak intervalnog sprinterskog treninga anaerobne prirode na odgovor katekolamina i ostalih hormona stresa relativno je slabo proučavan, a dobiveni rezultati poprilično kontradiktorni. Longitudinalna istraživanja (131) nisu pokazale značajne varijacije u odgovorima katekolamina na sprinterski trening, čak i kada su se kineziološke performanse značajno povećavale. Čini se kako intervalni trening utemeljen na sprintu dovodi do razvoja tzv. "sportske nadbubrežne žlijezde" kao rezultat kronične adaptacije koju karakterizira povećana sposobnost lučenja hormona i, eventualno, povećanje same nadbubrežne žlijezde

(114). Navedena zapažanja potkrjepljuju i rezultate ovog istraživanja dobivene određivanjem hormona adrenalina, noradrenalina, kortizola i prolaktina kod kojih je primijećen trend porasta koncentracija izazvan trenažnim protokolom ponavljanih sprintova, iako zabilježene promjene nisu bile statistički značajne.

Abderrahman i suradnici (126) proučavali su učinak intermitentnog VIIT-a (30 s trčanje na 400 m uz 30 s aktivnog ili pasivnog odmora) koji se provodio 3 puta tjedno kroz sedam tjedana i zaključili kako je samo među ispitanicima koji su se aktivno odmarali došlo do značajnog povećanja koncentracije katekolamina i kortizola određivanih u plazmi po završetku trenažnog programa. Nadalje, značajno smanjenje koncentracije adrenalina, ali bez promjene koncentracije noradrenalina zabilježeno je u zadnjem tjednu trenažnog programa u usporedni s prvim, tijekom 8 tjedana (tri treninga tjedno) ustrojenog od 60-minutnog kontinuiranog treninga na biciklu umjerenog intenziteta uz uključivanje 30-sekundnih sprintova svakih 10 minuta (132). Peake i suradnici (133) pratili su akutni odgovor hormona induciranih stresom nakon VIIT-a i prepoznali identičnu dinamiku koja se sastojala od porasta koncentracija adrenalina, noradrenalina, slobodnog kortizola, hormona rasta i adrenokortikotropnog hormona odmah nakon treninga, a potom pada i vraćanja na početne vrijednosti sat vremena nakon VIIT-a. Nadalje, pokazalo se da je akutni odgovor nadbubrežne žlijezde na oksidacijski stres ovisan o intenzitetu i volumenu trenažnog opterećenja, budući da su značajno više koncentracije adrenalina u plazmi pratile visokointenzivni intervalni treninga niskog volumena u odnosu na razine potaknute biciklizmom umjerenog intenziteta (122). Važno je istaknuti kako su rezultati svih iznesenih istraživanja temeljeni na određivanju adrenalina, noradrenalina i kortizola u uzorcima plazme za razliku od ovog istraživanja koje se temeljilo na određivanju stresnih hormona u uzorcima 24-satne mokraće, čime smo dobili cjelovitiju i pouzdaniju procjenu utjecaja trenažnog protokola na metabolizam ispitivanih hormona. Isto tako, u analizi katekolamina koristila se preporučena HPLC metodu zasnovana na specifičnom kromatografskom razdvajanju naspram velike većine ostalih istraživanja koja su koristila nestandardizirane imunokemijske metode iznimno podložne interferencijama.

Radi utvrđivanja razine mišićnog oštećenju na indirektan način, mnoga relevantna istraživanja ispitivala su opseg i dinamiku disocijacije proteina mišićnog porijekla nakon tjelesnog vježbanja, posebice mišićno-specifičnih enzima. Porast aktivnosti CK izazvan inicijalnim treningom sugerira kako je došlo do oštećenja mišića kao rezultat akutnog odgovora na trening ponavljanih sprintova. Uočen trend bio je u skladu s ranije objavljenim istraživanjima u kojima su slične razine aktivnosti CK od 592 U/L (27), ali i mnogo veće aktivnosti od 776

U/L (134), pa čak i 1121 U/L (135) zabilježene nakon različitih varijanti trkačkih ponavljanih sprintova. Zanimljivo je da su istraživanja koja su analizirala ponavljane sprintove na biciklu ustanovila znatno niže aktivnosti CK od 231 U/L (104) i 166 U/L (108) što je vjerojatno posljedica različite mišićne akcije kod sprinta biciklom naspram onog izvedenog trčanjem. Manji porast aktivnosti CK utvrđen ovim istraživanjem vjerojatno je rezultat provedbe manje stresnog trenažnog protokola u usporedbi s onima korištenim u ostalim istraživanjima ponavljanih sprintova. Zaista, treninzi ponavljanih sprintova proučavani u ovom istraživanju sastojali su se od $2 \times 6 \times 20$ m kod inicijalnog mjerenja i $3 \times 10 \times 20$ m kod finalnog mjerenja, dok su protokoli 40×15 m (135), 15×30 m (134) i 20×30 m (27) korišteni u ostalim istraživanjima. Budući da su se protokoli treninga ponavljanih sprintova u ostalim istraživanjima sastojali od dužih sprinterskih dionica unutar jednog seta (27,134), imali veći broj ponavljanja (135), opravdano je zaključiti kako su oni izazvali veći metabolički i neuromuskularni stres (136) koji posljedično rezultira većim oštećenjem mišića.

Odabrane vremenske točke u kojima se određivala aktivnosti CK definitivno su pridonijele složenijoj usporedivosti s vrijednostima dobivenim u ostalim istraživanjima. Naime, u ovom istraživanju vađenja krvi organizirano je unutar prvog sata nakon treninga, dok su objavljene vršne aktivnosti CK u ostalim istraživanjima dobivene 24 sata nakon treninga. Visokointenzivne sportske aktivnosti u kojima se intervali ponavljanih sprintova često izvode, praćene su vršnim aktivnostima CK koje se obično postižu nakon 24 sata (137). Zanimljivo je da su vrijednosti CK sat vremena nakon tjelesnog vježbanja, zabilježene u nekim od gore citiranih istraživanja, bile 362 U/L (27) i 376 U/L (135), što je bilo slično vrijednostima dobivenim u ovom istraživanju. Može se nagovijestiti da bi opažena razina mišićnog oštećenja u ovom istraživanju bila još veća, ali nas je odabrano vrijeme mjerenja spriječilo da zabilježimo odgovarajuće vršne aktivnosti CK. Unatoč tome, možemo zaključiti kako je razina mišićnog oštećenja bila vrlo visoka, jer su takve vrijednosti CK doista podudarne s onima utvrđenim nakon natjecateljske nogometne utakmice (137).

Pod pretpostavkom da su se za vrijeme realizacije cjelokupnog trenažnog programa ispitanici adaptirali na sve veće trenažno opterećenje, zbog čega je bilo suvislo očekivati smanjenje aktivnosti CK, ipak nisu utvrđene značajne promjena u stupnju mišićnog oštećenja, čak je suprotno predviđanjima, zabilježen porast aktivnosti CK od 23%. Zahtjevnost treninga u završnom dijelu eksperimentalnog programa ponavljanih sprintova nameće se kao vjerodostojno objašnjenje zašto nije došlo do značajnog smanjenja aktivnosti CK. Povrh toga, nemogućnost postizanja značajnijih promjena u aktivnostima može se dodatno obrazložiti vrlo

visokom interindividualnom varijabilnošću CK (138) koja može utjecati na osjetljivost longitudinalnog praćenja (139). Program treninga nije izazvao znakovit porast biljega oštećenja mišića, iako je finalni trening okarakteriziran 60%-tnim porastom u ukupnom broju izvedenih sprintova i pređene udaljenosti, što ukazuje na izvjesnu razinu adaptacije na ovu vrstu treninga. Čini se kako je ovaj trenažni protokol ponavljanih sprintova u trajanju od 6 tjedana pogodan za sportaše iste kondicijske pripremljenosti, radi održavanja i/ili ublažavanja razine mišićnog oštećenja tijekom povećanog trenažnog opterećenja, uobičajenog za razdoblje predsezone u sportskim igrama. Da je trenažni program bio intenzivniji i stresniji za ispitanike, akutno povećanje trenažnog opterećenja vjerojatno bi uzrokovalo kronično oštećenja mišića. Takav oblik stalnog povećanja aktivnosti CK primijećen je u ragbi ligama tijekom intenzivnog trenažnog razdoblja od šest tjedana što je u konačnici dovelo do sindroma prenaprezanja (140).

Većina istraživanja koja su proučavala vježbom izazvano oštećenje mišića bila su usredotočena na određivanje aktivnosti CK, stoga su rijetka istraživanja koja su izvještavala o razinama ostalih mišićno-specifičnih biljega, a gotovo raritetna u području intervalnih treninga ponavljanih sprintova. Program treninga u ovom istraživanju rezultirao je nepromijenjenim razinama AST, LD i mioglobina. U istraživanju Woolleya i suradnika (135) zabilježeno je povećanje aktivnost AST koje se zadržalo na istim razinama 72 sata nakon oštećenja izazvanog serijom uzastopnih sprintova (SPR; 40 × 15 m). Međutim, zbog značajne interindividualne varijabilnosti u vrijednostima AST, ovo povećanje nije bilo statistički značajno. Prethodno spomenutu istraživanje nije zabilježilo statistički značajne promjene u aktivnostima LD, štoviše povišene aktivnosti već su se normalizirale 48 sati nakon intervencije. Prikazana zapažanja koja opisuju mišićni odgovor LD mogu se obrazložiti neprikladnim vremenom vađenja krvi, zato što se aktivnost LD povećava između trećeg i petog dana nakon trenažne intervencije (141), a ponekad i nakon sedmog dana (44). Sustavni pregledni rad i meta analiza (137) koji je analizirao fiziološke, neuromuskularne, biokemijske i percepcijske reakcije na nogometnu utakmicu pokazao je kako ona rezultira umjerenim do izrazitim povećanjem serumskih biljega mišićnog oštećenja (CK, LD i mioglobina) unutar prva 24 sata, dostiže vršne vrijednosti nakon 24 sata i održava povišene razine do 72 sata nakon utakmice.

Trening ponavljanih sprintova izaziva metabolički stres, brzo postizanje maksimalnog primitak kisika (14) i snažan akutni proupalni odgovor. S druge strane, trening ponavljanih sprintova provodi se mnogo većim intenzitetom u usporedbi s aerobnim treningom umjerenog ili visokog intenziteta, pored toga čine ga pretežno ekscentrične mišićne akcije za razliku od koncentričnih koje prevladavaju kod trčanja ili džoginga, zbog čega u većoj mjeri dolazi do

mišićnog oštećenja, stoga ovaj format treninga može dati dodatni poticaj jačoj protuupalnoj adaptaciji. Kako su visokointenzivne kratkotrajne aktivnosti postale vrlo popularne, čak u općoj populaciji rekreativaca, nesumnjivo zbog vremenski učinkovite strategije u poboljšanju općeg zdravlja (142), od iznimne važnosti bilo je istražiti postoji li potencijal kojim se postižu poželjne prilagodbe unutar imunološkog sustava.

Citokini posreduju u imunološkoj reakciji na tjelesno vježbanje, a njihovo kvantificiranje omogućava analizu smjera i opsega imunogenog odgovora. Podudarno literaturnim spoznajama, program treninga ponavljanih sprintova izazvao je značajno povećanje koncentracije IL-6 od 136%, uslijed direktnog oslobađanja iz mišićnog tkiva (143). Kao rezultat akutne reakcije na trening, koncentracija IL-6 raste u širokom rasponu od 1 do 38 puta. Stupanj iskorištenja mišićne mase i volumen treninga igraju važnu ulogu u definiranju opsega citokinske reakcije na tjelesno vježbanje (144). Pretpostavlja se da je kratko trajanje trenažnog protokola u ovom istraživanju razlog za relativno blago povećanje koncentracije IL-6 nakon finalnog mjerenja (2,4 puta). U sličnom istraživanju Leederera i suradnika (106) produženi LIST protokol izazvao je značajan porast koncentracije IL-6, dvadeset puta u odnosu na bazalne vrijednosti, dok su razine CRP-a ostale nepromijenjene, što ukazuje na relativno slabi imunogeni odgovor u danima nakon kineziološke intervencije. Značajno povećanje koncentracije IL-6 od 77% zabilježeno je nakon treninga ponavljanih sprintova na biciklu (3 x 9 x 5 s) (109) što predstavlja dvostruko manji porast vjerojatno kao posljedica sprinterske izvedbe na biciklu naspram trčanja korištenog u ovom istraživanju. Gotovo identične rezultate donijelo je istraživanje u kojem su Peart i suradnici (105) pokazali kako trening ponavljanih sprintova na biciklu (10 x 15 s uz 45 s aktivnog odmora) uzrokuje akutno povećanje koncentracije IL-6 za 77% s vršnim koncentracijama postignutim 90 minuta nakon trenažne intervencije.

Određivanjem C-reaktivnog proteina, kao najčešće korištenog biljega sistemske upale, u ovom istraživanju nismo otkrili značajne promjene u njegovoj koncentraciji. Komplementarne zaključke iznijeli su Clifford i suradnici (27) ispitujući učinke treninga ponavljanih sprintova (20 x 30 m) na razine CRP-a te izvijestili kako su koncentracije ostale na razini bazalnih vrijednosti tijekom cijelog eksperimenta, ne pokazujući nikakve vremenske ni interakcijske učinke. Program treninga ponavljanih sprintova potaknuo je mobilizaciju leukocita s manifestnim povećanjem ukupnog broja leukocita i segmentiranih neutrofilnih granulocita, međutim zabilježene promjene nisu bile značajne. Fenomen mobilizacije leukocita vjerojatno je uvjetovan lokaliziranim upalnim odgovorom mišićnog tkiva uz prevladavajuću

diferencijaciju dvije subpopulacije bijelih krvnih stanica (145-146). Neutrofilni granulociti pokazali su najbrži odgovor ukazujući na svoju primarnu ulogu uklanjanja staničnog derbija (52). Bessa i suradnici (147) zabilježili su jednak modalitet imunosnog odgovora praćen nepromijenjenim razinama IL-6, CRP-a, leukocita i neutrofilnih granulocita nakon visokointenzivnog aerobnog i anaerobnog treninga. Temeljem kombiniranog određivanja upalnih biljega IL-6, CRP-a, leukocita i neutrofila, nametnuo se zaključak da je trenažni protokol ponavljanih sprintova bio praćen isključivo lokaliziranom upalom skeletnih mišića, međutim nije izazivao značajniji sistemski imunosni odgovor zbog nepromijenjenih razina reaktanata akutne faze.

Nadalje, kako je za populaciju rekreativaca specifičan isprekidan obrazac prakticiranja visokointenzivnih trenažnih programa, nakon čega slijede razdoblja potpunog prestanka vježbanja, što u konačnici uzrokuje neutreniranost (148), dodatno su se ispitali rezidualni učinci relativno kratkog treninga ponavljanih sprintova na biljege sistemske imunološke aktivnosti. Interleukin-6 istovremeno pokazuje proupalna i protuupalna svojstva (149), ali u kontekstu tjelesnog vježbanja dominiraju njegovi protuupalni učinci, zbog čega se smatra jednim od nositelja protektivnih učinaka tjelesnog vježbanja (143). Budući da je mjesec dana nakon finalnog mjerenja utvrđen značajan pad koncentracije IL-6, preciznije za 63% u usporedbi s bazalnim vrijednostima, odnosno 84% uspoređujući ih s finalnim mjerenjem, ovim istraživanjem opaženi su protuupalni učinci treninga ponavljanih sprintova. Osim toga, došlo je do značajnog smanjenja ukupnog broja leukocita praćenog efektom pada prevladavajućih leukocitnih subpopulacija gdje su neutrofilni granulocita bilježili izraženiji pad u odnosu na limfocite. Dugotrajna prisutnost neutrofila u mišićnom tkivu može odgoditi njegovu regeneraciju zbog intenzivnijeg stvaranja ROS-a (150), stoga je pad razine neutrofila mjesec dana nakon završetka eksperimentalnog protokola dodatan pokazatelj kako do progredirajućih oksidativnih oštećenja ipak nije došlo. Dodatno, kontinuiranim praćenjem omjera neutrofila i limfocita može se predvidjeti status individualiziranog posttrenažnog oporavka (151), a kako se mjesec dana nakon trenažnog protokola omjer smanjio za 33% može se sugerirati kako je došlo do vrlo učinkovitog oporavka. Respektabilan broj istraživanja provedenih na sportskim igrama, longitudinalnim praćenjem duž sezone utvrdio je nepromijenjene razine pokazatelja sistemskog imunosnog odgovora što je komplementarno zaključcima ovog istraživanja, čime je dodatno potkrepljena teza o konceptu uspješne adaptacije imunološkog sustava na trenažne podražaje (152-153).

Iako neka istraživanja sugeriraju da bi mišićno oštećenje moglo biti odgovorno za povećanje razina oksidacijskog stresa, kako na mišićnoj, tako i na serološkoj razini (112), ovo istraživanje nije utvrdilo značajnu povezanost između promjena aktivnosti CK i niti jednog od biljega oksidacijskog stresa i/ili antioksidacijskog statusa. Nepostojanje povezanosti između biljega mišićnog oštećenja i oksidacijskog stresa utvrđeno je i u drugim istraživanjima koja su analizirala akutne reakcije na trening ponavljanih sprintova (27,106,108). Naznačena istraživanja povezuje opažanje o značajnom povećanju aktivnosti CK bez značajnog porasta biljega oksidacijskog stresa, pod pretpostavkom kako oštećenje mišića može imati samo ograničenu ulogu u izazivanju oksidacijskog stresa, barem za određene formate treninga ponavljanih sprintova. Naglašenija anaerobna kondicijska komponenta (108), povećana aktivnost antioksidacijskih enzima nakon produženog intermitentnog treninga izdržljivosti (106) i razlike u odabiru biokemijskih biljega, kao i analitičkih metoda za procjenu oksidacijskog stresa (27), navede se kao vodeći razlozi izostanka mjerljivog oksidacijskog stresa nakon tjelesnog vježbanja koje izaziva oštećenja mišića. S druge strane, u sličnom istraživanju (113) primijećeno je značajno smanjenje aktivnosti CK, kao i biljega oksidacijskog stresa, tri tjedna nakon intervalnog sprint treninga, međutim autori nisu ispitali povezanost između dvije skupine varijabli, stoga je ostalo nepoznato je li oksidacijski stres uslijed SIT-a uistinu bio suprimiran smanjenom razinom mišićnog oštećenja. Nadalje, nije pronađena povezanost aktivnosti CK i antioksidacijskih enzima u jedinom istraživanju trenažnog protokola ponavljanih sprintova provedenog trčanjem, koje je analiziralo dugoročne učinke (110), već su autori zaključili da je porast aktivnosti GPx i GR nakon treninga ponajprije posljedica metabolički potaknutog stvaranja kisikovih radikala.

Čini se da razina mišićnog oštećenja mora biti izuzetno velika, kao nakon trčanja nizbrdo, kako bi trenažna intervencija postala glavni pokretač povećanog oksidacijskog stresa. Nakon tjelesnog vježbanja koje rezultira oštećenjem mišića, oksidacijski stres primarno se razvija oksidacijom neutrofilnih granulocita i ostalih fagocita koji sudjeluju u regeneraciji mišićnog tkiva (112). Iako je format treninga ponavljanih sprintova u ovom istraživanju bio trkački i, aktivnost CK bila očekivano visoka, sam opseg promjena aktivnosti CK tijekom trenažnog programa očito nije bio toliko značajan da bi izazvao promjene u posttrenažnim razinama oksidacijskog stresa i/ili antioksidacijskog statusa. Vjerojatno i zbog toga što je inicijalni trening na jednak način rezultirao jakim oštećenjem mišića, a treninzi koji su uslijedili nisu mogli izazvati daljnje povećanje aktivnosti CK. Povrh toga, odabir vremenskih faza procjenjivanja svih određivanih biokemijskih biljega mogao je pridonijeti manje pouzdanom

utvrđivanju mogućih povezanosti, budući da se vršne aktivnosti CK obično postižu jedan ili čak dva dana nakon treninga, dok biljezi oksidacijskog stresa vrhunac dostižu nekoliko sati nakon treninga (154). U konačnici, čini se da su adaptacijski procesi koji mijenjaju redoks status bili potaknuti drugim mehanizmima oksidacijskog stresa, poput procesa ishemije-reperfuzije i stvaranja laktata (4), prvenstveno radi izrazito anaerobne prirode treninga ponavljanih sprintova (136).

Vrijedno je istaknuti kako dosadašnja istraživanja koja su ispitivala dugoročne učinke različitih formata VIIT-a nisu zabilježila rezultate temeljene na određivanju ukupnih izoprostana u 24-satnoj mokraći, već se najčešće ispitivao učinak trenažnih programa procjenjivan biljezima iz krvi. Navedena činjenica je iznenađujuća budući da pregledni radovi (87) koji su istraživali kroničnu adaptaciju na trenažni protokol preporučuju uzorke mokraće prikupljene tijekom 24 sata ili ujutro kao prikladniju mjeru cjelovitijeg razumijevanja lipidne peroksidacije. Istražujući širi kineziološki kontekst, eksperimenti koji su analizirali ukupne izoprostane u mokraći, nakon bilo kojeg oblika tjelesnog vježbanja pokazali su stupnjevito povećanje ili sniženje koncentracije u ovisnosti o intenzitetu i volumenu trenažne intervencije (99,121,155-156).

