

Izdanje 67 / Broj 2 / Jun 2016.

MEDICINSKI PODMLADAK *medical youth*

PREGLEDNI RADOVI

Vežbanje je lek

Sanja Mazić

Ishrana sportista

Milena Tomanić

The role of physical activity in counteracting age-related sarcopenia and cancer cachexia. A brief literature review

Mattia Scalabrin, Daniela Caporossi

Sindrom sportskog srca - prijatelj ili neprijatelj sportista?

Marina Đelić

Sportska kineziologija - dijagnostika i terapijski značaj mirujućeg mišićnog tonusa

Duško Spasovski

Kontrola dopinga kao mera prevencije: Iskustvo Antidoping agencije republike Srbije

Nenad Dikić

PRATITE NAS

FOLLOW US



Medicinski podmladak / Medical Youth



@podmladak



Medicinski podmladak - Medical Youth

MEDICINSKI PODMLADAK

naučni časopis za studente i mlade istraživače



MEDICAL YOUTH

scientific journal for students and young researchers

Glavni i odgovorni urednik *Editor-in-Chief*

Brankica Dimitrijević

Zamenik glavnog i odgovornog urednika *Deputy Editor*

Smiljana Mihailović

Redakcija *Editorial Board*

Zlatko Pravdić
Marko Svetel
Nikola Pantić
Bogdan Bjelica

Saradnici redakcije *Editorial Assistants*

Stefan Bošković
Stevan Stojanović
Ana Marija Milanović
Ivana Jovanović
Petar Simić
Aleksandra Beleslin
Anida Ademović
Aleksandar Stevanović
Stefan Maksimović
Marija Malinić

Izdavački savet *Advisory Board*

Nebojša Lalić, MD, PhD
Tatjana Simić, MD, PhD
Petar Bulat, MD, PhD
Vesna Bjegović Mikanović, MD, PhD
Slobodan Savić, MD, PhD
Aleksandra Isaković, MD, PhD
Marina Svetel, MD, PhD
Vera Pravica, MD, PhD
Marija Plješa Ercegovac, MD, PhD
Nađa Marić Bojović, MD, PhD
Maja Čupić, MD, PhD
Silvio de Luka, MD, PhD
Darija Kisić Tepavčević, MD, PhD
Nela Puškaš, MD, PhD
Brankica Dimitrijević, glavni i odgovorni urednik
Smiljana Mihailović, zamenik urednika
Ratko Radeta, predsednik CSNIRS-a
Nebojša Prijović, član CSNIRS-a

Lektor za srpski jezik *Reader*

Nataša Ognjanović

Lektor za engleski jezik *Reader*

Ivana Katić

Kontakt *Contact*

Medicinski podmladak
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
Dr Subotića 8, 11000 Beograd, Srbija
email: medicinskipodmladak@med.bg.ac.rs
Tel: +381 11 36 36 382
ISSN-YU 0369-1527
UDK 61 (05)

Izdavač *Publisher*

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
Dr Subotića 8
11000 Beograd, Srbija

Priprema *Prepress*

Vladimir Radević

Štampa *Press*

Sprint, Beograd

Tiraž *Circulation*

300 primeraka

Naslovna strana *Cover*

Langstrup© 123RF.com
Rear view of a healthy athletic young man jogging at the park alone

Posebna zahvalnost *Acknowledgement*

Izdavačkom savetu, za vreme, strpljenje i savete
prof. Sanji Mazić i doc. Marini Đelić,
za svesrdnu pomoć u odabiru tema i realizaciji članaka

Medicina, sport i medicina sporta- nauka pokreta

Svakako nije slučajnost što će ovaj broj Medicinskog podmlatka biti objavljen tokom Olimpijskih igara u Riu. Ipak, manje je poznato da specijalisti medicine sporta sa istim nestrpljenjem čekaju vesti o medaljama i vesti o smanjenju incidence hroničnih nezaraznih, pre svih kardiovaskularnih oboljenja.

Još je Prof. Vojin Smodlaka, jedan od osnivača sportske medicine na ovim prostorima, rekao da se *medicina sporta bavi izučavanjem pozitivnih i negativnih uticaja sporta i drugih oblika fizičke aktivnosti na organizam ljudi, kod osoba oba pola, svih starosnih struktura, zdravih i bolesnih*. Obuhvata gotovo sve naučne oblasti u okviru medicinskih nauka, od kojih su se neke već izdvojile kao posebne discipline, sportska ortopedija, sportska kardiologija, sportska ishrana, fiziologija fizičke aktivnosti, sportska fizikalna medicina i rehabilitacija. S obzirom na to da danas samo mali broj ljudi ispunjava minimalnih preporučenih 150 minuta fizičke aktivnosti nedeljno, jasno je da je u ambulantama medicine sporta sve manje sportista, a sve više ljudi kod kojih je fizička aktivnost indikovana kao preventivno sredstvo ili deo terapije. Umesto tableta i injekcija, oni dobijaju naučno proverene, programirane i individualno dozirane, kontrolisane programe fizičke aktivnosti zdravstvene namene. Zato možemo reći da se ova multidisciplinarna klinička specijalizacija bavi očuvanjem i unapređenjem, zdravlja stimulišući fizički aktivan životni stil, ali i korišćenjem fizičke aktivnosti i vežbanja u terapijske svrhe.

Počeci razvoja medicine sporta datiraju još od antičkih olimpijskih igara, ali je prvi kongres naučnih istraživanja u sportu, sa 60 učesnika, održan tek 1912. godine u Oberhofu u Nemačkoj. 1928. godine u St. Moritz-u, tokom održavanja II Zimske olimpijade, formirano je Međunarodno udruženje sportske medicine (Federation International de Medicine Sportive - FIMS). Ovaj događaj smatra se zvaničnim datumom nastanka sportske medicine kao nove medicinske discipline. Iste godine, tokom IX. Letnjih olimpijskih igara u Amsterdamu održan je prvi kongres FIMS-a, uz učešće 286 lekara iz 30 zemalja.

U našoj zemlji medicina sporta počela je da se razvija još 1925. godine, dakle tri godine pre osnivanja FIMS-a. Još tada su, dva puta godišnje, organizovani lekarski pregledi sportista u Beogradu. Prva sportska ambulanta osnovana je 1936. godine na Internoj propedeutičkoj klinici, na inicijativu Predsednika zdravstvenog odbora Beogradskog loptačkog podsaveza dr Milutina Ivkovića – Milutinaca i prof. dr Vojislava Arnovljevića. U ovoj ambulanti je radilo nekoliko, kasnije istaknutih profesora Medicinskog fakulteta u Beogradu, kao i dr Vojin Smodlaka, koji se smatra doajenom moderne sportske medicine u Srbiji, ali i šire.

Katedra za poslediplomsku nastavu iz medicine sporta na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu formirana je 15. oktobra 1970. godine na inicijativu nastavnika i asistenata koji su se bavili istraživanjima iz ove oblasti. Osnivači katedre su bili Doc. dr D. Jović (prvi šef katedre), Prof. dr O. Nedeljković, Doc. dr O. Popović i asistenti dr V. Jorga, dr I. Jorga, dr V. Mujović i dr B. Mršulja. Sledeće godine počela je postdiplomska nastava. Danas se na katedri održavaju sledeći vidovi nastave:



- specijalistička nastava,
- specijalističke akademske studije sa tri modula, sportska kardiologija, sportska ortopedija i sportska ishrana,
- master akademske studije "Fizička aktivnost, zdravlje i terapija vežbanjem"
- doktorske akademske iz medicinskih nauka - smer "Primenjena istraživanja u medicini sporta i motornim veštinama".

Program master akademskih studija razvijen u okviru Tempus projekta SPEED, zajedno sa ekspertima sa Univerziteta u Rimu, Italija; Beču, Austrija; Atini, Grčka i Oden-si, Danska čime je usaglašen sa evropskim modelom studiranja. Završetkom master studija stiže se međunarodno priznata diploma. U pripremi su udžbenici za specijalističku nastavu i master akademske studije. Da je katedra za medicine sporta multidisciplinarna, govori i činjenica da je u teorijsku i praktičnu nastavu uključeno preko 80 nastavnika i saradnika Medicinskog fakulteta. Članovi Katedre medicine sporta saraduju sa relevantnim međunarodnim i domaćim organizacijama i ustanovama po pitanju edukacije i istraživanja, o čemu govore i promovisani Profesori po pozivu Medicinskog fakulteta, Prof. dr Nebojša Popović, Prof. dr Luc Vanhees, Prof. dr Antonio Pelliccia, Prof. dr Martin Halle i Prof. dr Daniela Caporosi.

Sledeći olimpijski ciklus donosi jos veće izazove za specijaliste medicine sporta. Pred nama je zadatak da pobedimo pandemiju hroničnih nezaraznih bolesti, edukujemo široku populaciju o preventivnom i terapijskom dejstvu fizičke aktivnosti i vežbanja, naučnim istraživanjima pronađemo pravu dozu ovog leka, i naravno, pomognemo sportistima da osvoje što više medalja na Olimpijadi 2020. u Tokiju. Zato, u sportskom duhu, naoružani optimizmom, pozivamo kolege da nam se pridruže na tom putu. Dobrodošli.

Prof. dr Sanja Mazić

Šef katedre za Medicinu sporta



Uvodna reč



foreword

Dragi čitaoci,

Zahvaljujući vrednom radu članova i volontera Redakcije, a uz neizmernu pomoć bivših članova i naših dragih nastavnika, pred vama se nalazi drugi broj 67. izdanja "Medicinskog podmlatka", časopisa za studente i mlade istraživače.

U iščekivanju ovogodišnjih letnjih Olimpijskih igara odlučili smo se da ovaj, junski broj posvetimo sportskoj medicini. Savremena istraživanja ukazuju na mnogobrojne dobrobiti fizičke aktivnosti i vežbanja na očuvanje i unapređenje zdravlja. Tek mali fragmenat tih saznanja, nalazi se na stranicama koje slede. U ovom broju otkrivamo: kako se određuje optimalni intenzitet i učestalost vežbanja i usklađuje ishrana sportista u cilju postizanja najboljih rezultata; kako mirujući tonus mišića utiče na pravilnu posturu i koje su savremene metode za njegovu procenu; koja je uloga fizičke aktivnosti u suzbijanju sarkopenije kod starih. Takođe, čitaćete i o najčešćim supstancama koje se koriste za doping, kao i o aktivnostima Antidoping agencije Republike Srbije.

Rubrika Mini pregledni članci prati istraživanja studenata doktoskih studija i kroz mini preseke literature upoznaće nas sa oblastima njihovih interesovanja. Takođe u duhu broja, oni su istraživali uticaj treninga na nivo adiponektina; eritropetin – kao terapiju i kao doping; sindrom sportskog srca; oporavak srčane frekvence nakon fizičke aktivnosti, kao i anomalije srca kod dece.

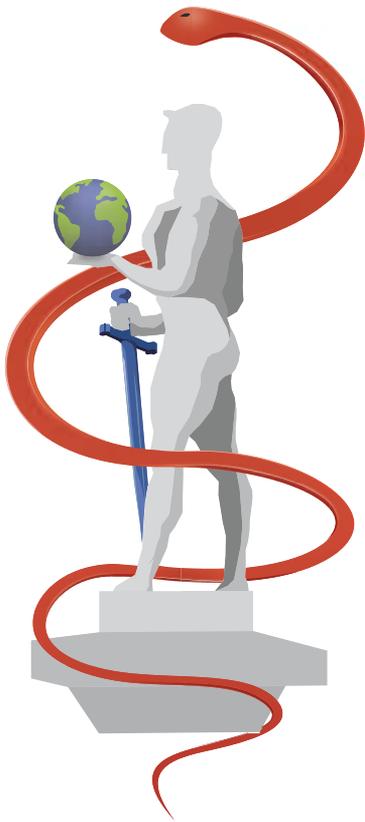
U skladu sa našom dugogodišnjom tradicijom objavljivanja najboljih radova studenata osnovnih studija, u ovom broju možete pročitati 7 najinovativnijih originalnih radova koje su realizovali studenti biomedicinskih fakulteta uz iskusno vođstvo svojih mentora.

Možda naš skromni doprinos nije od tolikog značaja kao očekivani rezultati naših sportista na Olimpijskim igrama, ali se ipak nadamo da smo ovim temama zavirili u, za većinu lekara, ne tako istraženi svet sportske medicine.

Do sledećeg broja, koračajte i dalje kroz svet nauke zajedno sa nama.

Srdačno,
Brankica Dimitrijević
glavni i odgovorni urednik





GSC Belgrade

From **20th to 23rd October 2016**, the third *Global Students' Conference of Biomedical Sciences* is going to take place **in Belgrade**, the capital of Serbia. Medical education in scientific research and as well as the acquisition of scientific working skills are of great importance to academic institutions of biomedical sciences on the globe.

Our goals:

- introducing students to research fields
- presenting results
- acquiring and sharing knowledge and skills
- creating friendships and ideas in future life and work
- implementation of contemporary knowledge of the biomedical sciences

The aims of our conference are to bring undergraduate and postgraduate students of biomedical sciences together and offer them an opportunity to present the results of their investigations and to discuss them with colleagues and leading experts. We also welcome and encourage students of PhD programs to present their research findings at our congress.

Academic Lectures, Workshops, Courses and a rich Social Programme will adorn our conference.

Deadline for Abstract Submission: 10th of July 2016

Place: Deanery of Faculty of Medicine University of Belgrade

Sadržaj



contents

PREGLEDNI RADOVI

Review articles

- Vežbanje je lek..... 1**
Sanja Mazić
- The role of physical activity in counteracting age-related sarcopenia and cancer cachexia. A brief literature review 5**
Mattia Scalabrin, Daniela Caporossi
- Ishrana sportista 13**
Milena Tomanić
- Sindrom sportskog srca – prijatelj ili neprijatelj sportista? 20**
Marina Đelić
- Sportska kineziologija – dijagnostika i terapijski značaj mirujućeg mišićnog tonusa..... 20**
Duško Spasovski
- Kontrola dopinga kao mera prevencije: Iskustvo Antidoping agencije republike Srbije 31**
Nenad Dikić

MINI PREGLEDNI RADOVI

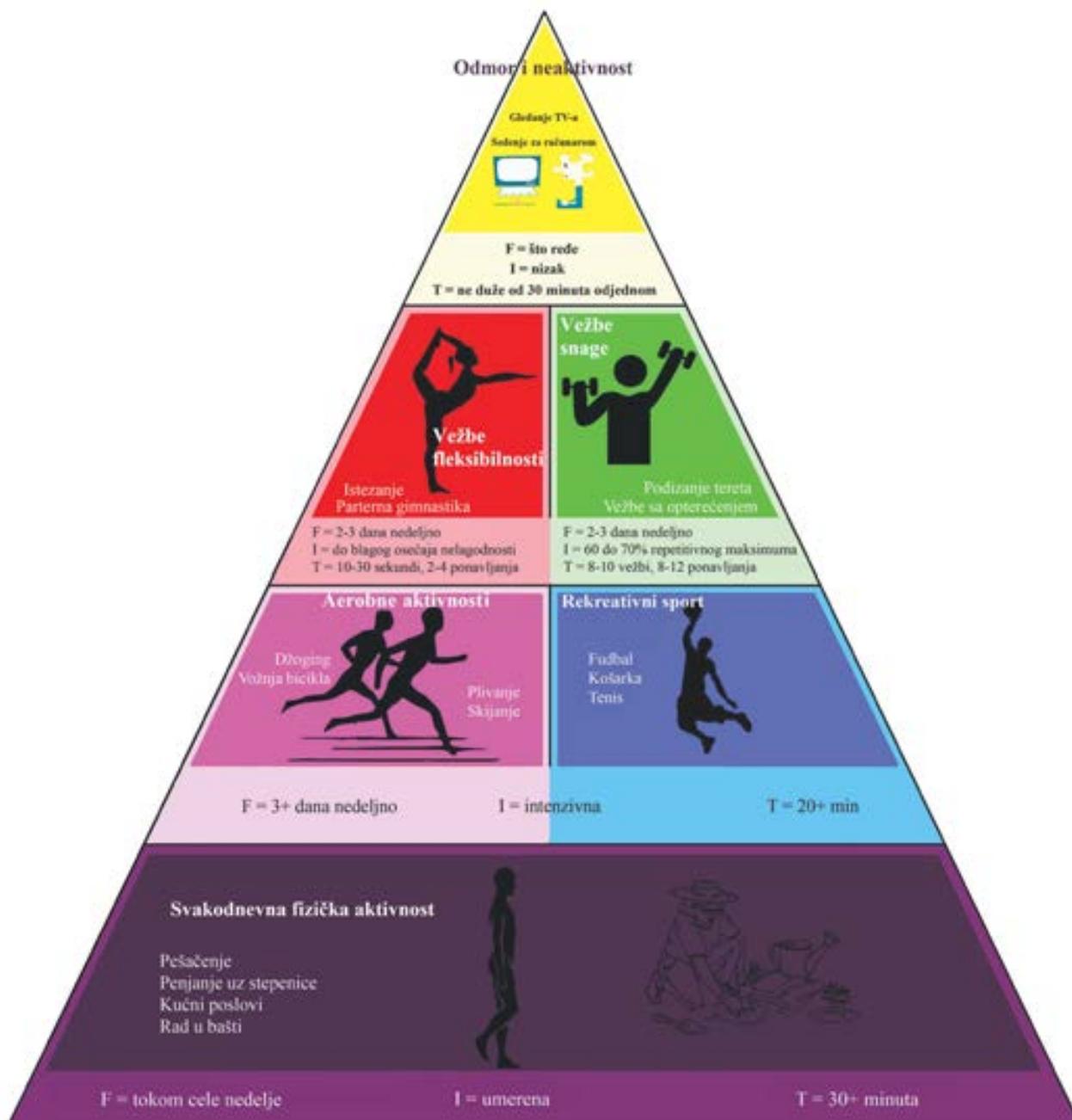
Mini review articles

- Effects of exercise on plasma adiponectin levels in athletes 39**
Mirjana Popović, Dejan Nešić
- Eritropoetin između terapije i dopinga – dve strane medalje 43**
Ana Ostojić, Jasna Trbojević-Stanković, Dejan Nešić
- Oporavak srčane frekvencije – kratak pregled metodologije 48**
Biljana Đurić, Slavica Suzić
- The most common cause of sudden cardiac death in athletes 51**
Nikola Topalović, Sanja Mazić
- Congenital long QT syndrome in children 56**
Ivana Cerović, Jovan Košutić

ORIGINALNI RADOVI

Original articles

- Uticaj finasterida na anksioznost kod pacova..... 63**
Dolika Vasović, Dušan Mladenović
- Polimorfizam gena za 3-fosfoglicerat dehidrogenazu kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde 69**
Jelena Pjevalica, Nevena Popovac, Momčilo Ristanović
- Ispitivanje kvaliteta i antimikrobne aktivnosti gajenog nevena, *Calendula officinalis* L..... 73**
Katarina Gurzulov, Mirjana Marčetić, Dragana Božić
- Protektivni uticaj N-acetil-L-cisteina na efekte stimulacije metioninom u kolonu pacova 80**
Lara Hadži Tanović, Dušan Todorović, Marija Stojanović, Ljiljana Šćepanović, Dragan Đurić
- Osetljivost sojeva grupe B streptokoka, izolovanih kod trudnica u Beogradu, na antibiotike..... 85**
Luka Jovanović, Katarina Isailović, Vera Mijač
- Uporedna analiza pokazatelja efektivnosti laparoscopske i otvorene apendektomije kod dece..... 88**
Mašinka Petrović, Ana Petakov, Sanja Sindić-Antunović
- Uticaj različitih karakteristika treninga na oporavak srčane frekvencije kod vrhunskih sportista.... 96**
Radovan Anđić, Biljana Đurić, Slavica Suzić



Piramida aktivnosti

Vežbanje je lek

Exercise as a therapy

Sanja Mazić^{1,2}

¹Institut za medicinsku fiziologiju “Rihard Burjan”, Medicinski fakultet u Beogradu, Srbija

²Katedra za medicinu sporta, Medicinski fakultet u Beogradu, Srbija

Kontakt: sagabgyu@yahoo.com

Definicija pojmova vezanih za fizičku aktivnost i vežbanje

Fizička aktivnost (engl. *physical activity*), prema definiciji Američkog koledža sportske medicine (*The American College of Sports Medicine, ACSM*) svaki je pokret tela koji je posledica mišićne kontrakcije i koji dovodi do potrošnje energije. Obuhvata širok spektar aktivnosti, od rekreativnog vežbanja i takmičarskih sportskih disciplina do fizičkih napora tokom profesionalnih aktivnosti, tokom obavljanja kućnih poslova ili dečje igre, jednom rečju, bilo koju vrstu fizičkog rada.

Fizičko vežbanje (engl. *exercise*), podgrupa fizičke aktivnosti, predstavlja osmišljene, definisane, repetitivne pokrete koji se izvode u cilju održanja ili unapređenja jedne ili više komponenti fizičke sposobnosti.

Fizička sposobnost, forma, fizička pripremljenost, fizički fitness (engl. *physical fitness*) sposobnost je da se određena fizička aktivnost izvrši na odgovarajući i efikasan način, odnosno to je skup karakteristika koje osoba ima ili razvija, a koje su povezane sa sposobnošću za obavljanje određene fizičke aktivnosti.

Komponente fizičke sposobnosti koje su povezane sa zdravljem su: sastav tela, funkcionalna sposobnost kardiovaskularnog sistema, fleksibilnost, mišićna izdržljivost i snaga. Komponente povezane sa veštinom izvođenja određene aktivnosti su: agilnost, ravnoteža, koordinacija, sila, reakciono vreme i brzina.

Trening (engl. *physical conditioning*) podrazumeva redovnu, ponavljaju i strukturisanu fizičku aktivnost na nivou većem od uobičajenih aktivnosti, koja ima za cilj poboljšanje jedne ili više komponenti fizičke sposobnosti.

Sport (engl. *sport*) je organizovano bavljenje fizičkom aktivnošću, orijentisano prema rezultatu i regulisano pravilima. Učesnici se ili naprežu do svog fizičkog i funkcionalnog maksimuma ili izvode kompleksne veštine. Sportska aktivnost obično ima takmičarski karakter (profesionalno ili amaterski).

Savremena medicina dokazala je pozitivan uticaj fizičke aktivnosti i vežbanja na očuvanje i unapređenje zdravlja (1). Vežbanje je “polipilula” koja ne samo da leči različite bolesti već je značajno efikasnija od bilo kog leka (2). Da bi ostvarila svoj pozitivni uticaj na prevenciju i terapiju oboljenja, ona mora da bude pravilno dozirana, kao i svaki lek.

Najjednostavniji način doziranja je prema *FITT* formuli (3), što su početna slova engleskih reči: (*Frequency*, učestalost), (*Intensity*, intenzitet), (*Time*, trajanje), (*Type*, oblik). Treba obratiti pažnju i na tzv. *VPP* princip, što su skraćenice od (*Volume*, obim), (*Pattern*, princip) i (*Progression*, progresija).

Program vežbanja u zdravstvene svrhe ima nekoliko definisanih komponenti: kardiorespiratorne vežbe (tzv. aerobne vežbe), vežbe sa opterećenjem (tzv. “*rezistens trening*”), vežbe fleksibilnosti i neuromotorne vežbe (tzv. funkcionalni fitness trening).

Za zdrave osobe mlađe od 65 godina, prema preporukama Američkog udruženja za srce (*American Heart Association, AHA*) i Američkog koledža sportske medicine (*ACSM*) karakteristike programa aerobnog vežbanja koji značajno doprinosi zdravlju su (4):

- učestalost: umerena fizička aktivnost minimalno 5 puta nedeljno (po mogućstvu svakodnevno) ili intenzivna fizička aktivnost minimalno tri puta nedeljno, može i u kombinaciji;

Tabela 1. Uporedni pregled principa doziranja leka i vežbanja

		LEK	VEŽBANJE
	Kontraindikacije	da/ne	da/ne
	Indikacije	da/ne	da/ne
	Doziranje		
F (<i>frequency</i>)	učestalost	2 puta dnevno	3-5 puta nedeljno
I (<i>intensity</i>)	doza	količina na dan	% HR max, % HRR, % VO ₂ max
T (<i>time</i>)	trajanje	7 dana	trajanje sesije, trajanje programa
T (<i>type</i>)	oblik	caps, tbl, i.m., ...	hodanje, trčanje, plivanje, vožnja bicikla, ...

% HR max - procenat maksimalne srčane frekvencije

% HRR - procenat rezerve srčane frekvencije

% VO₂ max - procenat maksimalne potrošnje kiseonika

- intenzitet: umerena do intenzivna fizička aktivnost, 55–90% od maksimalne srčane frekvencije (HR max), odnosno 40–85% rezerve srčane frekvencije (HRR);
- trajanje: 30-60 minuta dnevno (150 minuta nedeljno) umerene fizičke aktivnosti ili 20-60 minuta dnevno (75 minuta nedeljno) intenzivne fizičke aktivnosti, može i u kombinaciji;
- oblik: fizička aktivnost koja angažuje velike mišićne grupe, koja se odvija kontinuirano, ritmična je i aerobna po svojoj prirodi (npr. hodanje, džogiranje, vožnja bicikla, plivanje);
- obim: cilj je ukupna potrošnja od ≥ 500 -1000 MET min nedeljno (MET - metabolički ekvivalent individualne metaboličke potrebe tokom mirovanja, oko 3,5 ml kg⁻¹ min⁻¹ ili 1 kcal kg⁻¹ čas⁻¹, tj. 4,2 kJ kg⁻¹ čas⁻¹), odnosno ≥ 7000 koraka dnevno;
- obrazac: ukupno vreme vežbanja tokom dana može da se sabira, ali pojedinačna sesija ne treba da traje kraće od 10 minuta;
- progresija: treba započeti program vežbanja sa trajanjem i intenzitetom koji je prijatan za osobu, a zatim povećavati do ciljnih karakteristika koje će dovesti do zdravstveno povoljnih ili terapijskih efekata prema FITT principu.