Analizom objavljenih istraživanja, u većini se slučajeva razina 15-F_{2t}-IsoP u mokraći smanjivala kada su se ispitivali produženi učinci trenažnih intervencija (156-157), dok su rijetka istraživanja izvijestila o nepromijenjenim razinama 15-F_{2t}-IsoP u mokraći (19). Ispitujući dugoročne učinke trenažnog protokola ponavljanih sprintova određivanjem koncentracije ukupnih izoprostana u 24-satnoj mokraći, ovim istraživanjem primijećeno je povećanje od 15% u odnosu na bazalne vrijednosti, međutim, ono što je indikativnije za analizu dugoročnih učinaka, zabilježeno je i smanjenje od 11% u usporedbi s razinama zabilježenim na kraju trenažnog protokola, što je podudarno s rezultatima ostalih istraživanja. Devries i suradnici (156) istraživali su dugoročne učinke 12-tjednog treninga izdržljivosti na razine 15-F_{2t}-IsoP u 24-satnoj mokraći i zaključili kako je trenažni protokol doveo do smanjenja lipidne peroksidacije jer su se koncentracije ukupnih izoprostana smanjile za 38%. Kako su dugoročni učinci treninga okarakterizirani padom razine izoprostana u mokraći, može se sugerirati da je trenažni protokol bio učinkovito programiran, prvenstveno aludirajući na opseg intenziteta i volumena treninga, što je potaknulo adaptivne antioksidacijske mehanizme neutralizirajući pritom nepovoljne redoks promjene. Mjesec dana nakon finalnog mjerenja, koncentracija 15-F_{2t}-IsoP u plazmi značajno se povećala za 116%, no uzimajući u obzir relativno kratko vrijeme poluživota 15-F_{2t}-IsoP u plazmi od 20 minuta, zaključuje se kako je do povećanja došlo

isključivo kao rezultat akutnog učinka treninga. Dakle, plazma nije preporučljiv uzorak za procjenu dugoročnih učinaka treninga na razine lipidne peroksidacije temeljem određivanja 15-F_{2t}-IsoP.

Statistički značajan pad aktivnosti antioksidacijskih enzima zabilježen je mjesec dana nakon trenažnog programa, a u odnosu na bazalne vrijednosti iznosio je 20% za SOD, 52% za GPx i 60% za GR. Čini se da SOD zahtijeva dugoročno veće trenažno opterećenje koje bi dovelo do promijenjene aktivnosti, za razliku od enzimske aktivnosti GPx i GR (123). Značajan pad razina staničnih antioksidanasa, zajedno sa sniženom koncentracijom urata, predstavlja indirektan dokaz kako je na dugoročnoj razini došlo do izrazite aktivacije i potrošnje zaštitnih mehanizama. Tome je dodatno pridonijelo odabirano vrijeme ispitivanja dugoročnih učinaka na kraju akademske godine kada su opterećenja nastavom i pripreme za praktični dio ispitnih rokova bili na svome vrhuncu.

Nakon inicijalnog mjerenja, jednako nalazima prethodnih istraživanja (158), nije ustanovljena povezanost između VO_{2max} i biljega oksidacijskog stresa/antioksidacijskog statusa, dakle poboljšana aerobna izdržljivost praćena trenažnim programom ponavljanih sprintova nije utjecala na koncentracije 15-F_{2t}-IsoP. Nasuprot tome, trend promjena koncentracija 15-F_{2t}-IsoP i urata praćen trenažnim protokolom ukazivao je na linearnu pozitivnu povezanost s promjenama aerobne izdržljivosti, dok je trend promjena aktivnosti SOD pokazivao negativnu povezanost što sugerira da je kod aerobno pripremljenijih ispitanika redoks ravnoteža usmjerena prooksidacijskim učincima. Štoviše, ova zapažanja suprotstavljena su onima Campbell i suradnika (159), jedinog sličnog istraživanja kojim je utvrđeno da napredak u razini aerobne pripremljenosti rezultira padom razine biljega oksidacijskog stresa i porastom razine antioksidanasa potaknute vježbom. Doduše istraživanje je provedeno na puno većem broju ispitanika, ali potpuno različitoj populaciji od 173 sjedilačkih pretilih žena u postmenopauzi, koje su bile podvrgnute jednogodišnjem programu tjelesnog vježbanja koncipiranog od 45 minutnih aerobnih aktivnosti umjerenog intenziteta (60-75% maksimalne frekvencije srca) kroz 5 dana tjedno. Mali ukupni broj ispitanika u ovom je istraživanju sigurno utjecao na manjak reprezentativnosti unutar podskupina aerobno pripremljenijih (N=8) i aerobno manje pripremljenih (N=7) ispitanika, stoga zaključci o povezanosti redoks homeostaze i aerobne izdržljivosti tijekom trenažnog protokola ponavljanih sprintova zahtijevaju daljnja istraživanja na većem broju ispitanika.

Ovo istraživanje jest sveobuhvatno jer je istovremeno analiziran utjecaj trenažnog protokola ponavljanih sprintova na regulaciju redoks homeostaze, mišićni status i mehanizme imunskog odgovora te njihova međusobna povezanost. Rezultati prikazani u ovom radu, samim time su jedinstveni, zbog toga što izvorno predstavljaju kroničnu adaptaciju na trening ponavljanih sprintova longitudinalnim praćenjem biljega oksidacijskog stresa i antioksidacijskog statusa. Ponavljanje *per se*, evidentno nosi potencijal u unaprjeđenju adaptivnog odgovora na oksidativna oštećenja izazvana visokointenzivnim anaerobnim aktivnostima, stoga se trening ponavljanih sprintova nameće kao učinkovita strategija u poboljšanju željenih trenažnih performansi. Ostaje otvoreno pitanje vrednovanja akutne reakcije na trening ponavljanih sprintova u kontekstu biokemijskog odgovora što bi trebala utvrditi buduća istraživanja usredotočena na redoks biologiju ovog iznimno populariziranog formata treninga.

6. ZAKLJUČCI

Slijedom provedenog istraživanja, dobiveni rezultati upućuju na sljedeće zaključke:

- Konstantno povećanje intenziteta i volumena anaerobnog trenažnog podražaja izaziva prooksidacijski učinak karakteriziran značajnijim porastom koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u plazmi u odnosu na mokraću, te posredno ukazujući na proces trenažne adaptacije čime se u konačnici preveniraju daljnja oksidacijska oštećenja.
- Utvrđeno iscrpljenje kataboličke aktivnosti zaštitnih antioksidacijskih enzima i susljedan porast koncentracije hormona stresa čini tkivnu ishemiju-reperfuziju pretpostavljenim mehanizmom kojim nastaju ROS za vrijeme treninga ponavljanih sprintova.
- Trenažni protokol ponavljanih sprintova manifestiran je umjerenim metaboličkim i neuromuskularnim odgovorom praćen manje opsežnim oštećenjem mišića slijedom blagog porasta aktivnosti kreatin-kinaze.
- Imunosni odgovor na trenažni protokol ponavljanih sprintova obilježen je prvenstveno lokaliziranom upalom skeletnih mišića uz odsustvo sistemskog odgovora, međutim prepoznati su dugoročni protuupalni učinci.
- Mišićno oštećenje i lokalizirana upala zacijelo nisu čimbenici prooksidacijskog efekta trenažnog podražaja, obzirom da promjene u razinama kreatin-kinaze i visokoosjetljivog IL-6 nisu bile povezane s promjenama biljega oksidacijskog stresa i/ili antioksidacijskog statusa.
- Redoks homeostazu aerobno pripremljenijih označavaju dominantniji prooksidacijski učinci, zbog toga što je utvrđena umjerena pozitivna povezanost aerobne izdržljivosti i koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u mokraći te serumskih urata.

7. POPIS LITERATURE

- 1 Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee I-M, et al. Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2011 Jul;43(7):1334–59.
- 2 Pedersen BK, Saltin B. Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports* 2015 Dec;25:1–72.
- 3 Bok D. Učinci dva trenažna protokola ponavljanih sprintova na pokazatelje kondicijske pripremljenosti [dissertation]. Zagreb: Kineziološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2014. 145 p.
- 4 Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: Relationship with exercise and training. *Sports Med* 2006;36(4):327–58.
- 5 de Sousa CV, Sales MM, Rosa TS, Lewis JE, de Andrade RV, Simões HG. The antioxidant effect of exercise: A systematic review and meta-analysis. *Sports Med* 2017 Feb;47(2):277–93.
- 6 Bouzid MA, Filaire E, McCall A, Fabre C. Radical oxygen species, exercise and aging: An update. *Sports Med* 2015 Sep;45(9):1245–61.
- 7 Lewis NA, Howatson G, Morton K, Hill J, Pedlar CR. Alterations in redox homeostasis in the elite endurance athlete. *Sports Med* 2015 Mar;45(3):379–409.
- 8 Knez W, Jenkins D, Coombes J. The effect of an increased training volume on oxidative stress. *Int J Sports Med* 2013 Jul 9;35(01):8–13.
- 9 Glaister M. Multiple sprint work: Physiological responses, mechanisms of fatigue and the influence of aerobic fitness. *Sports Med* 2005;35(9):757–77.
- 10 Spencer M, Lawrence S, Rechichi C, Bishop D, Dawson B, Goodman C. Time–motion analysis of elite field hockey, with special reference to repeated-sprint activity. *J Sports Sci* 2004 Sep;22(9):843–50.
- 11 Girard O, Mendez-Villanueva A, Bishop D. Repeated-sprint ability – Part I: Factors contributing to fatigue. *Sports Med* 2011 Aug;41(8):673–94.

- 12 Bishop D, Girard O, Mendez-Villanueva A. Repeated-sprint ability – Part II: Recommendations for training. *Sports Med* 2011 Sep;41(9):741–56.
- 13 Taylor J, Macpherson T, Spears I, Weston M. The effects of repeated-sprint training on field-based fitness measures: A meta-analysis of controlled and non-controlled trials. *Sports Med* 2015 Jun;45(6):881–91.
- 14 Buchheit M, Laursen PB. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part I: Cardiopulmonary emphasis. *Sports Med* 2013 May;43(5):313–38.
- 15 Craig NP, Norton KI. Characteristics of track cycling. *Sports Med* 2001;31(7):457–68.
- 16 Calbet JAL, De Paz JA, Garatachea N, Cabeza de Vaca S, Chavarren J. Anaerobic energy provision does not limit Wingate exercise performance in endurance-trained cyclists. *J Appl Physiol* 2003 Feb 1;94(2):668–76.
- 17 Gaitanos GC, Williams C, Boobis LH, Brooks S. Human muscle metabolism during intermittent maximal exercise. *J Appl Physiol* 1993 Aug 1;75(2):712–9.
- 18 Morales-Alamo D, Calbet JAL. Free radicals and sprint exercise in humans. *Free Radic Res* 2014 Jan;48(1):30–42. www.tandfonline.com
- 19 Dawson B, Goodman C, Lawrence S, Preen D, Polglaze T, Fitzsimons M, et al. Muscle phosphocreatine repletion following single and repeated short sprint efforts. *Scand J Med Sci Spor* 2007 Jan 30;7(4):206–13.
- 20 McMahon S, Jenkins D. Factors affecting the rate of phosphocreatine resynthesis following intense exercise. *Sports Med* 2002;32(12):761–84.
- 21 Spencer M, Bishop D, Dawson B, Goodman C. Physiological and metabolic responses of repeated-sprint activities: Specific to field-based team sports. *Sports Med* 2005;35(12):1025–44.
- 22 Morales-Alamo D, Ponce-González JG, Guadalupe-Grau A, Rodríguez-García L, Santana A, Cusso MR, et al. Increased oxidative stress and anaerobic energy release, but blunted Thr 172 -AMPK α phosphorylation, in response to sprint exercise in severe acute hypoxia in humans. *J Appl Physiol* 2012 Sep 15;113(6):917–28.

- 23 Kenney WL, Wilmore JH, Costill DL, editors. *Physiology of sport and exercise*. Champaign (IL): Human Kinetics; 2012.
- 24 Bonen A. Skeletal muscle lactate transport and transporters. In: Hargreaves M, Spriet L, editors. *Exercise metabolism*. Champaign (IL): Human Kinetics, 2006:71-89.
- 25 Juel C. Muscle pH regulation: Role of training. *Acta Physiol Scand* 1998 Feb;162(3):359–66.
- 26 Vučetić V. Razlike u pokazateljima energetske kapaciteta trkača dobivenih različitim protokolima opterećenja [dissertation]. Zagreb: Kineziološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2007. 224 p.
- 27 Clifford T, Berntzen B, Davison G, West D, Howatson G, Stevenson E. Effects of beetroot juice on recovery of muscle function and performance between bouts of repeated sprint exercise. *Nutrients* 2016 Aug 18;8(8):506.
- 28 Verrall GM. The effect of sports specific training on reducing the incidence of hamstring injuries in professional Australian Rules football players. *Br J Sports Med* 2005 Jun 1;39(6):363–8.
- 29 Ropiak CR, Bosco JA. Hamstring injuries. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2012;70(1):41–8.
- 30 Armstrong RB, Ogilvie RW, Schwane JA. Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1983 Jan 1;54(1):80–93.
- 31 Armstrong RB. Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc* 1990 Aug;22(4):429–35.
- 32 Morgan DL. New insights into the behavior of muscle during active lengthening. *Biophys J* 1990 Feb;57(2):209–21.
- 33 Pinniger GJ, Steele JR, Groeller H. Does fatigue induced by repeated dynamic efforts affect hamstring muscle function? *Med Sci Sports Exerc* 2000 Mar;32(3):647–53.
- 34 Lempainen L, Banke IJ, Johansson K, Brucker PU, Sarimo J, Orava S, et al. Clinical principles in the management of hamstring injuries. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2015 Aug;23(8):2449–56.

- 35 Eryılmaz SK, Aslankeser Z, Özdemir Ç, Özgünen K, Kurdak S. The effect of 30-m repeated sprint exercise on muscle damage indicators, serum insulin-like growth factor-I and cortisol. *Biomed Hum Kinet* 2019 Jan 1;11(1):151–7.
- 36 Castrogiovanni P, Imbesi R. Oxidative stress and skeletal muscle in exercise. *Ital J Anat Embryol* 2012;117(2):107–17.
- 37 Peake J, Nosaka K, Suzuki K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc Immunol Rev* 2005;11:64–85.
- 38 Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. *Clin Chem Lab Med* 2010 Jun;48(6):757-67.
- 39 Baird MF, Graham SM, Baker JS, Bickerstaff GF. Creatine-kinase and exercise-related muscle damage implications for muscle performance and recovery. *J Nutr Metab* 2012;2012:1–13.
- 40 Koch AJ, Pereira R, Machado M. The creatine kinase response to resistance exercise. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2014 Mar;14(1):68–77.
- 41 Schillinger A, Koenig D, Haefele C, Vogt S, Heinrich L, Aust A, et al. Effect of manual lymph drainage on the course of serum levels of muscle enzymes after treadmill exercise. *Am J Phys Med Rehabil* 2006 Jun;85(6):516–20.
- 42 Lippi G, Schena F, Salvagno GL, Montagnana M, Gelati M, Tarperi C, et al. Acute variation of biochemical markers of muscle damage following a 21-km, half-marathon run. *Scand J Clin Lab Inv* 2008 Jan;68(7):667–72.
- 43 Priest JB, Oei TO, Moorehead WR. Exercise-induced changes in common laboratory tests. *Am J Clin Pathol* 1982 Mar 1;77(3):285–9.
- 44 Brown S, Day S, Donnelly A. Indirect evidence of human skeletal muscle damage and collagen breakdown after eccentric muscle actions. *J Sports Sci* 1999 Jan;17(5):397–402.
- 45 Jürgens KD, Papadopoulos S, Peters T, Gros G. Myoglobin: Just an oxygen store or also an oxygen transporter? *Physiology* 2000 Oct;15(5):269–74.

- 46 Speranza L, Grilli A, Patruno A, Franceschelli S, Felzani G, Pesce M, et al. Plasmatic markers of muscular stress in isokinetic exercise. *J Biol Regul Homeost Agents* 2007;21(1–2):21–9.
- 47 Peake JM, Neubauer O, Della Gatta PA, Nosaka K. Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. *J Appl Physiol* 2017 Mar 1;122(3):559–70.
- 48 Beaton LJ, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Contraction-induced muscle damage in humans following calcium channel blocker administration. *J Physiol* 2002 Nov;544(3):849–59.
- 49 Malm C, Nyberg P, Engström M, Sjödin B, Lenkei R, Ekblom B, et al. Immunological changes in human skeletal muscle and blood after eccentric exercise and multiple biopsies. *J Physiol* 2000 Nov;529(1):243–62.
- 50 Hamada K, Vannier E, Sacheck JM, Witsell AL, Roubenoff R. Senescence of human skeletal muscle impairs the local inflammatory cytokine response to acute eccentric exercise. *The FASEB J* 2005 Feb;19(2):264–6.
- 51 Saxton JM, Claxton D, Winter E, Pockley AG. Peripheral blood leucocyte functional responses to acute eccentric exercise in humans are influenced by systemic stress, but not by exercise-induced muscle damage. *Clin Sci* 2003 Jan;104(1):69–77.
- 52 Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005 Feb;288(2):345–53.
- 53 Peake JM, Suzuki K, Hordern M, Wilson G, Nosaka K, Coombes JS. Plasma cytokine changes in relation to exercise intensity and muscle damage. *Eur J Appl Physiol* 2005 Dec;95(5–6):514–21.
- 54 Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 2005 Apr;98(4):1154–62.
- 55 Nosaka K, Sakamoto K, Newton M, Sacco P. How long does the protective effect on eccentric exercise-induced muscle damage last? *Med Sci Sports Exerc* 2001 Sep;33(9):1490–5.
- 56 Sies H, Jones DP. Oxidative stress. In: Fink G, editor. *Encyclopaedia of stress*. San Diego, CA: Elsevier; 2007:45–48.

- 57 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell B* 2007 Jan;39(1):44–84.
- 58 Nikolaidis MG, Kyparos A, Spanou C, Paschalis V, Theodorou AA, Vrabas IS. Redox biology of exercise: An integrative and comparative consideration of some overlooked issues. *J Exp Biol* 2012 May 15;215(10):1615–25.
- 59 Fleury C, Mignotte B, Vayssière JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 2002 Feb;84(2–3):131–41.
- 60 Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 2001;10(1–2):125–40.
- 61 Powers SK, Jackson MJ. Exercise-induced oxidative stress: Cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev Suppl* 2008 Oct;88(4):1243–76.
- 62 Gomez-Cabrera M-C, Borrás C, Pallardó FV, Sastre J, Ji LL, Viña J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats: Oxidants as signals modulating muscle adaptations to exercise. *J Physiol* 2005 Aug;567(1):113–20.
- 63 Nethery D, Stofan D, Callahan L, DiMarco A, Supinski G. Formation of reactive oxygen species by the contracting diaphragm is PLA 2 dependent. *J Appl Physiol* 1999 Aug 1;87(2):792–800.
- 64 Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev Suppl* 2001 Jan 1;81(1):209–37.
- 65 Luo C-X, Zhu D-Y. Research progress on neurobiology of neuronal nitric oxide synthase. *Neurosci Bull* 2011 Feb;27(1):23–35.
- 66 Zouhal H, Rannou F, Gratas-Delamarche A, Monnier M, Bentué-Ferrer D, Delamarche P. Adrenal medulla responsiveness to the sympathetic nervous activity in sprinters and untrained subjects during a supramaximal exercise. *Int J Sports Med* 1998 Apr;19(03):172–6.

- 67 Bracken RM, Brooks S. Plasma catecholamine and neprine responses following 7 weeks of sprint cycle training. *Amino Acids* 2010 May;38(5):1351–9.
- 68 Dean JB. Hypercapnia causes cellular oxidation and nitrosation in addition to acidosis: Implications for CO₂ chemoreceptor function and dysfunction. *J Appl Physiol* 2010 Jun;108(6):1786–95.
- 69 Thaveau F, Zoll J, Bouitbir J, Ribera F, Di Marco P, Chakfe N, et al. Contralateral leg as a control during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 2009 Jul;155(1):65–9.
- 70 Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Update on ischemia-reperfusion injury for the plastic surgeon: 2011. *Plast Reconstr Surg* 2011 Dec;128(6):685–92.
- 71 Baudry N, Laemmel E, Vicaut E. In vivo reactive oxygen species production induced by ischemia in muscle arterioles of mice: involvement of xanthine oxidase and mitochondria. *Am J Physiol Heart C* 2008 Feb;294(2):821–8.
- 72 Tonkonogi M, Walsh B, Tiivel T, Saks V, Sahlin K. Mitochondrial function in human skeletal muscle is not impaired by high intensity exercise. *Pflugers Arch* 1999 Feb 23;437(4):562–8.
- 73 Dorado C, Sanchis-Moysi J, Calbet JAL. Effects of recovery mode on performance, O₂ uptake, and O₂ deficit during high-intensity intermittent exercise. *Can J Appl Physiol* 2004 Jun 1;29(3):227–44.
- 74 Pamplona R, Costantini D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011 Oct;301(4):843–63.
- 75 Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxid Med Cell Longev* 2017;2017:1–32.
- 76 Holmgren A, Johansson C, Berndt C, Lönn ME, Hudemann C, Lillig CH. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochem Soc Trans* 2005 Dec 1;33(6):1375.
- 77 Lei XG, Cheng W-H, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu Rev Nutr* 2007 Aug;27(1):41–61.

- 78 Worthington DJ, Rosemeyer MA. Glutathione reductase from human erythrocytes. catalytic properties and aggregation. *Eur J Biochem* 1976 Aug;67(1):231–8.
- 79 Nieto FJ, Iribarren C, Gross MD, Comstock GW, Cutler RG. Uric acid and serum antioxidant capacity: A reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis* 2000 Jan;148(1):131–9.
- 80 Hink HU, Santanam N, Dikalov S, McCann L, Nguyen AD, Parthasarathy S, et al. Peroxidase properties of extracellular superoxide dismutase: Role of uric acid in modulating in vivo activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 Sep;22(9):1402–8.
- 81 Fabbrini E, Serafini M, Colic Baric I, Hazen SL, Klein S. Effect of plasma uric acid on antioxidant capacity, oxidative stress, and insulin sensitivity in obese subjects. *Diabetes* 2014 Mar 1;63(3):976–81.
- 82 Stocker R. Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal* 2004 Oct;6(5):841–9.
- 83 Taverna M, Marie A-L, Mira J-P, Guidet B. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Ann Intensive Care* 2013;3(1):4.
- 84 Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija: uzroci i posljedice. *Medicina: glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora, Podružnica Rijeka* 2007;43(2):84-94.
- 85 Reis A, Spickett CM. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2012 Oct;1818(10):2374–87.
- 86 Milne GL, Yin H, Morrow JD. Human biochemistry of the isoprostane pathway. *J Biol Chem* 2008 Jun 6;283(23):1533–7.
- 87 Nikolaidis MG, Kyparos A, Vrabas IS. F2-isoprostane formation, measurement and interpretation: The role of exercise. *Prog Lipid Res* 2011 Jan;50(1):89–103. Copyright Elsevier
- 88 Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Nov 15;89(22):10721–5.