Određivanje intenziteta fizičke aktivnosti

Intenzitet fizičke aktivnosti može da se proceni na više načina, u zavisnosti od željenog stepena preciznosti.

Procenat VO₂ max (% VO₂ max) najpreciznija je metoda koja se koristi kod srčanih bolesnika, vrhunskih sportista i u naučnoistraživačke svrhe. Zahteva specifičnu aparaturu, obučeni kadar i određeno vreme za izvođenje. Podrazumeva individualno određivanje vrednosti maksimalne potrošnje kiseonika maksimalnim višestepenim ergospirometrijskim testom.

Rezerva srčane frekvencije (HRR) ili Karvonenov metod pouzdan je i precizan metod doziranja, ali zahteva i poznavanje individualne jutarnje srčane frekvencije HR min (najčešće se meri tri jutra uzastopce i uzima se srednja vrednost). Smatra se da ova metoda ima visoku korelaciju sa doziranjem pomoću ostvarene vrednosti maksimalne potrošnje kiseonika (VO₂ max). Izračunava se po formuli:

$$THR = k \times (HR \max - HR \min) + HR \min$$

gde je THR ciljna srčana frekvencija, k je koeficijent, HR max maksimalna srčana frekvencija (izračunata po formuli: 220 - godine starosti) i HR min jutarnja srčana frekvencija. Koeficijent k se izračunava ako se željeni procenat intenziteta vežbanja podeli sa 100. Na primer, ako osoba ima 20 godina, jutarnju frekvenciju od 60 min⁻¹ i želi da vežba u režimu rada koji doprinosi očuvanju i unapređenju zdravlja (40-84% HRR), ciljna srčana frekvencija je od 80 (0.4 x (220 - 20 - 60) + 60) do 168 (0.84 x (220 - 20 - 60) + 60) udara u minuti.

Maksimalna srčana frekvencija (HR max) najčešće se koristi u svakodnevnoj praksi, zbog izuzetne jednostavnosti. Dobija se ako se od vrednosti 220 oduzmu godine života osobe za koju se određuje trenazno opterećenje. Na primer, ako osoba ima 20 godina, HR max = 220 - 20 = 200 min⁻¹. Ciljna srčana frekvencija, tj. zona rada koja doprinosi očuvanju i unapređenju zdravlja je 55–89% HR max, što znači da ova osoba, ako želi da ostvari svoj cilj, treba da vežba na srčanoj frekvenciji od 110 do 178 min⁻¹ (200 x 0.55, odnosno 200 x 0.89). Važno je napomenuti da u praksi postoje i modifikacije ove formule (npr. za osobe ženskog pola, fizički aktivne osobe) jer ona izjednačava sve osobe za koje se izračunava, ne uzimajući u obzir naveden individualni parametar.

Tabela 2. Klasifikacija intenziteta rada. Preuzeto iz EACPR preporuka (5)

	MET	Relativni intenzitet (%)			Skala subjektivne procene zamora
		VO ₂ max	HRR	HR max	
<i>Lagan</i>	2-4	28-39	30-39	45-54	10-11
Umeren	4-6	40-59	40-59	55-69	12-13
<i>Težak</i>	6-8	60-79	60-84	70-89	14-16
<i>Vrlo težak</i>	8-10	> 80	> 84	> 89	17-19
<i>Maksimalan</i>	> 10	100	100	100	20

MET - metabolički ekvivalent (individualne metaboličke potrebe tokom mirovanja, oko 3,5 ml kg⁻¹ min⁻¹ ili 1 kcal, tj 4,2 kJ kg⁻¹ čas⁻¹), VO₂ max - maksimalna potrošnja kiseonika, HRR - rezerva srčane frekvencije, HR max - maksimalna srčana frekvencija, skala subjektivne procene zamora - Borgova skala

Skala subjektivnog osećaja zamora ili Borgova skala (engl. *rating of perceived exertion*, RPE) sastoji se od 20 numeričkih vrednosti (ocena), od kojih svaka neparna (od 7 do 19) ima verbalnu kvalifikaciju: 7 - neosetan, 9 - vrlo lagan, 11 - lagan, 13 - umereno težak, 15 - težak, 17 - vrlo težak, 19 - iscrpljujući fizički napor. Fizička aktivnost koju osoba procenjuje kao umerenu do tešku je ona koja dovodi do očuvanja i unapređenja zdravlja. Ova metoda pokazuje visoku korelaciju sa objektivnim ocenjivanjem preko ostvarene srčane frekvencije. Njeno korišćenje se ne preporučuje kod osoba sa zdravstvenim problemima.

Govor se često koristi u kliničkoj praksi, naročito u kardiologiji, kada se kardiološkim pacijentima savetuje da hodaju maksimalnom brzinom pri kojoj mogu da razgovaraju, a da se ne zadišu. Iako izuzetno jednostavan način doziranja fizičke aktivnosti, zbog uticaja velikog broja faktora nije naučno prihvaćen.

Prema preporukama Američkog koledža sportske medicine (6), vežbe sa opterećenjem tereba primenjivati (F) dva do tri dana nedeljno, pri čemu pauza između dana kada se vežba mora da bude najmanje 48 sati (I) intenzitetom od 60 do 70% repetitivnog maksimuma (RM), (T) pri čemu trajanje vežbi nije ograničeno, (T) a preporuka je da se posebno opterećuje svaka velika grupa mišića sa 8-10 različitih vežbi, na različitim spravama i da se izvodi 8-12 ponavljanja.

Vežbe fleksibilnosti se primenjuju u cilju povećanja obima pokreta. Treba ih primenjivati (F) dva do tri dana nedeljno, (I) intenzitetom istezanja koji izaziva blag osećaj nelagodnosti, (T) svaku mišićno-tetivnu grupu treba istegnuti 2-4 puta u pojedinačnom trajanju 10-30 s, (T) i potrebno je posebno istezati svaku od velikih mišićno-tetivnih grupa. Preporučene su i statičke (aktivne ili pasivne), dinamičke i vežbe ravnoteže, kao i proprioceptivna neuromuskularna facilitacija (PNF). Pošto su efekti istezanja najveći ako je mišić "zagrejan", pre otpočinjanja

vežbi se za povećanje fleksibilnosti preporučuju blage aerobne vežbe.

Neuromotorne vežbe se nazivaju još i funkcionalni fitness trening. Treba ih primenjivati (F) dva do tri dana nedeljno, (I) ne postoji preporuka za intenzitet, (T) u trajanju od 20 do 30 minuta dnevno. (T) Vežbe bi trebalo da uključuju i vežbe motorike (vežbe za ravnotežu, agilnost, koordinaciju i održanje položaja tela), proprioceptivne vežbe i vežbe sa višestrukim aktivnostima (kao što su Tai Chi i joga), čiji je cilj poboljšanje fizičke funkcije i sprečavanje padova kod starijih osoba.

Smatra se da su smanjene fizička aktivnost i kretanje kod kuće, na poslu i u slobodno vreme odgovorne za 3,2 do 5,3 miliona smrti godišnje (7). To znači da je fizička neaktivnost najčešći uzrok smrti, više nego pušenje, koji je uzrok smrtnosti kod 5,1 miliona ljudi (8). Iz tog razloga nekretanje nazivaju "tihim ubicom", izazivačem sedentarnog sindroma (engl. *sedentary death syndrome*, SeDS) koji dovodi do obolevanja i umiranja (9). Naučno je dokazan uticaj nedovoljne fizičke aktivnosti na pojavu i progresiju kardiovaskularnih bolesti (angina pektoris, infarkt miokarda, koronarna bolest, kongestivna srčana bolest, periferna vaskularna oboljenja, hipertenzija, moždani udar), metaboličkih poremećaja (visok nivo triglicerida i holesterola u krvi, nizak nivo HDL u krvi, gojaznost, tip 2 dijabetesa), nekih maligniteta (karcinom dojke i debelog creva, tumor pankreasa i prostate), mišićno-skeletna oboljenja (osteoporoza, ukočenost zglobova, fizička slabost), psihijatrijskih oboljenja (depresija, smanjenje kognitivnih funkcija) i smanjenu imunološku otpornost organizma. Jednom rečju, nedovoljna fizička aktivnost utiče na lošiji kvalitet života i prerani mortalitet (10). Najvažnije sredstvo prevencije i najbolji lek za ove bolesti je vežbanje.

Literatura

1. Kohl HW 3rd, Craig CL, Lambert EV, Inoue S, Alkandari JR, Leetongin G, Kahlmeier S; Lancet Physical Activity Series Working Group. The pan-

- demic of physical inactivity: global action for public health. *Lancet*. 2012; 21;380(9838):294-305.
2. Fiuzza-Luces C, Garatachea N, Berger NA, Lucia A. Exercise is the real polypill. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(5):330-58.
 3. American College of Sports Medicine (ACSM). ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription. LWW Lippincott Williams and Wilkins. 2013
 4. Nelson ME, Rejeski WJ, Blair SN, Duncan PW, Judge JO, King AC et al; American College of Sports Medicine; American Heart Association. Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation*. 2007; 28;116(9):1094-105.
 5. Vanhees L, De Sutter J, GeladaS N, Doyle F, Prescott E, Cornelissen V et al. EACPR. Importance of characteristics and modalities of physical activity and exercise in defining the benefits to cardiovascular health within the general population: recommendations from the EACPR (Part I). *Eur J Prev Cardiol*. 2012;19(4):670-86.
 6. Garber CE, Blissmer B, Deschenes MR, Franklin BA, Lamonte MJ, Lee IM et al. American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. 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;43(7):1334-59.
 7. Lim SS. et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012; 15;380(9859):2224-60. Erratum in: *Lancet*. 2013; 23;381(9867):628.
 8. Wen CP, Wai JP, Tsai MK, Yang YC, Cheng TY, Lee MC et al. Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *Lancet*. 2011; 1;378(9798):1244-53.
 9. Lees SJ, Booth FW. Sedentary death syndrome. *Can J Appl Physiol*. 2004; 29(4):447-60; discussion 444-6.
 10. Vanhees L, Geladas N, Hansen D, Kouidi E, Niebauer J, Reiner Z, et al. Importance of characteristics and modalities of physical activity and exercise in the management of cardiovascular health in individuals with cardiovascular risk factors: recommendations from the EACPR (Part II). *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation*. 2012;19(5):1005-33.

The role of physical activity in counteracting age-related sarcopenia and cancer cachexia. A brief literature review

Uloga fizičke aktivnosti u suzbijanju sarkopenije povezane sa starenjem i kaheksije kod karcinoma - kratak pregled literature

Mattia Scalabrin¹, Daniela Caporossi²

¹European Master in Health and Physical Activity, University of Rome "Foro Italico", Rome, Italy

²Department of Movement, Human and Health Sciences, University of Rome "Foro Italico", Rome, Italy

Contact: m.scalabrin@uniroma4.it

Abstract

Muscle tissue plays several important health functions. In addition to the important mechanical functions, it represents the biggest reserve of body proteins and it is also able to produce several myokines that are able to induce important beneficial effects, through the interaction with different organs. The loss of muscle mass has a tremendous impact on health and it is not surprising that a great interest has raised on two degenerative, irreversible and unstoppable conditions known as sarcopenia and cachexia.

Sarcopenia, the age-related loss of muscle mass, is not a disease or a syndrome, it is not even a medical sign sometimes. Indeed, a general consensus among scientists does not exist regarding the definition and the identification criteria of this condition.

On the other hand, cachexia is a wasting syndrome characterized by an uncontrolled and unstoppable loss of muscle mass, associated with fatigue and weakness. It is often associated with a disease like cancer, AIDS, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), multiple sclerosis, tuberculosis etc.

Given the complexity of these muscle conditions and considering that during aging and cancer there is an increased risk of comorbidities, regular physical activity might be a crucial point to be carefully evaluated on a single patient basis.

The aim of this review is to highlight the impact on society and the etiology of sarcopenia and cancer cachexia, with particular regard to the role played by physical activity in preventing and counteracting these muscle-wasting conditions, focusing attention also on the limitation factors that must be considered during the prescription of physical activity to sarcopenic and cachectic patients.

Key words: Sarcopenia, Cachexia, Muscle Tissue, Muscle Wasting, Physical Activity, Aging, Cancer.

Sažetak

Mišićno tkivo ima nekoliko važnih uloga po ljudsko zdravlje. Pored značajne mehaničke funkcije, ono predstavlja i najveći depo telesnih proteina. Osim toga, proizvodi i nekoliko miokina koji su, kroz interakcije sa drugim organima, u stanju da indukuju veoma bitne efekte. Gubitak mišićne mase ima izuzetan uticaj na zdravlje i ne iznenađuje činjenica da se sve više pažnje obraća na dva degenerativna, ireverzibilna i nezaustavljiva stanja, poznatija kao sarkopenija i kaheksija.

Sarkopenija, starosno zavisani gubitak mišićne mase, nije ni bolest ni sindrom, čak nekada nije ni medicinski znak. Konsenzus naučnika zapravo nije utemeljio preciznu definiciju, kao ni kriterijume u vezi sa ovim stanjem.

S druge strane, kaheksija predstavlja sindrom gubitka i karakteriše je nekontrolisan i nezaustavljiv gubitak mišićne mase, povezan sa umorom i slabošću. Često je povezana sa bolestima kao što su sindrom stečene imunodeficijencije (fr. *syndrome d'immunodéficience acquise*, SIDA), hronična opstruktivna bolest pluća (HOBP), multipla skleroza, tuberkuloza itd.

Imajući u vidu kompleksnost ovih stanja povezanih sa mišićnom masom, kao i činjenicu da je tokom starenja i u slučaju karcinoma povećan rizik od komorbiditeta, smatra se da redovna fizička aktivnost može da ima krucijalnu ulogu zbog koje bi je trebalo pažljivo oceniti, uzimajući u obzir svakog pacijenta pojedinačno.

Cilj ovog preglednog rada je da se naglase uticaj sarkopenije na društvo, kao i etiologija sarkopenije i kaheksije, koja je povezana sa rakom. Poseban akcenat će biti stavljen na ulogu koju fizička aktivnost može da ima u prevenciji i suzbijanju navedenih stanja (povezanih sa gubitkom mišićne mase), usredsređujući se i na faktore ograničenja koji se moraju uzeti u obzir prilikom propisivanja fizičke aktivnosti pacijentima sa sarkopenijom i kaheksijom.

Ključne reči: sarkopenija, kaheksija, mišićno tkivo, gubitak mišićne mase, fizička aktivnost, starenje, karcinom

Introduction

The muscle mass represents the biggest reserve of body proteins; it plays different mechanical functions (movement, maintaining posture, breathing etc.) and can be considered, to all-purposes, a secretory organ (1). Interestingly, skeletal muscle produces different cytokines and peptides classified as “myokines” which are able to communicate with several organs simultaneously and to produce different benefits for health. Indeed, myokines exert either autocrine, endocrine or paracrine effects and their production is strongly associated with muscle mass and muscle contraction (2).

As human body ages, there is a gradual decrease in muscle mass. This age-related loss of contractile tissue is a serious threat for health and it is associated with a risk of adverse outcomes such as frailty, disability, chronic diseases and death (3). Given the tremendous impact on health, a great interest has raised on two degenerative, irreversible and unstoppable conditions known as sarcopenia and cachexia.

Sarcopenia is a term introduced in 1988, by Irwin Rosenberg and means: “flesh poverty” (4). This age-related loss of skeletal muscle starts early in adulthood (approximately at the age of 20) (5), accelerating after the age of 65 with more than 1% of muscle mass loss per year (6). Moreover, it is often related to other conditions as dynapenia (loss of muscle strength and power associated with a reduced movement capability) and cachexia (3). Sarcopenia is not a disease or a syndrome, it is not even a medical sign sometimes. Indeed, it is difficult for physicians to determine whether the loss of muscle mass is physiological rather than pathological (3). In 2009, numerous scientific societies such as the European Geriatric Medicine, the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism, the International Association of Gerontology and Geriatrics-European Region and the International Association of Nutrition and Aging, challenged their efforts to form an European group to get a practical clinical definition and a diagnostic criteria for sarcopenia forming The European Working Group on Sarcopenia (EWGSOP). As explained in the next section, EWGSOP developed a clinical definition and consensus diagnostic criteria for the age-related sarcopenia, using both low muscle mass and low muscle functions (strength or performance) (7).

On the other hand, cachexia is a wasting syndrome, characterized by an uncontrolled and unstoppable loss of muscle mass, associated with fatigue and weakness. This condition is seen in patients with AIDS, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), multiple sclerosis, tuberculosis and cancer (8). It is possible to identify three different stages of clinical relevance for cancer cachexia: pre-cachexia, cachexia and refractory cachexia (9). Pa-

tients with an involuntary loss of body weight of 5% in 6 months or with a body mass index lower than 20 kg/m² are classified as having cachexia. In pre-cachexia, some symptoms (anorexia and impaired glucose tolerance) can accompany an involuntary loss of body weight lower than 5% in 6 months. Refractory cachexia is the last stage of this condition and is characterized by an intense catabolism, poor performance status and a life expectancy of a few months (10).

Currently, there are limited options to counteract the effects of muscle tissue loss as a part of aging or a disease process, except for lifestyle therapies like healthy nutrition and exercise training. The aim of this review is to highlight the impact on society and the etiology of sarcopenia and cancer cachexia with particular regard to the role played by physical activity, in preventing and counteracting these muscle-wasting conditions.

Epidemiology of sarcopenia and cancer cachexia

Despite the fact that the clinical definition and consensus about diagnostic criteria for age-related sarcopenia have been identified (7), it is still complicated to estimate the actual prevalence of sarcopenia and its impact on public health (11). Clear examples are presented in two different studies provided by Batsis et al. (12) and Bijlsma et al. (13), which compare the prevalence of sarcopenia using different definitions and diagnostic parameters. In particular, Batsis and colleagues found that sarcopenia ranges from 4.4% to 94% across definitions, while Bijlsma and collaborators, applying different diagnostic criteria to different age categories, found differences that range from 0% to 31.2% in the 60-69 years group and from 0% to 45.2% in the over 70 years category. In its definition, EWGSOP integrates the loss of muscle mass, the loss of muscle strength and the loss of physical functions to identify the presence of sarcopenia, suggesting to adopt two standard deviations below the mean value of healthy young adults, as cut-off point for each field. According to this definition, at the World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases, a research group from the University of Liège (Belgium) revealed dramatic numbers about the prevalence of sarcopenia in Europe, providing also some interesting projections. In 2016, the European citizens affected by sarcopenia there are 10 869 527 (11.1% of older population) and this number will tend to the increase of 72.4%, reaching a total of 18 735 173 sarcopenic people in 2045 (12.9% of older population) (14).

Similarly to sarcopenia, cachexia, internationally recognized as a complex “*multifactorial syndrome defined by an ongoing loss of skeletal muscle mass (with or without*

loss of fat mass) that cannot be fully reversed by conventional nutritional support and leads to progressive functional impairment” (9). Therefore, in agreement with this definition, epidemiological evidences show that cachexia affects 50% of cancer patients with a dramatic impact on quality of life, reducing the response to chemotherapy and even leading to death. In fact, it has been estimated that during cancer, more than 20% of patients die because of cachexia (15). Interestingly, the incidence of weight loss vary greatly according to the tumor site: the greatest weight loss was seen among patients with solid tumors (e.g. gastric, pancreatic, lung, colorectal, head and neck) (16). In particular, those patients with upper gastrointestinal and lung cancer are more predisposed to this condition with a prevalence of cachexia up to 80% and 60% respectively (17). Furthermore, patients with prostate or colon cancer experience cachexia in 50% of the cases while those with breast cancer or acute leukemia experience cachexia in 30% of cases (18).

Etiology of sarcopenia and cancer cachexia

Sarcopenia is characterized by a decline in muscle mass with aging, where the muscle fibers are substituted by non-contractile tissue such as intramuscular fat and connective tissue (19). Although their relative contribution is still unknown, there are multitude of concomitant “internal” and “external” causes that could lead to this altered muscle mass condition (Figure 1).

With regard to internal processes, the most important seems to be a reduced anabolic hormone production and sensitivity: in fact, aging is associated with lower Insu-

lin-like Growth Factor 1 (IGF-1), insulin resistance and testosterone levels, as well as a reduced sensitivity of their targets (20). Indeed, it is known that these hormones are potent activators of Protein kinase B (Akt) signaling pathway, resulting in increased production and decreased degradation of muscle proteins, by inhibition of the Forkhead box (FoxO) pathway. Moreover, testosterone activity affects skeletal muscle tissue growth and differentiation through myoblast stimulation, inhibition of myostatin and satellite cells renewal (21). In addition, the increase of apoptotic activities in myofibers, the increase of pro-inflammatory cytokines, the changes of muscle mitochondrial functions and the accumulation of free radicals, as well as the decline in the number of motor neurons (in particular of alpha-motor neurons) and a reduction of synaptic vesicles are all important contributors of muscle wasting in sarcopenia. (6, 22). Among external influences, those that could be able to drive the pathophysiological changes leading to muscle loss are “disuse or immobility” and a deficient intake of energy and proteins. It is important to consider that older people are among the most sedentary and physically inactive segment of society (23). As people age, they become less active and this places them inside a tremendous vicious cycle (figure 2) in which there is not only an increased loss of muscle mass but also an increased risk of disability, morbidities and premature death (24).

Similarly to sarcopenia, even the cachexia syndrome shows a systemic inflammation state (25). In fact, an imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines is currently believed to contribute to cachexia (26). Moreover, other pathophysiological mechanisms

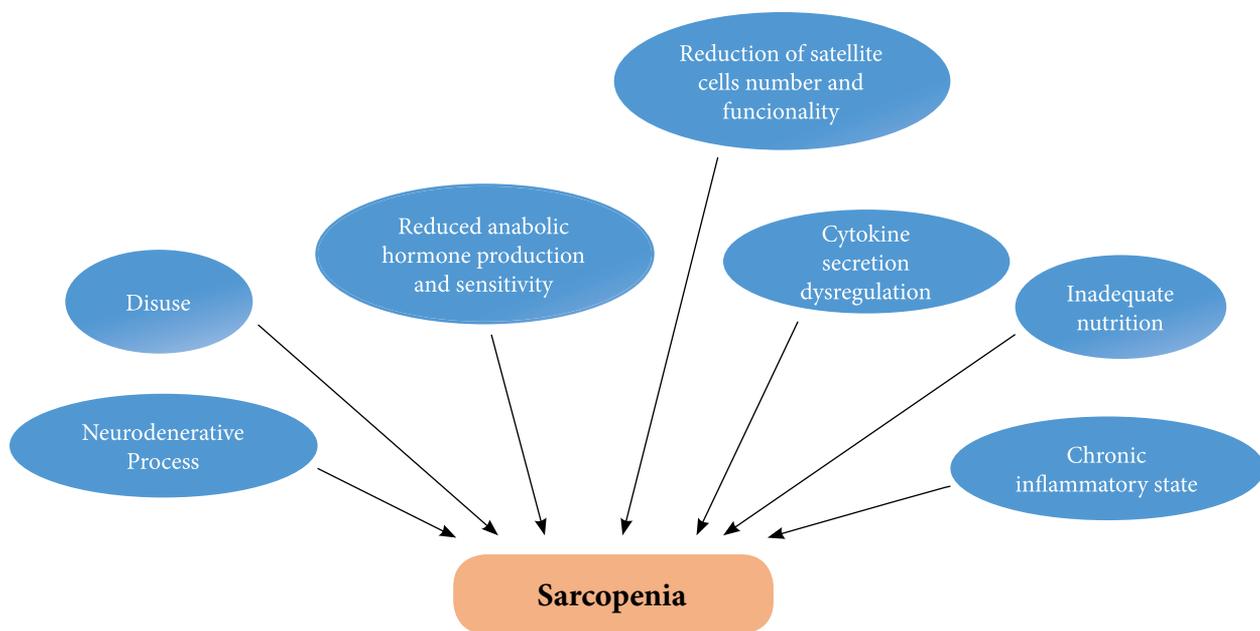


Figure 1. Sarcopenia is a complex condition mediated by different causes that interact to generate muscle wasting.



Figure 2: Entering in the physical inactivity vicious cycle has a tremendous impact on people quality of life. It provokes several detrimental effects and could leads to disability and death.

are shared with sarcopenia, such as the down-regulation of anabolic factors/pathways including IGF-1, androgens and satellite cells proliferation, as well as an increase in catabolic pathways such as apoptosis, autophagy and mitochondrial dysfunction (mitophagy) (6, 20, 21). Cachexia can also result from a reduced availability of nutrients; in fact, it is noteworthy that, while not all malnourished patients are cachectic, all cachectic patients are invariably malnourished. Therefore, together with the inflammatory imbalance, this state of malnutrition leads eventually to accumulation of damaging free radical that are known as reactive oxygen species (ROS), such as hydroxyl radicals, superoxide radicals and others (27). Reactive oxygen species are chemically reactive molecules containing oxygen with an unpaired electron and this conformation gives them the possibility to interact with different other

molecules (28). These molecules are considered regulators of cellular functions during inflammatory response, but an over-accumulation beyond a certain threshold, can have different detrimental effects (29). ROS activity can last for days in absence of an adequate antioxidant response and these species can move outside the cell and react with other tissues provoking oxidative stress (30). To date, oxidative stress plays a key role in tissue degeneration and, consequently, in systems dysfunctions; ROS accumulation seems to be the potential trigger of many chronic diseases (31).