- 89 Basu S. Review Isoprostanes: Novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 2004 Feb;38(2):105–22.
- 90 Halliwell B, Lee CYJ. Using isoprostanes as biomarkers of oxidative stress: Some rarely considered issues. *Antioxid Redox Sign* 2010 Jul 15;13(2):145–56.
- 91 Roberts LJ, Moore KP, Zackert WE, Oates JA, Morrow JD. Identification of the major urinary metabolite of the F₂-isoprostane 8-iso-prostaglandin F₂ α in Humans. *J Biol Chem* 1996 Aug 23;271(34):617–20.
- 92 Berdeaux O, Scruel O, Cracowski J, Durand T. F₂-isoprostanes: Review of analytical methods. *CPA* 2006 Feb 1;2(1):69–78.
- 93 Liu W, Morrow JD, Yin H. Quantification of F₂-isoprostanes as a reliable index of oxidative stress in vivo using gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) method. *Free Radic Biol Med* 2009 Oct;47(8):1101–7.
- 94 Li H, Lawson JA, Reilly M, Adiyaman M, Hwang S-W, Rokach J, et al. Quantitative high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of the four classes of F₂-isoprostanes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Nov 9;96(23):13381–6.
- 95 Basu S. Metabolism of 8-iso-prostaglandin F₂ α . *FEBS Lett* 1998 May 22;428(1–2):32–6.
- 96 Montuschi P, Barnes P, Jackson Roberts L. Insights into oxidative stress: The isoprostanes. *Curr. Med. Chem* 2007 Mar 1;14(6):703–17.
- 97 Nikolaidis MG, Mougios V. Effects of exercise on the fatty-acid composition of blood and tissue lipids. *Sports Med* 2004;34(15):1051–76.
- 98 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 Jun;181(2):199–208.
- 99 Margonis K, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Douroudos I, Chatzinikolaou A, et al. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: Implications for diagnosis. *Free Radic Biol Med* 2007 Sep;43(6):901–10.

- 100 Nikolac N, Šupak Smolčić V, Šimundić AM, Čelap I. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: National recommendations for venous blood sampling. *Biochem Med* 2013;23(3):242–54.
- 101 Šimundić AM. Practical recommendations for statistical analysis and data presentation in *Biochemia Medica* journal. *Biochem Med* 2012;22(1):15–23.
- 102 Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. What we need to know when calculating the coefficient of correlation? *Biochem Med* 2007;17(1):10–5.
- 103 Escobar M, Oliveira MWS, Behr GA, Zanotto-Filho A, Ilha L, Cunha GDS, et al. Oxidative stress in young football (soccer) players in intermittent high intensity exercise protocol. *J Exerc Physiol Online* 2009;12(5):1-10.
- 104 Jówko E, Długołęcka B, Makaruk B, Cieśliński I. The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced oxidative stress parameters in male sprinters. *Eur J Nutr* 2015 Aug;54(5):783–91.
- 105 Peart DJ, Kirk RJ, Hillman AR, Madden LA, Siegler JC, Vince RV. The physiological stress response to high-intensity sprint exercise following the ingestion of sodium bicarbonate. *Eur J Appl Physiol* 2013 Jan;113(1):127–34.
- 106 Leeder JDC, van Someren KA, Gaze D, Jewell A, Deshmukh NIK, Shah I, et al. Recovery and adaptation from repeated intermittent-sprint exercise. *Int J Sports Physiol Perform* 2014 May;9(3):489–96.
- 107 Farney TM, McCarthy CG, Canale RE, Schilling BK, Whitehead PN, Bloomer RJ. Absence of blood oxidative stress in trained men after strenuous exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2012 Oct;44(10):1855–63.
- 108 Bloomer RJ, Falvo MJ, Fry AC, Schilling BK, Smith WA, Moore CA. Oxidative stress response in trained men following repeated squats or sprints. *Med Sci Sports Exerc* 2006 Aug;38(8):1436–42.
- 109 Goods PSR, Dawson B, Landers GJ, Gore CJ, Croft K, Peeling P. Effect of repeat-sprint training in hypoxia on post-exercise interleukin-6 and F2-isoprostanes. *Eur J Sport Sci* 2016 Nov 16;16(8):1047–54.

- 110 Hellsten Y, Apple FS, Sjödín B. Effect of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1996 Oct 1;81(4):1484–7.
- 111 Douglas J, Pearson S, Ross A, McGuigan M. Eccentric exercise: Physiological characteristics and acute responses. *Sports Med* 2017 Apr;47(4):663–75.
- 112 Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: Magnitude and time-course considerations. *Sports Med* 2008;38(7):579–606.
- 113 Bogdanis GC, Stavrinou P, Fatouros IG, Philippou A, Chatzinikolaou A, Draganidis D, et al. Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. *Food Chem Toxicol* 2013 Nov;61:171–7.
- 114 Vezzoli A, Pugliese L, Marzorati M, Serpiello FR, La Torre A, Porcelli S. Time-course changes of oxidative stress response to high-intensity discontinuous training versus moderate-intensity continuous training in masters runners. *PLoS One* 2014 Jan 31; 9(1):e87506.
- 115 Fisher G, Schwartz DD, Quindry J, Barberio MD, Foster EB, Jones KW, et al. Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise. *J Appl Physiol* 2011 Mar;110(3):730–7.
- 116 Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: Unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 1997 Mar;36(1):1–21.
- 117 Mastaloudis A, Morrow JD, Hopkins DW, Devaraj S, Traber MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med* 2004 May;36(10):1329–41.
- 118 McAnulty S, McAnulty L, Nieman D, Morrow J, Dumke C, Utter A. Carbohydrate effect: Hormone and oxidative changes. *Int J Sports Med* 2007 Nov;28(11):921–7.
- 119 Steensberg A, Morrow J, Toft D, Bruunsgaard H, Pedersen K. Prolonged exercise, lymphocyte apoptosis and F2-isoprostanes. *Eur J Appl Physiol* 2002 May;87(1):38–42.

- 120 Morrow JD, Awad JA, Kato T, Takahashi K, Badr KF, Roberts LJ, et al. Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. An animal model of lipid peroxidation. *J Clin Invest* 1992 Dec 1;90(6):2502–7.
- 121 Medina S, Domínguez-Perles R, Cejuela-Anta R, Villaño D, Martínez-Sanz JM, Gil P, et al. Assessment of oxidative stress markers and prostaglandins after chronic training of triathletes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2012 Dec;99(3–4):79–86.
- 122 Wadley AJ, Chen Y-W, Lip GYH, Fisher JP, Aldred S. Low volume–high intensity interval exercise elicits antioxidant and anti-inflammatory effects in humans. *J Sports Sci* 2016 Jan 2;34(1):1–9.
- 123 Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, et al. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 2001 Feb 16;84(1–2):1–6.
- 124 Vollaard NBJ, Shearman JP, Cooper CE. Exercise-induced oxidative stress: Myths, realities and physiological relevance. *Sports Med* 2005;35(12):1045–62.
- 125 Finaud J, Scislowski V, Lac G, Durand D, Vidalin H, Robert A, et al. Antioxidant status and oxidative stress in professional rugby players: Evolution throughout a season. *Int J Sports Med* 2006 Feb;27(2):87–93.
- 126 Schippinger G, Fankhauser F, Abuja PM, Winklhofer-Roob BM, Nadlinger K, Halwachs-Baumann G, et al. Competitive and seasonal oxidative stress in elite alpine ski racers: Competitive and seasonal oxidative stress. *Scand J Med Sci Sports* 2008 Feb 6;19(2):206–12.
- 127 Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 1988 Feb;20(1):55–9.
- 128 Fragala Maren S, Bi C, Chaump M, Kaufman HW, Kroll MH. Associations of aerobic and strength exercise with clinical laboratory test values. *PLoS One* 2017 Oct 23;12(10):e0180840.

- 129 Fallon KE, Sivyer G, Sivyer K, Dare A. The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. *Br J Sports Med* 1999 Aug;33(4):264–9.
- 130 Röcker L, Kirsch KA, Stoboy H. Plasma volume, albumin and globulin concentrations and their intravascular masses. A comparative study in endurance athletes and sedentary subjects. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1976 Dec 6;36(1):57–64.
- 131 Zouhal H, Jacob C, Delamarche P, Gratas-Delamarche A. Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. *Sports Med* 2008;38(5):401–23.
- 132 Gunnarsson TP, Brandt N, Fiorenza M, Hostrup M, Pilegaard H, Bangsbo J. Inclusion of sprints in moderate intensity continuous training leads to muscle oxidative adaptations in trained individuals. *Physiol Rep* 2019 Feb;7(4):e13976.
- 133 Peake JM, Tan SJ, Markworth JF, Broadbent JA, Skinner TL, Cameron-Smith D. Metabolic and hormonal responses to isoenergetic high-intensity interval exercise and continuous moderate-intensity exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014 Oct 1;307(7):539–52.
- 134 Howatson G, Milak A. Exercise-induced muscle damage following a bout of sport specific repeated sprints. *J Strength Cond Res* 2009 Nov;23(8):2419–24.
- 135 Woolley BP, Jakeman JR, Faulkner JA. Multiple sprint exercise with a short deceleration induces muscle damage and performance impairment in young, physically active males. *J Athl Enhancement* 2014;03(02).
- 136 Buchheit M, Laursen PB. High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part II: Anaerobic energy, neuromuscular load and practical applications. *Sports Med* 2013 Oct;43(10):927–54.
- 137 Silva JR, Rumpf MC, Hertzog M, Castagna C, Farooq A, Girard O, et al. Acute and residual soccer match-related fatigue: A systematic review and meta-analysis. *Sports Med* 2018 Mar;48(3):539–83.
- 138 Russell M, Northeast J, Atkinson G, Shearer DA, Sparkes W, Cook CJ, et al. Between-match variability of peak power output and creatine kinase responses to soccer match-play. *J Strength Cond Res* 2015 Aug;29(8):2079–85.

- 139 Meister S, aus der Fünten K, Meyer T. Repeated monitoring of blood parameters for evaluating strain and overload in elite football players: is it justified? *J Sports Sci* 2014 Aug 9;32(13):1328–31.
- 140 Coutts AJ, Reaburn P, Piva TJ, Rowsell GJ. Monitoring for overreaching in rugby league players. *Eur J Appl Physiol* 2007 Jan 25;99(3):313–24.
- 141 Fridén J, Sfakianos PN, Hargens AR. Blood indices of muscle injury associated with eccentric muscle contractions: Blood indices of muscle injury. *J Orthop Res* 1989 Jan;7(1):142–5.
- 142 Batacan RB, Duncan MJ, Dalbo VJ, Tucker PS, Fenning AS. Effects of high-intensity interval training on cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of intervention studies. *Br J Sports Med* 2017 Mar;51(6):494–503.
- 143 Pedersen BK. Anti-inflammatory effects of exercise: Role in diabetes and cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest* 2017 Aug;47(8):600–11.
- 144 Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: What is the biological relevance? *Exerc Immunol Rev* 2006;12:6–33.
- 145 Peake J, Nosaka K, Suzuki K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc Immunol Rev* 2005;11:64–85.
- 146 Chazaud B. Inflammation during skeletal muscle regeneration and tissue remodeling: application to exercise-induced muscle damage management. *Immunol Cell Biol* 2016 Feb;94(2):140–5.
- 147 Bessa AL, Oliveira VN, G. Agostini G, Oliveira RJS, Oliveira ACS, White GE, et al. Exercise intensity and recovery: Biomarkers of injury, inflammation, and oxidative stress. *J Strength Cond Res* 2016 Feb;30(2):311–9.
- 148 Mujika I, Padilla S. Detraining: Loss of training-induced physiological and performance adaptations. Part I: Short term insufficient training stimulus. *Sports Med* 2000;30(2):79–87.
- 149 Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2011 May;1813(5):878–88.

- 150 Smith JK, Grisham MB, Granger DN, Korthuis RJ. Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1989 Mar 1;256(3):789–93.
- 151 Gomes TM, Simão R, Marques MC, Costa PB, da Silva Novaes J. Acute effects of two different stretching methods on local muscular endurance performance. *J Strength Cond Res* 2011 Mar;25(3):745–52.
- 152 Teixeira V, Valente H, Casal S, Pereira L, Marques F, Moreira P. Antioxidant status, oxidative stress, and damage in elite kayakers after 1 year of training and competition in 2 seasons. *Appl Physiol Nutr Metab* 2009 Aug;34(4):716–24.
- 153 Marin DP, Bolin AP, Campoio TR, Guerra BA, Otton R. Oxidative stress and antioxidant status response of handball athletes: Implications for sport training monitoring. *Int Immunopharmacol* 2013 Oct;17(2):462–70.
- 154 Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis Y, Papassotiriou I, et al. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 2007 Jul;39(7):1107–13.
- 155 Cornish SM, Candow DG, Jantz NT, Chilibeck PD, Little JP, Forbes S, et al. Conjugated linoleic acid combined with creatine monohydrate and whey protein supplementation during strength training. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2009 Feb;19(1):79–96.
- 156 Devries MC, Hamadeh MJ, Glover AW, Raha S, Samjoo IA, Tarnopolsky MA. Endurance training without weight loss lowers systemic, but not muscle, oxidative stress with no effect on inflammation in lean and obese women. *Free Radic Biol Med* 2008 Aug 15;45(4):503–11.
- 157 Schmitz KH, Warren M, Rundle AG, Williams NI, Gross MD, Kurzer MS. Exercise effect on oxidative stress is independent of change in estrogen metabolism. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008 Jan 9;17(1):220–3.
- 158 Mori TA, Dunstan DW, Burke V, Croft KD, Rivera JH, Beilin LJ, et al. Effect of dietary fish and exercise training on urinary F2-isoprostane excretion in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism* 1999 Nov;48(11):1402–8.

159 Campbell PT, Gross MD, Potter JD, Schmitz KH, Duggan C, Mctiernan A, et al. Effect of exercise on oxidative stress: A 12-month randomized, controlled trial. *Med Sci Sports Exerc* 2010 Aug;42(8):1448–53.

8. POPIS KRATICA

Kratica:	Značenje:
ADP	adenozin-difosfat
AMP	adenozin-monofosfat
AST	aspartat-aminotransferaza
ATP	adenozin-trifosfat
BCG	bromkrezol-zelenilo
CaMKII	kalcij/kalmodulin ovisne protein kinaze II
CAT	katalaza
CK	kreatin-kinaza
CK-MM	izoenzim kreatin-kinaze MM
cPLA2	fosfolipaza A2 ovisna o kalciju
CrP	kreatin-fosfat
CRP	C-reaktivni protein
DPD	3,5-diklorfenil-diazoniumtetrafluoroborat
EIA	imunokemijske metode obilježene enzimom
ELISA	enzimimunoanaliza
F_{2t}-IsoP	F _{2t} -izoprostani
FS_{max}	maksimalna frekvencija srca
FSVO_{2max}	frekvencija srca pri maksimalnom primitku kisika
GC-MS	plinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom
GPx	glutation-peroksidaza
GR	glutation-reduktaza
HIF-1β	čimbenik 1 β induciran hipoksijom
HRP	peroksidaza iz hrena
IL-1β	interleukin 1 β
IL-1ra	antagonist receptora interleukina 1
IL-4	interleukin 4

IL-6	interleukin 6
IL-10	interleukin 10
IL-13	interleukin 13
IMP	inozin-monofosfat
INT	2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijev klorid
KF1	progresivni test opterećenja na pokretnom sagu
La	koncentracija laktata u krvi u trećoj minuti oporavka
LC-MS	tekućinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom
LD	laktat-dehidrogenaza
LDL	lipoprotein niske gustoće
LIF	inhibicijski čimbenik leukemije
LOOH	lipidni hidroperoksidi
MCT	monokarboksilni prijenosnici
MtCK	mitohondrijska kreatin-kinaza
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
NHE1	proteinski izmjenjivač Na^+/H^+ izoforme 1
NO	dušikov oksid
NOS	sintetaza dušikovog oksida
NQO1	NAD(P)H-kinon oksidoreduktaza
PAF-AH	acetilhidrolaza čimbenika aktivacije trombocita
PC	proteinski karbonili
15-PGDH	15-hidroksid prostaglandin dehidrogenaza
PLA2	fosfolipaza A2
PUFA	višestruko nezasićene masne kiseline
RIA	imunokemijske metode obilježene radioaktivnim izotopima
RNS	reaktivni dušikovi spojevi

ROS	reaktivni kisikovi spojevi
RVO_{2max}	relativni maksimalni primitak kisika
SIT	intervalni sprint trening
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi
SPS	sposobnost ponavljanih sprintova
SOD	superoksid-dismutaza
TAC	ukupni antioksidacijski status
TBARS	reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline
TGF-β	transformirajući čimbenik rasta beta
t_{lim}	progresivni test opterećenja
TMB	3,3',5,5' tetrametilbenzidin
TNF-α	čimbenik nekroze tumora alfa
UPLC	tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
VIIT	visokointenzivni intervalni trening
v_{max}	maksimalna postignuta brzina trčanja
VO_{2max}	apsolutni maksimalni primitak kisika
vVO_{2max}	brzina trčanja pri maksimalnom primitku kisika

9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

9. ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Domagoj Marijančević rođen je 16.01.1983. godine u Slavanskom Brodu gdje je pohađao osnovnu školu i Gimnaziju „Matija Mesić“. Godine 2001. upisao je Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Tijekom studiranja dobio je CEPUS stipendiju za boravak u Odjelu za kliničku biokemiju Farmaceutskog fakulteta u Ljubljani. Diplomirao je 2007. godine stekavši zvanje diplomiranog inženjera medicinske biokemije. Nakon pripravničkog staža, 2008. godine zaposlio se u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava gdje je od 2010. godine obnašao funkciju voditelja kvalitete. Specijalistički ispit iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine položio je 2014. godine stekavši zvanje specijalista medicinske biokemije i laboratorijske medicine. Od 2015. godine do danas radi u Endokrinološkom laboratoriju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Aktivni je član Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB), Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) i radne skupine Medicinski laboratoriji Hrvatske akreditacijske agencije (HAA).

Od 2010. do 2018. godine nositelj je kolegija Toksikologija na Studiju medicinsko laboratorijske dijagnostike Zdravstvenog veleučilišta u Zagrebu. Od 2009. do 2015. godine kao suradnik, sudjeluje u nastavi kolegija Bioanorganska kemija te Evaluacija instrumenata, postupaka i reagenasa na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Aktivno je sudjelovao na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova. Bio je voditelj jednog i predavač na četiri tečaja trajne edukacije HKMB, te predavač na Simpoziju HDMBLM. Autor je i koautor 6 znanstvenih članaka objavljenih u časopisima indeksiranim u *Current Contents* i *Web of Science Core Collection*, 2 znanstvena članka u ostalim časopisima, 9 sažetaka kongresnih priopćenja objavljenim u časopisima s međunarodnom recenzijom, 5 sažetaka kongresnih priopćenja objavljenih u knjigama sažetaka te 5 poglavlja u knjigama i obrazovnim materijalima.

Popis objavljenih radova i kongresnih priopćenja

Znanstveni radovi u časopisima indeksiranim u *Current Contents (CC)*

1. Marijančević D, Vrkić N, Jukić I, Bok D. Alterations in redox homeostasis following repeated sprint training. *Kinesiology* 2020;52(1):19-29. <https://doi.org/10.26582/k.52.1.3>. [Epub ahead of print].
2. Tijardović M, Marijančević D, Bok D, Kifer D, Lauc G, Gornik O, Keser T. Intense physical exercise induces an anti-inflammatory change in IgG N-glycosylation profile. *Front Physiol* 2019 Dec 20;10:1522.
3. Šoštarić M, Bokulić A, Marijančević D, Zec I. Optimizing laboratory defined macroprolactin algorithm. *Biochem Med* 2019;29(2):020706.
4. Serdar T, Derek L, Unic A, Marijancevic D, Markovic D, Primorac A, Petrovecki M. Occupational exposures in healthcare workers in university hospital dubrava – 10 year follow-up study. *Cent Eur J Public Health* 2013;21(3):150–154.
5. Romic Z, Derek L, Burek V, Unic A, Serdar T, Marijancevic D, Morovic Vergles J, Mitrovic J, Petrovecki M. Anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in HIV positive patients. *Rheumatol Int* 2011;31(12):1607-10.
6. Romic Z, Unic A, Derek L, Zivkovic M, Marijancevic D, Kes P, Pehar M. Anti-citrullinated protein antibody and rheumatoid factor in patients with end-stage renal disease. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(8):959-62.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. Unic A, Derek L, Hodak N, Marijancevic D, Ceprnja M, Serdar T, Krhac M, Romic Z. Endothelins - clinical perspectives. *Biochem Med* 2011;21(3):231-42.
2. Juricek J, Derek L, Unic A, Serdar T, Marijancevic D, Zivkovic M, Romic Z. Analytical evaluation of the clinical chemistry analyzer Olympus AU2700 plus. *Biochem Med* 2010;20(3):334-40.

Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u časopisima s međunarodnom recenzijom

1. Krtanjek S, Petek Tarnik I, Marijancevic D, Bokulic A, Bukovec Megla Z. When screening for Down syndrome do we think about the preanalytics? 4th EFLM-BD European Conference on Preanalytical Phase, Amsterdam, Netherlands, 2017. CCLM. 2017;55(4):eA1-eA66.
2. Bokulic A, Krtanjek S, Marijancevic D, Bukovec Megla Z. Simplifying ACTH preanalytical procedure. 4th EFLM-BD European Conference on Preanalytical Phase, Amsterdam, Netherlands, 2017. CCLM. 2017;55(4):eA1-eA66.
3. Marijančević D, Unić A. Utječe li nadzor Hrvatske akreditacijske agencije na učinkovitije upravljanje nesukladnostima u laboratoriju? 8. kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Rijeka, Hrvatska, 2015. Biochem Med. 2015;25(Suppl 1):S1-S158.
4. Marijancevic D, Unic A, Fucek M, Rogic D. Is there any improvement in glycolysis inhibition due to new additive mixture? 3rd EFLM-BD European Conference on Preanalytical Phase, Porto, Portugal, 2015. CCLM. 2015;53(4):eA1-eA91.
5. Unic A, Grgurevic I, Derek L, Marijancevic D, Serdar T, Romic Z. AFP-L3-screening marker for a hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic cirrhosis. 20th IFCC-EFCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Milano, Italy, 2013. Biochim Clin. 2013;37(3):07-083.
6. Ceprnja M, Serdar T, Hodak N, Zivkovic M, Marijancevic D, Romic Z. Unsuitable specimens in clinical practice: before and after an educational lecture. 2nd EFLM-BD European Conference on Preanalytical Phase, Zagreb, Croatia, 2013. Biochem Med. 2013;23(1):A1-A55.
7. Unic A, Derek L, Marijancevic D, Serdar T, Romic Z. Analytical performance of tumor markers on UniCel DxI 600 using Sigma metrics. 2nd European Joint Congress of EFCC and UEMS: Laboratory Medicine at the Clinical Interface, Dubrovnik, Croatia, 2012. Biochem Med. 2012;22(3):A21-A204.
8. Đerek L, Unić A, Juriček J, Marijančević D, Romić Ž. Koncentracije humanog fetuina-A kod bolesnika na hemodijalizi. 6th Croatian congress of medical biochemists with international participation, Supetar, Brač, Hrvatska, 2009. Biochem Med. 2009;19,Suppl1:S148-S149.