Exercise as a tool to counteract sarcopenia and cancer-related cachexia

Sarcopenia and cachexia are complex conditions in which many systems are involved simultaneously. Hormonal and drugs supplementation are palliative solutions to counteract the effects of these two degenerative pathways (32, 33). On the other hand, physical activity seems to be the most effective treatment in preventing and counteracting age and cancer-related muscle tissue loss. It is widely known that physical activity is a panacea able to prevent and treat multiple age-related diseases (34) even in elders that have been inactive for the majority of their life (35). In the light of this, many studies have focused their attention on the effects of physical activity on prevention and treatment of sarcopenia, but only few studies have investigated the impact of exercise training on pre-cachectic and cachectic patients (36).

Physical activity produces many healthful benefits but, at the same time, it carries some risks: these types of interventions, in particular in elderly, must be carried out considering the patients profile and must be supervised

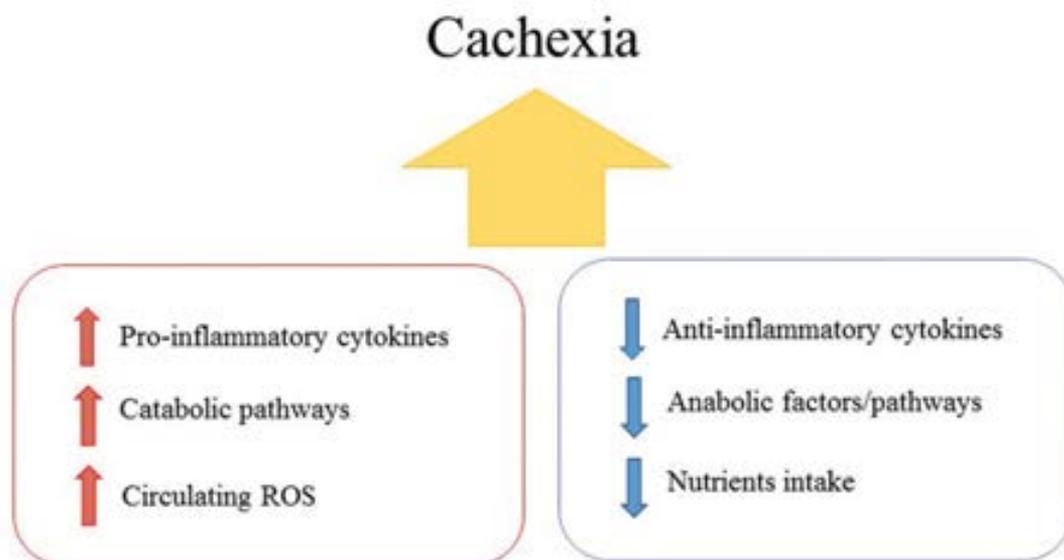


Figure 3: Cachexia is a multifactorial process determined by different bio-functional alterations of homeostasis.

by experts of the field and started after a careful medical screening. Prescribing physical activity to cancer patients is an extremely delicate process. Physicians must consider the complete medical case and the relative limitations associated with the pathology and the therapy. As for example, anemia is an important limiting factor to the participation in physical activities. Indeed, the concomitant presence of this condition, which affect one third of cancer patients at diagnosis (37), when participating in physical activities could be both dangerous and deleterious for patients, as demonstrated by Argilés and colleagues (38) in tumor bearing mice, where the health conditions of anemic animals worsen after exercise. It is, therefore, advisable to immediately interrupt any extra activity different from daily life, when anemia is present (38, 39). Despite anemia which is an important limitation factor to the participation in regular physical activity in cancer patients, there are many other aspects that must be taken into account during exercise prescription. It is necessary to consider that patients with compromised immune functions, that complete a bone marrow transplant, should avoid public places for at least 1 year after the transplantation and that the exposure to chlorine (swimming pool activities) after radioactive treatments could cause skin irritations (39).

In the end, it is important to consider that cachectic patients are overexposed to the risk of muscle dislodgment and an adequate warm-up and load progression are fundamental aspects of exercise prescription (39). Noteworthy, during chemotherapy and radiation, most patients feel a general sense of fatigue. This tiredness does not get better with rest, but at the same time could severely limit the participation in physical activity programs. The NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) for Cancer-Related Fatigue, suggest to physicians and sport scientists to start slowly and progressively increase the intensity and duration of the exercises, to avoid injuries and dropout.

A clear consensus regarding exercise recommendations for sarcopenic and cachectic patients do not exist. Anyway, the American College of Sport Medicine (ACSM) and the American Heart Association (AHA) provide some guidelines for adults over 65 years of age that could be applied, with the proper precautions, to both sarcopenic and cachectic groups (40).

To counteract muscle wasting and, in particular, the loss of muscle functions associated with sarcopenia and cachexia, ACSM and AHA suggest to integrate aerobic, resistance and flexibility training to routine activities of daily living of light or moderate intensity (e.g., self-care, cooking, casual walking or shopping etc.).

Aerobic training is any type of exercise that stimulates and strengthens the heart and lungs functions and improves the body's oxygen utilization. It is an important physiological stimulus able to induce many functional improvements extending life expectancy, reducing the risk of many chronic disorders and orchestrating numerous adaptation in skeletal muscles (see below) (41; 42). During this type of activities, such as walking, jogging and running, tissue metabolism uses oxygen at a rate at which the cardio respiratory system can replenish it in the working muscles.

ACSM and AHA recommend the participation in moderate-intensity aerobic training for a minimum of 30 minutes on five days each week (150 min/week) or vigorous-intensity aerobic activity for a minimum of 20 minutes on three days each week (60 min/week). Moderate-intensity aerobic activities produce a great increase in heart rate and breathing and, on a scale where 0 represents "no load" and 10 an "all-out effort", they represent a 5 or 6. On the other hand, vigorous intensity activities produce a large increase in heart rate and breathing and, on the same scale, represent 7 or 8 (43).

Several studies have shown the effectiveness of *resistance training* in improving muscle mass and functions. This type of training is "a form of physical activity designed to improve muscular fitness by exercising a muscle or a muscle group against external resistance" (44). ACSM and AHA recommend, at least, two resistance-training sessions per week (to be performed in non-consecutive days to ensure enough recovery time) in which all the six major muscle groups must be involved (chest, shoulders, arms, back, abdomen and legs). Different types of resistance training are described in literature, differing from each other regarding the intensity, the number of repetitions and the velocity of execution. ACSM and AHA suggest a slow-moderate intensity resistance training performed with a resistance (weight) that allows 10 to 15 repetitions at 65-70% of one repetition maximum (1RM), performing the concentric and eccentric phase in 2-3 seconds for each muscle contraction. This type of training is effective in increasing muscle strength but seems to be less effective in increasing muscle mass and power (43, 45, 46). In order to allow the proper progression, ACSM recommend to progressively increase the load according to the improvements made by the patients and in consideration of specific strength tests that must be performed frequently and constantly to estimate the 1 Repetition Maximum (1RM; index of maximal strength).

The loss of the muscle power, closely associated with muscle wasting, is a significant predictor of performing activities of daily living (i.e., getting dressed, cooking, carrying groceries, climbing stairs, etc.). To train muscle

power, the exercise protocols shall include 3 to 6 repetitions with an intensity higher than 80% of 1RM with a concentric phase performed as quickly as possible and an eccentric phase duration of approximately 2 seconds for each muscle contraction (45).

Finally, in order to reduce the risk of falls and subsequent debilitating injuries, ACSM and AHA suggest to integrate aerobic and resistance training with exercises focus on maintaining and improving balance and flexibility every day for at least 10 minutes (43).

Different molecular adaptations in multiple tissues underline the benefits determined by physical activity in both sarcopenic and cachectic subjects. Various signals, including Ca^{2+} and adenosine monophosphate (AMP), are activated by aerobic exercise. These signals activate intracellular pathways such as calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) and AMP-activated protein kinase (AMPK) that lead to an increase of mitochondrial genes activity (47). One of the most important regulators of mitochondrial biogenesis is the peroxisome proliferation activated receptor gamma co-activator -1 α (PGC-1 α) whose production is strongly induced by aerobic exercise (48, 49). Therefore, executing aerobic activities, the improved muscle mitochondrial content and efficiency, improves the capacity to cope with oxidative stress and optimize exercise capacity (50). Indeed, this type of exercise might not only counteract the reduction of oxidative capacity found in experimental cachexia (51), but it also stimulates the oxidative metabolism to prevent hyperlipidemia and, consequently, ameliorate the insulin resistance. Interestingly, aerobic exercise can also increase the skeletal muscle insulin sensitivity (52) increasing glucose transporters (GLUT 1-4) expression and activity. Although the mechanisms behind are still unknown, it seems that this increased insulin sensitivity could reduce the muscle protein breakdown (53).

On the other side, an intriguing hypothesis about the mechanism of action of resistance training foresees that this type of training is able to exert its effect on transcriptome and, in particular, Raue and colleagues (54) found that 661 genes were responsive to resistance exercise and that they correlated with the increase in whole

muscle size and strength. In addition, it has been widely demonstrated that resistance training enhances the rate of mixed muscle protein synthesis in older participants guarantying an effective muscle proteins turnover and reducing muscle wasting (55, 56, 57). Moreover, several studies agree with the idea that physical activity can exerts important functions against many other age-related markers improving the general adaptive response of specific anti-oxidant and stress proteins (58).

Conclusion

It is known that weight and muscle loss are associated with frailty, loss of independence and increased mortality. The population most affected by these wasting syndromes and their unfavorable consequences are elderly and cancer patients. Despite many efforts carried out by the scientific community to identify proper tests (i.e. postural balance, gait speed, handgrip strength, leg extension, measures of body composition and global physical function), to date, sarcopenia and cachexia in the majority of patients are not identified until the disease is advanced. In particular, cachexia is a condition that may be present in the early stages of tumor growth and sometimes before any signs or symptoms of malignancy (59). Currently, there are limited options to counteract the effects of muscle mass loss as a part of aging or a disease process, except for lifestyle therapies like physical activity.

Given the complexity of these muscle conditions and considering that during aging and cancer there is an increased risk of comorbidities, the exercise dose should be a crucial point to be carefully evaluated on a single patient basis.

In this review, we have presented some of the beneficial effects that physical activity could produce in counteracting sarcopenia and cancer cachexia. Indeed, physical activity seems to be the most effective method to treat these degenerative conditions, producing many benefits with very few side effects. Therefore, considering both the maintenance of muscle mass and the aforementioned molecular effects induced by different motor intervention protocols, a combination of aerobic and resistance exercise rather than only one of them appears to be preferred.

References

1. Wolfe RR. The underappreciated role of muscle in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 2006;84(3):475-82.
2. Pedersen BK. Muscles and their myokines. *J Exp Biol.* 2011;214(Pt 2):337-46.
3. Visser M. Towards a definition of sarcopenia--results from epidemiologic studies. *J Nutr Health Aging.* 2009;13(8):713-6.
4. Rosenberg IH, Roubenoff R. Stalking sarcopenia. *Ann Intern Med.* 1995;123(9):727-8. 5. Mazzeo, R. S. (2003). Exercise and the Older Adult. ACSM's Fit Society Page, 1-3.
5. Kim TN, Choi KM. Sarcopenia: definition, epidemiology, and pathophysiology. *J Bone Metab.* 2013;20(1):1-10.
6. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing.* 2010;39(4):412-23.
7. Payne C, Wiffen PJ, Martin S. Interventions for fatigue and weight loss in adults with advanced progressive illness. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;1:CD008427.

8. Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol.* 2011;12(5):489-95.
9. Mueller TC, Burmeister MA, Bachmann J, Martignoni ME. Cachexia and pancreatic cancer: are there treatment options? *World J Gastroenterol.* 2014;20(28):9361-73.
10. Beaudart C, Rizzoli R, Bruyère O, Reginster JY, Biver E. Sarcopenia: burden and challenges for public health. *Arch Public Health.* 2014;72(1):45.
11. Batsis JA, Barre LK, Mackenzie TA, Pratt SI, Lopez-Jimenez F, Bartels SJ. Variation in the prevalence of sarcopenia and sarcopenic obesity in older adults associated with different research definitions: dual-energy X-ray absorptiometry data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. *J Am Geriatr Soc.* 2013;61(6):974-80.
12. Bijlsma AY, Meskers CG, Ling CH, Narici M, Kurlle SE, Cameron ID, et al. Defining sarcopenia: the impact of different diagnostic criteria on the prevalence of sarcopenia in a large middle aged cohort. *Age (Dordr).* 2013;35(3):871-81.
13. Kanis JA, Cosman F. Osteoporosis international with other metabolic bone diseases. In 2016. p. 614.
14. Vaughan VC, Martin P, Lewandowski PA. Cancer cachexia: impact, mechanisms and emerging treatments. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2013;4(2):95-109.
15. Tan BH, Fearon KC. Cachexia: prevalence and impact in medicine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2008;11(4):400-7.
16. Fox KM, Brooks JM, Gandra SR, Markus R, Chiou CF. Estimation of Cachexia among Cancer Patients Based on Four Definitions. *J Oncol.* 2009;2009:693458.
17. Del Fabbro E, Inui A, Strasser F. Cancer Cachexia. Pocket book for cancer supportive care. New York: Springer Healthcare; 2012.
18. Muscaritoli M, Anker SD, Argilès J, Aversa Z, Bauer JM, Biolo G, et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: Joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics." *Clin Nutr.* 2010;29(2):154-9.
19. Drey M. Sarcopenia - pathophysiology and clinical relevance. *Wien Med Wochenschr.* 2011;161(17-18):402-8.
20. Bhasin S, Taylor WE, Singh R, Artaza J, Sinha-Hikim I, Jasuja R, et al. The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2003;58(12):M1103-10.
21. Jackson MJ. Reactive oxygen species in sarcopenia: Should we focus on excess oxidative damage or defective redox signalling? *Mol Aspects Med [Internet].* 2016;2016.
22. Dillin A, Gottschling DE, Nyström T. The good and the bad of being connected: the integrons of aging. *Curr Opin Cell Biol.* 2014;26:107-12.
23. Spirduso W, Francis K, MacRae P. Physical dimensions of aging. *Hum Kinet M. 2nd Editio.* Champaign, IL (USA): Human Kinetics; 2005;384.
24. Meng SJ, Yu LJ. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int J Mol Sci.* 2010;11(4):1509-26.
25. Deans C, Wigmore SJ. Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2005;8(3):265-9.
26. Khare M, Mohanty C, Das BK, Jyoti A, Mukhopadhyay B, Mishra SP. Free radicals and antioxidant status in protein energy malnutrition. *Int J Pediatr.* 2014;2014:254396.
27. Gilbert S. Developmental biology. Associates S, editor. *Methods [Internet].* 6th editio. Sunderland (MA); 2014;66(3):363-4.
28. Corbi G, Conti V, Russomanno G, Longobardi G, Furgi G, Filippelli A, et al. Adrenergic signaling and oxidative stress: a role for sirtuins? *Front Physiol.* 2013;4:324.
29. Pietrangelo T, Di Filippo ES, Mancinelli R, Doria C, Rotini A, Fanò-Illic G, et al. Low Intensity Exercise Training Improves Skeletal Muscle Regeneration Potential. *Front Physiol.* 2015;6:399.
30. Bouzid MA, Hammouda O, Matran R, Robin S, Fabre C. Changes in oxidative stress markers and biological markers of muscle injury with aging at rest and in response to an exhaustive exercise. *PLoS One.* 2014;9(3):e90420.
31. Sakuma K, Yamaguchi A. Sarcopenia and age-related endocrine function. *Int J Endocrinol.* 2012;2012:127362.
32. Aoyagi T, Terracina KP, Raza A, Matsubara H, Takabe K. Cancer cachexia, mechanism and treatment. *World J Gastrointest Oncol.* 2015;7(4):17-29.
33. Hubbard BP, Sinclair DA. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 2014;35(3):146-54.
34. Cvecka J, Tirpakova V, Sedliak M, Kern H, Mayr W, Hamar D. Physical Activity in Elderly. *Eur J Transl Myol.* 2015;25(4):249-52.
35. Bowen TS, Schuler G, Adams V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2015;6(3):197-207.
36. Knight K, Wade S, Balducci L. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *Am J Med.* 2004 Apr;116(7):11-26.
37. Argilès JM, Busquets S, López-Soriano FJ, Costelli P, Penna F. Are there any benefits of exercise training in cancer cachexia? *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2012;3(2):73-6.
38. Doyle C, Kushi LH, Byers T, Courneya KS, Demark-Wahnefried W, Grant B, et al. Nutrition and physical activity during and after cancer treatment: an American Cancer Society guide for informed choices. *CA Cancer J Clin.* 2006;56(6):323-53.
39. Montero-Fernández N, Serra-Rexach JA. Role of exercise on sarcopenia in the elderly. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2013;49(1):131-43.
40. Lindholm ME, Marabita F, Gomez-Cabrero D, Rundqvist H, Ekström TJ, Tegnér J, et al. An integrative analysis reveals coordinated reprogramming of the epigenome and the transcriptome in human skeletal muscle after training. *Epigenetics.* 2014;9(12):1557-69.
41. Saleem A, Safdar A. Exercise-induced histone acetylation - playing tag with the genome. *J Physiol.* 2010;588(Pt 6):905-6.
42. Nelson ME, Rejeski WJ, Blair SN, Duncan PW, Judge JO, King AC, et al. Physical activity and public health in older adults: recommendation from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Circulation.* 2007;116(9):1094-105.
43. Esco M. Resistance Training for Health and Fitness. *Am Coll Sport Med.* 2013;1-2.
44. Iolascon G, Di Pietro G, Gimigliano F, Mauro GL, Moretti A, Giamattei MT, et al. Physical exercise and sarcopenia in older people: position paper of the Italian Society of Orthopaedics and Medicine (OrtoMed). *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2014;11(3):215-21.
45. Yu J. The etiology and exercise implications of sarcopenia in the elderly. *Int J Nurs Sci.* Elsevier Ltd; 2015;2(2):199-203.
46. Hawley JA, Tipton KD, Millard-Stafford ML. Promoting training adaptations through nutritional interventions. *J Sports Sci.* 2006;24(7):709-21.
47. Lira VA, Benton CR, Yan Z, Bonen A. PGC-1 α regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;299(2):E145-61.
48. Baldwin KM, Haddad F. Research In the Exercise Sciences; Where We Are and Where Do We Go From Here: Part II? *Natl Inst Heal.* 2011;38(2):42-50.
49. Vincent G, Lamon S, Gant N, Vincent PJ, MacDonald JR, Markworth JF, et al. Changes in mitochondrial function and mitochondria associated protein expression in response to 2-weeks of high intensity interval training. *Front Physiol.* 2015;6:51.
50. White JP, Baynes JW, Welle SL, Kostek MC, Matesic LE, Sato S, et al. The regulation of skeletal muscle protein turnover during the progression of cancer cachexia in the Apc(Min/+) mouse. *PLoS One.* 2011;6(9):e24650.
51. Hawley JA, Lessard SJ. Exercise training-induced improvements in insulin action. *Acta Physiol (Oxf).* 2008;192(1):127-35.
52. Gordon BS, Kelleher AR, Kimball SR. Regulation of muscle protein synthesis and the effects of catabolic states. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(10):2147-57.
53. Raue U, Trappe TA, Estrem ST, Qian HR, Helvering LM, Smith RC, et al. Transcriptome signature of resistance exercise adaptations: mixed muscle and fiber type specific profiles in young and old adults. *J Appl Physiol (1985).* 2012;112(10):1625-36.

54. Yarasheski KE, Pak-Loduca J, Hasten DL, Obert KA, Brown MB, Sincore DR. Resistance exercise training increases mixed muscle protein synthesis rate in frail women and men ≥ 76 yr old. *Am J Physiol*. 1999;277(1 Pt 1):E118-25.
55. Frontera WR, Meredith CN, O'Reilly KP, Knuttgen HG, Evans WJ. Strength conditioning in older men: skeletal muscle hypertrophy and improved function. *J Appl Physiol* (1985). 1988;64(3):1038-44.
56. Fry CS, Drummond MJ, Glynn EL, Dickinson JM, Gundermann DM, Timmerman KL, et al. Skeletal muscle autophagy and protein breakdown following resistance exercise are similar in younger and older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013;68(5):599-607.
57. Beltran Valls MR, Dimauro I, Brunelli A, Tranchita E, Ciminelli E, Caserotti P, et al. Explosive type of moderate-resistance training induces functional, cardiovascular, and molecular adaptations in the elderly. *Age (Dordr)*. 2014;36(2):759-72.
58. Jurdana M. Cancer cachexia-anorexia syndrome and skeletal muscle wasting. *Radiol Oncol*. 2009;43(2):65-75.

Ishrana sportista

Sports nutrition

Milena Tomanic¹

¹Katedra za higijenu sa medicinskom ekologijom, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Kontakt: milena.tomanic@yahoo.com

Sažetak

S obzirom na veću energetske potrošnje, fizički aktivne osobe imaju i povećane nutritivne zahteve. Pored drugih važnih faktora za bavljenje sportom, kao što su dobro zdravstveno stanje i fizička predispozicija, adekvatna ishrana predstavlja fundamentalnu komponentu. Ishrana sportista mora da bude dobro isplanirana i individualno prilagođena na osnovu telesnih karakteristika, tendencije ka dobijanju u težini ili mršavljenju, učestalosti, dužini i intenzitetu treninga. Studije su pokazale da dobro balansirani odnos makro- i mikronutrijenata, uz podršku suplemenata i adekvatnu hidrataciju, može da značajno unapredi sportske performanse i odigra ključnu ulogu u postizanju boljih rezultata. Optimalno dizajniran program ishrane, sa realnim i dostižnim ciljevima, koji se nadovezuju na dobro isplanirane treninge, predstavlja osnov za uspešno bavljenje sportom. Samo ispunjeni nutritivni zahtevi mogu da preveniraju deficite i unaprede sportska dostignuća do krajnjih granica.

Cljučne reči: ishrana, dijeta, sport, sportisti, suplementi, hidratacija

Abstract

Due to higher energy consumption, physically active people have higher nutritional requirements. In addition to other important factors for sports, such as good health and physical predisposition, adequate nutrition is a fundamental component. Sports nutrition must be well planned and individually adapted based on physical characteristics, tendencies towards gaining or losing weight, frequency, duration and intensity of training sessions. Studies have shown that a well-balanced ratio of macro and micronutrients, with the support of supplements and adequate hydration, can significantly improve athletic performance and plays a key role in achieving better results. An optimally designed nutritional program, with realistic and achievable goals, which complements a well-planned training program, is the basis for success in sports. Only when nutritional requirements are met, deficits can be prevented and performance in sport pushed to the limit.

Key words: nutrition, diet, sport, athlete, supplements, hydration

Uvod

Prema Insitutu Mulier (Holandija) (1), preko 60 miliona ljudi u Evropi su članovi nekog sportskog kluba. Kada se tome doda broj rekreativaca u svim vidovima fizičke aktivnosti postaje jasno kolika je razmera sportske populacije. Uprkos potencijalno negativnim ishodima, kao što su relativno česte povrede i slično, preovlađuje jedinstveno mišljenje da pozitivni aspekti bavljenja sportom umnogome nadmašuju negativne (2). Brojne studije ukazuju da fizička aktivnost i sport imaju pozitivne efekte na razvoj ličnosti, kao i na emotivno i psihosocijalno sazrevanje kod mladih. U poređenju sa vršnjakinjama koje se nisu bavile sportom, sportistkinje u srednjoj školi ređe su stupale u seksualne odnose, ređe konzumirale alkohol, cigarete i drogu i u manjem broju slučajeva patile od depresije (3).

Pored drugih važnih faktora koji predstavljaju osnov za uspešno bavljenje sportom, kao što su fizička predispozicija, dobro zdravstveno stanje, posvećenost sportu i jaka motivacija, redovni treninzi, rad na brzini, snazi, tehnici i drugim veštinama koje odgovaraju na specifične zahteve svakog sporta (4), adekvatna ishrana predstavlja fundamentalnu komponentu. Ishrana sportista je prepoznata kao ključni faktor za postizanje dobrih rezultata (5, 6).

Opšti nutritivni ciljevi u sportu

Optimalan unos energije kod sportista predstavlja imperativ iz više razloga. Važno je, pre svega, podmiriti potrebe organizma za makro- i mikronutrijentima, neophodne za normalno funkcionisanje i očuvanje dobrog zdravlja.

Unos energije utiče na izgradnju mišićne mase i nivoa masti koji su od izuzetnog značaja za postizanje visokog nivoa fizičke spremnosti, kao i na funkciju hormonskog i imunog sistema. Održavanje energije i dobar balans tečnosti imaju važnu ulogu tokom sportskih aktivnosti i predstavljaju osnovu za specijalne nutricionističke programe (7).

Svaki sportista ima individualne energetske zahteve. Oni su uslovljeni telesnom masom i visinom, tendencijom ka dobijanju u težini ili mršavljenju i prilagođeni su učestalosti, dužini i intenzitetu treninga (8). Program treninga kod sportista razlikuje se prema vrsti samog takmičenja i fazama sportske sezone, pa ishrana treba da bude usklađena prema tome.

Rezultati ispitivanja otkrivaju da sportisti tokom intenzivnog treninga troše između 3 000 i 5 000 kcal. Deca i tinejdžeri treba da unesu adekvatnu količinu hranljivih materija neophodnih za normalan rast i razvoj, a preko toga još i energiju za vežbanje različitog intenziteta (9).

Iako je veliki broj onih koji su sposobni da održe balans energije tokom dužeg perioda, otkriveno je da su sportisti često suočeni sa problemima koji se odnose na unos energije kod ekstremno visokih ili ekstremno niskih zahteva. Korist od pravilnog načina ishrane najviše dolazi do izražaja u takmičarskom delu bavljenja sportom, gde adekvatna nutritivna strategija omogućava da takmičar pruži svoj maksimum. Iako je od naročite važnosti stručno planirana ishrana u fazama takmičenja, svakodnevni režim ishrane čini osnov u izgradnji telesne kompozicije i održavanju zdrave i snažne strukture koja omogućava sportistima da se takmiče.