9. Romić Ž, Unić A, Đerek L, Živković M, Marijančević D. Protutijela na ciklički citrulinski protein i reumatoidni faktor u bolesnika s kroničnom bubrežnom insuficijencijom na hemodijalizi. 6th Croatian congress of medical biochemists with international participation, Supetar, Brač, Hrvatska, 2009. *Biochem Med.* 2009;19,Suppl1:S148-S149.

Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u knjigama sažetaka

1. Tijardovic M, Keser T, Kifer D, Marijancevic D, Lauc G, Gornik O. Intensive exercise induces an increase in anti- inflammatory IgG N-glycans. 2nd GlycoCom 2018 and 1st Human Glycome Project Meeting, Dubrovnik, Croatia, 2018. Book of abstracts.
2. Bolanca I, Marijancevic D, Krtanjek S, Pitner I, Bukovec Megla Z, Kuna K. The level of basal progesterone and its influence on IVF/ICSI results – what is to high? 11th Croatian Congress on Gynaecological Endocrinology, Human Reproduction and Menopause, 4th Congress of Croatian Society of Clinical Embryologists with international participation, Brijuni, Croatia, 2017. Book of abstracts.
3. Krtanjek S, Marijančević D, Bokulić A, Bukovec Megla Ž. Verifikacija metode i dinamika tendera – Jesmo li u nemogućoj misiji? Simpozij Lokus, Tuheljske toplice 2016. Knjiga sažetaka.
4. Bokulić A, Zec I, Marijančević D, Bukovec Megla Ž. Utječe li smanjenje vremena izdavanja nalaza (TAT, turn around time) na potrošnju laboratorija? Simpozij Lokus, Tuheljske toplice 2016. Knjiga sažetaka.
5. Marijančević D, Petek Tarnik I, Bokulić A, Bukovec Megla Ž. Doprinosi li izbor in house protokola za određivanje katekolamina boljem financijskom poslovanju laboratorija? Simpozij Lokus, Tuheljske toplice 2016. Knjiga sažetaka.

Poglavlja u knjigama i obrazovnim materijalima

1. Analiza rizika, novost u medicinsko-biokemijskom laboratoriju ili novi pojam za dobro poznate procese. U: Ines Vukasović. Analize, planovi, komunikacija – ključni čimbenici kvalitete i unaprjeđenja poslovanja medicinsko-biokemijskog laboratorija. Priručnik za trajno usavršavanje Hrvatske komore medicinskih biokemičara (Medicinska naklada, Zagreb, studeni 2019.).

2. Korionski gonadotropin – što, kako i kada određivati? U: Domagoj Marijančević. Planiranje i nadzor trudnoće – multidisciplinarni pristup. Priručnik za trajno usavršavanje Hrvatske komore medicinskih biokemičara (Medicinska naklada, Zagreb, studeni 2018.).
3. Osiguranje kontrole kvalitete. U: Ivana Baršić. Pretrage uz bolesnika - izazov za laboratorijsku medicinu. Priručnik za trajno usavršavanje Hrvatske komore medicinskih biokemičara (Medicinska naklada, Zagreb, studeni 2016.).
4. Pristupi uspostavljanja sustava upravljanja kvalitetom u medicinsko-biokemijskom laboratoriju. U: Ines Vukasović. Cjelovito upravljanje kvalitetom. Priručnik za trajno usavršavanje Hrvatske komore medicinskih biokemičara (Medicinska naklada, Zagreb, ožujak 2015.).
5. Dio XII. Laboratorijska medicina – odabrani primjeri laboratorijskih nalaza (Slučajevi za studente). U: Jadranka Sertić i suradnici. Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi (Drugo, dopunjeno i obnovljeno izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 201

ALTERATIONS IN REDOX HOMEOSTASIS FOLLOWING REPEATED SPRINT TRAINING

Domagoj Marijančević¹, Nada Vrkić², Igor Jukić³, and Daniel Bok³

¹Laboratory of Endocrinology, Department of Oncology and Nuclear Medicine, Sestre Milosrdnice University Hospital Center, Zagreb, Croatia

²Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia; Department of Clinical Chemistry, Sestre Milosrdnice University Hospital Center, Zagreb, Croatia

³Faculty of Kinesiology, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Original scientific paper

DOI: 10.26582/k.52.1.3

Abstract:

This study examined the effects of a 6-week repeated sprint training on redox-based homeostasis and their association with muscle damage. Fifteen male physical education students (aged 20.0±1.0 years; body weight 77.7±6.0 kg; height 181.0±4.4 cm; %body fat 8.7±3.0 %), familiar with intermittent activities, volunteered to participate in the study. Experimental training program consisted of 2-3 sets of 6-10 straight-line or shuttle 20-m repeated sprints with departures every 25 seconds and a 2-minute inter-set passive recovery. The training intervention lasted six weeks during which 18 training sessions were performed. The levels were measured of the following: 15-F_{2t}-isoprostanes in plasma and 24-hour urine; superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in erythrocytes; uric acid and creatine kinase in serum after the first and the penultimate training session. The level of muscle damage following the repeated sprint exercise was not significantly altered (402 to 496 U/L; p=.151) and had no significant associations with the changes in markers depicting redox-homeostasis. A significant increase in plasma 15-F_{2t}-isoprostanes (0.32 to 0.56 ng/mL; p=.026), and a subsequent decrease in glutathione reductase (7.7 to 3.4 U/g Hb; p<.001) were observed. Urinary 15-F_{2t}-isoprostane levels were 25% greater at post-training, although this increase did not reach statistical significance. These results indicate that repeated sprint training stimulates the equilibrium in redox homeostasis developing antioxidant protection to the constantly increasing training load.

Key words: training program, muscle damage, oxidative stress, 15-F_{2t}-isoprostanes, antioxidant status, high-intensity interval training

Introduction

Regular physical exercise is recognized as an important contributor to health (Garber, et al., 2011). However, acute response to exercise results in the increased production of reactive oxygen species (ROS), which may lead to oxidative stress (OS) (Finaud, Lac, & Filaire, 2006). An excessive ROS production can cause cellular damage and chronic inflammation, which is associated with the development of various diseases (de Sousa, et al., 2017), and accentuate aging process (Bouzid, Filaire, McCall, & Fabre, 2015). Besides being responsible for cellular damage, ROS are also important molecules that serve as secondary messengers in skeletal muscle signaling cascades, so their role is essential for muscle adaptation after training (Lewis, Howatson, Morton, Hill, & Pedlar, 2015). The production of ROS is dependent on exercise intensity and volume (Knez, Jenkins, & Coombes,

2014) and it can vary considerably depending on the athletes' fitness level, training phase and environmental conditions (Lewis, et al., 2015). However, negative post-exercise effects of acute OS can be counteracted to a certain degree by the acute increase of antioxidants such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) (Finaud, et al., 2006). These acute reactions to exercise seem to cause a decrease in pro-oxidants and an increase in antioxidants after periods of physical training regardless of intensity, volume and type of exercise (de Sousa, et al., 2017). Generally, exercise training of any kind is recommended to all populations because it may protect them from OS by reinforcing their antioxidant defenses.

Repeated sprint training (RST) is a form of a high-intensity interval training (HIIT) in which short-duration all-out sprints are interspersed with

short recovery periods (Buchheit & Laursen, 2013a). This type of training is often used by team sports players since, during a game, they are required to perform repeated bursts of intensive activities interspersed with very short recovery periods (Bishop, Girard, & Mendez-Villanueva, 2011). Indeed, RST has shown to be effective in improving power, speed, repeated sprint ability and endurance, which may transfer positively on players' game performance (Taylor, Macpherson, Spears, & Weston, 2015). Besides being used to improve athletes' fitness, HIIT formats have recently become a very popular and time-efficient training strategy for health improvement among general population (Gibala, 2007). Studies show that HIIT is very effective in improving cardiorespiratory fitness in sedentary population (Weston, Taylor, Batterham, & Hopkins, 2014) and cardiometabolic health in normal and overweight/obese people (Batacan, Duncan, Dalbo, Tucker, & Fenning, 2017) as well as in patients with various chronic cardiometabolic diseases (Weston, Wisløff, & Coombes, 2014). Although HIIT has been recognized and accepted as an effective training modality for fitness and health improvement, there is very little information about the effects of RST, a specific HIIT format, on health in general and, especially, on alterations in redox homeostasis (ARH). Namely, a great anaerobic demand, stemming from the repeated all-out sprints, and increasing aerobic contribution throughout a bout, as the sprints are done with very little recovery in between, may increase the production of ROS and cause OS. Previous studies have reported conflicting results in which an increase (Clifford, et al., 2016; Escobar, et al., 2009; Jówko, Długołęcka, Makaruk, & Cieśliński, 2015; Peart, et al., 2013), no change (Bloomer, et al., 2006; Clifford, et al., 2016; Farney, et al., 2012; Leeder, et al., 2014) and even a decrease (Goods, et al., 2016) in OS markers were observed following an acute repeated sprint (RS) exercise. Similarly, an increase (Escobar, et al., 2009; Jówko, et al., 2015), no change (Peart, et al., 2013) and a decrease (Farney, et al., 2012) in parameters of antioxidant capacity/activity were observed after acute RS exercises. These discrepancies in acute responses can be attributed to different modes and protocols of RS exercises used in the studies, to the differences in study participants' fitness levels, as well as in ARH markers used for analysis and in measurement time-points. Such opposing acute responses render the prediction of chronic adaptation to RST almost impossible. Namely, in a single study investigating training effects of a cycling RST on antioxidant activity Hellsten, Apple, and Sjödin (1996) reported that six weeks of RST, consisting of three training sessions per week, did not lead to an increase of muscle antioxidant enzymes, while a much more intensive one week training period,

consisting of two training sessions per day for seven consecutive days, did lead to a significant increase in muscle GPx and GR. These findings suggest that the level of antioxidant protection in the muscles is related to training volume. As most training programs used in practice follow undulating and progressive increase in training volume to induce adaptation-optimal stress, it is important to investigate whether these constant increases in volume could create positive ARH and provide protection from more intensive RS exercises that are utilized at the end of the training program. Additionally, since Hellsten et al. (1996) used cycling repeated sprints and only measured antioxidant activity, there is still a lack of information about the effects of running RST protocols on both the OS and antioxidant activity. As opposed to cycling, which is an activity comprised of concentric muscle actions only, running, and especially sprinting, is an activity in which high-intensity eccentric muscle contractions are represented. As eccentric contractions are mostly responsible for inducing muscle damage (Douglas, Pearson, Ross, & McGuigan, 2016) and the muscle damage is reported to be one of the important factors contributing to the increase of OS (Nikolaidis, et al., 2008), it is important to investigate the effects of running RS exercise on ARH.

Therefore, the main aim of the study was to investigate the effects of a running RST on the markers of OS and antioxidant activity. Additionally, the study investigated whether muscle damage serves as a contributing factor in ARH after a training period. It was hypothesized that a six-week RST would result in the reduction of OS and in the increment of antioxidant activity, and that these alterations would be influenced by a reduced post-training muscle damage.

Methods

Participants

Fifteen male physical education students volunteered to participate in the study (age 20.0 ± 1.0 years; body weight 77.7 ± 6.0 kg; body height 181.0 ± 4.4 cm; % body fat 8.7 ± 3.0 %). A statistical power analysis was performed for sample size estimation, based on the data from a published study (Margonis, et al., 2007). With a power of 0.90 and a two-tailed level set at 0.05, the minimum number of participants required to detect a 6.4-fold increase of the 15-F_{2t}-isoprostanes (15-F_{2t}-IsoP) concentration (SD=10 ng/mL) was estimated as twelve. 15-F_{2t}-IsoP has been selected because it is widely regarded as the gold standard marker for the assessment of oxidative perturbations in the redox biology of exercise. Participants were recruited for the study through oral announcements of the study, which were delivered on several occasions at the begin-

ning of their university classes. All participants were screened for cardiovascular diseases, muscle injuries or ongoing medical treatment with the Physical Activity Readiness Questionnaire (PAR-Q) before their inclusion into the experimental protocol. The basic inclusion criterion was nonparticipation in any organized physical activity program or sport for three months before and throughout the study. Participants were, however, allowed to be physically active and to exercise during practical classes they were obligated to undertake as their course requirement. As they were physical education students, all participants were either former athletes or had participated in extensive training of a certain sport, so they were familiar with intermittent activities. Participants were instructed to refrain from alcohol and cigarette as well as antioxidant supplementation consumption throughout the study. Before the study, the experimental procedures and potential risks were explained in detail to the participants and they all provided written informed consent. The study was designed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb.

Study design

The experimental protocol was carried out within nine weeks. Anthropometric measurements were performed during the first and the final week of the experimental protocol along with the other fitness tests which were required as this study was conducted as a part of a larger sports physiology study. In order to familiarize the participants with the training program, two 60-minute familiarization training sessions were scheduled during the second week. The training intervention started on the third week and lasted for six weeks during which 18 training sessions were performed. Training sessions were scheduled on the same time of the day (from 4 to 6 pm), three times a week, with a 48-hour lag between the sessions. All training sessions were performed in a handball-court gym on a wooden floor and were supervised by a strength and conditioning coach. In order to test the protective effects of undulating increase in training load on OS and antioxidant activity, blood samples were

taken after the first intervention training session (pre-training time point), which was least intensive, and the penultimate training session (post-training time point), which was the most intensive one. Blood samples were taken within 20 minutes after the training sessions. This protocol is justified by a relatively short elimination half-life of 15-F_{2t}-IsoP in blood. Judging from the studies that measured 15-F_{2t}-IsoP immediately after exercise, it appears that the plasma 15-F_{2t}-IsoP levels return to baseline values in less than one hour after exercise cessation.

Training intervention

Each training session started with the standardized warm-up consisting of low-intensity running, dynamic stretching and progressive short-distance accelerations for the total duration of 18 minutes. The main part of the session consisted of 2-3 sets of 6-10 straight-line or shuttle 20-meter repeated sprints with departures every 25 seconds and a 2-minute inter-set passive recovery (Table 1). Recovery between sprints was active as the participants were required to jog back to the starting line and assume starting position three seconds before the audio signal for the next sprint. The entire training protocol for each session was prerecorded as an audio file and was then played on a personal computer, so that timing for the commencement of each sprint and duration of recovery interval could be fully controlled. After the starting signal, the participants were required to run the 20-m distance as fast and possible. As this study was conducted as a part of a larger study in which two experimental groups were formed, 12 participants performed straight-line repeated sprints while the other three participants performed shuttle repeated sprints in all training sessions. The total training volume in both groups was equal, so this difference between the two experimental protocols should not be reflected in the results of this particular study; therefore, we decided to conduct the analysis on pooled data. In order to comply with the progression and undulation principle of the training, the number of sets and repetitions was progressively increased throughout the six-week intervention period. During the intervention period, each partici-

Table 1. Experimental training program

	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6
Monday	2 × 6 × 20 m 12 sprints	3 × 6 × 20 m 18 sprints	2 × 8 × 20 m 16 sprints	3 × 8 × 20 m 24 sprints	2 × 10 × 20 m 20 sprints	3 × 10 × 20 m 30 sprints
Wednesday	2 × 6 × 20 m 12 sprints	3 × 6 × 20 m 18 sprints	2 × 8 × 20 m 16 sprints	3 × 8 × 20 m 24 sprints	2 × 10 × 20 m 20 sprints	3 × 10 × 20 m 30 sprints
Friday	2 × 6 × 20 m 12 sprints	3 × 6 × 20 m 18 sprints	2 × 6 × 20 m 12 sprints	3 × 8 × 20 m 24 sprints	2 × 10 × 20 m 20 sprints	2 × 6 × 20 m 12 sprints
Total weekly training load	36 sprints 720 m	54 sprints 1080 m	44 sprints 880 m	72 sprints 1440 m	60 sprints 1200 m	72 sprints 1440 m

pant executed 338 sprints and covered 6,760 meters in total. This training program was chosen as it elicits significant improvements in maximal oxygen uptake, speed, agility, power and repeated sprint ability (Bok, Jukić, Milanović, & Gregov, 2015). In order to maintain maximal intensity throughout the entire training session, a constant verbal encouragement was provided by the training supervisor.

Anthropometric measurements

Anthropometric measurements were performed in the fitness laboratory during the first and the ninth week. Portable anthropometer (Holtain, Instruments Ltd., Crosswell, UK) was used for measuring body height, while segmental body composition analyzer (BC-418, Tanita Corporation, Tokio, Japan) was used for assessing body weight and body fat percentage. Anthropometric measurements were taken by the same experienced member of the fitness laboratory staff.

Blood and urine sampling

Blood was collected within 20 minutes post-exercise after each experimental phase, at the same time at each stage to control for diurnal variation in analytes concentrations. Phlebotomy was performed after at least 15 minutes of resting in a seated position by the expert phlebotomists according to the national recommendations for venous blood sampling issued by the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine (Nikolac, Šupak-Smolčić, Šimundić, & Čelap, 2013). All blood samples were drawn from the antecubital vein, using a 20-G straight needle (BD), directly into K₂EDTA vacuum tubes (1 x 2 mL; BD, Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) and serum vacuum tubes with clot activator (1 x 10 mL; BD, Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA). EDTA tubes were immediately centrifuged (at 1370 x g for 10 minutes) to separate erythrocytes from plasma, while serum tubes were left to clot for 45 min before centrifugation. All biochemistry routine parameters were measured immediately after the serum preparation. Subsequently, erythrocytes were washed three times with a cold isotonic saline solution. Erythrocytes, plasma, and serum supernatant were aspirated into a series of 1 mL aliquots and stored at - 80 °C until analysis.

A 24-hour urine sample was collected four days post-exercise, following each experiment phase, using a plastic container (1 x 3000 mL; Vacutest Kima, PD, Italy). Participants were previously trained in how to accurately collect a 24-hour urine sample. When the collection was completed, the total urine volume was measured upon arrival in the laboratory. The total 24-hour urine sample was agitated to obtain homogeneous aliquots. One 10

mL aliquot of each participant's urine sample was stored at - 80 °C for later analysis.

Biochemical markers of muscle damage and redox-based homeostasis

Creatine kinase (CK) and uric acid (UA) were determined using AU2700 plus analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), according to the manufacturer's specifications and using proprietary reagents: N-acetylcysteine-activated IFCC UV method (CK) and uricase/peroxidase colorimetric method (UA).

Plasma levels of free 15-F_{2t}-IsoP were measured using a competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) kit (Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, USA). Solid-phase extraction (SPE) was carried out with Oasis HLB extraction plate 10 mg, 30 µm SPE columns (Waters, Milford, MA, USA). Plasma (1 mL; pH adjusted to 3) was pre-purified on a C18 Sep Pak column and then loaded onto a Silica Sep Pak column. After two wash steps, the bound 15-F_{2t}-IsoP was eluted from the SPE column with a mixture of ethyl acetate/heptane and evaporated to dryness. Before performing ELISA, samples were reconstituted in 1 mL of dilution buffer (provided with the kit) and the assay was performed as recommended by the manufacturer. The standard curve ranged between 0.05 and 100 ng/mL 15-F_{2t}-IsoP. According to the information provided, the antibody cross-reacts weakly with 9 α ,11 β -prostaglandin-F_{2 α} (4.1%) and 13,14-dihydro-15-keto-F_{2 α} (3%). Within-laboratory precision (% CV intra-assay variation based on the standard curve samples run in triplicates over five days) was less than 20%.

15-F_{2t}-IsoP levels in 24-hour urine were quantified using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as described in the manufacturer's protocol (Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, USA). To eliminate interferences due to non-specific binding, a 24-hour urine sample (1 mL) was diluted 1:4 using enhanced dilution buffer before performing the assay. Oxford Biomedical Research has found that an average of 50% of the isoprostane excreted in human urine is conjugated to glucuronic acid. The extent of glucuronidation among individuals ranges significantly from 28% to 80%. In addition, specimens were pre-treated with β -glucuronidase prior to the analysis in order to provide a more accurate assessment of redox-based homeostasis. The assay range, precision and the cross-reactivity of the antibody were the same as described above for the corresponding plasma kit.

Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in erythrocytes were evaluated by the spectrophotometric method using commercially available kits (RANSOD,

RANSEL, and GLUT RED, respectively; Randox, Crumlin, UK). The antioxidant enzyme activities were measured at 37 °C and expressed in U/g Hb. Hemoglobin was assessed by a standard cyanmethemoglobin method, on ADVIA 2120i hematology analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Germany). Within-laboratory precision (% CV intra-assay variation based on the control samples run in triplicates over five days) for SOD, GPx, and GR were 6.5, 5.8, and 5.4%, respectively.

Statistical analysis

Normality of data distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test. Statistical significance of the pre- to post-differences were tested by Wilcoxon matched pairs test and the data were presented as the median and interquartile range (IQR). Relations between data were analyzed by Spearman correlation analysis. Level of statistical significance was set at $p < .05$. Statistical analysis was performed using MedCalc Statistical Software version 19.1 (MedCalc Software bv, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2019).

Results

The RST program did not affect the marker of muscle damage since no significant post-training difference was determined in CK activities (Table 2).

The responses of the redox-based homeostasis markers induced by the RST program are presented in Table 2. The statistically significant changes were observed in repeated measures of plasma 15-F_{2t}-IsoP concentration and GR activity. While the median plasma 15-F_{2t}-IsoP increased by 75% (from 0.32 to 0.56 ng/mL; $p = .026$), the median GR decreased by 56% (from 7.7 to 3.4 U/g Hb; $p < .001$; Figure 1).

In 24-hour urine samples, 15-F_{2t}-IsoP levels were 25% greater in post-training, although these increases did not reach statistical significance. In addition, following the RST, erythrocyte SOD and GPx activities were 11% and 27% lower, although these decreases were not statistically significant. Serum UA concentration remained close to the baseline values throughout the training program, showing no time effects (Table 2).

Table 2. Changes in the biochemical markers of muscle damage and redox-based homeostasis induced by the repeated sprint training program

Biochemical marker (unit)	Pre	Post	p
CK (U/L)	402 (288 to 579)	496 (414 to 812)	.151
Plasma 15-F _{2t} -IsoP (ng/mL)	0.32 (0.13 to 0.57)	0.56 (0.30 to 1.24)	.026 *
Urinary 15-F _{2t} -IsoP (ng/24h)	1.02 (0.77 to 1.72)	1.31 (0.91 to 1.99)	.121
SOD (U/g Hb)	372.3 (300.8 to 431.4)	354.2 (310.2 to 392.0)	.489
GPx (U/g Hb)	16.6 (12.5 to 28.1)	13.2 (11.9 to 17.0)	.119
GR (U/g Hb)	7.7 (5.0 to 9.0)	3.4 (3.3 to 3.8)	<.001 *
Uric acid (μmol/L)	300 (275 to 338)	325 (290 to 347)	.229

Note. Values are presented as median (interquartile range). Abbreviations: Pre – time point after the first training session; Post – time point after the penultimate repeated sprint training; CK – creatine kinase; 15-F_{2t}-IsoP – 15-F_{2t}-isoprostane; SOD – superoxide dismutase; GPx – glutathione peroxidase; GR – glutathione reductase; * – significant difference in comparison to the Pre value ($p < .05$).

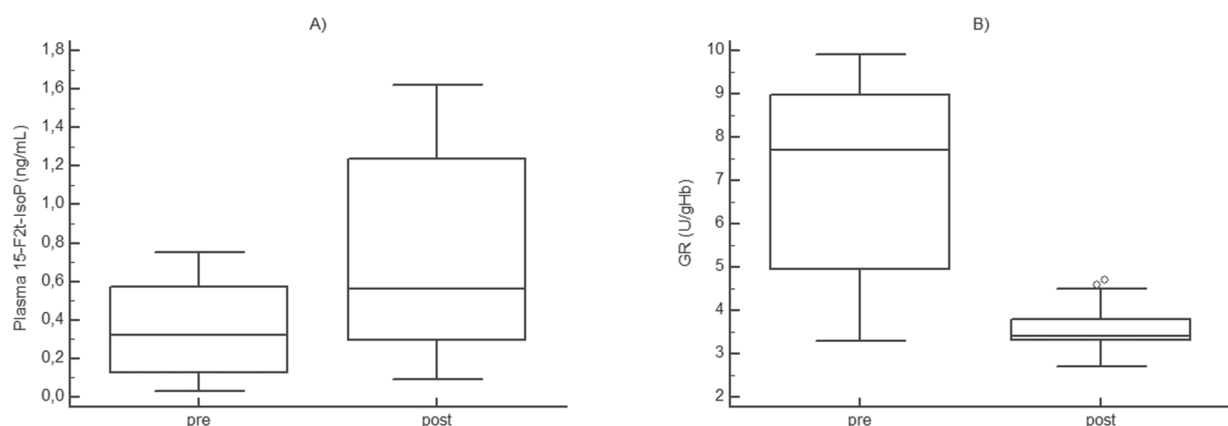


Figure 1. Statistically significant pre- to post-differences in ARH markers caused by RST; A) plasma 15-F_{2t}-IsoP (ng/mL) and B) GR (U/g Hb). Values are presented as median (interquartile ranges). Abbreviations: GR – glutathione reductase; Pre – time point after the first training session; Post – time point after the penultimate repeated sprint training.

Table 3. Spearman's rank correlation between biochemical markers of muscle damage and redox-based homeostasis induced by the repeated sprint training program

	Correlation coefficient (r) (95% Confidence Interval for r)	p
Δ CK vs. Δ plasma 15-F _{2t} -IsoP	0.35 (-0.20 to 0.73)	.200
Δ CK vs. Δ urinary 15-F _{2t} -IsoP	0.04 (-0.48 to 0.54)	.889
Δ CK vs. Δ SOD	0.07 (-0.46 to 0.56)	.800
Δ CK vs. Δ GPx	0.14 (-0.40 to 0.61)	.612
Δ CK vs. Δ GR	-0.09 (-0.58 to 0.44)	.752
Δ CK vs. Δ Uric acid	0.10 (-0.44 to 0.58)	.723

Note. Abbreviations: Δ – the mean difference (%) between measurements at different time points; 15-F_{2t}-IsoP – 15-F_{2t}-isoprostane; SOD – superoxide dismutase; GPx – glutathione peroxidase; GR – glutathione reductase.

There were no significant correlations between pre-to-post change in CK and pre-to-post change in any marker of redox homeostasis (Table 3).

Discussion and conclusions

This was the first study to report the effects of a 6-week running RST on ARH and their association with muscle damage. The main findings of the study were that: 1) the level of muscle damage following RS exercise was not significantly altered after the RST program; 2) there was a significant increase in plasma 15-F_{2t}-IsoP and a non-significant increase in the urinary 15-F_{2t}-IsoP after the RST program; 3) there was a significant decrease in GR, but not in any other marker of antioxidant activity after the RST program; and 4) the pre-to-post training changes in markers depicting ARH established no significant associations with the pre-to-post changes in CK.

The level of CK obtained at the pre- and post-training time points suggests that a high muscle damage occurs as a result of the RS exercise. This was consistent with the previously published studies in which similar CK values of 592 U/L were registered (Clifford, et al., 2016); however, even much higher values of 776 U/L (Howatson & Milak, 2009) and 1120.7 U/L (Woolley, Jakeman, & Faulkner, 2014) were also reported after different running RS exercises. Interestingly, much lower CK values of 230.6 U/L (Jówko, et al., 2015) and 166 U/L (Bloomer, et al., 2006) were reported in studies investigating cycling RS exercises, which was probably caused by a different muscle action utilized in cycling versus running. Lower CK values obtained in our study were probably due to the less stressful RS exercise utilized here in comparison to the ones utilized in other running RS studies. Indeed, the RS exercises analyzed in our study were comprised of two sets of six 10 × 20-m sprinting and three sets of 10 × 20-m sprinting prior to the initial and the final measurement, respectively, while the 40 × 15 m (Woolley, et al., 2014), 15 × 30 m (Howatson & Milak, 2009) and 20 × 30 m (Clifford, et al., 2016) RS protocols were used in other studies. Since those

RST protocols were comprised of longer sprint distances ran within a single set (Clifford et al., 2016; Howatson & Milak, 2009) and even had a greater number of repetitions (Woolley, et al., 2014), a greater metabolic and neuromuscular stress could be expected in those studies (Buchheit & Laursen, 2013b), which could then induce a greater muscle damage. However, different measurement time points also contributed to dissimilar CK values as the blood drawing procedure was performed within the first hour post-exercise in this study, while the reported peak CK values in other studies were obtained 24 hours post-exercise. Namely, peak CK values are usually reached 24 hours after high-intensity sport activities in which RS sequences are frequently executed (Silva, et al., 2018). Interestingly, 1-hour post-exercise CK values, reported in some of the above-cited studies, were 362 U/L (Clifford, et al., 2016) and 376 U/L (Woolley, et al., 2014), which was similar to the values obtained in the present study. It can be implicated that the level of muscle damage in our study was even greater, but the measurement time point prevented us from capturing the peak CK values. Nonetheless, we can conclude that the level of muscle damage was very high as such CK values were actually compatible to the ones registered after a competitive soccer match (Bok & Jukić, 2019). Somewhat contrary to the expectations of CK decrease in post-training measurement as the participants are getting accustomed to the increasing training load, no significant change in the level of muscle damage was observed, and even an increase of 23% in post-training CK was registered. Of course, a more demanding RS exercise, executed immediately prior to the post-training measurement, was probably the main reason why there was no significant decrease in CK values. Additionally, the absence of significance in change can partially be explained by very high inter-individual variability of CK (Russell, et al., 2015) which may influence the sensitivity of CK for longitudinal monitoring (Meister, der Füntten, & Meyer, 2014). However, the fact that there was no significant increase in muscle damage post-training, even

though the RS exercise done immediately prior to the post-training measuring point had 60% greater number of sprints and overall distance run, indicates a certain level of adaptation was developed to this type of training. It appears that this 6-week RST program is suitable for athletes of a similar fitness level as were the participants in this study, to maintain, or even alleviate, the level of muscle damage during the period of the increasing training load implementation, which is common for the preseason training in team sports. If the program had been too intensive and stressful for the participants, the acute increases in training load would probably have caused an accumulation of muscle damage. Such accumulation of CK throughout the intensified 6-week training period resulting in overreaching was already reported in rugby league players (Coutts, Reaburn, Piva, & Rowsell, 2007). Obviously, the participants in our study were more on the path of getting accustomed than overreached to the constantly increasing training load.

The markers of OS increased following the training period and this increase in plasma 15-F_{2t}-IsoP was statistically significant. This was again contrary to our expectations as numerous studies showed a decrease of pro-oxidants following physical training in general (de Sousa, et al., 2017). Additionally, the results of just a few studies in which ARH following different types of HIIT were investigated actually reported the same. Bogdanis et al. (2013) reported a significant reduction of protein carbonyls (PC) and a non-significant decrease of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) following three weeks of sprint interval training consisting of four to six 30-second all out sprints. A significant reduction of TBARS, but not of PC, was also reported following eight weeks of HIIT consisting of eighteen 1-minute intervals performed at 120 to 140% of VO_{2peak} and separated by 2-minute rest intervals performed at 65% VO_{2peak} in master runners (Vezzoli, et al., 2014). Finally, after only three HIIT sessions consisting of four 30-second cycling sprints performed at 90% of maximal anaerobic power and separated by 4-minute active rest intervals, Fisher et al. (2011) reported a reduced acute response of TBARS following the session, indicating a reduction of oxidative stress as a result of even such a short training period. Generally, all HIIT formats investigated so far induced the same chronic adaptation after a training period, i.e. they led to the reduction of OS. Unfortunately, the only study that investigated ARH following an actual RST did not measure markers of OS, but only GPx, GR and SOD as markers of antioxidant capacity (Hellsten, et al., 1996), so no comparison with our study was possible. Contrary to the aforementioned studies, OS in this study was assessed through plasma and urinary 15-F_{2t}-IsoP levels as this marker had been proven to be stable in body

fluids and, therefore, is considered the best marker of lipid peroxidation *in vivo* (Basu, 2004). Unfortunately, due to different blood analysis techniques utilized in other studies (Goods et al., 2016; Leeder et al., 2014), it was impossible to make any comparisons with the OS levels recorded in our study. Plasma and urinary 15-F_{2t}-IsoP levels were 75% and 25% greater at post-training, respectively, with the plasma 15-F_{2t}-IsoP increase being statistically significant. Therefore, the main finding of our study was that following an intensive RST program significantly greater OS was obtained only in plasma marker, probably because the post-training RS exercise had 60% greater workload in comparison to the pre-training one. The fact that urinary 15-F_{2t}-IsoP was not significantly greater at post-training may suggest that the training program did offer some kind of protection from OS. Namely, Knez et al. (2014) showed that constantly increased weekly training volume was responsible for the significantly increased OS following 30 km cycling time trial and this increase in OS was significantly associated with the increase in training volume ($r=0,71$; $p<.001$). The authors concluded that this was probably due to the inadequate recovery from training sessions as even resting OS significantly increased over the 8-week training period. Additionally, acute OS response was shown to be intensity- and workload-dependent as significantly greater plasma lipid hydroperoxides concentrations were obtained following a low-volume high-intensity interval exercise than following a moderate-intensity cycling bout (Wadley, Chen, Lip, Fisher, & Aldred, 2016). Therefore, greater levels of plasma and urinary 15-F_{2t}-IsoP obtained at post-training are probably the result of a combination of inadequate recovery, resulting from constantly increasing 6-week training volume, and a higher acute OS response due to the 60% greater workload of post-training RS exercise. Assuming that a significant correlation between training volume and the post-training 15-F_{2t}-IsoP levels exist (Knez, et al., 2014) and that the greater exercise workload elicits greater OS response (Wadley, et al., 2016), the fact that the increase in urinary 15-F_{2t}-IsoP level was much lower (25%) than the increase of the total training volume from the first to the final week (100%), and the increase of exercise workload (60%) suggest that RST may actually cause attenuation of OS, conforming to the results of other studies analyzing exercise programs in general (de Sousa, et al., 2017).

Following RST, a decrease in GR, GPx and SOD was obtained, with only GR reaching statistical significance, thus indicating reduced antioxidant activity. On the other hand, serum UA showed a non-significant increase in the post-training measurement. Again, this was contrary to the findings of the meta-analysis indicating that physical training in general induced an increase in antioxidant param-

eters (de Sousa, et al., 2017). This was also contrary to the results of the studies in which interval training programs were evaluated as significant increases in GPx, catalase (CAT) and total antioxidant capacity (TAC) were obtained following three weeks of HIIT program (Bogdanis, et al., 2013). On the other hand, no significant change in CAT, SOD and GPx was found after a HIIT program consisting of only three all-out sprint cycling sessions (Fisher, et al., 2011) as well as in resting TAC following four and eight weeks of HIIT (Vezzoli, et al., 2014). Also, no significant change in GPx, GR and SOD following six weeks of training was reported in the only study that investigated the effects of RST on muscle antioxidant enzymes (Hellsten, et al., 1996). However, in the same study, a significant increase in GPx and GR, but not in SOD was reported following one week of intensified RST, thus indicating that increased activity of muscle antioxidant enzymes was volume-dependent (Hellsten, et al., 1996). As no increase in muscle damage was observed, the authors suggested that this increase in post-training antioxidant activity was mainly due to an elevation in metabolically induced oxygen radical formation since cycling sprints were performed at the intensity corresponding to 300-400% of the intensity eliciting maximal oxygen uptake (Hellsten, et al., 1996). A volume-dependent significant increase in CAT following 8-week intensified cycling training was also observed by Knez et al. (2014). This increase in CAT was, however, a result of the upregulation of the antioxidant system in order to prevent excessive oxidative damage as significant increase in OS markers was also observed (Knez, et al., 2014). However, although chronic effects of exercise usually induce an increase in antioxidant activity, the acute reaction to high-intensity exercise might actually induce reduction in antioxidants, which may also be intensity-dependent. Namely, Farney et al. (2012) reported a significant decrease in CAT immediately after ten 15-second sprints, while the decrease in CAT following 60 minutes of moderate-intensity aerobics was not statistically significant. The immediate non-significant reduction in CAT was also observed following the cycling RS exercise in the Peart et al. (2013) study as well. However, both studies actually reported an increase in antioxidants within one to two hours following this initial drop that occurred immediately post-exercise, thus exhibiting the underlying mechanism responsible for the chronic upregulation of antioxidant status (Farney, et al., 2012; Peart et al., 2013). Therefore, it seems that this significant reduction in GR, obtained immediately post-exercise following a training period in our study, was probably a result of a necessity for greater antioxidant counteract to a greater OS, caused by a 60% more stressful post-training RS exercise. The main ROS generating mechanism during RS

exercise is probably ischemia-reperfusion process (Morales-Alamo & Calbet, 2014) since intensive, anaerobic exercises are associated with a transient muscle hypoxia when oxygen supply cannot match energy demands (Volllaard, Shearman, & Cooper, 2005). This is probably the reason why reduction was registered in SOD, GPx and GR, all involved in the ischemia-reperfusion process, while the non-significant increase was reported in UA, which is an end-product of purine metabolism (Finaud, et al., 2006) with a rather fast upregulating acute response to exercise via the activity of xanthine oxidase (Morales-Alamo & Colbet, 2014). Therefore, this significant reduction of GR, probably stimulated with a significant increase of OS post-training, might suggest that the participants were actually developing an antioxidant protection necessary to attenuate oxidative damage of their erythrocytes being imposed by an extremely stressful anaerobic exercise.

Although some studies suggest that muscle damage might be responsible for the increase in blood and muscle OS (Nikolaidis, et al., 2008), there were no significant associations between changes in CK and changes in any of the redox homeostasis markers found in our study. The absence of associations between the markers of muscle damage and OS was also found in other studies investigating acute responses to RS exercises (Bloomer, et al., 2006; Clifford, et al., 2016; Leeder, et al., 2014). In all these studies significant increase in CK was observed without the significant increase in OS markers, suggesting that muscle damage might have a limited role in inducing OS, at least during certain forms of RS exercises. High anaerobic fitness (Bloomer, et al., 2006), increased antioxidant enzyme activity after a prolonged intermittent-endurance training (Leeder, et al., 2014), and the difference in biochemical markers analyzed as well as the analytical techniques used (Clifford, et al., 2016) were all suggested as reasons for the absence of OS following a muscle damaging exercise. On the other hand, although the significant decrease in post-training CK as well as in the post-training OS markers was observed following three weeks of sprint interval training (Bogdanis, et al., 2013), the authors did not statistically test associations between these variables, therefore, it remained unknown whether the post-training OS was really attenuated by the attenuation of muscle damage. Additionally, no connection of CK and antioxidant enzyme activities was found in the only running RST study investigating chronic effects (Hellsten, et al., 1996) so the authors concluded that the increase in GPx and GR post-training was mostly due to the metabolically induced oxygen radical formation. It appears that the level of muscle damage needs to be rather great, like after a downhill running, to become a major contributor to the increase in OS

as after a muscle-damaging exercise, OS is mostly achieved through the oxidation of neutrophils and other phagocytic cells engaged in tissue reparation (Nikolaidis, et al., 2008). Although the exercise mode was running and, therefore, the level of CK was high in this study, the pre- to post-training change in CK was obviously not that great to present a significant impact on the significant increase and decrease of post-training OS and GR, respectively. This was probably because even the pre-training RS exercise was highly muscle damaging and post-training RS exercise could not elicit any further increase in CK. Additionally, the chosen assessment time points at which biological material was sampled might also be contributors to the blurring of any possible associations between them. Namely, peak CK is usually obtained one or even two days post-exercise, while the OS markers peak within several hours post-exercise (Michailidis, et al., 2007). Anyway, it seems that the adaptations in redox homeostasis were more altered through other OS mechanisms, such as the ischemia-reperfusion process and lactate production (Finaud, et al., 2006), as RS exercises were of high anaerobic nature (Buchheit & Laursen, 2013b).

The limitation of the study was that blood and urine samples were not taken before and at several time points after the first and the penultimate RS training session; consequently, an acute reaction to RS exercises could not be determined. Also, it was impossible to compare 15-F_{2t}-IsoP results between the studies due to the lack of method standardization.

In conclusion, we showed for the first time that RST may stimulate the balance in redox homeostasis. Significant increase in OS coupled with a significant reduction in GR at post-training are probably the result of a more stressful post-training RS exercise and, therefore, may suggest that RTS actually leads to the reduction in OS and may provide antioxidant protection. The level of muscle damage following RS exercise was not changed after the RST program and showed not to be associated with changes in markers representing ARH. Our findings suggest that healthy trained individuals involved in RS exercises should not be concerned about the increased oxidative stress because such a condition does not seem to occur in this type of training intervention.

References

- Basu, S. (2004). Isoprostanes: Novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free Radical Research*, 38(2), 105-122.
- Batacan, R.B., Duncan, M.J., Dalbo, V.J., Tucker, P.S., & Fenning, A.S. (2017). Effects of high-intensity interval training on cardiometabolic health: A systematic review and meta-analysis of intervention studies. *British Journal of Sports Medicine*, 51(6), 494-503.
- Bishop, D., Girard, O., & Mendez-Villanueva, A. (2011). Repeated-sprint ability – Part II. Recommendations for training. *Sports Medicine*, 41(9), 741-756.
- Bloomer, R.J., Falvo, M.J., Fry, A.C., Schilling, B.K., Smith, W.A., & Moore, C.A. (2006). Oxidative stress response in trained men following repeated squats or sprints. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 38(8), 1436-1442.
- Bogdanis, G.C., Stavrinou, P., Fatouros, I.G., Philippou, A., Chatzinikolaou, A., Draganidis, D., Ermidis, G., & Maridaki, M. (2013). Short-term high-intensity interval exercise training attenuates oxidative stress responses and improves antioxidant status in healthy humans. *Food and Chemical Toxicology*, 61, 171-177.
- Bok, D., & Jukić, I. (2019). Muscle damage during a soccer World Cup preparatory and competition period. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, ahead of print. doi: <https://doi.org/10.1123/ijssp.2019-0084>
- Bok, D., Jukić, I., Milanović, D., & Gregov, C. (2015). Improving repeated sprint ability: Repeated sprint vs shuttle repeated sprint training. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 47(5, Suppl. 1), 543.
- Bouzid, M.A., Filaire, E., McCall, A., & Fabre, C. (2015). Radical oxygen species, exercise and aging: An update. *Sports Medicine*, 45, 1245-1261.
- Buchheit, M., & Laursen, P.B. (2013a). High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle. Part 1: Cardiopulmonary emphasis. *Sports Medicine*, 43(5), 313-338.
- Buchheit, M., & Laursen, P.B. (2013b). High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle. Part 2: Anaerobic energy, neuromuscular load and practical application. *Sports Medicine*, 43(10), 927-954.
- Clifford, T., Berntzen, B., Davison, G.W., West, D.J., Howatson, G., & Stevenson, E.J. (2016). Effects of beetroot juice on recovery of muscle function and performance between bouts of repeated sprint exercise. *Nutrients*, 8(8), 506. doi: 10.3390/nu8080506.