Uticaj sporta na kontrolu telesne težine

Neki sportisti imaju telesnu konstituciju predodređenu za sport kojim se bave, pa lako postižu i održavaju idealnu telesnu formu. Drugi moraju da vrše korekcije u vidu smanjenja ili povećanja telesne mase ili promene odnosa mišićnog i masnog tkiva, a to postižu prilagođavanjem ishrane usmerenim treninzima.

Istraživanje kojim je procenjivan međusobni odnos telesnih dimenzija i veštine izvođenja fundamentalnih pokreta među decom i adolescentima pokazalo je da prekomerno povećanje telesne mase smanjuje veštinu izvođenja pokreta (10). Pošto je dostizanje idealne mase i željene telesne strukture od ključnog značaja za ostvarenje vrhunskih rezultata, mnogi sportisti su izloženi povećanom riziku od unosa nedovoljne količine hranljivih materija. U praksi je često prisutan restriktivan unos kalorija koji se sreće kod sportista, naročito žena (11).

Istraživanje sprovedeno na rekreativcima muškog i ženskog pola pokazalo je da 23% muškaraca i 63% žena unose neadekvatne količine hranljivih materija zato što žele da smanje telesnu težinu (12). Ovaj problem naročito dolazi do izražaja u sportovima koji naglašavaju telesnu figuru ili prave podele prema težinskim kategorijama (npr. ritmička gimnastika, umetničko klizanje i ples, džudo, boks i drugi), gde regulacija telesne težine, između ostalog, može da ima odlučujuću ulogu u uspehu (13, 14).

Pritisak kompetitivnih sportova stvara veliki rizik za razvoj patološke kontrole telesne težine kod oba pola (15). Gubitak telesne masti trebalo bi da bude dostignut isključivo kroz program baziran na umerenom i postepenom gubitku energije.

Hranljive materije bogate energijom

Energiju potrebnu za ćelijske funkcije tokom mirovanja i mišićnog napora telo dobija iz ugljenih hidrata, masti i proteina.

Energija za rad mišića može da bude stvorena anaerobno, procesom glikolize, gde se isključivo razlažu glukoza ili glikogen, ili aerobno, Krebsovim ciklusom, gde se metabolički proizvodi glikolize koriste zajedno sa masnim kiselinama putem procesa beta oksidacije. Kada je telo u mirovanju, većina energije (oko 60%) dolazi od sagorevanja masti, dok je značajno manji (oko 35%) udeo ugljenih hidrata. Preostalih 5% u proseku potiče iz proteina. Tokom mišićnog napora relativno učešće goriva u proizvodnji potrebne energije zavisi od intenziteta i trajanja vežbanja, kao i od ishrane i nivoa treninga sportiste (16).

1. Ugljeni hidrati

Ljudski organizam ima rezervu od oko 500 g ugljenih hidrata. Najveći deo ugljenih hidrata je uskladišten u formi glikogena u mišićima (oko 450 g) i jetri (oko 50 g), a svega 15 g u obliku glukoze u krvi. Ishrana bogata ugljenim hidratima može skoro da duplira rezerve u mišićima i jetri, dok će ishrana sa smanjenim unosom ugljenih hidrata imati suprotan efekat (16).

Potrebe sportista za ugljenim hidratima zasnivaju se na nekoliko faktora. Sportisti moraju da unesu dovoljno ugljenih hidrata da bi obezbedili dovoljno energije i zadovoljili većinu potreba za kalorijama, kako bi rezerve glikogena učinili optimalnim, omogućili oporavak mišića nakon fizičke aktivnosti, obezbedili brzo i lako dostupan izvor energije između obroka i održali optimalan nivo glukoze u krvi. Glukoza predstavlja glavni izvor energije za mišićnu aktivnost. Sa povećanjem intenziteta vežbanja javljaju se sve veće potrebe za glukozom kao energetskim gorivom. Održavanje količine ugljenih hidrata na visokom nivou je veoma zahtevno jer su, za razliku

Tabela 1. Preporuke za unos ugljenih hidrata u skladu sa fizičkom aktivnošću

Aktivnost	Preporučeni unos UH	Primer
Neposredan oporavak nakon vežbanja (0 do 4 sata)	1 g/kg TM/h (konzumirano u čestim intervalima)	Sportista težak 70 kg treba da unosi 70 g UH (280 kcal) neposredno nakon vežbanja, a zatim dodatnih 70 g svakog sata naredna 4 sata
Dnevni unos: trening umerenog trajanja i niskog intenziteta	5 - 6 g/kg TM/dan	Sportista težak 70 kg treba da unosi 350 do 490 g UH (1400 do 1960 kcal) tokom celog dana. U tu količinu je uračunata količina koja se unosi radi oporavka neposredno nakon vežbanja
Dnevni unos: trening izdržljivosti umerenog do visokog intenziteta	7 - 12 g/kg TM/dan	Sportista težak 70 kg treba da unosi 490 do 840 g UH (1960 do 3360 kcal) tokom celog dana. U tu količinu je uračunata količina koja se unosi radi oporavka neposredno nakon vežbanja
Dnevni unos: ekstremni trenazni program koji traje 4 i više sati dnevno	10 - 12 (ili više) g/kg TM/dan	Sportista težak 70 kg treba da unosi 700 do 840 g UH (2800 do 3360 kcal) tokom celog dana. U tu količinu je uračunata količina koja se unosi radi oporavka neposredno nakon vežbanja

Adaptirano iz: L. Burke and E. Coyle, 2004, „Nutrition for athletes”, *Journal of Sport Sciences* 22(1): 39-55.

od mogućnosti ljudskog organizma da deponuje mast, kapaciteti za deponovanje ugljenih hidrata veoma ograničeni. Unos ugljenih hidrata naročito postaje značajan pri veoma intenzivnim treninzima jer se energetske metaboličke reakcije tada maksimalno oslanjaju na njih kao na izvor energije za mišiće. Brojne studije su pokazale da je nizak nivo ugljenih hidrata tokom vežbanja povezan sa relativno brzom pojavom zamora (17-19).

S obzirom na to da su rezerve ugljenih hidrata ograničene (350 kcal glikogena u jetri i 1400 kcal glikogena u mišićima), sportisti treba da razmotre strategiju kako da započnu vežbanje sa punim rezervama glikogena i kako da uspostave rutinu koja sprečava da se te rezerve drastično smanje. Dokazano je da veći intenzitet vežbanja zahteva ugljene hidrate kao dominantno gorivo za mišićnu kontrakciju, ali takođe i da vežbanje niskog intenziteta, za koje se energija dominantno crpi iz masti, i dalje zahteva izvestan nivo ugljenih hidrata za potpuno sagorevanje masti i za održavanje koncentracije glukoze u krvi. Dakle, svi oblici fizičke aktivnosti su u nekom stepenu zavisni od ugljenih hidrata (11).

Tradicionalan način za utvrđivanje potreba za ugljenim hidratima jeste razmatranje učešća ugljenih hidrata u ukupnom unosu kalorija. Preporuke za opštu populaciju sugerišu unos ugljenih hidrata od 50 do 55% od ukupnog broja kalorija (20). Međutim količina koja se preporučuje sportistima iznosi 55 do 65% unosa kalorija iz ugljenih hidrata (11). Drugi, i svakako bolji način utvrđivanja potreba za ugljenim hidratima jeste da se u razmatranje uzme količina ugljenih hidrata (u gramima) koja treba da se konzumira po kilogramu telesne mase (**Tabela 1**).

Većina ugljenih hidrata trebalo bi da bude uneta iz žitarica, mahunarki, voća i povrća. Ako se prisetimo glikemijskog indeksa kao merila brzine kojom se ugljeni hidrati uneti ishranom apsorbuju i pojavljuju u cirkulaciji, za opštu populaciju je poželjno (uključujući i sportiste)

da konzumira ugljene hidrate koji imaju nisku do srednju vrednost glikemijskog indeksa (banana, pomorandža, mekinje, testenina, integralni pšenični hleb, zobena kaša). Postoje periodi, međutim, (npr. za vreme i neposredno nakon vežbanja), kada bi za sportiste mogla da bude korisnija hrana sa visokoglikemijskim vrednostima (beli hleb, med, pečeni krompir, kukuruzne pahuljice). Uopšteno govoreći, namirnice bogate ugljenim hidratima sa višim sadržajem vlakana imaju niži glikemijski indeks, tako da predstavljaju dobar izbor za sportiste. Dijetetska vlakna, međutim, mogu da izazovu gasove i nadimanje, što znači da predstavljaju loš izbor namirnica za konzumiranje neposredno pre ili za vreme takmičenja. Namirnice od rastvorljivih (solubilnih) vlakana mogu da izazovu manje problema, ali se preporučuje da sportisti sami eksperimentišu da bi utvrdili koje namirnice najbolje podnose. Smatra se da se najlakše podnose skrobni ugljeni hidrati sa niskom koncentracijom vlakana, kao što su testenine (11).

2. Masti

Masti su idealna forma kroz koju ćelije mogu da skladište i troše energiju. Jedan gram masti sadrži oko 9 kcal, dvostruko više od jednog grama proteina ili ugljenih hidrata. Masti su uskladištene u obliku triglicerida u mišićnim ćelijama (oko 500 g) i adipocitima (oko 14 000 g), dok je zanemarljiva količina (0,4 g) u plazmi u obliku slobodnih masnih kiselina (11, 16).

Iako su se u novijoj literaturi pojavljivale teze koje govore u prilog unosu velikih količina masti (unos 30% ili više od ukupnih kalorija), treba naglasiti da su masti visokokonzentrovani izvor energije koji ne dovodi do poboljšanja sportskih rezultata kada se unosi u velikim količinama. Ne postoje relevantne naučne informacije koje ukazuju na to da je unos masti iznad 25% od ukupnih kalorija generalno koristan za sportiste (21).

Sa stanovišta vežbanja, nije dokazano da povećanje unosa masti rezultira poboljšanjem sportskih rezultata, izuzev ako je povećan unos masti jedini način da sportista dobije dovoljno energije. Sportistima kojima je potrebno više od 4 000 kcal svakog dana da bi zadovoljili kombinovane potrebe rasta, vežbanja i regeneracije tkiva, može da bude potrebno umereno povećanje unosa masti u ishrani (poželjno biljnog ili ribljeg porekla). Pošto je mast koncentrovani oblik energije i od ugljenih hidrata i od proteina, više energije može se uneti u manjim količinama hrane ukoliko namirnice sadrže više masti. Ako bi sportista pokušao da potpuno obustavi unos masti, morao bi da konzumira toliko hrane da bi postalo nemoguće organizovati dovoljno obroka ili odvojiti dovoljno vremena za obroke da bi se konzumirala potrebna energija (11). Pošto sportisti deponuju više kalorija iz masti nego iz ugljenih hidrata, povećanje sposobnosti da se koriste masti uzrokuje proporcionalnu redukciju u oslanjanju na ugljene hidrate, čime se povećava izdržljivost. Jednostavno rečeno, ako se sagoreva više masti pri većem intenzitetu vežbanja, time će rezerve ugljenih hidrata trajati duže, čime se poboljšava izdržljivost.

Oksidacija masti, dakle, nikada ne može da dostigne taj nivo da eliminiše potrebu za ugljenim hidratima (glikogenom) za vreme intenzivnog vežbanja. Prema tome, veća sposobnost da se masti metabolišu za dobijanje energije ne treba da usmeri sportiste da povećaju proporcionalan unos masti. Pod pretpostavkom da je nivo unosa kalorija adekvatan, sportisti mogu da proizvedu i deponuju masti koje su im potrebne, a veći unos masti u ishrani jasan je faktor rizika za pojavljivanje ateroskleroznih bolesti srca. Čak i kratkoročno povećanje unosa masti sa pratećim smanjenjem ugljenih hidrata u trajanju od samo 3 do 5 dana izaziva opadanje parametara izdržljivosti kada se uporede sa sposobnostima pri visokom unosu ugljenih hidrata (22). Što se tiče triglicerida, za većinu sportista maksimalan unos triglicerida srednje dugačkih lanaca ne treba da prelazi 30 grama (270 kcal). Unos iznad pomenute količine u ogromnoj meri povećava rizik od pojave smetnji gastrointestinalnog trakta, uključujući i dijareju (23).

Zadnjih godina se sve veća pažnja posvećuje mogućim korisnim efektima omega 3 masnih kiselina u poboljšanju rezultata u sportu. Unos omega 3 masnih kiselina ostvaruje

pozitivne efekte pospešujući aerobne metaboličke procese, što se pozitivno ispoljava i na rezultate sportista i na sposobnost pojedinca da efikasno koristi masti kao energetsko gorivo. To ne znači da je povećanje ukupnog unosa masti poželjno ili neophodno da bi se ostvarili pomenuti korisni efekti, ali sportisti mogu da razmotre promenu vrste masti koje unose u ishranu time što će uključiti periodične ali redovne (jednom ili dva puta nedeljno) obroke lososa, albakor tune, atlantske haringe i ostalih riba hladnih dubokih mora u količini od 110 do 140 grama da bi povećali udeo omega 3 masnih kiselina koje su im na raspolaganju. U drugim studijama koje su ispitivale uticaj omega 3 masnih kiselina nisu nađena konzistentna poboljšanja snage i izdržljivosti, kao ni dokazi da omega 3 masne kiseline smanjuju bol u mišićima (24-26).

3. Proteini

Ugljeni hidrati i masne kiseline su prioritetno gorivo koje služi kao izvor energije tokom vežbanja. Sa produženim vežbanjem se smanjuju rezerve mišićnog glikogena, a počinju da se koriste proteini. Aminokiseline se konvertuju u jetri preko glukoneogeneze i dovode do oksidativnih procesa (16).

Mnogi sportisti imaju stav da su proteini najvažniji za postizanje dobrih rezultata u sportu. U sportovima snage sve više se koristi neka vrsta proteinske suplementacije. Suficitarnim unosom proteina smanjuje se mogućnost za adekvatan unos drugih esencijalnih hranljivih materija. Česte su i situacije u kojima su potrebe za proteinima veće nego što ih sportista unosi. Takmičari u sportovima aerobne izdržljivosti, koji izgledaju mršavo i manje mišićavo od npr. dizača tegova, zapravo imaju skoro jednako visoku potrebu za proteinima (po jedinici telesne mase) kao sportisti u sportovima snage (27, 28). Preporučeni dnevni nivo unosa proteina za opštu populaciju je 12-15% od ukupnog unosa kalorija, što bi iznosilo nekih 0,8 grama proteina po kilogramu telesne mase. Sportistima je potrebno više proteina zbog veće bezmasne telesne mase, veće potrebe za oporavkom tkiva i zato što se za vreme fizičkih aktivnosti sagoreva mala količina proteina. To kod sportista povećava potrebe za proteinima približno dvostruko u odnosu na potrebe onih koji nisu sportisti (1,2 do 1,7 grama po kilogramu) (Tabela 2) (11).

Tabela 2. Potrebe za proteinima fizički aktivnih ljudi

Tip aktivnosti	Ukupna energija (kcal/dan)	Proteini		
		g/kg/dan	g/dan	% ukupnih kcal/dan
Izdržljivost (a, b)	3800	1,2-1,4	84-98	9-10
Snaga (a, c)	3.200	1,6-1,7	112-119	14-15

a Pod pretpostavkom da potrošnja energije u miru iznosi 40 kcal po kg telesne mase na dan

b Pod pretpostavkom da atletičar muškarac trči 16 km na dan tempom 3,7 minuta po km

c Pod pretpostavkom da je potrebno dodatnih 6 kcal po kg telesne mase dnevno za trening sa velikim opterećenjem

Preuzeto iz Dr. M. J.Gibala, 2002. „Dietary protein, amino acid supplements, and recovery from exercise”, GSSI Sports Science Exchange, br. 87, 15(4)

Tabela 3. Funkcije aminokiselina i proteina

Funkcionalni proteini (hemoglobin, enzimi, hormoni; održavanje normalne osmolalnosti krvi; antitela; izvor energije)	Enzimi
	Antitela
	Transparentni proteini
	Hormoni
Strukturni proteini (konstituišu ćelijsku strukturu; pomažu razvoj, obnavljanje i održavanje tkiva)	Mišići, tetive, ligamenti
	Koža
	Zubna i koštana srž
	Kosa i nokti

Prerađeno iz Benardot D. Napredna sportska ishrana; [translated by Halilovic R]. Beograd: Data Status, 2010. p 27.

Pravilo sportske ishrane jeste da ugljeni hidrati imaju efekat štednje proteina. To znači da će, ako sportista unese dovoljno ugljenih hidrata u energetske svrhe, proteini biti pošteđeni sagorevanja kako bi mogli da se iskoriste za mnogo važnije funkcije (**Tabela 3**).

Preporuke za povećanim unosom proteina kod sportista zasnivaju se na četiri faktora (29-31). Sportisti obično imaju veću bezmasnu telesnu masu, za čije je održavanje potrebno više proteina; oni putem urina gube malu količinu proteina (fenomen poznat kao proteinurija), sagorevaju malu količinu proteina za vreme fizičke aktivnosti (približno 5% od ukupnog sagorevanja energije) i potrebna im je dodatna količina proteina da bi se oporavili od oštećenja mišića koja nastaju tokom trajanja treninga.

Visokoproteinske namirnice imaju nisku brzinu želudačnog pražnjenja, tako da se ne preporučuje njihova konzumacija neposredno pre ili za vreme vežbanja.

Mikronutrijenti

Vitamini i minerali (mikronutrijenti) su esencijalne hranljive materije koje učestvuju u brojnim fiziološkim funkcijama, ali i u sintezi i reparaciji mišićnog tkiva tokom oporavka od vežbanja i povreda. Kod prolongiranih sportskih aktivnosti povećava se rizik za nastanak oksidativnog stresa i javlja se povećana proizvodnja slobodnih radikala. Intenzivna fizička aktivnost stimuliše antioksidativnu odbranu, ali sportisti treba da raspoložu dovoljnom količinom antioksidanasa koji će se suprotstaviti slobodnim radikalima. Vitamini i minerali su antioksidansi koji smanjuju oksidativni stres nastao tokom vežbanja (32). Rutinsko vežbanje izaziva „trošenje” i gubitak mikronutrijenata iz tela. Kao rezultat svega toga javlja se potreba za većim unosom mikronutrijenata koji će učestvovati u izgradnji, reparaciji i održavanju mišićnog tkiva kod sportista (33). Zbog

toga je sportistima potrebno više različitih vrsta vitamina i minerala nego osobama koje se ne bave sportom. Većina sportista, međutim, ne shvata kolika količina određenih vitamina i minerala im je potrebna, niti razume principe optimalnog unosa za obezbeđivanje adekvatnih količina, tako da većina njih čini istu grešku i unosi preveliku količinu mikronutrijenata putem suplementacije.

Činjenica da mikronutrijenti imaju integrisane funkcije treba da ohrabri sportiste da obezbede najširi mogući spektar vitamina i minerala svojim ćelijama. Dodatni unos samo jednog vitamina ili samo jednog minerala može da naruši ravnotežu hranljivih materija i delikatan odnos između njih.

Institut za medicinu SAD je dao preporuke za unos vitamina i minerala na osnovu starosti, pola i trudnoće (**Tabele 4 i 5**).

Tzv. DRI (Dietary Reference Intakes) prilagođene su zdravim, umereno aktivnim osobama. S obzirom na to da diskrepanca između potreba sportista i umereno aktivnih ljudi nije prevelika, ove preporuke zadovoljavaju i potrebe sportista.

Sportisti koji se iz nekog razloga podvrgavaju restriktivnim dijetama ili imaju velike oscilacije u telesnoj težini, gde eliminišu određenu grupu namirnica iz ishrane ili konzumiraju hranu siromašnu mikronutrijentima, pod rizikom su da dospeju u mikronutritivni deficit. U ovakvim situacijama im se preporučuje da dnevnu nadoknadu vitamina i minerala realizuju putem suplemenata. Treba imati na umu da korišćenje suplemenata ne oslobađa sportistu obaveze da i dalje teži dobrom izboru hranljivih materija (34).

Hidratacija

Dobra hidriranost omogućava održavanje ravnoteže intracelijske i ekstrakelijske tečnosti u organizmu i čini osnov za nesmetano obavljanje fizičke aktivnosti. Uprkos tome, većina sportista je nekad doživela određen stepen dehidracije. Imajući u vidu da se za vreme intenzivnog vežbanja oslobađa gromna količina znoja, sportisti su prinuđeni da nadoknađuju tečnost kako bi održali optimalno stanje vode u organizmu. Ako se tečnost ne nadoknadi dolazi do prevremenog zamora sa mogućnošću razvoja toplotnog udara. Od ključne važnosti za sportiste je da budu u stanju optimalne hidratacije pre započinjanja vežbanja ili takmičenja. Svi dokazi ukazuju na to da čak i minimalan stepen hipohidratacije (npr. deficit od svega 2% telesne mase) može da izazove merljive razlike u izdržljivosti i sportskim rezultatima. Što je stepen deficita veći negativan uticaj je izraženiji (35).

Tabela 4. Preporučeni dnevni unos 13 esencijalnih vitamina

Vitamin	DRI - odrasli* muškarci	DRI- odrasli* žene (koje nisu trudne)
Vitamin A	900 µg	700 µg
Vitamin D	5 µg	5 µg
Vitamin E	15 µg	15 mg
Vitamin K	120 µg	90 µg
Vitamin C	90 mg nepušači 125 mg pušači	75 mg nepušači 110 mg pušači
Tiamin (B1)	1,2 mg	1,1 mg
Riboflavin (B2)	1,3 mg	1,1 mg
Niacin (B3)	16 mg	14 mg
Piridoksin (B6)	1,3 mg	1,3 mg
Kobalamin (B12)	2,4 µg	2,4 µg
Folati	400 µg	400 µg
Pantotenska kiselina	5 mg	5 mg
Biotin	30 µg	30 µg

* starosna dob od 19 do 50 godina

DRI= Dietary Reference Intake; µg= mikrogram; mg= miligram

Podaci preuzeti sa: Instituta za Medicinu, SAD, 2000.

Iako nije moguće izbeći određeni gubitak tečnosti, sportista treba da održava stepen deficita na prihvatljivom nivou i da razvije dobru strategiju nadoknade tečnosti pre, tokom i posle sportskog nastupa. Saznanja o postizanju optimalne hidratacije tokom vežbanja napredovala su u poslednjih 30 godina. Početni fokus koji se odnosio samo na potrebe za tečnošću evoluirao je do realizacije strategi-

je koja omogućava da se potrebe za tečnošću i energijom mogu kombinovano regulisati. Mnoga istraživanja su pokazala da unos pića koja sadrže 4-8% ugljenih hidrata pruža efikasnu rehidraciju tokom vežbanja i obezbeđuju koristan izvor energije za mišiće i centralni nervni sistem. Poslednja uputstva za rehidraciju tokom vežbanja podržavaju korišćenje gotovih sportskih napitaka (4-8%

Tabela 5. Preporučeni dnevni unos minerala

Minerali	DRI - odrasli* muškarci	DRI- odrasli* žene (koje nisu trudne)
Kalcijum	1000 mg	1000 µg
Fosfor	700 mg	700 µg
Magnezijum	400 mg (od 19 do 30 godina) 420 mg (od 31 do 50 godina)	310 mg (od 19 do 30 godina) 320 mg (od 31 do 50 godina)
Cink	11 mg	8 mg
Gvožđe	8 mg nepušači	18 mg
Fluoridi	4 mg	3 mg
Mangan	2,3 mg	1,8 mg
Bakar	900 mg	900 mg
Jod	150 µg	150 mg
Selen	55 µg	55 µg
Molibden	45 µg	45 µg
Hrom	35 mg	25 mg

* starosna dob od 19 do 50 godina

DRI= Dietary Reference Intake; µg= mikrogram; mg= miligram

Podaci preuzeti sa: Instituta za Medicinu, SAD, 2000.

ugljenih hidrata, 10-25 mmol/L natrijuma) tokom raznih produženih takmičenja i treninga, iako se voda i dalje smatra najprikladnijim pićem za aktivnosti koje traju kraće od 60 minuta (7).

Zaključak

Osobe koje se bave sportom uvek nastoje da pronađu novi način da unaprede svoje rezultate, a dobra nutritivna strategija je put koji im otvara velike mogućnosti za to. Suptilna korekcija ishrane veoma često može da unapre-

di takmičarski rezultat za mali deo sekunde ili nekoliko milimetara koliko je često dovoljno za pobjedu. Od suštinskog značaja je da sportisti i treneri nauče da procene koji je unos energetske materije potreban i kakav treba da bude odnos ugljenih hidrata, masti i proteina u svakom obroku, sa ciljem da se obezbede optimalne mentalne i mišićne funkcije neophodne za sport kojim se bave. Dobar program ishrane, osmišljen na vreme, optimalno dizajniran i sa realnim ciljevima treba da bude osnov koji bi svakom ozbiljnom sportisti bio na raspolaganju. Samo ispunjeni nutritivni zahtevi mogu da preveniraju deficite i unaprede sportske performanse do krajnjih granica.

Literatura

1. http://www.measuresport.eu/news/item/1000000344/sports_clubs_form_the_heart_of_the_european_sports_sector
2. Reiner M, Niermann C, Jekauc D, Woll A. Long-term health benefits of physical activity—A systematic review of longitudinal studies. *BMC Public Health* 2013;13:813.
3. Cockburn C, and Clarke G. Everybody's Looking at You! Girls negotiating the 'femininity deficit' they incur in physical education. *Women Studies International Forum* 2002.25;6:651-665.
4. Mahan LK and Stump SE. „Nutrition for exercise and sports performance“, *Food Nutrition and Diet therapy*.10th edition, WB Saunders Company; 2000. p. 545.
5. Hottenrott K, Hass E, Kraus M, Neumann G, Steiner M, Knechtle B. A scientific nutrition strategy improves time trial performance by ≈6% when compared with a self-chosen nutrition strategy in trained cyclists: a randomized cross-over study. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2012; 37:637-45
6. Hansen EA, Emanuelsen A, Gertsen RM, Sørensen S. Improved marathon performance by in-race nutritional strategy intervention. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2014; 24:645-55.
7. Burke L. Editor. *Practical sports nutrition*. Champaign, IL: Human Kinetics, 2007.
8. Jeukendrup AA. Step towards personalized sports nutrition: carbohydrate intake during exercise. *Sports Med*. 2014; 44:25-33.
9. Mudambi SR, Rajagopal MV. *Fundamentals of Foods and Nutrition*. (4th ed): New Delhi: Wiley Eastern Limited, 1989.
10. Okely AD, Booth ML et Chey T. Relationships between body composition and fundamental movements skills among children and adolescents. *Research Quarterly for Exercise and Sport* 2004; 75:238-247.
11. Benardot D. *Napredna sportska ishrana*, Beograd: Data Status, 2010.
12. Hinton PS, Stanfor TC, Davidson MM, Yakushko OF. et Beck NC. Nutrient intake and dietary behaviors of male and female collegiate athletes. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 2004;14:389-405.
13. Sundgot-Borgen J. et Torstveit M.K. Prevalence of eating disorders in elite athletes is higher than in the general population. *Clinical Journal of Sport Medicine* 2004; 14:25-32.
14. Dosil J, González-Oya J. *Eating disorders in athletes*. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons, Ltd; 2008. *Eating disorders and the Athlete's environment*; pp. 41–63.
15. Werner A, Thiel A, Schneider S, Mayer J, Giel KE, Zipfel A. Weight-control behaviour and weight-concerns in young elite athletes – a systematic review. *J Eat Disord*. 2013; 1:18.
16. Klissouras V. *Osnovi sportske fiziologije*; [translated by Andjelkovic M. et al.]; Dikić N. Beograd: Institut za sport, 2013.
17. Wagenmakers AJ, Beckers EJ, Brouns F, Kuipers H, Soeters PB, van der Vusse GJ, et al. Carbohydrate supplementation, glycogen depletion, and amino acid metabolism during exercise. *Am J Physiol* 1991; 260:883-890.
18. Bosch AN, Dennis SC, Noakes TD. Influence of carbohydrate loading on fuel substrate turnover and oxidation during prolonged exercise. *J Appl Physiol* 1993; 74:1921-1927.
19. Coggan AR, Coyle EF. Reversal of fatigue during prolonged exercise by carbohydrate infusion or ingestion. *J Appl Physiol* 1987; 63:2388-2395.
20. USDA/HHS. *Nutrition and your health: Dietary guidelines for Americans*. Home and Garden bulletin br. 232. Washington DC: Government Printing Office. 2000.
21. Noakes T, Volek JS, Phinney SD. Low-carbohydrate diets for athletes: what evidence? *Br J Sports Med*. 2014; 48:1077–8.
22. Kiens B. i Helge J.W. Adaptations to a high fat diet. In: *Nutrition in sport* (Ed. Maughan R.J.). London: Blackwell Science. 2000; 192-202.
23. Jukendrup AE, Saris WHM, Schrauwen P, Brouns F et Wagemakers AJM. Metabolic availability of mediumchain triglycerides increase energy expenditure and decrease adiposity in overweight men. *Obesity Research* 2003; 11:395-402.
24. Brilla LF et Lanerholm TE. Effect of fish oil supplementation and exercise on serum lipids and aerobic fitness. *Journal of Sports Medicine* 1990; 30:173.
25. Huffman DM, Altena TS, Mawhinney TP et Thomas TR. Effect on n-3 fatty acids on free tryptophan and exercise fatigue. *European Journal of Applied Physiology* 2004; 92:584-91.
26. Lenn J, Uhl T, Mattacola C, Boissonneault G, Yates J, Ibrahim W. et Bruckner G. The effects of fish oil and isoflavones delayed onset muscle soreness. *Medicine & Science in Sports and Exercise* 2002; 34:1605-13.
27. Meredith CN, Zackin MJ, Frontera WR et Evans WJ. Dietary Protein requirements and body protein metabolism in endurance-trained men. *Journal of Applied Physiology* 1989; 66:2850-2856.
28. Butterfield GE et Calloway DH. Physical activity improves protein utilization in young men. *British Journal of Nutrition*, 1984; 51:171-184.
29. Meredith CN, Zackin MJ, Frontera WR et Evans WJ. Dietary Protein requirements and body protein metabolism in endurance-trained men. *Journal of Applied Physiology*, 1989; 66:2850-2856.
30. Butterfield G, Cady C et Moynihan S. Effect of increasing protein intake on nitrogen balance in recreational weight lifters. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 1992; 24:71.
31. Tarnopolsky MA, MacDougall JD. et Atkinson SA. Influence of protein intake and training status on nitrogen balance and lean body mass. *Journal of Applied Physiology*, 1988; 64(1):187-193.
32. Pingitore, Alessandro et al. Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports *Nutrition*, 2015; 31:916–922.
33. Driskell J. Summary: Vitamins and trace elements in sports nutrition. In: Driskell J, Wolinsky I, editors. *Sports Nutrition. Vitamins and Trace Elements*. New York (NY): CRC/Taylor & Francis; 2006. p. 323-31.
34. Lukaski HC. Vitamin and mineral status: effects on physical performance. *Nutrition*. 2004; 20:632-44.
35. Hargreaves M. Physiological benefits of fluid and energy replacement during exercise. *Australian Journal of Nutrition and Dietetics* 1996; 53:3-7.

Sindrom sportskog srca - prijatelj ili neprijatelj sportista?

Athlete's heart syndrome - a friend or foe?

Marina Đelić^{1,2}

¹Institut za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“

²Medicinski fakultet, Univerziteta u Beogradu

Kontakt: mdjelic011@gmail.com

Sažetak

Sindrom sportskog srca je skup morfoloških i funkcionalnih adaptivnih promena srca i, posledično, kardiovaskularnog sistema kao fiziološkog odgovora na kontinuiranu i intenzivnu fizičku aktivnost. Smatra se da je ovaj sindrom "siva zona" između fiziologije i patologije, dakle nedovoljno poznat i samim tim podložan različitim tumačenjima. Poslednjih nekoliko godina smo bili svedoci nekolicine iznenadnih smrti vrhunskih mladih sportista na terenu koje su dovođene u vezu sa sindromom sportskog srca. Interes pobuđen ovim tragičnim događajima izazvao je brojne rasprave u stručnoj javnosti i naveo na dilemu: "Da li je fiziološka adaptivna promena kao što je sportsko srce prijatelj ili neprijatelj sportista?" U ovom revijskom radu ćemo pokušati da damo neke smernice koje su u vezi sa ovom dilemom.

Ključne reči: sindrom sportsko srce, iznenadna srcana smrt, vrhunski sportisti

Abstract

Athlete's heart syndrome is a set of morphological and functional adaptive changes of the heart and consequently the cardiovascular system as a physiological response to chronic physical activity. It is believed that this syndrome is "gray zone" between physiology and pathology and therefore subject to different interpretations. In the last few years, we have some sudden cardiac deaths of elite young athletes that have been speculated and associated with the athlete's heart syndrome. There is an increase in the scientific research in this field and the debate among the experts with one dilemma: if these physiological adaptive changes, athlete's heart syndrome, is the athletes friend or foe? In this Review, we describe various types of athlete's heart syndrome- their developmental, biology, differentiation, cell heterogeneity and functional characteristics.

Key words: Athlete's heart syndrome, Sudden cardiac deaths, Elite athletes

Uvod

Kontinuirana fizička aktivnost izaziva adaptivne promene na svim organskim sistemima čoveka, od kojih su najizraženije i najviše proučavane one na kardiovaskularnom sistemu (KVS). Kardiovaskularni sistem je i ograničavajući faktor za fizičku aktivnost koji aktivnim mišićima omogućava dopremanje dovoljne količine kiseonika tokom jednog srčanog ciklusa (1). Iz ovog razloga je srčani mišić izložen ponavljanim naporima visokog intenziteta i podleže fiziološkim promenama, u literaturi poznatim pod nazivom "sindrom sportskog srca" (engl. *Athletes heart syndrome*) (2). Sindrom sportskog srca je skup morfoloških i funkcionalnih adaptivnih promena srca i, posledično, kardiovaskularnog sistema kao fiziološkog odgovora na kontinuiranu i intenzivnu fizičku aktivnost. Termin sportsko srce u stručnoj literaturi prvi

put opisuje švedski fizičar S. Hensken (*S. Henschen*) 1899. godine (3). On je perkutanom metodom utvrdio povećanje srca kod jednog sportiste skijaša i već tada zaključio da fizička aktivnost poput skijanja, u kojoj se istovremeno koristi mnogo aktivnih mišića i koja uključuje prvenstveno aerobnu fizičku aktivnost, rezultira povećanjem dimenzija obe strane srca (4). Od tada pa do danas sindrom sportskog srca je definisan kao složen fenomen, još uvijek nedovoljno istražen, kako u anatomsom, tako i u funkcionalnom smislu (5). Smatra se da je ovaj sindrom "siva zona" između fiziologije i patologije, dakle nedovoljno poznat i time podložan različitim tumačenjima.

Poslednjih nekoliko godina smo bili svedoci nekolicine iznenadnih smrti vrhunskih mladih sportista na terenu koje su dovođene u vezu sa sindromom sportskog srca (6). Interes pobuđen ovim tragičnim događajima izazvao je

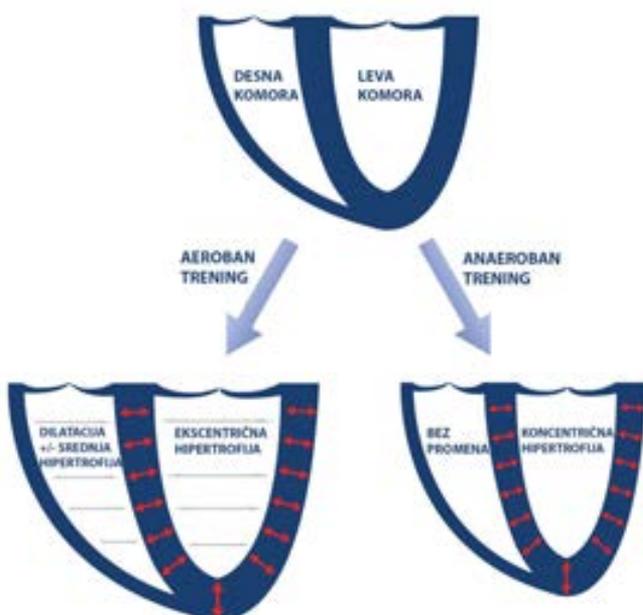
brojne rasprave u stručnoj javnosti i naveo na dilemu: “Da li je fiziološka adaptivna promena kao što je sportsko srce prijatelj ili neprijatelj sportista?” U ovom revijijskom radu ćemo pokušati da damo neke smernice u vezi sa ovom dilemom.

Morfološke karakteristike sindroma sportskog srca

U morfološkom smislu, najjednostavnije je objasniti da se sindrom sportskog srca odlikuje benignim povećanjem srca u celini, povećanjem svih šupljina, tj. hipertrofijom srca (7). Sindrom sportsko srce, međutim, ima različite adaptivne morfološke karakteristike koje zavise od vrste fizičke aktivnosti (u zavisnosti od preovlađivanja dinamičke i statičke komponente), intenziteta fizičke aktivnosti, pola, uzrasta i rase (8).

Svaki sport ima svoje specifičnosti koje zavise od grupe mišića koji se prilikom sportskih aktivnosti koriste. Zato su Mičel (*Mitchell*) i saradnici (2005) predložili klasifikaciju sporta u devet grupa, na osnovu preovlađivanja dinamičke (u literaturi se mogu naći i termini: izdržljivost, aerobna i/ili izotonična aktivnost) i statičke (u literaturi se mogu naći i termini: trening sa otporom, anaerobna i/ili izometrijska aktivnost) komponente. Ova klasifikacija je napravljena u cilju uključivanja sportista sa kardiovaskularnim oboljenjima u sportske aktivnosti (9). Poslednjih godina se primenjuje i modifikovana Mičelova klasifikacija na četiri grupe, u skladu sa preovlađujućim karakteristikama treninga: veštine (engl. *skill*), sportove snage (engl. *power*), mešovite discipline (engl. *mixed*) i

Slika 1. Adaptivne morfološke karakteristike sindroma sportskog srca koje zavise od vrste fizičke aktivnosti.



sportove izdržljivosti (engl. *endurance*) (10). Suštinska razlika o uticaju ovih vrsta fizičkih aktivnosti ogleda se u mehanizmu nastanka uvećanja šupljina i zadebljanja zida komora (**Slika 1**).

Krajem 20. veka istraživači su ukazali na to da se najuočljivije kliničke promene u dimenzijama srca događaju kod vrhunskih sportista, čiji treninzi zahtevaju izdržljivost ili preovladavanje dinamičke komponente i koji traju duže od šest meseci ($\geq 6-8$ h nedeljno) (7, 11). Kod kontinuiranog dinamičkog opterećenja, koje se karakteriše ponavljanim izotoničnim kontrakcijama velikih grupa mišića, što rezultira vidljivim kretanjem u prostoru, mišići se ponašaju kao mišićna pumpa, vraćaju krv u srce, najviše ga opterećujući volumenom krvi. Dugotrajna fizička aktivnost ovog tipa povećava i zahteve za kiseonikom u aktivnim mišićima, što posledično izaziva povećanje ukupne zapremine potrošnje kiseonika i dopremanja kiseonika mišićima (8). Prema Fikovoj jednačini, po kojoj je minutni volumen srca (MVS) srazmeran količniku potrošnje kiseonika i arteriovenskoj razlici ($MVS = VO_2 / A - VO_2$) proizilazi da je povećanje potrošnje kiseonika srazmerno povećanju MVS i razlike u koncentraciji kiseonika u arterijama i venama ($A - VO_2$). Tokom akutne fizičke aktivnosti dolazi do povećanja protoka i MVS na račun srčane frekvencije i udarnog volumena. Maksimalni MVS sa porastom intenziteta fizičke aktivnosti može da dostigne vrednosti 20-25 ml/min kod sedentarne populacije i 35-40 ml/min kod vrhunskih sportista (2). Periferni vaskularni otpor se smanjuje uz malu promenu dijastolne vrednosti arterijskog krvnog pritiska, dok se sistolna vrednost arterijskog krvnog pritiska značajno povećava zbog naglog porasta MVS (11). Ponavljanjem, tj. kontinuiranom fizičkom aktivnošću, kao posledica opterećenja volumenom nastaju adaptivne promene na srčanim šupljinama koje treba da zadovolje nove zahteve organizma sportista sa preovlađivanjem dinamičke komponente. Ova adaptacija srca se odlikuje povećanjem dimenzija komora (ekscentrična hipertrofija srčanog mišića), zajedno sa zadebljanjem zadnjeg zida leve komore i interventrikularnog septuma, kao i povećanjem end-dijastolnog prečnika (12). Ovde bi trebalo naglasiti da je ovaj koncept adaptacije (poznat kao Mongartov model, 1975) danas pod velikim znakom pitanja zbog najčešće mešovitog tipa treninga i, posledično, uključivanja efekata statičkih komponenti, ali i hormonskih i metaboličkih uticaja (13). Prosečno povećanje debljine zadnjeg zida leve komore je za samo 10-25% veće nego kod sedentarne populacije, dok je end-dijastolni prečnik veći za 33% (14). Prema većini studija, prosečna vrednost debljine zadnjeg zida leve komore je 10,6 mm, dok je debljina septuma 10,4 mm (5, 6). S druge strane, poznato je da kontinuirana fizička aktivnost utiče i na frekvenciju i ritam rada srca (15, 16). Maksimalna frekvencija srca se ne menja kod sportista sa preovladavanjem dinamičke kom-

ponente, ali je zato prisutna sinusna bradikardija u mirovanju, kao i sporije povećanje brzine rada srca pri bilo kom stepenu submaksimalnog opterećenja (17). Ove promene su verovatno povezane sa promenom simpatičko-vagusni balansa (viša parasimpatička i niža simpatička aktivnost), kao što je pokazano u mnogim studijama (15, 16, 17). I dalje, međutim, ostaje nejasno kojim mehanizmima kontinuirana fizička aktivnost poboljšava tonus vagusa. Neke studije ukazuju na to da povećanje tonusa vagusa na sinoatrijalnom (SA) čvoru ima ulogu u nastanku sinusne bradikardije (17, 18). Sve ove promene dovode do ekonomičnijeg rada srca u mirovanju, ali i u uslovima fizičkog opterećenja, što predstavlja pozitivne adaptivne promene u sindromu sportskog srca kod sportista sa preovlađujućom dinamičkom komponentom.

Nasuprot tome, kod sportista koji su podvrgnuti kraćem, ali intenzivnijem opterećenju, kao što je slučaj u sportovima sa preovlađujućom statičkom komponentom (npr. dizači tegova), može da postoji značajno povećanje srčane mase, ali bez povećanja srčane šupljine (19). Kod ovog tipa adaptacije, koji se još naziva i koncentrična adaptacija srca, pojavljuje se značajno zadebljanje leve komore, koje ne prelazi 12 mm (20). Objašnjenje leži u činjenici da kod treninga brzine i snage nastaje periferna mišićna hipertrofija s malim ili nikakvim promenama MVS. Razlog je prvenstveno povećanje perifernog vaskularnog otpora, što posledično izaziva značajno povećanje dijasolne vrednosti arterijskog krvnog pritiska (opterećenje pritiskom), ali se sistolna vrednost arterijskog krvnog pritiska malo povećava zbog malog porasta MVS (21). Tako se kod sportista sa preovlađujućom statičkom komponentom povećava odnos masa/volumen srca (22).

Najveći deo istraživanja na temu sindroma sportskog srca, opisanih u literaturi, rađen je na muškoj populaciji, ali se u dostupnoj literaturi ukazuje i na pojavu simptoma sportskog srca i kod žena koje se bave sportom (2). Povećanje dimenzije leve komore na kraju dijasole i maksimalne debljine leve komore zabeležena je kod 8% testiranih sportistkinja još davne 1996. godine (23). Ipak, u poređenju sa muškom populacijom sportista, kod žena su zabeležena značajno manja povećanja dimenzija leve komore i debljine zidova (2, 23).

Klinički aspekt sindroma sportskog srca

Iako su u većini slučajeva gore navedene adaptivne promene sindroma sportskog srca asimptomatske, u 3-5% slučajeva mogu da daju promene na elektrokardiografskom zapisu (EKG) ili ultrazvučnoj dijagnostici, testovima opterećenja i magnetnoj rezonanci (24, 25, 26).

Elektrokardiografske studije su ukazale da se adaptivne promene sportskog srca mogu uočiti na EKG zapisima vrhunskih sportista, zbog čega i zato je elektrokardiografija obavezan deo pregleda sportista (25). Treba, međutim, imati na umu da je 50-60% EKG zapisa normalno kod vrhunskih sportista muškog pola i kod 75-80% ženskog pola uzrasta 12-40 godina (24). Sportovi koji iziskuju veću izdržljivost imaju veću učestalost fizioloških promena u EKG zapisu. Zato su Korado (*Corado*) i saradnici 2010. godine (26) nalaze na EKG zapisu podelili u dve grupe: na učestale EKG promene (u vezi sa fizičkom aktivnošću) i manje česte EKG promene (nisu u vezi samo sa fizičkom aktivnošću) (**Tabela 1**). Uopšteno, u poređenju sa sedentarnom populacijom, učestali nalazi na EKG kod

Tabela 1. Klasifikacija promena u EKG zapisu kod sportista

Učestale EKG promene u skladu sa fizičkom aktivnošću	Manje česte EKG promene koje nisu u skladu sa fizičkom aktivnošću
Sinus bradikardija	Inverzija T-talasa
AV blok I stepena	Depresija ST segmenta
Nekompletan blok desne grane	Patološki Q-zubac
Rana repolarizacija	Uvećanje leve pretkomore
QRS voltažni kriterijum za hipertrofiju leve komore	Odstupanje od leve osovine/prednji levi hemiblok
	Odstupanje od desne osovine/zadnji levi hemiblok
	Hipertrofija desne komore
	Preekscitacija komora
	Kompletan levi ili desni blok grane
	Produžen ili skraćen QT interval
	Repolarizacija nalik brugadi

sportista su respiratorna aritmija sa sinusnom bradikardijom između 45-55 srčanih ciklusa u minutu i atrioventrikularni (AV) blok I stepena. Često se uočava i proširenje QRS kompleksa, sa blagim porastom amplitude (oko 60% aerobnih sportista ima dokazanu hipertrofiju leve komore na EKG zapisu koristeći Sokolov-Lion indeks) i levom devijacijom srčane osovine (27). Kod sportista se često javlja visok T-talasa koji mora da bude pozitivan u svim odvodima, a može da bude negativan u aVR, gde je uvek negativan i u III i V1 (25). Kod nekih sportista može se naći i nodalni ritam ili AV blok drugog stepena (Mobic tip 1) (26).

Na pojavu specifičnog EKG zapisa sportista značajan uticaj imaju uzrast, pol i vrsta sporta. Sportisti sa preovlađujućom dinamičkom komponentom imaju učestalije promene na EKG koje su u vezi sa sindromom sportskog srca. Adolescenti sportisti (ispod 14 godina starosti) učestalo imaju inverziju T-talasa u odvodima V1-V4, koja bi trebalo da nestane do 16. godine (može se zadržati u odvodima iznad V2) (2). Kada se, međutim, uoče manje česte promene na EKG zapisu ili dve i više udruženih promena, obavezno je dodatno ispitivanje (26). Na primer, ako je PR interval duži od 0,3 s ili je QRS kompleks nenormalan, uz prisutan AV blok (Venkenbah) ili kongenitalni kompletan AV blok, sportistu obavezno treba dodatno ispitati na testu opterećenja, 24-časovnom holteru EKG-a i ehokardiografiji (2).

Ehokardiografske studije potvrđuju adaptivne promene sindroma sportskog srca u zavisnosti od vrste fizičke aktivnosti, odnosno opterećenja volumenom i pritiskom. Ova metoda za sada predstavlja zlatni standard za razlikovanje adaptivnih promena sindroma sportskog srca od patološke hipertrofične kardiomiopatije (HCM), ali i drugih patoloških stanja.

Najveće promene na ultrazvučnom nalazu uglavnom se nalaze kod sportista muškog pola, u čijim trenizima prevladava dinamička komponenta, i sa velikom ukupnom površinom tela (npr. veslači i biciklisti na duge staze) (27). Brojne ehokardiografske studije su pokazale da je kod sindroma sportskog srca prisutna normalna ili blago povećana dijastolna funkcija leve komore uz postojanje hipertrofije karakteristične za ekscentričnu adaptaciju (26, 27, 28). U studiji Pelicija (*Pelliccia*) i saradnika više od 10% sportista izdržljivosti imalo je end-dijastolne dimenzije leve komore veće od 60 mm (28). Ovi autori su naglasili i značaj ultrazvučnih dimenzija zida leve komore i septuma, sa prosečnom debljinom zida do 13 mm, i uglavnom simetričnom hipertrofijom. Važno meriti i odnos srednje debljine zida leve komore i prečnika leve komore, koji kod sportista ne bi trebalo da prelazi 0,45 (29). Ovaj parametar može da omogući razlikovanje koncentričnog (relativna debljina zida $\leq 0,45$) od ekscentričnog remodelinga (relativna debljina zida $< 0,3$) (28, 29). Poslednje

dve decenije istraživači ukazuju i na remodelovanje desne komore u kojoj vladaju niski pritisci (30, 31). Strukturno, dinamička fizička aktivnost može da poveća dimenzije desne komore u smislu hipertrofije koja prati hipertrofiju leve komore (31). Zato je važno odrediti i odnos dimenzija leve i desne komore (LV/RV), koji kod vrhunskih sportista ostaje nepromenjen (30). Smanjenje ovog odnosa ukazuje na patološka stanja.

Razlikovanje sindroma sportskog srca od sličnih patoloških stanja

Samom činjenicom da u okviru sindroma sportskog srca dolazi do jasnog zadebljanja srčanog mišića i/ili uvećanja šupljina, postavlja se pitanje diferenciranja ove fiziološke hipertrofije od patološke, koja se viđa u brojnim kardiološkim i nekardiološkim bolestima (1). Najpre treba naglasiti da je za ovo razlikovanje najvažnija primena dijagnostičkih metoda (EKG, ehokardiografija, testovi opterećenja, genetske analize, magnetna rezonanca...). Pojava udruženih simptoma i nalaza, uz pozitivnu anamnezu, ukazuje na patološka stanja (30).

Osnovni dijagnostički problem je razlikovanje HCM od sindroma sportskog srca, gde prisustvo depresije ST segmenta, inverzije T-talasa u lateralnim odvodima i patološkog Q-zupca uz asimetrično uvećanje zadnjeg zida leve komore na ultrazvučnom nalazu ukazuje na prisustvo HCM (29). Hipertrofična kardiomiopatija je udružena i sa smanjenjem end-dijastolnog prečnika leve komore (≤ 45 mm) (30). Konačnu dijagnozu i razlikovanje sindroma sportskog srca i HCM omogućavaju magnetna rezonanca i genetska ispitivanja (31).