- Coutts, A.J., Reaburn, P., Piva, T.J., & Rowsell, G.J. (2007). Monitoring for overreaching in rugby league players. *European Journal of Applied Physiology*, 99(3), 313-324.
- de Sousa, C.V., Sales, M.M., Rosa, T.S., Lewis, J.E., de Andrade, R.V., & Simões, H.G. (2017). The antioxidant effect of exercise: A systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine*, 42(2), 277-293.
- Douglas, J., Pearson, S., Ross, A., & McGuigan, M. (2016). Eccentric exercise: Physiological characteristics and acute responses. *Sports Medicine*, 47(4), 663-675.
- Escobar, M., Oliveira, M.W.S., Behr, G.A., Zantotto-Filho, A., Ilha, L., Dos Santos Cunha, G., de Oliveira, A.R., & Moreira, J.C.F. (2009). Oxidative stress in young football (soccer) players in intermittent high intensity exercise protocol. *Journal of Exercise Physiology Online*, 12(5), 1-10.
- Farney, T.M., McCarthy, C.G., Canale, R.E., Schilling, B.K., Whitehead, P.N., & Bloomer, R.J. (2012). Absence of blood oxidative stress in trained men after strenuous exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 44(10), 1855-1863.
- Finlaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress: Relationship with exercise and training. *Sports Medicine*, 36(4), 327-358.
- Fisher, G., Schwartz, D.D., Quindry, J., Barberio, M.D., Foster, E.B., Jones, K.W., & Pascoe, D.D. (2011). Lymphocyte enzymatic antioxidant responses to oxidative stress following high-intensity interval exercise. *Journal of Applied Physiology*, 110(3), 730-737.
- Garber, C.E., Blissmer, B., Deschenes, M.R., Franklin, B.A., Lamonte, M.J., Lee, I.M., Nieman, D.C., & Swain, D.P. (2011). Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: Guidance for prescribing exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 43(7), 1334-1359.
- Gibala, M. (2007). High-intensity interval training: A time-efficient strategy for health promotion. *Current Sports Medicine Reports*, 6(4), 211-213.
- Goods, P.S.R., Dawson, B., Landers, G.J., Gore, C.J., Croft, K., & Peeling, P. (2016). Effect of repeated-sprint training in hypoxia on post-exercise interleukin-6 and F2-isoprostanes. *European Journal of Sport Science*, 16(8), 1047-1054.
- Hellsten, Y., Apple, F.S., & Sjödin, B. (1996). Effect of sprint cycle training on activities of antioxidant enzymes in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 81(4), 1484-1487.
- Howatson, G., & Milak, A. (2009). Exercise-induced muscle damage following a bout of sport specific repeated sprints. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 23(8), 2419-2424.
- Jówko, E., Długołęcka, B., Makaruk, B., & Cieśliński, I. (2015). The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced oxidative stress parameters in male sprinters. *European Journal of Nutrition*, 54(5), 783-791.
- Knez, W.L., Jenkins, D.G., & Coombes, J.S. (2014). The effect of an increased training volume on oxidative stress. *International Journal of Sports Medicine*, 35(1), 8-13.
- Leeder, J.D.C., van Someren, K.A., Gaze, D., Jewell, A., Deshmukh, N.I.K., Shah, I., Barker, J., & Howatson, G. (2014). Recovery and adaptation from repeated intermittent-sprint exercise. *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 9(3), 489-496.
- Lewis, N.A., Howatson, G., Morton, K., Hill, J., & Pedlar, C.R. (2015). Alterations in redox homeostasis in the elite endurance athlete. *Sports Medicine*, 45(3), 379-409.
- Margonis, K., Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Douroudos, I., Chatzinikolaou, A., Mitrakou, A., Mastorakos, G., Papassotiriou, I., Taxildaris, K., & Kouretas, D. (2007). Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: Implications for diagnosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(6), 901-910.
- Meister, S., der Füntten, K., & Meyer, T. (2014). Repeated monitoring of blood parameters for evaluating strain and overload in elite football players: Is it justified? *Journal of Sports Sciences*, 32(13), 1328-1331.
- Michialidis, Y., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Fatouros, I.G., Koutedakis, Y., Papassotiriou, I., Kouretas, D. (2007). Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 39(7), 1107-1113.
- Morales-Alamo, D., & Calbet, J.A.L. (2014). Free radicals and sprint exercise in humans. *Free Radical Research*, 48(1), 30-42.
- Nikolac, N., Šupak-Smolčić, V., Šimundić, A.M., & Čelap, I. (2013). Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: National recommendations for venous blood sampling. *Biochemia Medica*, 23(3), 242-254.
- Nikolaidis, M.G., Jamurtas, A.Z., Paschalis, V., Fatouros, I.G., Koutedakis, Y., & Kouretas, D. (2008). The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: Magnitude and time-course considerations. *Sports Medicine*, 38(7), 579-606.

- Peart, D.J., Kirk, R.J., Hillman, A.R., Madden, L.A., Siegler, J.C., & Vince, R.V. (2013). The physiological stress response to high-intensity sprint exercise following the ingestion of sodium bicarbonate. *European Journal of Applied Physiology*, 113(1), 127-134.
- Russell, M., Northeast, J., Atkinson, G., Shearer, D.A., Sparkes, W., Cook, C.J., & Kilduff, L.P. (2015). Between-match variability of peak power output and creatine kinase responses to soccer match-play. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 29(8), 2079-2085.
- Silva, J.R., Rumpf, M.C., Hertzog, M., Castagna, C., Farooq, A., Girard, O., & Hader, K. (2018). Acute and residual soccer match-related fatigue: A systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine*, 48(3), 539-583.
- Taylor, J., Macpherson, T., Spears, I., & Weston, M. (2015). The effects of repeated-sprint training on field-based fitness measures: A meta-analysis of controlled and non-controlled trials. *Sports Medicine*, 45(6), 881-891.
- Vezzoli, A., Pugliese, L., Marzorati, M., Serpiello, F.R., La Torre, A., & Porcelli, S. (2014). Time-course changes of oxidative stress response to high-intensity discontinuous training versus moderate-intensity continuous training in master runners. *PLoS One*, 9(1), e87506
- Vollaard, N.B.J., Shearman, J.P., & Cooper, C.E. (2005). Exercise induced oxidative stress: Myths, realities and physiological relevance. *Sports Medicine*, 35(12), 1045-1062.
- Wadley, A.J., Chen, Y.W., Lip, G.Y.H., Fisher, J.P., & Aldred, S. (2016). Low volume-high intensity interval exercise elicits antioxidant and anti-inflammatory effects in humans. *Journal of Sports Sciences*, 34(1), 1-9.
- Weston, M., Taylor, K.L., Batterham, A.M., & Hopkins, W.G. (2014). Effects of low-volume high-intensity interval training (HIIT) on fitness in adults: A meta-analysis of controlled and non-controlled trials. *Sports Medicine*, 44(7), 1005-1017.
- Weston, K.S., Wisløff, U., & Coombes, J.S. (2014). High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Sports Medicine*, 48(16), 1227-1234.
- Woolley, B.P., Jakeman, J.R., & Faulkner, J.A. (2014). Multiple sprint exercise with a short deceleration induces muscle damage and performance impairment in young, physically active males. *Journal of Athletic Enhancement*, 3(2). doi: <http://dx.doi.org/10.4172/2324-9080.1000144>

Submitted: November 13, 2019

Accepted: January 21, 2020

Published Online First: March 9, 2020

Correspondence to:

Domagoj Marijančević, M.D.

European Specialist in Laboratory Medicine

(EuSpLM)

Endocrinology Laboratory

Department of Oncology and Nuclear Medicine

Sestre Milosrdnice University Hospital Center

Vinogradska 29, 10000 Zagreb, Croatia

Phone: +385989480437,

E-mail: domagoj.marijancevic@kbcsm.hr



Intense Physical Exercise Induces an Anti-inflammatory Change in IgG N-Glycosylation Profile

Marko Tijardović^{1*}, Domagoj Marijančević², Daniel Bok³, Domagoj Kifer¹,
Gordan Lauc^{1,4}, Olga Gornik¹ and Toma Keser^{1*}

¹ Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Zagreb, Croatia, ² Endocrinology Laboratory, Department of Oncology and Nuclear Medicine, University Hospital Centre Sestre Milosrdnice, Zagreb, Croatia, ³ Faculty of Kinesiology, University of Zagreb, Zagreb, Croatia, ⁴ Genos Glycoscience Research Laboratory, Zagreb, Croatia

OPEN ACCESS

Edited by:

Brian Keith McFarlin,
University of North Texas,
United States

Reviewed by:

Asghar Abbasi,
Harbor-UCLA Medical Center,
United States
Anand Thirupathi,
Hebei Normal University, China

*Correspondence:

Marko Tijardović
mtijardovic@pharma.hr
Toma Keser
tkeser@pharma.hr

Specialty section:

This article was submitted to
Exercise Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 29 May 2019

Accepted: 03 December 2019

Published: 20 December 2019

Citation:

Tijardović M, Marijančević D,
Bok D, Kifer D, Lauc G, Gornik O and
Keser T (2019) Intense Physical
Exercise Induces an Anti-inflammatory
Change in IgG N-Glycosylation Profile.
Front. Physiol. 10:1522.
doi: 10.3389/fphys.2019.01522

Exercise is known to improve many aspects of human health, including modulation of the immune system and inflammatory status. It is generally understood that exercise reduces inflammation, but there are missing links in terms of understanding the mechanisms as well as the differences between exercise modalities. N-glycosylation of immunoglobulin G (IgG) and total plasma proteins was previously shown to reflect changes in inflammatory pathways, which could provide valuable information to further clarify exercise effects. In order to further expand the understanding of the relationship between physical activity and inflammation, we examined the effect of intense exercise, in the form of repeated sprint training (RST), on IgG and total plasma proteins N-glycosylation in combination with traditionally used inflammation markers: C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL-6), and leukocyte count. Twenty-nine male physical education students were separated into treatment (RST, $N = 15$) and control ($N = 14$) groups. The RST group completed a 6-week exercise protocol while the control group was instructed to refrain from organized physical activity for the duration of the study. Three blood samples were taken at different time points: prior to start of the training program, the final week of the exercise intervention (EXC), and at the end of the 4-week recovery period (REC). Following the end of the recovery period IgG N-glycosylation profiles showed anti-inflammatory changes in RST group compared to the control group, which manifested as a decrease in agalactosylated ($p = 0.0473$) and an increase in digalactosylated ($p = 0.0473$), and monosialylated ($p = 0.0339$) N-glycans. Plasma protein N-glycans didn't change significantly, while traditional inflammatory markers also didn't show significant change in inflammatory status. Observed results demonstrate the potential of intense physical exercise to reduce levels of systemic basal inflammation as well as the potential for IgG N-glycosylation to serve as a sensitive longitudinal systemic inflammation marker.

Keywords: IgG, glycans, N-glycome, inflammation, exercise, repeated sprint training

INTRODUCTION

Exercise has long been known to improve many aspects of human health, having wide range of beneficial effects on musculoskeletal, metabolic and even cognitive functions. As a result, continuous physical exercise reduces the risk of cardiovascular diseases, diabetes, certain types of cancer, osteoporosis as well as depression (Kruk, 2007). Furthermore, many studies have shown that exercise reduces levels of basal inflammation which could be one of the mechanisms responsible for the observed health benefits (Beavers et al., 2010; Hamer et al., 2012; Pedersen, 2017).

During and after synthesis, most proteins undergo structural modification in which glycans, complex oligosaccharides, are attached to their backbone. This process is called glycosylation and blood plasma proteins are no exception to this mechanism. Most glycans present on plasma proteins are classified as N-glycans since they are attached by amide linkage to the nitrogen of the protein's asparagine. In order for asparagine to be able to receive N-glycan, it has to be part of the Asn-X-Ser/Thr amino acid sequence, where X is any amino acid except proline. Glycosylation is a highly regulated process which is in different ways affected by almost any physiological and pathophysiological change in the organism. As a result, provoked changes in glycosylation are not random and they show repeatable patterns for different ways the homeostasis is being disrupted. Glycans regulate the cellular and humoral immune responses, including assembly of peptide-loaded major histocompatibility complexes (MHC) antigens, reorganization of T-cell receptor complexes, modulation of immune receptor clustering, endocytosis, receptor signaling, and immunoglobulin functions (Verhelst et al., 2019). The immune system contains different classes of glycan-binding proteins, including C-type lectins, galectins, and siglecs, which are expressed by immune cells and can be secreted. Glycan-binding proteins regulate leukocyte trafficking, pathogen recognition, immune cell activation, and immunosuppression (Verhelst et al., 2019). Many studies have found altered glycosylation patterns in chronic inflammatory and autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis (Parekh et al., 1985), inflammatory bowel disease (Trbojević Akmačić et al., 2015), systemic lupus erythematosus (Tomana et al., 1992), diabetes mellitus (Keser et al., 2017), cardiovascular disease risk and subclinical atherosclerosis (Menni et al., 2018), and many others, such as cancer and infections (Ohtsubo and Marth, 2006; Moremen et al., 2012; Pinho and Reis, 2015). Although less pronounced, it is even possible to associate lifestyle habits such as smoking with individual's glycan profile (Knežević et al., 2010). These observations demonstrate the wide scope of glycan involvement in chronic diseases, indicating that changes in glycosylation could be used as diagnostic and prognostic markers for many different diseases as well as assessing the general health status of an individual.

Apart from being the most abundant antibody in our body, IgG is also one of the most studied glycoproteins. Each IgG molecule has two conserved glycosylation sites, one for each of its heavy chains at Asn-297 of the constant heavy (CH2) domain (Krapp et al., 2003). In addition to conserved IgG Fc glycans, ~15–25% of serum IgG contains glycans within the variable

domains (van de Bovenkamp et al., 2016). Different glycans attached to these glycosylation sites can alter IgG's conformation, stability and half-life, but even more importantly, its affinity for Fc receptors. By changing this affinity, its effector functions are altered causing it to become more or less inflammatory (Jennewein and Alter, 2017). Glycans that lack terminal galactose activate complement and make IgG pro-inflammatory, while the addition of galactose decreases inflammatory potential of IgG (Malhotra et al., 1995; Karsten et al., 2012; Mihai and Nimmerjahn, 2013). Further extension of IgG glycans by the addition of sialic acid dramatically changes the physiological role of IgG, converting it from a pro-inflammatory into an anti-inflammatory agent. Terminal α 2,6-sialylation of IgG glycans decreases the ability of IgG to bind to activating Fc γ Rs and promotes recognition by the C-type lectin dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-grabbing non-integrin (DC-SIGN), which increases expression of inhibitory Fc γ RIIB and is anti-inflammatory (Anthony et al., 2011; Quast et al., 2015). However, these findings have not been confirmed in all studies (Boyd et al., 1995; Campbell et al., 2014; Issekutz et al., 2015). IgG galactosylation is strongly associated with aging and it decreases to less than 50% of its maximal value through lifetime (Yamada et al., 1997; Krištić et al., 2014). Only three IgG glycans are sufficient to explain up to 58% of variance in chronological age, significantly more than other markers of biological age like telomere lengths (Krištić et al., 2014). Furthermore, it is well-established that increased abundance of agalactosylated IgG glycans has been found in various diseases and states with an underlying inflammatory component: infectious diseases [hepatitis C infection (Mehta et al., 2008), HIV infection (Moore et al., 2005)], autoimmune diseases [rheumatoid arthritis (Parekh et al., 1985, 1988; Van Zeben et al., 1994; van de Geijn et al., 2009), juvenile chronic arthritis (Bond et al., 1997; Flögel et al., 1997), Crohn's disease (Dubé et al., 1990; Trbojević Akmačić et al., 2015), ulcerative colitis (Dubé et al., 1990; Trbojević Akmačić et al., 2015), systemic lupus erythematosus (Vučković et al., 2015), myositis (Perdivara et al., 2011)], and cancer [prostate cancer (Kanoh et al., 2004), lung cancer (Kanoh et al., 2006), ovarian cancer (Saldova et al., 2007), gastric cancer (Ruhaak et al., 2015), breast cancer (Kawaguchi-Sakita et al., 2016)]. At the same time, increased levels of IgG digalactosylation and sialylation are acting in an anti-inflammatory manner (Gudelj et al., 2018). Therefore, IgG glycosylation pattern cannot be used as a stand-alone disease-specific biomarker and is of more value as a biomarker of general immune activation (de Jong et al., 2016) and an excellent marker of a person's general health state (Gudelj et al., 2018).

Very little research has been done on the effects of exercise either on total plasma N-glycosylation or IgG N-glycosylation. Recently published study (Sarin et al., 2019) investigated a number of molecular pathways, including IgG N-glycosylation, explaining immunosuppression in individuals undergoing prolonged periods of intense training with low-energy availability. They observed IgG glycosylation status alteration toward pro-inflammatory activity. However, changes in the abundance of distinct glycan peaks were mostly observed after the weight loss period and the effect of the intense exercise alone could not be inferred (main aim of the study was to assess the

effect of energy deprivation leading to substantial fat mass loss). Other relevant studies focused on relation of exercise and GlycA levels, a glycan biomarker of systemic inflammation, where decreasing levels of GlycA following exercise were observed (Bartlett et al., 2017; Barber et al., 2018). However, training interventions investigated in the aforementioned studies were all comprised of either moderate (40–55% VO₂max) and/or high-intensity (65–80% VO₂max) aerobic exercise (Bartlett et al., 2017; Barber et al., 2018). So far, there are no studies available in the literature in which inflammatory effects of anaerobic all-out exercises were investigated. Repeated sprint training (RST) is an increasingly popular training program comprised of short-duration maximal-effort sprints separated with up to 30-s recovery periods (Girard et al., 2011). This type of training induces great metabolic stress and may lead to acute attainment of VO₂max (Buchheit and Laursen, 2013). Due to much greater intensity at which RST is executed in comparison to moderate and high-intensity aerobic training and due to much greater eccentric muscle contractions elicited while sprinting as opposed to running or jogging, leading to a greater level of subsequent muscle damage, this type of training may provide stimulus for greater anti-inflammatory adaptations. As short-duration high-intensity activities became very popular even among general population as a time-efficient strategy for health improvement (Batacan et al., 2017), it is of utmost importance to investigate its potential for inducing positive adaptations of the immune system. Therefore, we aimed to investigate the way 6-week RST affects IgG and total plasma N-glycan profiles in healthy individuals. In order to get more detailed insight into inflammatory activities, along with glycosylation, we also analyzed traditionally used inflammatory markers: C-reactive protein (CRP), interleukin 6 (IL-6) as well as leukocyte count. Additionally, as general population usually follows an undulating pattern of undergoing intensive training phases followed by periods of complete exercise cessation, which leads to detraining (Mujika and Padilla, 2000), we were also interested in residual effects of relatively short-volume RST on parameters of immune activity. Therefore, this longitudinal intervention study performed on 29 individuals out of which 14 served as controls, was designed with three assessment time-points: before and immediately after the penultimate training session of the 6-week training period and following 1-month detraining period.

MATERIALS AND METHODS

Participants

Twenty-nine male physical education students volunteered to participate in the study. They were recruited for the study through oral announcements about commencement of the study which were delivered on several occasions at the beginning of their university classes. All participants were screened for cardiovascular diseases, muscle injuries or ongoing medical treatment using the Physical Activity Readiness Questionnaire (PAR-Q) before their inclusion into the experimental protocol. Basic inclusion criteria involved non-participation in any

organized physical activity program or sport for 3 months before and throughout the study. Participants were, however, allowed to be physically active and exercise during practical classes they were obligated to undertake as their course requirement. As they were physical education students all participants were either former athletes or had been extensively trained in a certain sport, so they all were familiar with intermittent activities. Participants were instructed to refrain from alcohol and cigarette consumption as well as antioxidant supplementation throughout the study. For the purpose of the study the participants were randomly selected into either experimental (RST) or control group (**Table 1**). Before the commencement of the study, the experimental procedures and potential risks were fully explained to all participants and they all provided written informed consent. The study was designed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Study Design

Intervention group underwent 6-week long exercise protocol which consisted of 18 progressively more intense exercise sessions. Main part of sessions included 2–3 sets with 6–10 repetitions of 20-m sprints, with departures every 25 s and 2-min inter-set passive recovery. Blood samples were taken simultaneously from all participants at three time points: before the training intervention protocol, immediately after the most intense, penultimate exercise session, and 1-month following the end of EXC protocol. For detailed protocol description and blood sampling information please refer to **Supplementary Material**.

Laboratory Analysis of Traditional Inflammation Markers

C-reactive protein was measured in plasma down to very low concentrations on Beckman Coulter AU System (AU 2700 plus) with CRP Latex reagent (Highly sensitive application). In this procedure, decreasing intensity of transmitted light (increasing absorbance) through reaction solution reflects the formation of complexes during the immunological reaction between the subject's plasma CRP and the rabbit anti-CRP-antibodies coated latex particles. The within-run precision was $\leq 5\%$ CV or SD ≤ 0.02 mg/L and the total precision was $\leq 10\%$ CV or SD ≤ 0.02 mg/L.

Interleukin-6 levels in plasma were measured using ultrasensitive sandwich ELISA assay as described in the manufacturer's protocol (BioVendor Laboratory Medicine, Inc., Brno, Czechia). The standard curve ranged between 1.56 and 50 pg/mL IL-6. The assay recognizes both natural and

TABLE 1 | Descriptive data for participants in the experimental (RST) and control group shown as mean and standard deviation.

	RST <i>n</i> = 15	Control <i>n</i> = 14
Age (years)	20.0 ± 1.0	19.5 ± 0.7
Height (cm)	181.0 ± 4.4	180.2 ± 6.9
Weight (kg)	77.7 ± 6.0	77.8 ± 12.9
Body fat (%)	8.7 ± 3.0	9.8 ± 4.8

recombinant human IL-6. To define the specificity of this ELISA, several proteins were tested for cross-reactivity. There was no cross-reactivity observed for any protein tested (IL-1a, IL-1b, IL-10, IL-12, IFN γ , IL-4, TNF α , IL-8, and IL-13). The overall intra-assay coefficient of variation was calculated to be 4.4%.

A complete blood cell count was performed on ADVIA 2120 (Siemens Healthcare Diagnostics), immediately after sampling.

IgG Isolation

Immunoglobulin G was isolated from plasma by affinity chromatography using 96-well protein G monolithic plates (BIA Separations, Ljubljana, Slovenia) as described previously (Pučić et al., 2011). Briefly, 100 μ L of plasma was diluted 10 \times with PBS and then applied to the protein G plate and instantly washed. IgGs were eluted with 1 mL of 0.1 M formic acid (Merck, Darmstadt, Germany) and immediately neutralized with 1 M ammonium bicarbonate (Acros Organics, NJ, United States).

IgG N-Glycans Release and Labeling

Dried IgG samples were resuspended and denatured by incubation with 30 μ L SDS (1.33% wt/vol; Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) at 65°C for 10 min. Subsequently, 10 μ L of 4% Igepal-CA630 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) and 1.2 u PNGase F (Promega, Madison, WI, United States) in 10 μ L 5 \times PBS were added. The samples were incubated overnight at 37°C to allow release of N-glycans. The released N-glycans were labeled with 2-AB. The labeling mixture was freshly prepared by dissolving 2-AB (19.2 mg/ml; Sigma-Aldrich) and 2-picoline borane (44.8 mg/ml; Sigma-Aldrich) in a mixture of DMSO (Sigma-Aldrich) and glacial acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) (70:30, vol/vol). Labeling mixture (25 μ L) was added to each N-glycan sample in the 96-well plate, which was then sealed using adhesive seal. Mixing was achieved by shaking for 10 min, followed by incubation at 65°C for 2 h. To each sample (75 μ L), 700 μ L of acetonitrile (ACN) (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, United States) was added. Free label and reducing agent were removed from the samples using HILIC solid-phase extraction (SPE). A GHP filter plate, 0.2 μ m (Pall Corporation, Ann Arbor, MI, United States) was used as the stationary phase. All wells were prewashed using 1 \times 200 μ L of ethanol/water (70:30, vol/vol) and 1 \times 200 μ L water, followed by equilibration using 1 \times 200 μ L of ACN/water (96:4, vol/vol). Solvent was removed by the application of a vacuum using a vacuum manifold (Millipore Corporation, Billerica, MA, United States). The samples were loaded into the wells, which were subsequently washed five times using 200 μ L of ACN/water (96:4, vol/vol). Glycans were eluted with 2 \times 90 μ L of water and combined eluates were stored at -20°C until usage.

Total Plasma Proteins N-Glycans Release and Labeling

Total plasma proteins glycans were prepared in the same way as the IgG glycans. The only difference is that, instead with dried IgG eluate, the preparation began with 10 μ L of blood plasma and with addition of 20 μ L 2% SDS (w/v) (Invitrogen, Carlsbad,

CA, United States) to each sample before the incubation at 65°C for 10 min.

Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC)-UPLC Analysis of Labeled Glycans

Fluorescently labeled N-glycans were separated by HILIC on Waters Acquity ultra-performance liquid chromatography (UPLC) instrument (Milford, MA, United States) consisting of a quaternary solvent manager, sample manager, and a FLR fluorescence detector set with excitation and emission wavelengths of 250 and 428 nm, respectively. The instrument was under the control of Empower 2 software, build 2145 (Waters, Milford, MA, United States). Labeled N-glycans were separated on a Waters bridged ethylene hybrid (BEH) Glycan chromatography column, 100 \times 2.1 mm i.d. for IgG glycans and 150 \times 2.1 mm i.d. for total plasma proteins glycans, 1.7 μ m BEH particles, with 100 mM ammonium formate, pH 4.4, as solvent A and acetonitrile as solvent B. The separation method used a linear gradient of 75–62% acetonitrile (v/v) at flow rate of 0.4 ml/min in a 25 min analytical run for IgG glycans and linear gradient of 70–53% acetonitrile (v/v) at flow rate of 0.561 ml/min in a 24.81 min analytical run for total plasma proteins glycans. The separation temperature was 60°C for IgG glycans and 25°C for total plasma proteins glycans. Samples were maintained at 10°C before injection. Data processing was performed using an automatic processing method with a traditional integration algorithm after which each chromatogram was manually corrected to maintain the same intervals of integration for all the samples. The chromatograms were all separated in the same manner into 24 peaks (**Supplementary Figure S1**) for IgG glycans and 39 peaks (**Supplementary Figure S2**) for total plasma proteins glycans and the amount of glycans in each peak was expressed as percentage of total integrated area. The system was calibrated using an external standard of hydrolyzed and 2-AB labeled glucose oligomers from which the retention times for the individual glycans were converted to glucose units. Glycan peaks were analyzed on the basis of their elution positions and measured in glucose units then compared to reference values in the “GlycoStore” database¹ for structure assignment (Campbell et al., 2008; Abrahams et al., 2018). From directly measured glycan peaks, derived traits were calculated. These derived traits average particular glycosylation features (e.g., galactosylation, fucosylation, bisecting GlcNAc, sialylation) across different individual glycan structures, and consequently they are more closely related to individual enzymatic activities and underlying genetic polymorphisms. As derived traits represent sums of directly measured glycans, they were calculated using normalized glycan measurements (**Supplementary Table S2**).

Statistical Analysis

From directly measured and normalized 24 glycan peaks for IgG and 39 glycan peaks for plasma proteins, derived traits

¹<https://glycostore.org/>

were calculated following formulas in **Supplementary Table S2**. Statistical analysis was carried out using R programming language (version 3.5.1). In order to compare changes in derived traits as a result of exercise, before the statistical analysis was performed, each subject's result was expressed as an absolute change in individual glycan trait or level of inflammation marker, relative to the baseline measurement. Linear mixed regression model was used to perform the analysis, where change in individual measurement was set as dependent variable. Time point as well as group (treatment or control) were set as independent variables, with group variable being nested inside the time point variable. As a random intercept, subjects IDs were used to minimize effects of interindividual differences. To account for multiple testing, Benjamini–Hochberg correction was used to adjust the *p*-values.

In order to describe relations between glycan traits and inflammatory markers we calculated Kendall rank correlation coefficient and presented it with unadjusted significance as a correlation matrix.

RESULTS

To investigate the effects of intense physical training on proportions of N-glycans, we conducted a longitudinal intervention study and measured the samples in three time points: before, at the peak of training program intensity (EXC), and 1 month after the intervention (recovery period, REC). We measured IgG and total plasma N-glycomes from blood plasma samples for each time point and each subject. The samples were measured by HILIC-UPLC, which produces chromatogram with 24 glycan peaks for IgG N-glycome (**Supplementary Figure S1**) and 39 peaks for plasma N-glycome (**Supplementary Figure S2**). Derived glycan traits were calculated from directly measured glycan peaks (**Supplementary Table S2**). These derived traits represent common biologically meaningful features (agalactosylation, monogalactosylation, digalactosylation, sialylation, fucosylation, etc.) shared among several measured glycans (for more details see section “Materials and Methods”). Results were compared between treatment and control group to estimate the effect of RST protocol on measured parameters.

Effect of Intense Exercise on IgG N-Glycosylation

After the analysis of IgG N-glycosylation, we compared results from EXC and REC time points to the baseline measurement for each of the seven following derived traits: agalactosylation, monogalactosylation, digalactosylation, monosialylation, disialylation, bisection, and core fucosylation. Calculated effect of exercise showed significant changes of IgG N-glycans in the last (REC) time point relative to the baseline, which includes decrease of agalactosylated N-glycans (-0.8080 , $p = 0.0473$), and increase in digalactosylated and monosialylated N-glycans (0.9949 , $p = 0.0473$ and 0.5270 , $p = 0.0339$, respectively) (**Table 2**). **Figure 1** shows changes of each IgG glycosylation

derived trait from baseline to REC for each subject represented by boxplots. Interestingly, there were no significant changes in the EXC time point, although by looking at the data in **Table 2** it is possible to see the trend in EXC toward the results observed in REC.

Effect of Intense Exercise on Total Plasma Protein N-Glycosylation

To determine whether intense exercise induces a more general change in glycosylation of multiple proteins, the effect of exercise on N-glycome of total plasma proteins was also investigated. Plasma samples were analyzed in the same way as IgG samples regarding time points and derived traits, while the only difference was presence of 14 instead of 7 calculated traits: low branching, high branching, agalactosylation, monogalactosylation, digalactosylation, trigalactosylation, tetragalactosylation, asialylation, monosialylation, disialylation, trisialylation, tetrasialylation, core fucosylation, and antennary fucosylation. The only significant effect of exercise on total plasma protein N-glycosylation was a decrease in monosialylated glycans in the third (REC) time point relative to the baseline (-1.2560 , $p = 0.0371$) (**Table 3**). **Figure 2** shows changes of each glycosylation derived trait from baseline to the end of the study represented by boxplots.

Effect of Intense Exercise on Traditional Inflammation Markers

C-reactive protein, IL-6 as well as leukocyte count have all been traditionally used to measure the extent of inflammation in patients, so we have also analyzed these markers to investigate the dynamics of change with exercise.

Opposite to the N-glycans, some inflammatory markers showed significant changes in the EXC time point while in the REC time point, after the recovery period, there were no changes compared to the baseline (**Table 4**). IL-6 as well as total leukocyte count was significantly increased in EXC (2.7837 pg/mL, $p = 0.0006$ and $1.4624 \times 10^9/L$, $p = 0.0489$, respectively). Neutrophil count also increased in EXC although the result was not statistically significant ($1.2732 \times 10^9/L$, $p = 0.0631$).

Furthermore, we investigated relationship between inflammation markers and derived glycan traits in the exercise group. For IgG N-glycans, we calculated the relationships of inflammatory markers with glycan traits related to galactose and sialic acid (**Supplementary Figure S3A**). Correlation coefficients were mostly weak and statistically insignificant, indicating there is no clear and strict relationship between derived IgG glycan traits and inflammatory markers.

Regarding total plasma proteins N-glycans we found moderate positive correlations with high branching glycans and antennary fucosylation and negative correlations with low branching glycans (**Supplementary Figure S3B**). Branching and antennary fucosylation are considered as inflammatory traits so the observed correlations were expected (Novokmet et al., 2015; Gudelj et al., 2016).

TABLE 2 | Estimated effects of training intervention on levels of individual derived IgG N-glycan traits, and their respective unadjusted and adjusted *p*-values.

	Estimate EXC	<i>p</i> -value EXC	Adj. <i>p</i> -value EXC	Estimate REC	<i>p</i> -value REC	Adj. <i>p</i> -value REC
G0	-0.2009	0.5394	0.6152	-0.8080	0.0190	0.0473
G1	-0.1040	0.5388	0.6152	-0.1710	0.3149	0.4409
G2	0.3049	0.4554	0.6152	0.9950	0.0203	0.0473
S1	0.2688	0.1283	0.6152	0.5270	0.0048	0.0339
S2	0.1430	0.2206	0.6152	0.2465	0.0399	0.0698
Bisecting	0.0901	0.5807	0.6152	0.1095	0.5030	0.5868
CoreFuc	-0.0373	0.6152	0.6152	-0.0339	0.6479	0.6479

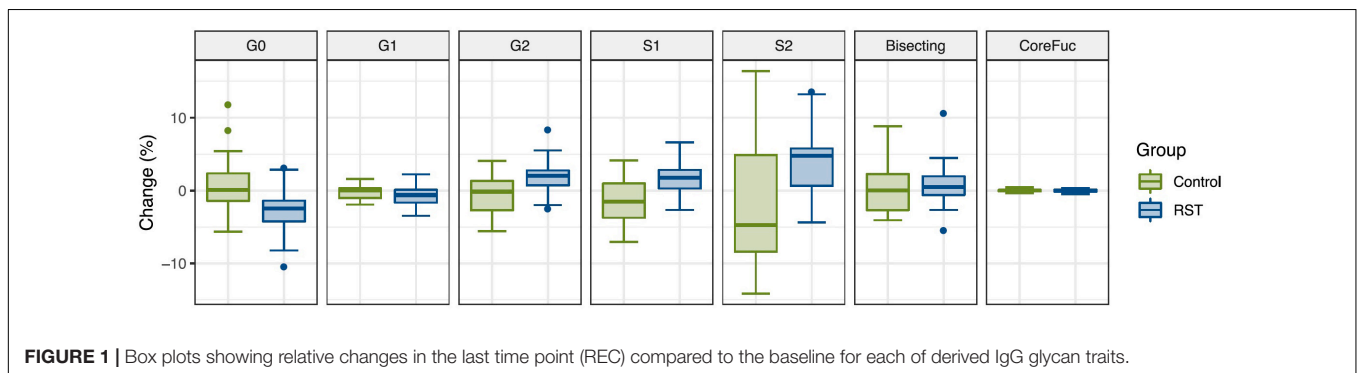
The exercise effect coefficients are calculated relative to the baseline. Significant results ($\alpha = 0.05$) are shown in bold.

DISCUSSION

In this study we aimed to investigate the effects of long term intense physical training on IgG and total plasma N-glycan profiles in healthy individuals. We conducted a longitudinal intervention study and measured the samples in three time points: before, at the peak of training program intensity, and 1 month after the intervention.

Immunoglobulin G N-glycosylation is known to reflect inflammatory and anti-inflammatory processes occurring in the

body. Our findings of decreased agalactosylated N-glycans and rise in digalactosylated and monosialylated N-glycans attached to IgG, 1 month after the end of the training protocol, suggest exercise indeed induced anti-inflammatory effects in the experimental group (Seeling et al., 2017; Gudelj et al., 2018). It is important to emphasize the fact that the observed changes in IgG glycans had the same anti-inflammatory trend in both measurements after the initial baseline measurement, despite leukocyte count being slightly elevated right after the end of EXC. This indicates that IgG N-glycans could be reflecting only

**FIGURE 1** | Box plots showing relative changes in the last time point (REC) compared to the baseline for each of derived IgG glycan traits.**TABLE 3** | Estimated effects of training intervention on levels of individual derived total plasma protein N-glycan traits, and their respective unadjusted and adjusted *p*-values.

	Estimate EXC	<i>p</i> -value EXC	Adj. <i>p</i> -value EXC	Estimate REC	<i>p</i> -value REC	Adj. <i>p</i> -value REC
LoBranch	-0.1896	0.7358	0.8905	-0.9541	0.0981	0.2746
HiBranch	0.1956	0.7270	0.8905	0.9672	0.0927	0.2746
G0	0.1120	0.6400	0.8905	-0.0980	0.6820	0.7956
G1	0.5400	0.2185	0.7646	0.0204	0.9623	0.9699
G2	-0.8416	0.1532	0.7646	-0.8765	0.1375	0.3209
G3	0.1965	0.6806	0.8905	0.8536	0.0821	0.2746
G4	-0.0009	0.9932	0.9932	0.1137	0.2924	0.4277
S0	0.7506	0.3763	0.8905	-0.4377	0.6041	0.7688
S1	-0.5685	0.1447	0.7646	-1.2561	0.0027	0.0371
S2	-0.3638	0.6154	0.8905	0.8110	0.2673	0.4277
S3	0.1806	0.6220	0.8905	0.7881	0.0387	0.2710
S4	0.0070	0.9374	0.9374	0.1079	0.2323	0.4277
CoreFuc	1.4520	0.1858	0.7646	0.0407	0.9699	0.9699
AntFuc	-0.0475	0.7632	0.8905	0.1632	0.3055	0.4277

The exercise effect coefficients are calculated relative to the baseline. Significant results ($\alpha = 0.05$) are shown in bold.

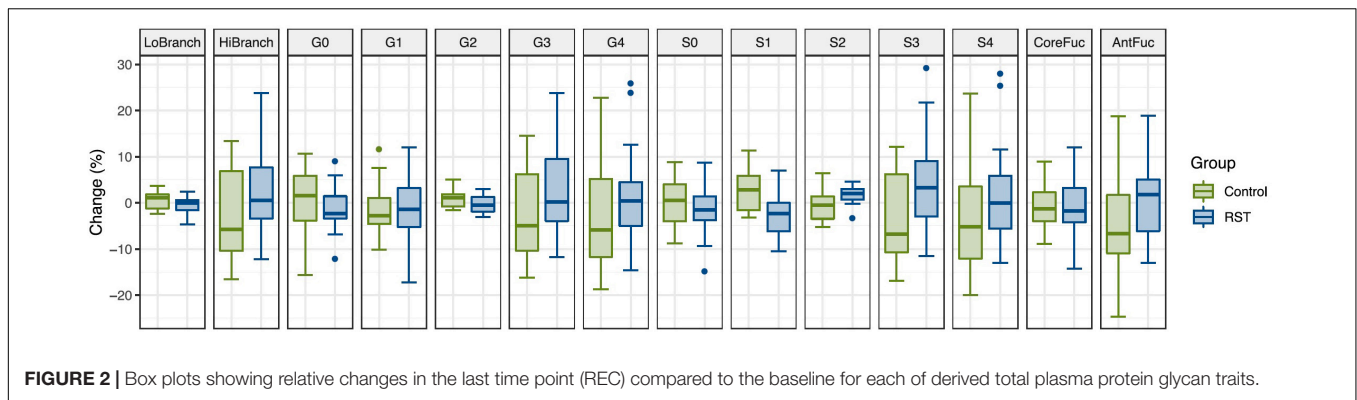


TABLE 4 | Estimated effects of training intervention on levels of inflammatory markers, and their respective unadjusted and adjusted *p*-values.

	Estimate EXC	<i>p</i> -value EXC	Adj. <i>p</i> -value EXC	Estimate REC	<i>p</i> -value REC	Adj. <i>p</i> -value REC
CRP (mg/L)	0.3074	0.5688	0.5688	0.4499	0.4059	0.8118
IL-6 (pg/mL)	2.7837	0.0002	0.0006	0.6835	0.2890	0.8118
Leu (10 ⁹ /L)	1.4624	0.0245	0.0489	-0.1338	0.8287	0.8979
Neu (10 ⁹ /L)	1.2732	0.0474	0.0632	0.0792	0.8979	0.8979

The exercise effect coefficients are calculated relative to the baseline. Significant results ($\alpha = 0.05$) are shown in bold.

general and long-term changes in inflammatory status of an individual, while not being greatly affected by acute variations which can be detected using traditional markers. Previous studies have also shown that IgG glycosylation has a great potential for monitoring and managing levels of inflammation in chronic disease patients, and other individuals with risk of inflammatory processes or even general population (Krištić et al., 2014; Novokmet et al., 2015; Menni et al., 2018). Our findings suggest that these changes in IgG glycosylation are sensitive enough to even detect subtle anti-inflammatory changes caused by an intense exercise and that IgG glycosylation could be a useful tool in assessment of new exercising methods for professional athletes. Moreover, increased levels of terminally galactosylated and sialylated IgG glycan structures in students who underwent RST indicates an improvement in their general health, since this trend of change in IgG glycosylation is associated with lower biological age and lower inflammatory status (Krištić et al., 2014; Gudelj et al., 2018). It would be interesting to investigate for how long these changes in IgG glycosylation would last, and if RST would have the same or larger effect on elder, overweight or sedentary individuals, who would largely benefit from anti-inflammatory effect of exercise. It is possible that IgG glycosylation could be used in assessing the anti-inflammatory effect of different exercise treatments in individuals with metabolic syndrome or similar conditions with underlying systemic inflammation. Pedersen and Saltin gathered evidence for therapeutic effect of exercise in 26 different chronic diseases (Pedersen and Saltin, 2015). IgG glycosylation could help to determine the best type and dose of exercise for each disease more precisely. Furthermore, this type of testing could prove to be beneficial for professional athletes in order to help them balance their training intensity and avoid development of overtraining syndrome (Carfagno and Hendrix, 2014).

In order to determine whether intense exercise induces a more general change in glycosylation of multiple proteins, we also investigated the effect of exercise on N-glycome of total plasma proteins. Decrease in total monosialylated N-glycans is the only glycosylation trait among 14 measured that was significantly different after the exercise in total plasma protein N-glycome. Since it is the only visible change, it is hard to distinguish the real cause and meaning of its change, because measured glycan levels in total plasma protein N-glycome are product of both composition of glycans attached to different proteins, as well as the relative abundance of those proteins.

Furthermore, to get more detailed insight into inflammatory activities, along with glycosylation, we also analyzed traditionally used inflammatory markers: CRP, interleukin 6 (IL-6) as well as leukocyte count. In accordance with literature, we found significant increase in plasma IL-6 following the most intense RST as a result of its release from the muscle tissue (Pedersen, 2017). IL-6 has both pro-inflammatory and anti-inflammatory properties (Scheller et al., 2011), but in context of exercise its anti-inflammatory effects dominate, and it is even considered as one of the drivers of beneficial anti-inflammatory effects of exercise (Pedersen, 2017). CRP is the most often used general marker of inflammation and in this study, we did not detect significant change in its concentration. Leukocyte count can also indicate presence of inflammation and here we detected elevated values after the most intense RST. This suggests some inflammatory activity, but the observed effect is likely arising from local acute muscle tissue inflammatory response to exercise (Peake et al., 2005; Chazaud, 2016). Based on the combination of measured parameters, particularly CRP, we cannot conclude that significant change in systemic inflammatory status was visible.

In conclusion, our study showed shift toward less inflammatory IgG N-glycosylation profile following intense

RST that manifested as decrease in agalactosylated and increase in digalactosylated and monosialylated N-glycans. Limit of the study was a relatively small sample size, but the fact that it was a longitudinal intervention study, compensates for this shortcoming to some extent. Very little research was done in terms of exercise induced changes in glycosylation, so this work presents a source of novel information, while providing foundation for future research. IgG glycosylation was sensitive enough to detect anti-inflammatory effect of intense exercise on young and healthy individuals, despite it not being clearly visible using traditional inflammation markers, suggesting its potential as promising marker for long term pro/anti-inflammatory effects of physical exercise. This finding, of course, should be confirmed on larger sample size and different exercise paradigms.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding authors.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the Ethical Committee of the University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry. The

patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TK conceived and designed the study with DM and OG. OG and GL supervised the study. MT, DM, DB, DK, and TK participated in data acquisition, collection, and analysis. All authors participated in interpretation and approved the final version of the manuscript. MT and TK drafted the manuscript. OG, GL, DM, DB, and DK critically revised the manuscript for intellectual content.