Ekstremno remodelovanje desne komore, kao što je moguće kod sportista izdržljivosti, treba razlikovati od aritmogene displazije desne komore (ARVD). U pitanju je bolest nepoznate etiologije koja se karakteriše infiltracijom srčanog mišića desne komore masnim i vezivnim tkivom (30, 31, 32). Razlikovanje ARVD od sportskog srca je izuzetno teško zato što u oba slučaja može da postoje uvećanje desne komore i poremećaji repolarizacije i sprovođenja. Zato je ovde važno odrediti odnos dimenzija leve i desne komore, koji je kod ARVD najčešće smanjen. Konačnu dijagnozu daje magnetna rezonanca, gde se mogu videti diskinezija desne komore i fibrozno tkivo u miokardu (32).

Miokarditis je retko oboljenje, najčešće izazvano virusima (u više od polovine obolelih uzročnik je koksaki virus) i nekada ga je teško razlikovati od sindroma sportskog srca. Karakteristično je da se kod miokarditisa javljaju aritmije, povećanje prečnika, koje kod vrhunskih sportista može da bude udruženo i sa adaptacijom leve komore,

kao i prisustvo sistolne disfunkcije (33). Jasnu dijagnozu moguće je postaviti biopsijom i PCR metodom kojom se otkriva viralna RNK. Ukoliko se utvrdi prisustvo virusa, vrhunskog sportistu je neophodno privremeno isključiti iz procesa treniranja (6).

Najvažniji zadatak skrininga sportista i ostalih aktivnih učesnika u sportu je razlikovanje promena na srcu nastalih usled fiziološke adaptacije na kontinuiranu fizičku aktivnost od onih koje nastaju kao posledica različitih patoloških stanja. Samo tada će ova benigna adaptivna i fiziološka promena biti prijatelj svakog sportiste.

Literatura

- Schnell F, Riding N, O'Hanlon R, Axel Lentz P, Donal E, Kervio G, et al. Recognition and significance of pathological T-wave inversions in athletes. *Circulation*. 2015; 131(2): 165-73.
- Sharma S, Merghani A, Mont L. Exercise and the heart: the good, the bad, and the ugly. *Eur Heart J*. 2015; 36(23): 1445-53.
- Henschen S. *Skilanglauf und skiwettlauf. Eine medizini-sche sport studie*. Jena: Mitt Med Klin Uppsala; 1899.
- Mills JD, Moore GE, Thompson PD. The athlete's heart. *Clinic Sports Med*. 1997; 16: 725-37.
- Kaşıkcıoğlu E. The incognita of the known: the athlete's heart syndrome. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2011; 11(4): 351-9.
- Maron BJ. Historical Perspectives on Sudden Deaths in Young Athletes With Evolution over 35 Years. *Am J Cardiol*. 2015;116(9): 1461-8.
- Pelliccia A, Culasso F, Di Paolo FM, Maron BJ. Physiologic left ventricular cavity dilatation in elite athletes. *Ann Internal Med*. 1999; 130: 23-31.
- Eijssvogels TM, Fernandez AB, Thompson PD. Are There Deleterious Cardiac Effects of Acute and Chronic Endurance Exercise? *Physiol Rev*. 2016; 96(1): 99-125.
- Mitchell JH, Haskell W, Snell P, Van Camp SP. Task Force 8: Classification of sports. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45(8): 1364-7.
- Caselli S, Di Paolo FM, Pisicchio C, Di Pietro R, Quattrini FM, Di Giacinto B, et al. Threedimensional echocardiographic characterization of left ventricular remodeling in Olympic athletes. *Am J Cardiol*. 2011; 108(1): 141-7.
- Rowell LB, O'Leary DS. Reflex control of the circulation during exercise: chemoreflexes and mechanoreflexes. *J Appl Physiol*. 1990; 69: 407-18.
- Utomi V, Oxborough D, Ashley E, Lord R, Fletcher S, Stemberge M, et al. Predominance of normal left ventricular geometry in the male 'athlete's heart'. *Heart*. 2014; 100(16): 1264-71.
- Morganroth J, Maron BJ, Henry WL, Epstein SE. Comparative left ventricular dimensions in trained athletes. *Ann Intern Med*. 1975; 82: 521-4.
- Naylor LH, George K, O'Driscoll G, Green DJ. The athlete's heart: a contemporary appraisal of the 'Morganroth hypothesis'. *Sports Med*. 2008; 38(1): 69-90.
- Fagard RH. Impact of different sports and training on cardiac structure and function. *Cardiol Clin*. 1992; 10: 241-56.
- Dong JG. The role of heart rate variability in sports physiology. *Exp Ther Med*. 2016; 11(5): 1531-6.
- Le Meur Y, Pichon A, Schaal K, Schmitt L, Louis J, Gueneron J, et al. Evidence of parasympathetic hyperactivity in functionally overreached athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2013; 45(11): 2061-71.
- Nakamura FY, Soares-Caldeira LF, Laursen PB, Polito MD, Leme LC, Buchheit M. Cardiac autonomic responses to repeated shuttle sprints. *Int J Sports Med*. 2009; 30(11): 808-13.
- Boettger S, Puta C, Yeragani VK, Donath L, Müller HJ, Gabriel HH, et al. Heart rate variability, QT variability, and electrodermal activity during exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2010; 42(3): 443-8.
- Oxborough D, Heemels A, Somauroo J, McClean G, Mistry P, Lord R, et al. Left and right ventricular longitudinal strain-volume/area relationships in elite athletes. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2016, *in press*.
- Toufan M, Kazemi B, Akbarzadeh F, Ataei A, Khalili M. Assessment of electrocardiography, echocardiography, and heart rate variability in dynamic and static type athletes. *Int J Gen Med*. 2012; 5: 655-60.
- Longhurst JC, Stebbins CL. The isometric athlete. *Cardiol Clin*. 1992; 10: 281-94.
- Pelliccia A, Maron BJ, Culasso F, Spataro A, Caselli G. Athlete's heart in women. Echocardiographic characterization of highly trained elite female athletes. *JAMA*. 1996; 276(3): 211-5.
- Calore C, Zorzi A, Sheikh N, Nese A, Facci M, Malhotra A, et al. Electrocardiographic anterior T-wave inversion in athletes of different ethnicities: differential diagnosis between athlete's heart and cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2015; *in press*.
- Corrado D, Schimoddi C, Basso C, Borjesson M, Schiavon M, Pelliccia A, et al. Risk of sports: do we need a pre-participation screening for competitive and leisure athletes? *Eur Heart J*. 2011; 32(8): 934-44.
- Corrado D, Pelliccia A, Heidbuchel H, Sharma S, Link M, Basso C, et al. Recommendations for interpretation of 12-lead electrocardiogram in the athlete. *Eur Heart J*. 2010; 31(2):243-59.
- Carre F, Chignon JC. Advantages of electrocardiographic monitoring in top level athletes. *Int J Sports Med*. 1991; 12(2): 236-40.
- Pelliccia A, Culasso F, Di Paolo FM, et al. Physiologic left ventricular cavity dilatation in elite athletes. *Ann Intern Med*. 1999; 130(1): 23-31.
- Kerkhof DL, Gleason CN, Basilio FC, Corrado GD. Is There a Role for Limited Echocardiography During the Preparticipation Physical Examination? *PM R*. 2016; 8(3 Suppl): S36-44.
- Grazioli G, Sanz M, Montserrat S, Vidal B, Sitges M. Echocardiography in the evaluation of athletes. *F1000Res*. 2015; 4:151.
- Scharf M, Brem MH, Wilhelm M, et al. Cardiac magnetic resonance assessment of left and right ventricular morphologic and functional adaptations in professional soccer players. *Am Heart J*. 2010; 159(5): 911-8.
- te Riele AS, Tandri H, Bluemke DA: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC): cardiovascular magnetic resonance update. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2014;16: 50.
- Basso C, Carturan E, Corrado D, Thiene G. Myocarditis and dilated cardiomyopathy in athletes: diagnosis, management, and recommendations for sport activity. *Cardiol Clin*. 2007; 25(3): 423-9.

Sportska kineziologija – dijagnostika i terapijski značaj mirujućeg mišićnog tonusa

Sports kinesiology – diagnostic and therapeutic aspects of human resting muscle tone

Duško Spasovski^{1,2}

¹Institut za ortopedsko-hirurške bolesti “Banjica”, Beograd

²Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Kontakt: duskosp@gmail.com

Sažetak

Laboratorijska i klinička ispitivanja mišića pokazala su da i u odsustvu bioelektrične aktivnosti, odnosno kontrakcije, skeletni mišići čoveka ispoljavaju određeni bazični nivo tenzije. Ova pojava se označava kao mirujući tonus mišića (engl. *human resting muscle tone*, HRMT) uzrokovan viskoelastičnom vezivnog tkiva, prisustvom titina u miofibrilima i fenomenom triksotrofije (promene viskoziteta u zavisnosti od intenziteta sile smicanja) i u okviru Hillovog biomehantičkog modela mišića predstavljena je paralelnom pasivnom elastičnom komponentom.

Mirujući tonus mišića je značajan izvor sile duž muskuloskeletnog sistema, dovodeći do pritiska u nivou hrskavica, rasta većeg od 0,3 MPa, u proseku više od 96,53% vremena dnevno, značajno utičući na nastanak ortopedskih deformiteta. Na intenzitet HRMT utiču brojni faktori: emocionalni, konstitucionalni i refleksni faktori, fizička aktivnost, rast skeleta i drugi.

Direktna procena HRMT nuklearnom magnetnom rezonancom (NMR) ili ultrazvučnom (UZ) elastografijom, analizom elektromiografskog (EMG) signala, mehanomiografijom ili miotonometrijom komplikovana je i skupa i podesna jedino za eksperimentalne uslove. Kliničku procenu HRMT moguće je obaviti putem reverznog inženjeringa - analizom posledica. *CoreFitMax* metod analizira posturalne parametre (43 statička i 40 dinamičkih) algoritmom diskretne analize konačnih elemenata i proračunava relativni odnos HRMT grupe od 62 mišića najznačajnijih za posturu i lokomociju. Ovaj metod koristi savremenu kineziološku analizu zasnovanu na miofascijalnim lancima. Rezultati pomažu u postavljanju pravilne etiološke dijagnoze strukturnih deformiteta i funkcionalnih poremećaja lokomotornog sistema. Restitucija odgovarajućeg HRMT doprinosi poboljšanju balansa i posturalnoj korekciji, a to je moguće postići na više načina: vežbanjem, fizikalnom terapijom i rehabilitacijom, kao i primenom sredstava za imobilizaciju, lekova ili hirurških postupaka.

Savremena saznanja o biomehantičkoj integraciji vezivnog tkiva u miofascijalne lance dovode HRMT u središte pažnje u pogledu terapije i prevencije u svakodnevnoj ortopedskoj i fizijatrijskoj praksi.

Ključne reči: mirujući tonus mišića, kineziološka analiza, mišićna kontrakcija, skeletni deformitet, miofascijalni lanci

Abstract

Laboratory and clinical muscle analysis has revealed that even in the absence of bioelectrical and motor activity, skeletal muscles have certain basic level of tension. This is called *Human Resting Muscle Tone* (HRMT). It results from viscoelasticity of connective tissue, titin action in muscle fibers and the trixotrophy of muscle tissue (nonlinear relation between muscle viscosity and shear force) and in Hill's muscle model it is represented by parallel elastic component.

HRMT is a source of significant force across the musculoskeletal system, exerting an average pressure on growth cartilages larger than 0.3MPa, for more than 96,53% of time and participating in the development of orthopedic deformities. The intensity of HRMT is under the influence of many factors: emotional, constitutional, reflex activity, physical activity, skeletal growth and other.

Direct measurement of HRMT by NMR, US elastography, EMG analysis, mechanomyography or myotonometry is complicated and expensive, therefore it is reserved mostly for scientific investigation. Clinical assessment of HRMT can be done by reverse engineering approach: the analysis of consequences. *CoreFitMax* method provides an analysis of postural data (43 static and 40 dynamic), using a discrete finite element analysis algorithm to calculate relative HRMT levels of 62 major muscles important for posture and locomotion. *CoreFitMax* algorithm uses myofascial, chains-based, kinesiological analysis. Results contribute to establishing an etiological diagnosis of structural and functional deformity of the human body. Restitution of adequate HRMT improves muscular balance and posture. It can be achieved by exercise, physical therapy and rehabilitation, using immobilization or medication, or even by surgical procedures.

Biomechanical integration of connective tissue into myofascial chains brings HRMT into focus in therapeutic and preventive measures in everyday orthopaedic and physiatric practice.

Key words: human resting muscle tone, kinesiology analysis, muscle contraction, skeletal deformity, myofascial chains

Uvod

Pod pojmom “sistem organa za kretanje” u medicini se eufemistički podrazumeva skeletni sistem - najveći deo čovekovih kostiju, zglobljenih pokretnim zglobovima koji su biomehantički premošćeni važnim mekim tkivima, poput skeletnih mišića sa svojim tetivama, zglobnih kapsula, brojnih ligamenata i fascija. Kompleksni zadatak kao što je međusobno kretanje delova tela ili pomeraj kompletnog tela u prostoru zahteva, međutim, daleko više od koštanozglobnih elemenata. Za to su neophodni funkcionisanje značajnog dela centralnog i perifernog nervnog sistema, kao i cirkulatorna, metabolička i hormonska homeostaza. Može se reći da je pokret, u opštem smislu, najsloženija integrativna funkcija ljudskog bića, takva da se sve čovekove osnovne životne potrebe mogu podeliti na one koje zadovoljavaju potrebu za kretanjem, i na preostale, koje su tim kretanjem zadovoljene. Pored individualnog, fiziološkog značaja, kretanje svakako ima i svoju evolutivno-filogenetsku vrednost.

Ovako složena aktivnost medicinski se može analizirati na brojne načine: na primer, zasebne oblasti medicine se bave ispitivanjem funkcionisanja neuro-mišićne komponente kretanja (neurologija), anatomskog integriteta lokomotornog sistema (ortopedija, traumatologija, fizijatrija), energetskog aspekta kretanja (interna medicina, sportska medicina, farmakologija). Kada je u pitanju kvalitet kretanja, odnosno motoričke karakteristike kretanja koje se mogu meriti i kod zdravih ljudi, on retko dospeva u fokus zdravstvenih radnika već se tiho prepušta stručnjacima iz oblasti sporta i fizičkog vaspitanja.

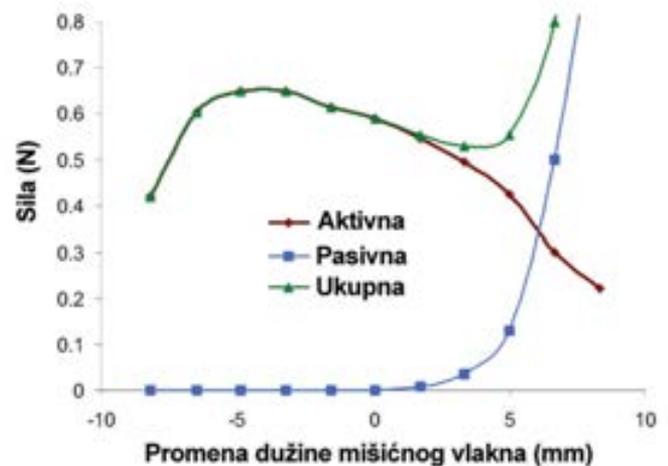
Uzevši u obzir intenzivni razvoj sportske nauke, koji je uz primenu savremene tehnologije postao veoma značajan izvor informacija o funkcionisanju čovekovog tela u različitim motoričkim uslovima, pojavila se potreba da se znanje i iskustvo dve susedne, povezane oblasti sublimiraju i na taj način oplemene i unaprede. Kao jedna od važnih zajedničkih tema nameće se i problem dijagnostike i doziranja kvaliteta čovekovog kretanja, čija je paradigma fenomen mirujućeg mišićnog tonusa.

Mišićni tonus

Mišićna vlakna imaju sposobnost kontrakcije na osnovu nervnog impulsa, pristiglog putem motornog nerva, kao

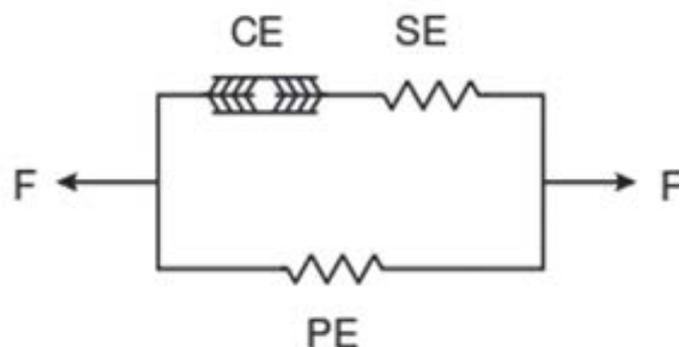
i zahvaljujući uticaju skoka koncentracije jona kalcijuma (Ca^{2+}) u sarkoplazmi. Pri kontrakciji se značajno menja oblik (ne i zapremina) mišića, i to u vidu skraćanja po uzdužnoj osi, uz proširenje mišićnog tela i povećanje koncentrične sile na pripojima. Pomenuta koncentrična sila, kojom se mišić opire istezanju svojih krajeva, naziva se mišićni tonus (1).

Laboratorijska biomehantička merenja tonusa mišića tokom ciklusa skraćanja i istezanja pokazala su da odnos tonusa i dužine mišića nije linearan (slika 1).



Slika 1. Grafik odnosa dužina-sila (2)

Postoji više biomehantičkih modela koji opisuju ovu i druge mehaničke karakteristike mišića, a jedan od savremenih je i Hilov model (slika 2). On uvodi dve komponente mišićne sile: aktivnu komponentu, oličenu u mehaničkom efektu kontrakcije određenog broja mišićnih vlakana u skeletnom mišiću, i pasivnu komponentu, proisteklu iz modula elastičnosti vezivnog tkiva koje okružuje i prožima mišić.



Legenda: F- sila; CE - kontraktilni element; SE - serijski elastični element; PE - paralelni elastični element

Slika 2. Hilov mišićni model (2)

Naknadna istraživanja su potvrdila vrednosti sile koju model predviđa prilikom pokreta i to u različitim nivoima istegnutosti ili skraćanja mišića.

Mirujući mišićni tonus

Mišićna kontrakcija zahteva određeni nivo električne stimulacije. Merenja, međutim, pokazuju da je izvesni nivo mehaničke tenzije u mišiću prisutan i u stanju mirovanja (3). Ova pojava se naziva mirujući tonus mišića (engl. *human resting muscle tone, HRMT*). Bilo je više teorija koje su se odnosile na mehanizam nastanka *HRMT*: Davidof (*Davidoff*) je, na primer, zastupao teoriju o toničkoj γ -motornoj frekvenciji, dok su Gajton i saradnici smatrali da je u pitanju bazična α -motorna aktivnost (4,5). Laboratorijska i klinička ispitivanja skeletnih mišića pokazala su, međutim, da u mirovanju ne postoji α -motorna bioelektrična aktivnost, a da γ -motorna aktivnost ima zanemarljiv mehanički uticaj (6). Savremeno objašnjenje za pojavu *HRMT* odnosi se na viskoelastična svojstva skeletnih mišića: viskoelastičnost vezivnog tkiva i vezivanje titina za kontraktilne proteine u miofibrilima, kao i fenomen triksotrofije (7-13). Triksotrofna supstanca nelinearno menja svoj viskozitet, u zavisnosti od intenziteta spoljašnje sile smicanja. Kao rezultat, ponaša se kao čvrsto telo ukoliko je izložena sili smicanja manjoj od određenog praga intenziteta, a kao tečnost ukoliko je prag prevaziđen. U okviru Hilovog biomehaničkog modela mišića *HRMT* je predstavljen paralelnom elastičnom komponentom.

Uticaj HRMT na koštanozglobni sistem

Odavno je poznato da sila fiziološkog intenziteta ima značajan uticaj na morfologiju i metabolizam svih histoloških elemenata muskuloskeletnog sistema: koštanog, hrskavičavog, mišićnog i vezivnog tkiva (14-17). Na naš muskuloskeletni sistem u svakom trenutku deluju različite spoljašnje sile (sila gravitacije, sile nastale pod uticajem različitih predmeta sa kojima je telo u kontaktu), kao i unutrašnje sile generisane tonusom mišića koje imaju za cilj zauzimanje određenog položaja tela, kretanje tela u celini ili njegovih delova. Od unutrašnjih sila, *HRMT* je prema intenzitetu skoro zanemarljiv (1-2%) u odnosu na maksimalni mišićni tonus, odnosno intenzitet sile dobijene maksimalnom voljnom kontrakcijom (engl. *maximal voluntary isometric contraction, MVIC*).

Postoji više načina izražavanja *MVIC*. Na nivou mišićnog tkiva, ova sila iznosi 20-135 N/cm² fiziološkog preseka mišića. Ovako izražena sila ima ograničenu praktičnu upotrebnu vrednost u proceni snage realnog pokreta iz više razloga: većina mišićnih vlakana nije orijentisana paralelno rezultantnoj sili na pripoju merenog mišića; uticaj

kraka sile u odnosu na osovinu zglobne rotacije presudno utiče na snagu pokreta; u svakom pokretu učestvuje više od jednog mišića; postoji značajan mehanički uticaj ektramuskularnog vezivnog tkiva (18,19). Zbog toga se vrednosti intenziteta sile na nivou pokreta izražavaju relativno, u odnosu na telesnu težinu (TT). Vrednosti *MVIC* za pojedine pokrete dostižu do 8,7 TT (20,21).

Poput mnogih drugih fizioloških veličina, i mehanička sila ispoljava svoje dejstvo samo ukoliko je dovoljnog intenziteta. Na primer, izmereni intenzitet sile pritiska koji ispoljava fiziološki efekat na nivou hrskavica, uključujući i hrskavice rasta (fize), iznosi 0,3-1,1 MPa. Uočeno je da 0,1 MPa dodatnog pritiska smanjuje brzinu rasta fize za 17,1%, a 4 MPa ga sasvim zaustavlja (22). Uzevši u obzir da izmerene sile pritiska kod *MVIC* prevazilaze 20 MPa, nameće se zaključak da *HRMT* prema svom intenzitetu dostiže pomenute vrednosti, tj. ispoljava mehanički uticaj na zglobne hrskavice kao i na rast kostiju (23-27).

Pravi značaj fiziološkog efekta *HRMT* uočava se tek kada se analizira kumulativno dejstvo sile tokom vremena. Naime, epidemiološka istraživanja prosečnog stepena fizičke aktivnosti u sadašnjem dominantno sedentarnom načinu života urbane populacije pokazuju zabrinjavajuće podatke: prosečno dnevno trajanje aktivnosti srednjeg i visokog intenziteta je 80 minuta za muškarce i 72 minuta za žene, a od toga pokreti intenziteta > 50% *MVIC* prosečno traju svega 5,1 ± 6,4 minuta (28-30). Prevedeno u kretanje, to opterećenje je ekvivalentno sa 31 minutom trčanja brzinom oko 10 km/h, odnosno 65 minuta hodanja brzinom oko 4 km/h, tj. 4800-5300 koraka (31, 32). To ukupno iznosi manje od 12000 pokreta dnevno, što znači da je aktivni tonus bio zastupljen manje od 3,47% ukupnog vremena dnevno, odnosno da *HRMT* vremenski apsolutno dominira. Uzevši u obzir da svi aktivni pokreti ne mogu da budu istovremeno izvedeni svim pokretnim delovima tela u svim pravcima i sve vreme maksimalnom silom, proizilazi da *HRMT* u stvari predstavlja glavni mehanički stimulans koji oblikuje naš muskuloskeletni sistem. Može se, dakle, reći da su akutni efekti vežbanja (zamor, povreda ili slične akutne mehaničke promene) na muskuloskeletni integritet uglavnom direktni - posledica su aktivnog tonusa tokom vežbanja, a hronični efekti vežbanja (nekada željeni tj. terapijski, a neretko i neželjeni, usputni, odnosno patološki) prvenstveno indirektni, odnosno posredovani rezidualnim promenama *HRMT*.

Mirujući tonus mišića u fiziološkom smislu predstavlja rezultat morfoloških adaptivnih promena u mišiću pod dejstvom fizičke aktivnosti (svakodnevne aktivnosti, sport, rekreacija...), rasta skeleta i promena telesne težine. Sa kliničkog stanovišta, na nivo *HRMT* utiču brojni faktori: limbički (emocionalni), refleksni (aktivnost inter-neurona u segmentima kičmene moždine), nivo koordi-

nisanosti motornih jedinica unutar jednog mišića (aktivnost neuromuskularnih sinapsi), prisustvo bola i reakcije na bol, konstitucionalni (biomehaničke karakteristike koštanozglobnog sistema, distribucija nivoa elastičnosti vezivnog tkiva), kao i fiziološki (sindrom preopterećenja – engl. *overuse*) (33).

Dijagnostika HRMT

Procena mišićnog tonusa je značajan deo kliničkog pregleda muskuloskeletnog sistema. Manuelna procena se u svakodnevnoj praksi radi kroz testiranje pokretljivosti susednih telesnih segmenata uz goniometriju. Ova metoda je brza i jednostavna za primenu, a mane su joj subjektivnost i niska specifičnost (ne izoluje aktivnu komponentu tonusa). U kliničkoj upotrebi je i niz drugih, aparaturnih metoda: elastografija nuklearnom magnetnom rezonancom (NMR), ultrazvučna elastografija, analiza elektromiografskog (EMG) signala, mehanomiografija piezoelektričnim akcelerometrom, dinamometrija, miotonometrijske metode i drugo (34-39). Većina ovih metoda zahteva specifičnu i skupu opremu i relativno je komplikovana za izvođenje i interpretaciju.