FUNDING

This study was funded by the Scientific Center of Excellence for Personalized Health Care (Grant #KK.01.1.1.01.0010) and the European Structural and Investment Funds IRI (Grant #KK.01.2.1.01.0003).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.01522/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abrahams, J. L., Campbell, M. P., and Packer, N. H. (2018). Building a PGC-LC-MS N-glycan retention library and elution mapping resource. *Glycoconj. J.* 35, 15–29. doi: 10.1007/s10719-017-9793-4
- Anthony, R. M., Kobayashi, T., Wermeling, F., and Ravetch, J. V. (2011). Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel TH2 pathway. *Nature* 475, 110–113. doi: 10.1038/nature10134
- Barber, J. L., Kraus, W. E., Church, T. S., Hagberg, J. M., Thompson, P. D., Bartlett, D. B., et al. (2018). Effects of regular endurance exercise on GlycA: combined analysis of 14 exercise interventions. *Atherosclerosis* 277, 1–6. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.07.029
- Bartlett, D. B., Slentz, C. A., Connelly, M. A., Piner, L. W., Willis, L. H., Bateman, L. A., et al. (2017). Association of the composite inflammatory biomarker GlycA, with exercise-induced changes in body habitus in men and women with prediabetes. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017, 1–12. doi: 10.1155/2017/5608287
- Batacan, R. B., Duncan, M. J., Dalbo, V. J., Tucker, P. S., and Fenning, A. S. (2017). Effects of high-intensity interval training on cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of intervention studies. *Br. J. Sports Med.* 51, 494–503. doi: 10.1136/bjsports-2015-095841
- Beavers, K. M., Brinkley, T. E., and Nicklas, B. J. (2010). Effect of exercise training on chronic inflammation. *Clin. Chim. Acta* 411, 785–793. doi: 10.1016/j.cca.2010.02.069
- Bond, A., Alavi, A., Axford, J. S., Bourke, B. E., Bruckner, F. E., Kerr, M. A., et al. (1997). A detailed lectin analysis of IgG Glycosylation, demonstrating disease specific changes in terminal galactose and N-acetylglucosamine. *J. Autoimmun.* 10, 77–85. doi: 10.1006/jaut.1996.0104
- Boyd, P. N., Lines, A. C., and Patel, A. K. (1995). The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H. *Mol. Immunol.* 32, 1311–1318. doi: 10.1016/0161-5890(95)00118-2
- Buchheit, M., and Laursen, P. B. (2013). High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: part I: cardiopulmonary emphasis. *Sports Med.* 43, 313–338. doi: 10.1007/s40279-013-0029-x
- Campbell, I. K., Miescher, S., Branch, D. R., Mott, P. J., Lazarus, A. H., Han, D., et al. (2014). Therapeutic effect of IVIG on inflammatory arthritis in mice is dependent on the Fc portion and independent of Sialylation or Basophils. *J. Immunol.* 192, 5031–5038. doi: 10.4049/jimmunol.1301611
- Campbell, M. P., Royle, L., Radcliffe, C. M., Dwek, R. A., and Rudd, P. M. (2008). GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis. *Bioinformatics* 24, 1214–1216. doi: 10.1093/bioinformatics/btn090
- Carfagno, D. G., and Hendrix, J. C. (2014). Overtraining syndrome in the athlete: current clinical practice. *Curr. Sports Med. Rep.* 13, 45–51. doi: 10.1249/JSR.0000000000000027
- Chazaud, B. (2016). Inflammation during skeletal muscle regeneration and tissue remodeling: application to exercise-induced muscle damage management. *Immunol. Cell Biol.* 94, 140–145. doi: 10.1038/icb.2015.97
- de Jong, S. E., Selman, M. H. J., Adegnik, A. A., Amoah, A. S., van Riet, E., Kruize, Y. C. M., et al. (2016). IgG1 Fc N-glycan galactosylation as a biomarker for immune activation. *Sci. Rep.* 6:28207. doi: 10.1038/srep28207
- Dubé, R., Rook, G. A., Steele, J., Brealey, R., Dwek, R., Rademacher, T., et al. (1990). Agalactosyl IgG in inflammatory bowel disease: correlation with C-reactive protein. *Gut* 31, 431–434. doi: 10.1136/gut.31.4.431
- Flögel, M., Lauc, G., Gornik, I., and Maček, B. (1997). Fucosylation and Galactosylation of IgG heavy chains differ between acute and remission phases of juvenile chronic arthritis. *Clin. Chem. Lab. Med.* 36, 99–102. doi: 10.1515/CCLM.1998.018
- Girard, O., Mendez-Villanueva, A., and Bishop, D. (2011). Repeated-sprint ability - part I: factors contributing to fatigue. *Sports Med.* 41, 673–694. doi: 10.2165/11590550-000000000-00000
- Gudelj, I., Baciarello, M., Ugrina, I., De Gregori, M., Napolioni, V., Ingelmo, P. M., et al. (2016). Changes in total plasma and serum N-glycome composition and patient-controlled analgesia after major abdominal surgery. *Sci. Rep.* 6:31234. doi: 10.1038/srep31234
- Gudelj, I., Lauc, G., and Pezer, M. (2018). Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases. *Cell Immunol.* 333, 65–79. doi: 10.1016/j.cellimm.2018.07.009

- Hamer, M., Sabia, S., Batty, G. D., Shipley, M. J., Tabák, A. G., Singh-Manoux, A., et al. (2012). Physical activity and inflammatory markers over 10 years. *Circulation* 126, 928–933. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.103879
- Issekutz, A. C., Rowter, D., Miescher, S., and Käsemann, F. (2015). Intravenous IgG (IVIG) and subcutaneous IgG (SCIG) preparations have comparable inhibitory effect on T cell activation, which is not dependent on IgG sialylation, monocytes or B cells. *Clin. Immunol.* 160, 123–132. doi: 10.1016/j.clim.2015.05.003
- Jennwein, M. F., and Alter, G. (2017). The immunoregulatory roles of antibody glycosylation. *Trends Immunol.* 38, 358–372. doi: 10.1016/j.it.2017.02.004
- Kanoh, Y., Mashiko, T., Danbara, M., Takayama, Y., Ohtani, S., Egawa, S., et al. (2004). Changes in serum IgG oligosaccharide chains with prostate cancer progression. *Anticancer. Res.* 24, 3135–3139.
- Kanoh, Y., Ohara, T., Mashiko, T., Abe, T., Masuda, N., and Akahoshi, T. (2006). Relationship between N-linked oligosaccharide chains of human serum immunoglobulin G and serum tumor markers with non-small cell lung cancer progression. *Anticancer. Res.* 26, 4293–4297.
- Karsten, C. M., Pandey, M. K., Figge, J., Kilchenstein, R., Taylor, P. R., Rosas, M., et al. (2012). Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of FcγRIIB and dectin-1. *Nat. Med.* 18, 1401–1406. doi: 10.1038/nm.2862
- Kawaguchi-Sakita, N., Kaneshiro-Nakagawa, K., Kawashima, M., Sugimoto, M., Tokiwa, M., Suzuki, E., et al. (2016). Serum immunoglobulin G Fc region N-glycosylation profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry can distinguish breast cancer patients from cancer-free controls. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469, 1140–1145. doi: 10.1016/J.BBRC.2015.12.114
- Keser, T., Gornik, I., Vučković, F., Selak, N., Pavić, T., Lukić, E., et al. (2017). Increased plasma N-glycome complexity is associated with higher risk of type 2 diabetes. *Diabetologia* 60, 2352–2360. doi: 10.1007/s00125-017-4426-9
- Knežević, A., Gornik, O., Polašek, O., Pučić, M., Redžić, I., Novokmet, M., et al. (2010). Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology* 20, 959–969. doi: 10.1093/glycob/cwq051
- Krapp, S., Mimura, Y., Jefferis, R., Huber, R., and Sondermann, P. (2003). Structural analysis of human IgG-Fc glycoforms reveals a correlation between glycosylation and structural integrity. *J. Mol. Biol.* 325, 979–989.
- Krištić, J., Vučković, F., Menni, C., Klarić, L., Keser, T., Beceheli, I., et al. (2014). Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. *J. Ser. A* 69, 779–789. doi: 10.1093/gerona/glt190
- Kruk, J. (2007). Physical activity in the prevention of the most frequent chronic diseases: an analysis of the recent evidence. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 8, 325–338.
- Malhotra, R., Wormald, M. R., Rudd, P. M., Fischer, P. B., Dwek, R. A., and Sim, R. B. (1995). Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nat. Med.* 1, 237–243. doi: 10.1038/nm0395-237
- Mehta, A. S., Long, R. E., Comunale, M. A., Wang, M., Rodemich, L., Krakover, J., et al. (2008). Increased levels of Galactose-deficient anti-gal immunoglobulin g in the sera of hepatitis c virus-infected individuals with fibrosis and cirrhosis. *J. Virol.* 82, 1259–1270. doi: 10.1128/JVI.01600-07
- Menni, C., Gudelj, I., Macdonald-Dunlop, E., Mangino, M., Zierer, J., Bečić, E., et al. (2018). Glycosylation profile of immunoglobulin g is cross-sectionally associated With cardiovascular disease risk score and subclinical atherosclerosis in two independent cohorts. *Circ. Res.* 122, 1555–1564. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312174
- Mihai, S., and Nimmerjahn, F. (2013). The role of Fc receptors and complement in autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* 12, 657–660. doi: 10.1016/j.autrev.2012.10.008
- Moore, J. S., Wu, X., Kulhavy, R., Tomana, M., Novak, J., Moldoveanu, Z., et al. (2005). Increased levels of galactose-deficient IgG in sera of HIV-1-infected individuals. *AIDS* 19, 381–389. doi: 10.1097/01.aids.0000161767.21405.68
- Moremen, K. W., Tiemeyer, M., and Nairn, A. V. (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 448–462. doi: 10.1038/nrm3383
- Mujika, I., and Padilla, S. (2000). Detraining: loss of training-induced physiological and performance adaptations. part I: short term insufficient training stimulus. *Sports Med.* 30, 79–87. doi: 10.2165/00007256-200030020-00002
- Novokmet, M., Lukić, E., Vučković, F., Durić, Ž., Keser, T., Rajšl, K., et al. (2015). Changes in IgG and total plasma protein glycomes in acute systemic inflammation. *Sci. Rep.* 4, 4347. doi: 10.1038/srep04347
- Ohtsubo, K., and Marth, J. D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126, 855–867. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.019
- Parekh, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L., Leung, A., Stanworth, D., et al. (1985). Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature* 316, 452–457. doi: 10.1038/316452a0
- Parekh, R. B., Isenberg, D. A., Ansell, B. M., Roitt, I. M., Dwek, R. A., and Rademacher, T. W. (1988). Galactosylation of IgG associated oligosaccharides: reduction in patients with adult and juvenile onset rheumatoid arthritis and relation to disease activity. *Lancet* 331, 966–969. doi: 10.1016/S0140-6736(88)91781-3
- Peake, J., Nosaka, K., and Suzuki, K. (2005). Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exerc. Immunol. Rev.* 11, 64–85.
- Pedersen, B. K. (2017). Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 47, 600–611. doi: 10.1111/eci.12781
- Pedersen, B. K., and Saltin, B. (2015). Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand. J. Med. Sci. Sports* 25, 1–72. doi: 10.1111/sms.12581
- Perdivara, I., Peddada, S. D., Miller, F. W., Tomer, K. B., and Deterding, L. J. (2011). Mass spectrometric determination of IgG subclass-specific glycosylation profiles in siblings discordant for myositis syndromes. *J. Proteom. Res.* 10, 2969–2978. doi: 10.1021/pr200397h
- Pinho, S. S., and Reis, C. A. (2015). Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer* 15, 540–555. doi: 10.1038/nrc3982
- Pučić, M., Knežević, A., Vidić, J., Adamczyk, B., Novokmet, M., Polašek, O., et al. (2011). High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG Glycome in three isolated human populations. *Mol. Cell. Proteom.* 10, M111.010090. doi: 10.1074/mcp.M111.010090
- Quast, I., Keller, C. W., Maurer, M. A., Giddens, J. P., Tackenberg, B., Wang, L.-X., et al. (2015). Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* 125, 4160–4170. doi: 10.1172/JCI82695
- Ruhaak, L. R., Barkauskas, D. A., Torres, J., Cooke, C. L., Wu, L. D., Stroble, C., et al. (2015). The serum immunoglobulin G glycosylation signature of gastric cancer. *Eupa Open Proteom.* 6, 1–9. doi: 10.1016/j.euprot.2014.11.002
- Saldova, R., Royle, L., Radcliffe, C. M., Abd Hamid, U. M., Evans, R., Arnold, J. N., et al. (2007). Ovarian cancer is associated with changes in Glycosylation in both acute-phase proteins and IgG. *Glycobiology* 17, 1344–1356. doi: 10.1093/glycob/cwm100
- Sarin, H. V., Gudelj, I., Honkanen, J., Ihalainen, J. K., Vuorela, A., Lee, J. H., et al. (2019). Molecular pathways mediating immunosuppression in response to prolonged intensive physical training, low-energy availability, and intensive weight loss. *Front. Immunol.* 10:907. doi: 10.3389/FIMMU.2019.00907
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1813, 878–888. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034
- Seeling, M., Brückner, C., and Nimmerjahn, F. (2017). Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? *Nat. Rev. Rheumatol.* 13, 621–630. doi: 10.1038/nrrheum.2017.146
- Tomana, M., Schrohenloher, R. E., Reveille, J. D., Arnett, F. C., and Koopman, W. J. (1992). Abnormal galactosylation of serum IgG in patients with systemic lupus erythematosus and members of families with high frequency of autoimmune diseases. *Rheumatol. Int.* 12, 191–194. doi: 10.1007/BF00302151
- Trbojević Akmačić, I., Ventham, N. T., Theodoratou, E., Vučković, F., Kennedy, N. A., Krištić, J., et al. (2015). Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome. *Inflamm. Bowel Dis.* 21, 1237–1247. doi: 10.1097/MIB.0000000000000372
- van de Bovenkamp, F. S., Hafkenscheid, L., Rispens, T., and Rombouts, Y. (2016). The Emerging Importance of IgG Fab Glycosylation in Immunity. *J. Immunol.* 196, 1435–1441. doi: 10.4049/jimmunol.1502136

- van de Geijn, F. E., Wuhrer, M., Selman, M. H., Willemsen, S. P., de Man, Y. A., Deelder, A. M., et al. (2009). Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. *Arthritis Res. Ther.* 11:R193. doi: 10.1186/ar2892
- Van Zeben, D., Rook, G. A. W., Hazes, J. M. W., Zwinderman, A. H., Zhang, Y., Ghelani, S., et al. (1994). Early agalactosylation of IGG is associated with a more progressive disease course in patients with rheumatoid arthritis: results of a follow-up study. *Rheumatology* 33, 36–43. doi: 10.1093/rheumatology/33.1.36
- Verhelst, X., Dias, A. M., Colombel, J.-F., Vermeire, S., Van Vlierberghe, H., Callewaert, N., et al. (2019). Protein glycosylation as a diagnostic and prognostic marker of chronic inflammatory gastrointestinal and liver diseases. *Gastroenterology* doi: 10.1053/j.gastro.2019.08.060 [Epub ahead of print].
- Vučković, F., Krištić, J., Gudelj, I., Teruel, M., Keser, T., Pezer, M., et al. (2015). Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the IgG glycome. *Arthritis Rheumatol.* 67, 2978–2989. doi: 10.1002/art.39273
- Yamada, E., Tsukamoto, Y., Sasaki, R., Yagyu, K., and Takahashi, N. (1997). Structural changes of immunoglobulin G oligosaccharides with age in healthy human serum. *Glycoconj. J.* 14, 401–405. doi: 10.1023/a:1018582930906

Conflict of Interest: GL is the founder and owner of Genos Ltd., a company that specializes in high-throughput glycomics and has several patents in this field.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Tijardović, Marijančević, Bok, Kifer, Lauc, Gornik and Keser. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

UČINCI TRENAŽNOG PROTOKOLA PONAVLJANIH SPINTOVA NA KONCENTRACIJU F_{2t}-IZOPROSTANA

DOMAGOJ MARIJANČEVIĆ

Trening ponavljanih sprintova (RST, engl. *repeated sprint training*) jest format visokointenzivnog intervalnog treninga koji se posljednjih godina sve učestalije koristi kao trenažna strategija u poboljšanju snage, brzine, izdržljivosti i sposobnosti ponavljanja sprintova. Programirano tjelesno vježbanje može rezultirati nekontroliranim i prekomjernim stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS, engl. *reactive oxygen species*) uzrokujući pomak redoks ravnoteže u smjeru oksidansa, međutim ROS također predstavljaju sekundarne glasnike čije stvaranje ima važnu ulogu u regulaciji stanične signalizacije na nivou skeletnih mišića. Cilj istraživanja bio je utvrditi biokemijski odgovor na RST analizom biljega oksidacijskog/antioksidacijskog statusa, mišićnog oštećenja i imunskog odgovora te ispitati njihovu međusobnu povezanost.

U istraživanje je uključeno 15 studenata prve godine Kineziološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, muškog spola, raspona dobi od 18 do 22 godine. Eksperimentalni program RST sastojao se od 2 do 3 seta, 6 do 10 pravocrtnih ili povratnih sprintova na kratkoj dionici s polascima svakih 25 sekundi, isprepletenih s periodima kratkotrajnog pasivnog odmora od 2 minute. Razine 15-F_{2t}-izoprostana (15-F_{2t}-IsoP) u plazmi i 24-satnoj mokraći, superoksid-dismutaze, glutation-peroksidaze i glutation-reduktaze u eritrocitima, urata, ukupnog bilirubina, albumina, transferina i prolaktina u serumu, slobodnog kortizola i katekolamina u 24-satnoj mokraći; kreatin-kinaze, aspartat-aminotransferaze, laktat-dehidrogenaze i mioglobina u serumu; visokoosjetljivog IL-6 i C-reaktivnog proteina u serumu te kompletne krvne slike, određene su u tri vremenske točke: nakon inicijalnog mjerenja (T₀), nakon finalnog mjerenja (T₁) i mjesec dana nakon finalnog mjerenja (T₂).

Rezultati ovog rada pokazali su da je RST izazvao značajno povećanje koncentracije 15-F_{2t}-IsoP u plazmi, dok analizom 24-satne mokraće značajne promjene nisu utvrđene, iako se radilo o umjerenom povećanju. Finalno mjerenje, karakterizirano 60%-tnim povećanjem opterećenja u odnosu na inicijalno, rezultiralo je značajnim smanjenjem aktivnosti glutation-reduktaze i koncentracije albumina, ali ne i ostalih biljega antioksidacijskog statusa. Premda je ustanovljen zamjetan porast aktivnosti kreatin-kinaze, sugerirajući kako je došlo do oštećenja mišića, razlike u aktivnostima ipak nisu bile značajne. Program RST rezultirao je značajnim povećanjem koncentracije IL-6 i gotovo nepromijenjenim koncentracijama C-reaktivnog proteina. Mjesec dana nakon završetka RST, zabilježen je značajan pad koncentracije IL-6, broja leukocita i neutrofilnih granulocita. Povećanje koncentracije 15-F_{2t}-IsoP nije bilo povezano s pokazateljima oštećenja mišića i imunskog odgovora.

Ovo istraživanje je pokazalo da prateći ispitanike kroz vrijeme u kojem je sukcesivno povećavan volumen treninga povećanjem broja sprintova, nije dokazan proporcionalan porast lipidne peroksidacije kao ni porast biljega oštećenja mišića što upućuje na zaključak da se u ovoj vrsti trenažnog protokola vremenom postiže uspješna adaptacija i zaštita od daljnjih oksidacijskih oštećenja.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 112 stranica, 12 slika, 13 tablica i 159 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: trenažni protokol ponavljanih sprintova, redoks homeostaza, 15-F_{2t}-izoprostani, antioksidansi, mišićno oštećenje, imunski odgovor

Mentori: izv. prof. dr. sc. Nada Vrkić
doc. dr. sc. Vlatko Vučetić

Povjerenstvo: prof. dr. sc. Dunja Rogić
prof. dr. sc. Jerka Dumić
prof. dr. sc. Hrvoje Pintarić

Rad je prihvaćen: 17. lipnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

THE EFFECTS OF REPEATED SPRINT TRAINING PROTOCOL ON F_{2t}-ISOPROSTANE CONCENTRATION

DOMAGOJ MARIJANČEVIĆ

Repeated sprint training (RST) is a form of high-intensity interval training in which short-duration all-out sprints are interspersed with short recovery periods. High anaerobic demand and increasing aerobic contribution throughout a bout, as sprints are done with very little recovery in-between, may increase production of reactive oxygen species (ROS) which may lead to oxidative stress (OS). Besides being responsible for cellular damage, ROS are also important molecules serving as secondary messengers in skeletal muscle signaling cascades. The main aim of this study was to investigate the effects of running RST on alterations in redox homeostasis (ARH) by monitoring 15-F_{2t}-isoprostane (15-F_{2t}-IsoP) concentration, widely regarded as the “gold standard” marker for the assessment of in vivo lipid peroxidation. Additionally, the study investigated whether muscle and inflammatory status serve as the contributing factor in ARH during the training period.

Fifteen male physical education students volunteered to participate in the study. The experimental training program consisted of 2-3 sets of 6-10 straight-line or shuttle 20-meter repeated sprints with departures every 25 seconds and 2-minute inter-set passive recovery. The levels of 15-F_{2t}-IsoP were measured in plasma and 24-hour urine, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR) in erythrocytes; uric acid (UA), total bilirubin, albumin, transferrin and prolactin in serum, free cortisol and catecholamines in 24-hour urine; creatine kinase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase and myoglobin in serum; interleukin 6, C-reactive protein as well as complete blood counts were determined at three time points: after an initial training session (T₀), after the final training session (T₁) and one month after the final training session (T₂).

The significant changes were observed in repeated measures of plasma 15-F_{2t}-IsoP concentration and GR activity. While the median plasma 15-F_{2t}-IsoP increased by 75%, the median GR decreased by 56%. In 24-hour urine samples, 15-F_{2t}-IsoP levels were 25% greater in post-training, although these increase did not reach statistical significance. Following RST erythrocyte SOD and GPx activities were 11% and 27% lower, although these decreases were nonsignificant. The concentration of extracellular antioxidants, except albumin, remained close to the baseline values throughout the training program. RST program did not affect the marker of muscle damage since there were no significant post-training differences in CK activities. Interleukin-6 was significantly increased, while total leukocyte and neutrophil count also increased although the results were not significant. There were no significant correlations between pre-to-post change in muscle damage and inflammation markers and pre-to-post change in any marker of ARH.

Assuming that significant correlation between training volume and post-training 15-F_{2t}-IsoP levels exist and that greater exercise workload elicits greater OS response, the fact that the increase in urinary 15-F_{2t}-IsoP level was much lower than the increase of total training volume from first to the final week and the increase of exercise workload (60%) suggests that RST may cause attenuation of OS.

This thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

This thesis includes: 112 pages, 12 figures, 13 tables and 159 references. Original is in Croatian language.

Keywords: repeated sprint training protocol; alterations in redox homeostasis; 15-F_{2t}-isoprostanes; antioxidant status; muscle damage; inflammation

Supervisors: Associate Professor Nada Vrkić, Ph.D.
Assist. Professor Vlatko Vučetić, Ph.D.

Reviewers: Full Professor Dunja Rogić, Ph.D.
Full Professor Jerka Dumić, Ph.D.
Full Professor Hrvoje Pintarić, Ph.D.

Accepted: 17th June 2020.