Nabrojane metode merenja tonusa uglavom nisu podesne za merenje HRMT. On se, ipak, može proceniti metodom reverznog inženjeringa - analizom njegovih posledica. Jedan od metoda koji funkcionišu na ovaj način je i *CoreFitMax* metod analize telesne posture. Ulazni posturalni parametri (43 statička i 40 dinamičkih), dobijeni anamnezom i standardnim kliničkim pregledom, transformišu se algoritmom diskretne analize konačnih elemenata u izlazni set vrednosti relativnog odnosa HRMT (izraženo u procentima) 62 mišića, najznačajnijih za posturu i lokomociju. Osnovu algoritma predstavlja savremena kineziološka analiza, zasnovana na miofascijalnim lancima (40-42). Jednostavnost primene uz pomoćni softver i nisku relativnu grešku od 0,84% čini *CoreFitMax* veoma upotrebljivim u svakodnevnoj praksi.

Zaključak

Mirujući tonus mišića je značajan parametar u ortopediji, kao jedan od faktora distribucije sile duž muskuloskeletnog sistema te, kao takav, utiče na mehaničko opterećenje hrskavica rasta, kao i na nastanak ortopedskih deformiteta. Njegova veličina zavisi od više faktora, od genetskih (npr. prisustvo benigne hiperomobilnosti zglobova) do konstitucionalnih (fiziološki presek mišića, dimenzije i lokalizacija mišićnih pripoja na skeletu, varijacije u uglovima zglobnih okrajaka i dr.). Na HRMT se može uticati na više načina: vežbanjem, metodama fizikalne terapije i rehabilitacije, primenom sredstava za imobilizaciju, farmakološki (npr. primenom botulinum toksina), kao i hirurškim putem (npr. fasciotomijom, reinsercijom i transpozicijom tetive).

Ispitivanje i procena HRMT pomažu u postavljanju pravilne etiološke dijagnoze strukturnih deformiteta i funkcionalnih poremećaja lokomotornog sistema. Restitucija odgovarajućeg HRMT doprinosi poboljšanju balansa i posturalnoj korekciji.

Savremena saznanja o biomehaničkoj integraciji vezivnog tkiva u okviru muskuloskeletnog sistema u miofascijalne lance dovode HRMT u središte pažnje u pogledu terapijskog pristupa i izbora preventivnih medicinskih mera u svakodnevnoj ortopedskoj i fizijatrijskoj praksi.

Reference

1. Simons DG, Mense S. Understanding and measurement of muscle tone as related to clinical muscle pain. *Pain* 1998; 75:1-17.
2. https://en.wikipedia.org/wiki/Hill's_muscle_model (14.06.2016.)
3. Basmajian JV, DeLuca CJ. *Muscles Alive*, 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985. p247-257.
4. Davidoff RA. Skeletal muscle tone and the misunderstood stretch reflex. *Neurology* 1992; 42:951-963.
5. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Human Physiology*, 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 2001. p76.
6. Hagbarth KE. Microneurography and applications to issues of motor control: 5th annual Stuart Reiner Memorial Lecture. *Muscle & Nerve* 1993; 16:693-705.
7. Taylor DC, Dalton JD, Seaber AV, Garrett WE. Viscoelastic properties of muscle-tendon units: the biomechanical effects of stretching. *Am J Sports Med* 1993; 18:300-309.
8. Edman KAP, Elzinga G, Noble MIM. Residual force enhancement after stretch of contracting frog single muscle fibers. *J Gen Physiol* 1982; 80:769-784.
9. Wang K, McCarter R, Wright J, Beverly J, Ramirez-Mitchell R. Regulation of skeletal muscle stiffness and elasticity by titin isoforms: a test of the segmental extension model of resting tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7101-7105.
10. Proske U, Morgan DL. Do cross-bridges contribute to the tension during stretch of passive muscle? *Journal of muscle research and cell motility* 1999; 20:433-442.
11. Minajeva A, Kulke M, Fernandez JM, Linke WA. Unfolding of titin domains explains the viscoelastic behavior of skeletal myofibrils. *Biophys J* 2001; 80(3):1442-1451.
12. Nishikawa KC, Monroy JA, Uyeno TE, Yeo SH, Pai DK, Lindstedt SL. Is titin a 'winding filament'? A new twist on muscle contraction. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2012; 279(1730):981-990.
13. Hagbarth KE, Hagglund JV, Mordin M, Wallin EU. Thixotropic behavior of human finger flexor muscles with accompanying changes in spindle and reflex responses to stretch. *J Physiol* 1985; 368:323-342.
14. Wolff, J. *Ober die Wechselbeziehungen Zwischen der Form und der Function tier Einzelnen Gebilde des Organismus*. Leipzig, FCW. Vogel, 1901.
15. Hueter C. *Anatomische Studien an den Extremitätengelenken Neugeborener und Erwachsener*. Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie 1862; 25:572.
16. Lister CC. *Muscular movement writing: manual*. Macmillan; 1915.
17. FR Morgan. The mechanical properties of collagen fibres: stress strain curves. *J Soc Leather Trades Chem* 1960; 44(4)170-182.
18. Powell PL, Roy RR, Kanim P, Bello MA, Edgerton VR. Predictability of skeletal muscle tension from architectural determinations in guinea pig hindlimbs. *J Appl Physiol* 1984; 57: 1715-1721.

19. Zajac FE. How musculotendon architecture and joint geometry affect the capacity of muscles to move and exert force on objects: a review with application to arm and forearm tendon transfer design. *J Hand Surg [Am]*. 1992; 17:799–804.
20. Meldrum D, Cahalane E, Conroy R, Fitzgerald D, Hardiman O. Maximum voluntary isometric contraction: reference values and clinical application. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. 2007; 8(1):47-55.
21. Hogrel JY, Payan CA, Ollivier G, Tanant V, Attarian S, Couillandre A, et al. Development of a French isometric strength normative database for adults using quantitative muscle testing. *Arch Phys Med Rehab* 2007; 88(10):1289-1297.
22. Cook SD, Lavernia CJ, Burke SW, Skinner HB, Haddad RJ Jr. A biochemical analysis of the etiology of tibia vara. *J Pediatr Orthop* 1983; 3:449-454.
23. Brand RA. Joint contact stress: a reasonable surrogate for biological processes? *Iowa Orthop J*. 2005; 25:82-94.
24. Jacob S, Patil MK. Three-dimensional foot modeling and analysis of stresses in normal and early stage Hansen's disease with muscle paralysis. *J Rehab Res Dev* 1999; 36(3):252.
25. Wang X, Mao JJ. Accelerated chondrogenesis of the rabbit cranial base growth plate by oscillatory mechanical stimuli. *J Bone Mineral Res* 2002; 17(10):1843-1850.
26. McElveen MT, Riemann BL, Davies GJ. Bilateral comparison of propulsion mechanics during single-leg vertical jumping. *Journal Strength Cond Res* 2010; 24(2):375-381.
27. Dorn TW, Schache AG, Pandy MG. Muscular strategy shift in human running: dependence of running speed on hip and ankle muscle performance. *The Journal of experimental biology*. 2012; 215(11):1944-1956.
28. Tikkanen O, Haakana P, Pesola AJ, Häkkinen K, Rantalainen T, Havu M, et al. Muscle activity and inactivity periods during normal daily life. *PLoS One* 2013; 8(1):e52228.
29. InterAct Consortium. Validity of a short questionnaire to assess physical activity in 10 European countries. *European journal of epidemiology* 2012; 27(1):15-25.
30. Gopura RA, Kiguchi K, Horikawa E. A study on human upper-limb muscles activities during daily upper-limb motions. *Int. J Bioelectromagnetism*. 2010; 12(2):54-61.
31. Matthews CE, Chen KY, Freedson PS, Buchowski MS, Beech BM, Pate RR, et al. Amount of time spent in sedentary behaviors in the United States, 2003–2004. *American journal of epidemiology*. 2008; 167(7):875-881.
32. Healy GN, Matthews CE, Dunstan DW, Winkler EA, Owen N. Sedentary time and cardio-metabolic biomarkers in US adults: NHANES 2003–06. *European heart journal*. 2011; 32:590-597.
33. Janda V. Muscle spasm – a proposed procedure for differential diagnosis. *Man Med* 1991; 6:136-139.
34. Klatt D, Papazoglou S, Sack I. Viscoelasticity-based MR elastography of skeletal muscle. *Physics in medicine and biology*. 2010; 55(21):6445.
35. Eby SF, Song P, Chen S, Chen Q, Greenleaf JF, An KN. Validation of shear wave elastography in skeletal muscle. *J Biomech* 2013; 46(14):2381-2387.
36. Beck TW, Housh TJ, Cramer JT, Weir JP, Johnson GO, Coburn JW, et al. Mechanomyographic amplitude and frequency responses during dynamic muscle actions: a comprehensive review. *Biomedical engineering online*. 2005; 4(1):1.
37. Osternig LR. Isokinetic Dynamometry: Implications for Muscle Testing and Rehabilitation. *Exercise and sport sciences reviews*. 1986; 14(1):45-80.
38. Đorđević S, Stančin S, Meglič A, Milutinović V, Tomažič S. MC sensor—A novel method for measurement of muscle tension. *Sensors*. 2011 30; 11(10):9411-9425.
39. Van Leeuwen JL, Spoor CW. Modelling the pressure and force equilibrium in unipennate muscles with in-line tendons. *Phil Transactions Royal Soc of London B: Biological Sciences* 1993; (1302):321-333.
40. Myers TW. *Anatomy trains: myofascial meridians for manual and movement therapists*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 2014.
41. Wilke J, Krause F, Vogt L, Banzer W. What Is Evidence-Based About Myofascial Chains: A Systematic Review. *Arch Phys Med Rehab* 2016; 97(3):454-461.
42. Krause F, Wilke J, Vogt L, Banzer W. Intermuscular force transmission along myofascial chains: a systematic review. *J Anatomy* 2016; 228(6):910-918.



It is our great pleasure to announce to you and invite you to the third International Medical Student Congress in Sarajevo – SaMED 2017. SaMED 2017 – third International Medical Student Congress will be held from 1st to 5th February 2017 in Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

SaMED represents the one of the largest student congress in the field of biomedicine in Southeast Europe, and last year's congress hosted students from over 30 countries. This is a unique gathering of science, skills, knowledge and friendship which is continuously being organized by the Association of Students of Faculty of Medicine (ASMF) in partnership with Bosnian and Herzegovinian Medical Students' Association (BoHeMSA), and under auspices of the Faculty of Medicine, University of Sarajevo.

This year, according to the expressed interest of the participants, we expect more than 400 participants from all around the world. In addition to our participants, we have the support of our eminent speakers who are certainly the leading experts in their respective fields of scientific interests, who will be joining us from the United States and Europe. Their presence certainly tells us about the significance of SaMED and its role in the field of medical science.

Conference topics are of general medical and biomedical character, and range from the basic medical sciences of pre-clinical disciplines, through clinical topics and modern trends in the field of medicine and biomedicine. In that way, the Congress opens a wide range of scientific subjects that will be presented and which will be discussed.

In addition to attending and giving presentations, the congress participants will be able to partake in numerous workshops, which attract a large number of interested parties every year. This year we will have workshops that cover various practical aspects of medicine, which students should be able to master and to know in their practical work as doctors and scientists of tomorrow. The modern trend of the evolution of science realizes that a medical doctor is therewithal a scientist.

All information about SaMED 2017, including paper submission guidelines, manuscript templates, registration etc., can be found at Congress webpage: www.samed.ba, which will be open for registrations on 1st August 2016.

Kontrola dopinga kao mera prevencije: Iskustvo Antidoping agencije republike Srbije

Doping Prevention: Experience of Antidoping Agency of Serbia

Nenad Dikić¹

¹Antidoping agencija Republike Srbije

Kontakt: nenad.dikic@gmail.com

Sažetak

Potpisivanjem Kopenhagenske deklaracije o dopingu u sportu u decembru 2003. godine stvorena je osnova za donošenje Zakona o sprečavanju dopinga u sportu. Skupština Republike Srbije je prvi put usvojila ovaj zakon 2005. godine, na osnovu koga je osnovana Antidoping agencija Republike Srbije (ADAS). S obzirom na izmene koje pretrpeo Svetski antidoping kodeks, Skupština Republike Srbije je u oktobru 2014. godine donela novi Zakon o sprečavanju dopinga u sportu. Iza svih ovih zakonodavnih i državnih aktivnosti je, međutim, stajalo višegodišnje iskustvo i znanje članova Udruženja za medicinu sporta Srbije (UMSS), koji su sprovodili doping kontrole i kada nije postojala zvanična agencija i tako započeli jednu novu aktivnost koju do tada lekari nisu radili.

Antidoping agencija Republike Srbije je, osim toga, jedna od retkih antidoping organizacija na svetu u kojima kao doping kontrolori rade samo ljudi zdravstvene struke. Tako su postavljeni najviši standardi, koje imaju i Međunarodna košarkaška federacija (FIBA), Udruženje evropskih fudbalskih asocijacija (UEFA), Međunarodna federacija fudbalskih asocijacija (FIFA) i ne više od 20% evropskih nacionalnih antidoping organizacija (NADO). Na ovo smo jako ponosni jer smo stvorili instituciju koja predstavlja baštinu za dobrobit budućih generacija lekara.

U trenutku kada je osnivanja Antidoping agencija Republike Srbije smatralo se da u Srbiji ne postoji problem dopinga i da se srpski sportisti ne dopinguju. Broj otkrivenih slučajeva pozitivnih na doping, međutim, jasno govori u prilog činjenici da taj problem postoji, ali i da se tokom godina broj sportista pozitivnih na doping smanjivao zahvaljujući, pre svega, upornom radu na edukaciji ne samo sportista već i ostalih sportskih radnika.

U periodu od osnivanja do 1. januara 2016. godine Antidoping agencija Republike Srbije sprovela je ukupno 5974 doping kontrola, a 62 sportista je bilo pozitivno na doping na preko 70 različitih zabranjenih supstanci.

Cljučne reči: doping kontrola, antidoping agencija, lista zabranjenih supstanci

Abstract

By signing the Copenhagen Declaration on Doping in Sport, in December 2003, the basis was created for the adoption of the Law on prevention of doping in sports. The Parliament of Serbia has adopted this law firstly in 2005, on the basis of which was established Antidoping Agency of Serbia (ADAS). Due to changes, which are done on the World Antidoping Code, the Parliament of Serbia has adopted a new Law on the Prevention of doping in sport in 2014. Behind all these legislative and governmental activity, however, there is a long experience and knowledge of members of the Sports Medicine Association of Serbia, who conducted the doping control when there was no official agency and started a new activity that, until then, doctors did not practice.

Not only that, ADAS is one of the few antidoping organization in the world where only the people in health profession are working as a doping control officers. ADAS set the highest standards that have the most important international federations (FIBA, UEFA, FIFA etc.) and not more than 20% of national antidoping organization. For this we are very proud, because we have created an institution that represents the heritage for the future generations of medical doctors.

By the time ADAS has been established, it was considered there is no problem of doping in Serbia. However, the number of doping positive cases clearly supports the fact that the problem exists. Over the years, the number of athletes who are tested positive, have decreased, primarily due to hard work on education, not only of the athletes, but also of the other sports officials.

From the period of establishment until January 1, 2016, ADAS has completed a total of 5974 doping controls and 62 athletes have been tested positive for doping on over 70 different banned substances.

Key words: Doping controls, Antidoping agency, Prohibited list

Potpisivanjem Kopenhagenske deklaracije o dopingu u sportu u decembru 2003. godine stvorena je osnova za donošenje Zakona o sprečavanju dopinga u sportu. Skupština Republike Srbije je ovaj zakon, kojim je osnovana Antidoping agencija Republike Srbije (ADAS), usvojila 14. novembra 2005. godine, a nepunih mesec dana kasnije - 12. decembra 2005. konstituisan je Upravni odbor ADAS i započet rad na uspostavljanju sistema borbe protiv dopinga u Srbiji u skladu sa međunarodnim normama i standardima.

Srbija je 2009. godine ratifikovala Međunarodnu konvenciju protiv dopinga u sportu pod okriljem UNESCO i time preuzela obavezu da preduzme „dalje i jače akcije usmerene ka eliminaciji dopinga u sportu“. Svetski antidoping kodeks iz 2009. je u procesu revizije pod rukovodstvom Svetske antidoping agencije (WADA) pretrpeo značajne izmene tako da je 1. januara 2015. godine na snagu stupio novi svetski antidoping kodeks. S obzirom na značajne izmene koje je ovaj novi svetski antidoping kodeks doneo, a i na obavezu koju smo kao zemlja preuzeli potpisivanjem Međunarodne konvencije, bila je neophodna i izmena Zakona o sprečavanju dopinga u sportu. Tako je u oktobru 2014. godine donet novi Zakon o sprečavanju dopinga u sportu.

Treba reći da su svi ovi naponi prvenstveno urađeni da bi se omogućio nesmetan razvoj našeg sporta jer je jedna od mogućih sankcija za nepridržavanje normi međunarodnih konvencija i nepostojanje zakona koji regulišu borbu protiv dopinga u sportu i zabrana učestvovanja sportista na Olimpijadi i međunadnim takmičenjima.

Iza svih ovih zakonodavnih i državnih aktivnosti je, međutim, stajalo višegodišnje iskustvo i znanje članova Udruženja za medicinu sporta Srbije (UMSS), koji su sproveli doping kontrole i kada nije postojala zvanična

agencija. Može se slobodno reći da je idejni tvorac Antidoping agencije Republike Srbije dr Nenad Dikić, koji je, kao generalni sekretar UMSS, okupio mlade doktore i organizovao ih tako da su mogli da počnu sa jednom novom aktivnošću koju do tada lekari nisu radili. I ne samo to, ADAS je jedna od retkih antidoping organizacija (ADO) u kojima samo ljudi zdravstvene struke rade kao doping kontrolori. Tako su postavljeni najviši standardi koji imaju Međunarodna košarkaška federacija (FIBA), Udruženje evropskih fudbalskih asocijacija (UEFA), Međunarodna federacija fudbalskih asocijacija (FIFA) i ne više od 20% evropskih nacionalnih antidoping organizacija (NADO). I danas u redovima ADAS ima oko 40 lekara i nekoliko farmaceuta koji i bukvalno predstavljaju elitu evropskih doktora angažovanih u borbi protiv dopinga u sportu. Na ovo smo jako ponosni jer smo stvorili instituciju koja predstavlja baštinu za dobrobit budućih generacija lekara.

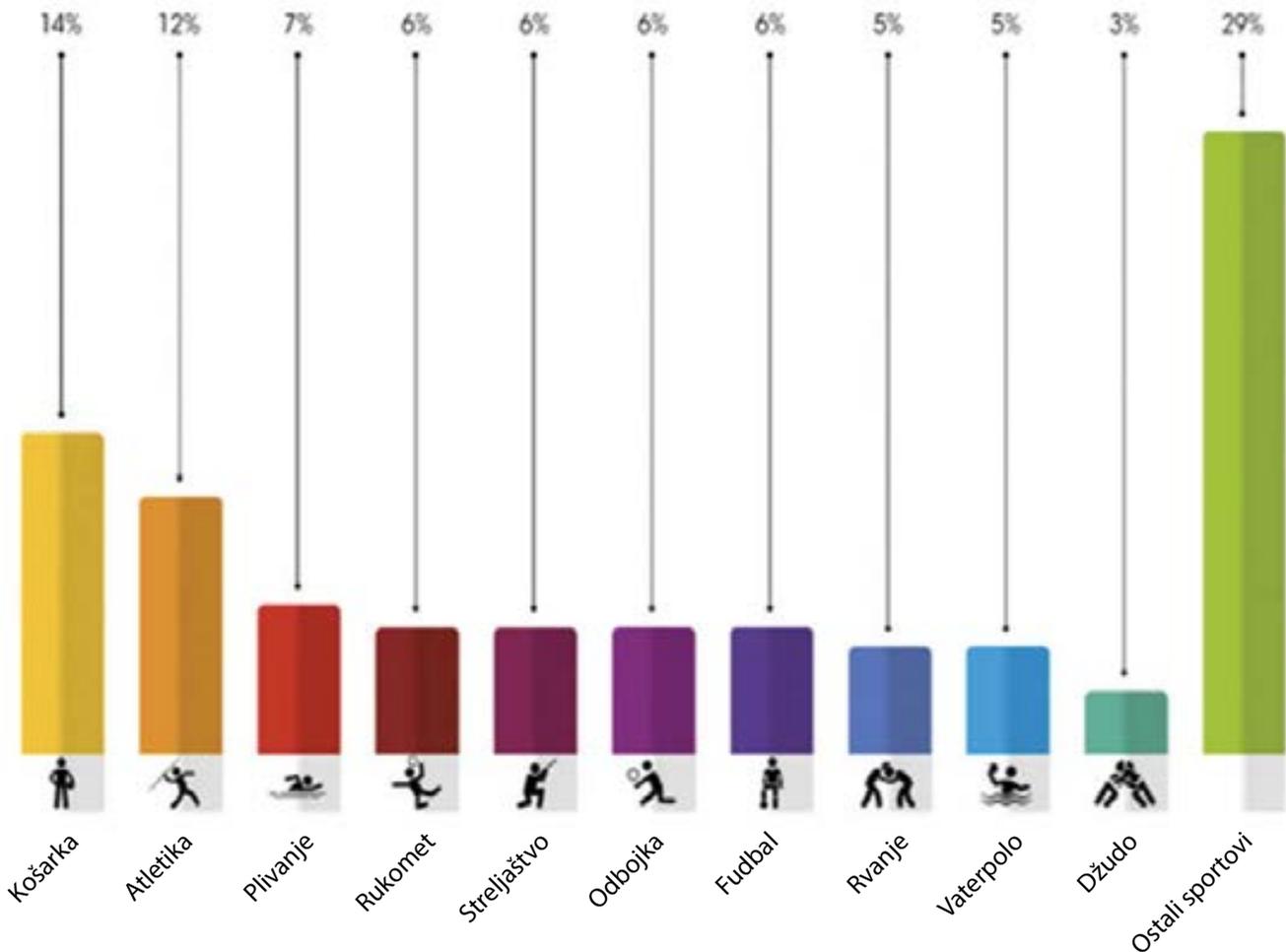
U trenutku kada je osnovana Antidoping agencija Republike Srbije smatralo se da u Srbiji ne postoji problem dopinga i da se srpski sportisti ne dopinguju. Broj otkrivenih slučajeva pozitivnih na doping, međutim, jasno govori u prilog činjenici da taj problem postoji, ali i da se tokom godina broj sportista pozitivnih na doping smanjivao zahvaljujući, pre svega, upornom radu na edukaciji ne samo sportista već i ostalih sportskih radnika.

U periodu od osnivanja do 1. januara 2016. godine Antidoping agencija Republike Srbije sprovela je ukupno 5974 doping kontrola, a 62 sportista je bilo pozitivno na doping na preko 70 različitih zabranjenih supstanci.

Sportisti pozitivni na doping su bili iz 22 različita od ukupno testirana 83 sporta. Najveći broj pozitivnih na doping bio je u rvanju (7), nakon toga u bodibildingu i rukometu (po 6), u boksu (5), u atletici (4), u košarci (3),

Tabela 1. Doping kontrole u Srbiji 2006-2015.

Godina	Ukupno testirani po godinama	Broj sportista pozitivnih na doping	Druge povrede antidoping pravila
2006.	31	1	0
2007.	347	0	0
2008.	494	8	1
2009.	767	3	1
2010.	717	20	1
2011.	1021	12	0
2012.	605	4	0
2013.	537	1	0
2014.	725	4	0
2015.	703	8	0
Ukupno	5947	62	3



Grafikon 1. Kontrolisani sportisti po sportovima 2006-2015.

zatim u dizanju tegova, ragbiju 13, američkom fudbalu, kik boks i biciklizmu (po 2), a najmanje u karateu, veslanju, kajakaštvu, tenisu, fudbalu, hokeju na ledu, džudou, streljaštvu, bobu i među džokejima (po 1).

Tokom deset godina postojanja, pored prisustva zabranjene supstance u telesnom uzorku sportiste, imali smo i 3 druge povrede antidoping pravila kao što su ometanje doping kontrole, davanje doping sredstava sportisti i pokušaj korišćenja i posedovanje zabranjenih supstanci. Procentualna raspodela između grupa supstanci na koje su sportisti bili doping pozitivni gotovo se ne razlikuje od one na svetskom nivou. Naime, 48,57% od svih prisutnih supstanci na koje su sportisti bili doping pozitivni su anabolički steroidi, 18,57% su kanabinoidi, 15,71% stimulanasi, 14,29 % diuretici i 1,43% beta blokatori i beta 2 agonisti.

Sve supstance zabranjene u sportu nalaze se na jedinstvenoj listi koja se menja najmanje jednom godišnje i zvanično objavljuje na engleskom jeziku na internet stranici WADA i na srpskom jeziku na internet stranici ADAS. Osnovna podela zabranjenih supstanci je na one koje su uvek zabranjene i na supstance zabranjene samo na

takmičenjima. Pored toga, postoje supstance zabranjene samo u pojedinim sportovima.

Antidoping agencija Republike Srbije od početka radi na razvijanju biološkog pasoša, aktivno sprovodeći doping kontrolu krvi pored standardne analize urina, prateći parametre krvi i anaboličkih steroida kod najboljih u sportovima izdržljivosti. Poštujući tehnički dokument za specifične analize, ADAS od 2015. godine redovno analizira stimulanse eritropoeze (ESA), oslobađajuće faktore hormona rasta (GHRF), kao i sam hormon rasta (GH).

Antidoping agencija od 2008. godine sprovodi i doping kontrole konja jer smatramo da zaštita životinja treba da bude važan segment našeg delovanja. U periodu od 2008. do 1. juna 2015. godine sproveli smo 338 doping kontrola konja, a od ukupnog broja testiranih 28 je bilo pozitivno na doping. Kuriozitet kod doping kontrole konja je da se svaka supstanca koja se nađe u njihovom organizmu smatra dopingom, pa smo u tom smislu imali konje pozitivne na sledeće supstance: fenilbutazon, fluniksini, diklofenak, triamcinolone acetamid, kofein, heptaminol, teofilin, furosemid, deksametazon, ketorolak, oksifenbutazon, salicilnu kiselinu, mentol, lidokain, 3 hidroksilidokain. Kao



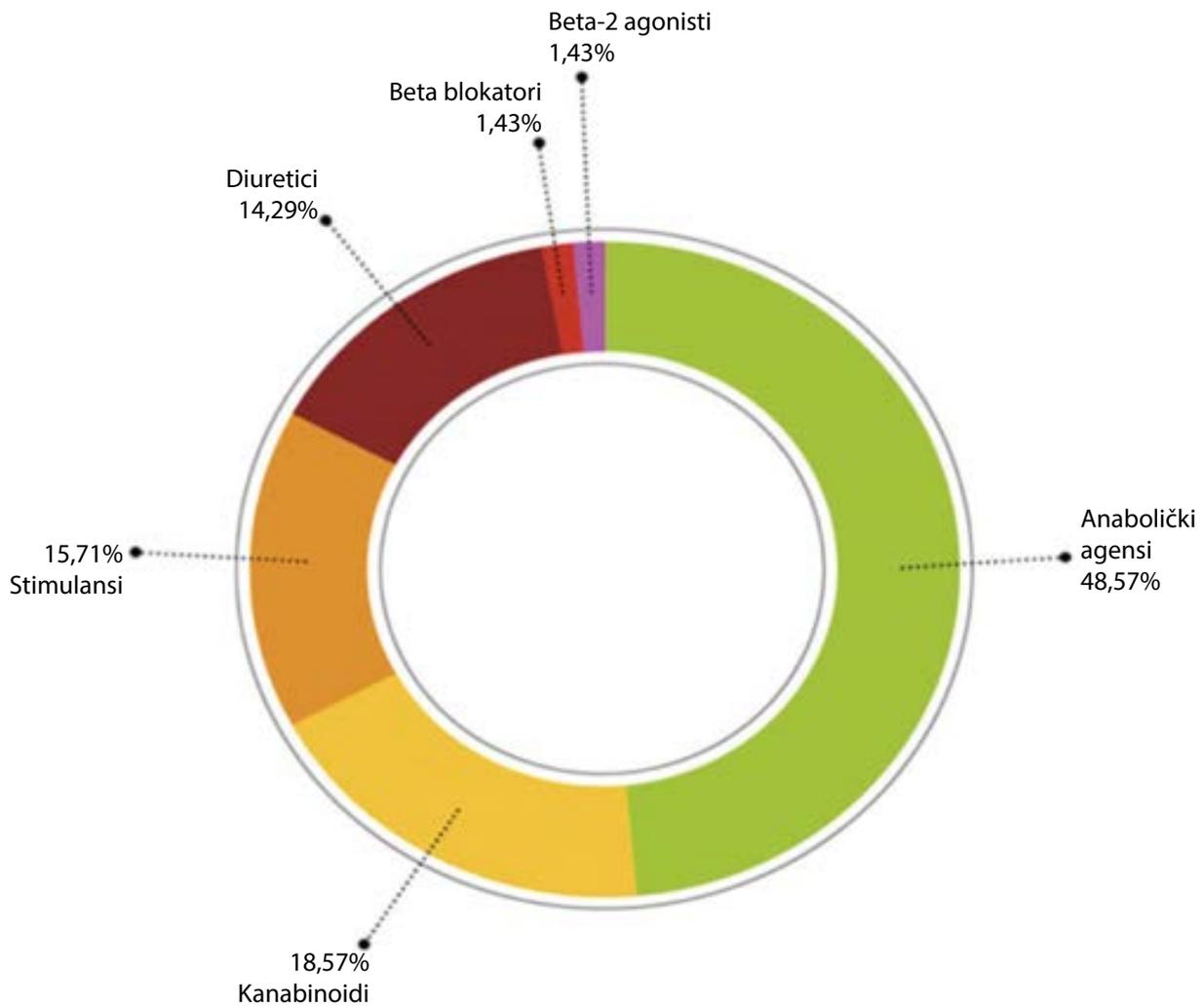
Grafikon 2. Slučajevi pozitivni na doping po sportovima 2006-2015.

i u slučaju kontrole sportista, angažovani su isključivo doktori veterinarske medicine, čime smo zaštitili struku, ali i podigli nivo usluge na najviši nivo.

Napori Antidoping agencije Republike Srbije su očigledno uticali i na shvatanje javnog mnjenja da se sportski rezultat može postići i bez dopinga. Smatrajući da je edukacija jedini pravi put za smanjenje slučajeva pozitivnih na doping u Srbiji, Antidoping agencija Republike Srbije je u prethodnih deset godina održala preko 400 edukativnih sastanaka, od toga 9 antidoping seminara, 4 kongresa o dijetetskim suplementima, 12 Pansport seminara ili u proseku 1 predavanje nedeljno za sve učesnike u sportu i 2 edukacije godišnje za 350 najboljih sportista stipendista Ministarstva omladine i sporta. Od 2015. godine ADAS organizuje Kongres o prevenciji dopinga u sportu.

U okviru svoje izdavačke delatnosti ADAS je pomogao izdavanje knjiga „100 pitanja o dopingu“ i „Praktična sportska ishrana“, priručnika za sportiste „Džepni priručnik o dopingu“, kao i dvojezičnu knjigu „Druga strana medalje/Both sides clean“, u kojoj poznati iz sveta sporta i kulture govore o fenomenu dopinga. Samo u 2015. godini ADAS je učestvovao u izdanju tri knjige: „Sportski kuvar“, „Intolerancija na hranu u sportu“ i „Probiotici u sportu“, koje se indirektno tiču dopinga i omogućio da ih najbolji srpski sportisti dobiju na poklon.

Velika pažnja je posvećena i etici koja predstavlja jedan od tri stuba na kojima počiva borba protiv dopinga u sportu, pa je tako dr Nenad Dikić objavio dva rada: „Sports physicians, ethics and antidoping governance: between assistance and negligence“ i „On the Efficacy of WADAs



Grafikon 3. Zastupljenost nedozvoljenih supstanci 2006-2015.

Whereabouts Policy: Between Filing Failures and Missed Tests“ i napisao poglavlje u Springerovoj enciklopediji o etičkim dilemama dopinga.

Upravo zahvaljujući kontinuiranoj edukaciji uspjeli smo da kroz godine unazad smanjimo broj sportista pozitivnih na doping i ukažemo im ne samo na etičke probleme

Tabela 2. Lista zabranjenih supstanci i metoda

Supstance i metode uvek zabranjene (na takmičenju i van takmičenja)	Supstance i metode zabranjene na takmičenju
S0. Lekovi u kliničkim ispitivanjima	S6. Stimulansi
S1. Anabolički steroidi	S7. Narkotici
S2. Peptidni hormoni, faktori rasta i srodne supstance	S8. Kanabinoidi
S3. Beta 2 agonisti	S9. glukokortikosteroidi
S4. Hormoni i metabolički modulatori	Supstance zabranjene u određenim sportovima
S5. Diuretici i drugi maskirajući agensi	P1. Alkohol
Zabranjene metode	P2. Beta blokatori
M1. Pобољшanje transporta kiseonika	
M2. Hemijske i fizičke manipulacije	
M3. Genski doping	

Tabela 3. Doping kontrola konja

Godina	Broj doping kontrola	Broj konja pozitivnih na doping	Procenta konja pozitivnih na doping
2008.	49	4 + 1	10,2%
2009.	27	2	7,4%
2010.	60	3 + 1	6,6%
2011.	68	6	8,8%
2012.	35	1	2,8%
2013.	36	4	11,11%
2014.	56	6	10,71%
2015.	58	3	5,17%
Ukupno	389	31	7,96%

već i na, što je mnogo značajnije, štetne posledice po zdravlje koje uzimanje doping supstanci ima. Dok smo u 2010. godini imali 4% sportista pozitivnih na doping u odnosu na broj testiranih, taj procenat u 2014. iznosi 1%.

Antidoping agencija Republike Srbije je realizovala i nekoliko međunarodnih projekata i istraživanja: projekat sa WADA – „*Medical Doctors and Doping in Sport: Attitudes and Experience in Balkan Region - 8 Countries Study*“, projekte sa FIBA – „*The use of medication and nutritional supplements during FIBA EuroLeague Women 2009 and EuroCup / EuroChallenge Men 2009*“ i „*Hydration assessment of basketball teams – participants of U20 European Championship Men 2011 – Division B*“, kao i projekat sa UNESCO – „*New curriculum of anti-doping education in Serbia*“.

Značajna je i aktivnost ADAS u procesu suplementacije naših vrhunskih sportista i olimpijskih kandidata, koja se sprovodi u saradnji sa Olimpijskim komitetom Srbije, nacionalnim sportskim savezima i sa Centrom za sportsku ishranu i suplementaciju. Značajan je projekat testiranja dijetetskih suplemenata na eventualnu kontaminiranost anaboličkim steroidima i stimulansima u Kelnskoj laboratoriji, kao i obeležavanja testiranih suplemenata markicama „*DOPING FREE*“.

Kada se, međutim, govori o stručnom radu, verovatno je podjednako važan i rad na izuzeće za terapijsku upotrebu (TUE) koje važi za sve supstance ili metode koje se nalaze na Listi zabranjenih doping sredstava, a koje sportista mora da uzima zbog određenog stanja ili bolesti.

Sportisti se može odobriti korišćenje zabranjenih supstanci i/ili metoda koje se nalaze na Listi zabranjenih doping sredstava u terapijske svrhe u slučaju kada za to postoji jasna i nužna medicinska indikacija.

Korišćenje zabranjenih supstanci i/ili metoda u terapijske svrhe odobrava se isključivo ako sportista može da dokaže da je zadovoljen svaki od sledećih kriterijuma:

- neuzimanje zabranjenih supstanci ili metoda značajno bi pogoršalo njegovo zdravlje
- terapijsko korišćenje zabranjenih doping supstanci i/ili metoda neće izazvati nikakvo dodatno poboljšanje sportskih sposobnosti;
- ne postoji adekvatna terapijska alternativa zabranjenoj doping supstanci i/ili metodi;
- neophodnost korišćenja zabranjenih doping supstanci i/ili metoda nije posledica njihovog prethodnog neterapeutskog korišćenja.

Pet sportova (od ukupno 26 različitih) koji su imali najveći broj prijave TUE od 2007. godine su: košarka, fudbal, veslanje, rvanje i vaterpolo. Razlog za ovakvu raspodelu nalazi se, pre svega, u masovnosti određenih sportova u Srbiji, ali i u nivou takmičenja na koje ovi sportisti odlaze. Učestvovanje na svetskim i međunarodnim takmičenjima podrazumeva i strogo poštovanje pravila koja se tiču prijave TUE.

Najzastupljenije dijagnoze zbog kojih su sportisti morali da prijave TUE bile su iz grupe inflamatornih stanja lokomotornog aparata: entezitisi, tendinitisi i fasciitisi (17%). Astma i lumbalni sindrom se nalaze na drugom i trećem mestu po broju prijave TUE sa 14% i 11% učestalosti.

Da bi pomogli sportistima, stručnjaci ADAS su im omogućili da pitaju za mišljenje o određenom leku ili suplementu preko zvaničnog portala agencije. Time je napravljen značajan korak u savetovanju sportista, na čemu su izuzetno zahvalni.

Kao primer toga šta sportisti misle o antidoping borbi i radu ADAS možemo navesti činjenicu da je 94% od ukupno 500 anketiranih učesnika Beogradskog maratona 2014. godine potvrdilo da podržava rad Agencije. S druge strane, rad ADAS ocenjen je od strane Svetske antidoping agencije (WADA) maksimalnom ocenom, kako u pogledu usklađenosti antidoping pravila sa međunarodnim konvencijama, tako i u pogledu rada i sprovođenja pravila.

U najveće poduhvate i uspehe svakako spada više stotina urađenih kontrola na Evropskom festivalu mladih 2007. godine i Univerzijadi Beograd 2009. godine, četiri godine ekskluzivnih kontrola na FIBA takmičenjima širom Evrope, kao i činjenica da su kontrolori ADAS bili angažovani za doping kontrole na Olimpijskim igrama u Vanuveru, Londonu, Evropskom prvenstvu u fudbalu 2012. u Poljskoj i Ukrajini i Euro Basketu u Poljskoj, Litvaniji, Sloveniji i Francuskoj, kao i da se spremaju za Olimpijske igre u Rio de Žaneiru.

Antidoping agencija Republike Srbije u svojim redovima, između ostalog, ima i 4 licencirana UEFA doping kontrolora, 3 licencirana doping kontrolora Međunarodne asocijacije planinarskih saveza (UIAA) i 2 FIBA nadzorna doktora. Osnivač ADAS, dr Nenad Dikić, potpredsednik je Medicinske komisije FIBA Evrope, predsednik Antidoping komisije UIAA i predsednik TUE komisije Međunarodne federacije za skijanje na vodi (IWSF). Stručni saradnik za izuzeće za terapijsku upotrebu i direktor Centra za sportsku ishranu i suplementaciju, dr Marija Anđelković, osim što je UEFA doping kontrolor i FIBA nadzorni doktor, delegat je i Evropske atletske federacije. Dr Milica Vukašinić Vesić, direktor ADAS, član je Medicinske komisije Evropske plivačke asocijacije (LEN) od maja 2016. godine. Time je na najbolji način demonstrirana ideja da je samo maksimalnim zalaganjem i prisustvom u međunarodnim organizacijama moguće unaprediti naš sport i medicinu.

Antidoping agencija Republike Srbije ima još jednu posebnost, a to je da i pored toga što je državna institucija, sistematizacijom radnih mesta ima i administratora sistema, što je uslovljeno potrebom za obavljanjem sledećih poslova:

- projektovanja i održavanja internet stranice (uglavnom za edukovanje sportista, novosti, itd.);
- onlajn edukacije preko Mudl (engl. *Moodle*) platforme;
- korišćenja Fejsbuk (engl. *Facebook*) servisa za obrazovanje i komunikaciju;
- korišćenja Jutjub (engl. *Youtube*) i Gugl knjige (engl. *Google books*) servisa za dodatnu edukaciju i komunikaciju;
- razvoja android aplikacija;
- pripreme za štampu svih edukativnih materijala, uključujući i knjige.

Najvažnija je, svakako, internet stranica čija je četvrta verzija urađena u WordPress sa mejling listom kako bismo omogućili svima koji su zainteresovani za temu antidopinga da budu informisani. Pored toga, uveli smo dva veoma popularna servisa - zahtev za mišljenje o suplementu/leku (4).

Internet stranica ADAS beleži oko 97 000 poseta i više od 163 000 pregleda pojedinačnih stranica od septembra

2008. godine, od kada smo počeli prikupljanje statističkih podataka. Tokom ovog perioda saobraćaj je eksponencijalno rastao, tako da je samo u poslednjih 12 meseci bilo oko 30 000 poseta (skoro trećina ukupnog broja poseta), od čega je oko 6% dolazilo sa Fejsbuka.

Nedavno objavljena vest (5) ima više od 2 200 pregleda. Stranica „Osnovna antidoping edukacija”, dobila je oko 7 000 pregleda (6). Stranica „Zahtev za mišljenje o suplementu” broji oko 5 000 pregleda.

Pored sajta koristimo Mudl platformu za učenje, dizajniranu kao bezbedan i integrisan sistem koji predstavlja personalizovano okruženje za učenje. Pošto veliki broj sportista često nije u stanju da prisustvuje obaveznim predavanjima zbog planiranih treninga i takmičenja, ADAS koristi Mudl platformu (7). Kroz naše Mudl kurseve do sada je prošlo više od 3.000 sportista.

Zbog ogromne popularnosti društvenih mreža, odlučili smo da se uključimo u ovaj vid komunikacije sa sportistima i drugim zainteresovanim stranama kako bismo efikasnije proširili našu edukaciju.

Naša Fejsbuk stranica (8) ima oko 700 članova. Povezana Fejsbuk stranica Udruženja za medicinu sporta Srbije (9) ima oko 500 članova. Ranije pomenuti članak o meldonijumu je pogledalo više od 3 000 ljudi na Fejsbuku.

Pored toga, svi naši obrazovni filmovi nalaze se na Jutjubu (10). Naš nedavno postavljen edukativni film „Procedura doping kontrole” (11) imao je oko 60 000 pregleda. Na našem sajtu nalazi se ukupno oko 200 video snimaka postavljenih na Jutjub.

Antidoping agencija Republike Srbije i Udruženje za medicinu sporta Srbije postavili su sve svoje objavljene knjige na Gugl knjige sa besplatnim pristupom, tako da je ceo tekst javno dostupan na internetu. Na Gugl knjige su postavljena i većina predavanja koja smo držali na raznim seminarima. Sve u svemu, tu je oko 90 naslova (12). Među najpopularnijim naslovima su: „Praktična sportska ishrana” (više od 22 000 pregleda), „Priručnik za klupske lekare” (oko 17 000 pregleda), „Sportsko-medicinski pregled” (oko 12 000 pregleda)...

U duhu kontinuirane edukacije sportista bilo je prirodno da proširimo svoje edukativne aktivnosti na sledeću logičnu platformu sa ciljem približavanja sportistima – aplikaciju za pametni telefon sa sledećim sadržajem (13):

- listom zabranjenih doping sredstava (LZS): naša aplikacija nudi pretraživu Listu zabranjenih doping sredstava tako da sportista može brzo da proveriti da li neki aktivni sastojak, prisutan u leku/dijetetskom suplementu, predstavlja doping;
- izuzećem za terapijsku upotrebu: ova opcija nudi detaljan tekst na temu izuzeća za terapijsku upotrebu;

Pregledni radovi

- mišljenjem o dijetetskom suplementu/leku: ovo će verovatno biti najpopularnija opcija jer nudi pretraživ spisak izdatih mišljenja o raznim lekovima i dijetetskim suplementima;
- ADAMS: sveobuhvatna baza podataka koju održava Svetska antidoping agencija, a koju sportisti koriste da unose podatke o svom kretanju, tako da stalno mogu da budu na raspolaganju za antidoping kontrolu.
- Vesti: aplikacija prikazuje objavljene članke na našem veb sajtu na jednostavan način.

Na kraju se umesto zaključka može reći da, zahvaljujući postojanju Antidoping agencije Republike Srbije, naša zemlja ima:

- uglednu organizaciju sa specifičnim znanjem koje ne pružaju ni ustanove iz oblasti sporta ni ustanove iz oblasti zdravstva i sportske medicine. Iza stručnjaka ADAS stoje deset godina međunarodne edukacije i usavršavanja, poznavanje sistema antidopinga i uspostavljanje organizacije antidoping borbe u Srbiji, a iza doping kontrolora ADAS stoje veliko međunarodno iskustvo, stručnost i znanje;
- broj sportista pozitivnih na doping na nivou svetskog proseka. Do 2011. godine procenat pozitivnih u Srbiji kretao se oko 4%. Od 2011. godine ovaj procenat se

smanjio na nivo od 1,5 do 2 %, čime smo se izjednačili sa svetskim prosekom od 1-2%;

- zapaženu međunarodnu poziciju (zahvaljujući dobrom radu ADAS Srbija je 2 godine imala predstavnička u Osnivačkom odboru WADA koji broji 18 članova predstavnika država i 18 članova predstavnika Olimpijskog pokreta; ADAS je angažovan za doping kontrole na preko 50 međunarodnih takmičenja, uključujući i kontrole u inostranstvu; kontrolori ADAS su angažovani na tri Olimpijade do sada, evropskim prvenstvima u fudbalu, košarci i slično);
- telo koje veštači u sudskim sporovima koji uključuju krivična dela vezana za distribuciju doping supstanci. U Srbiji su predviđena 2 krivična dela vezana za distribuciju, davanje ili upotrebu doping supstanci, za koja su predviđene višegodišnje zatvorske kazne, kao i niz prekršajnih dela. Predstavnici ADAS su do sada veštačili, tj. davali stručna mišljenja u 5 krivičnih postupaka pred tri različita Viša suda u Srbiji i učestvovali u prekršajnim postupcima;
- lidersko mesto u regionu na polju antidoping borbe;
- pre svega edukativnu ustanovu jer je obrazovanje prepoznato kao ključni razlog za smanjenje broja slučajeva pozitivnih na doping u Srbiji tokom deset godina rada ove institucije.

Literatura

1. Dikic N, McNamee M, Günter H, Markovic SS, Vajgic B. Sports physicians, ethics and antidoping governance: between assistance and negligence. *Br J Sports Med.* 2013;47(11):701-4.
2. Dikic N, Samardzic Markovic S, McNamee M. On the Efficacy of WADA's Whereabouts Policy: Between Filing Failures and Missed Tests. *Deutsche zeitschrift fur sportmedizin.* (2011), vol. 62 (10): 324
3. Vukasinovic-Vesic Milica, Andjelkovic Marija, Stojmenovic Tamara, Dikic Nenad, Kostic Marija, Curcic Djordje, Sweat rate and fluid intake in young elite basketball players on FIBA Europe U20 Championship, *Vojnosanit Pregl* 2015; 72(12): 1063–1068.
4. <http://www.adas.org.rs>
5. <http://www.adas.org.rs/vesti/2016/03/08/zasto-je-lek-mildronat-meldonium-zabranjen-u-sportu/>
6. <http://www.adas.org.rs/en/vesti/2016/02/26/adas-pokrenuo-program-vrsnjacke-edukacije-o-borbi-protiv-dopinga>
7. <http://online-kurs.cis.edu.rs>
8. <https://www.facebook.com/ADAS.Srbija>
9. <https://www.facebook.com/MedicinaSporta>
10. <http://www.adas.org.rs/youtube-kanal-adas>
11. <https://www.youtube.com/watch?v=zCOsX1CJVps>
12. <http://smas.org/izdavacka-delatnost.html>
13. <http://www.adas.org.rs/edukacija/android-aplikacija-adas-za-sportiste>

Effects of exercise on plasma adiponectin levels in athletes

Efekat treninga na vrednosti adiponektina u plazmi vrhunskih sportista

Mirjana Popović¹, Dejan Nešić^{1,2}

¹ Faculty of Medicine, University of Belgrade

² Institute of Medical Physiology „Richard Burian“

Abstract

Adipose tissue is an endocrine organ which releases biologically active adipokines. Adiponectin, an adipocyte-derived protein structurally similar to complement 1q, plays a significant role in metabolic disorders, due to its insulin sensitizing, anti-inflammatory and anti-atherogenic properties. AdipoR₁ and AdipoR₂ mediate the metabolic actions of adiponectin by activating adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and peroxisome proliferator-activated receptors-alpha (PPAR- α) which leads to an increase in fatty acid combustion and energy consumption, fatty acid oxidation and glucose uptake in myocytes and reduces gluconeogenesis and thus leads to increased insulin sensitivity. Plasma adiponectin level is affected by multiple factors: gender (females have higher plasma adiponectin levels), obesity-linked diseases (metabolic syndrome, diabetes mellitus type 2 and atherosclerosis are associated with lower adiponectin levels), lifestyle - including exercise. Yet, to date, little is known about the response of adiponectin concentrations to exercise and, in particular, the response of this hormone to training in population of athletes. The aim of this review is to overview the published evidence for the effects of exercise on adiponectin levels in athletes.

Adiponectin concentration presents a delayed increase (30 min) after short-term intense performance, by athletes, both male and female. It seems that adiponectin concentrations do not change in response to long-term exercise. No significant difference was found in total adiponectin and/or high-molecular weight (HMW) oligomers in long-term effects of high physical training in athletes. Adiponectin can serve to monitor training loads and the establishment of individual limit values of training loads. Further studies are needed to clarify possible mechanisms by which adiponectin might influence energy homeostasis during heavy training in elite athletes.

Key words: adiponectin, adipose tissue, athletes, exercise.

Adipose tissue functions as an endocrine organ (1). In addition to its role in fuel storage, thermal insulation and

Sažetak

Masno tkivo je endokrini organ, koji oslobađa biološki aktivne adipokine. Jedan od adipokina je adiponektin, protein strukturno sličan komplementu 1q, koji ima značajnu ulogu u metaboličkim poremećajima zbog antiinflamatornog dejstva, anti-aterogenih svojstava i dejstva na insulin. Receptori AdipoR₁ i AdipoR₂ posreduju metaboličko dejstvo adiponektina aktiviranjem adenozin-monofosfat aktivirane protein-kinaze (AMPK) i peroksizom proliferator aktiviranog receptora alfa (PPAR- α), što dovodi do povećanog katabolizma i oksidacije masnih kiselina, preuzimanja glukoze u miocitima, smanjenja glukoneogeneze i povećanja osetljivosti na insulin. Na nivoe adiponektina utiče više činilaca: pol (žene imaju više vrednosti adiponektina u plazmi), bolesti povezane sa gojaznošću (metabolički sindrom, tip 2 dijabetesa melitusa i ateroskleroza su povezane sa nižim vrednostima adiponektina) i način života (uključujući vežbanje). Do danas se ipak malo zna o uticaju rekreativnog vežbanja na nivoe adiponektina, a posebno o uticaju treninga na nivo adiponektina u populaciji sportista. U ovom radu smo prikazali pregled literature o efektima treninga na nivoe adiponektina u plazmi vrhunskih sportista.

Koncentracija adiponektina pokazuje odloženo povećanje (30 min) nakon kratkotrajnog intenzivnog treninga u sportista oba pola. Prema podacima iz literature, koncentracije adiponektina se ne menjaju kao odgovor na dugotrajno vežbanje. Kod sportista posle treninga nema značajne razlike u nivou ukupnog adiponektina vs. oligomera visoke molekularne težine (HMW). Adiponektin može da služi za praćenje opterećenja tokom treninga i postavljanje individualnih normi za intenzitet treninga. Potrebna su dalja istraživanja radi pojašnjenja mogućih mehanizama kojima adiponektin utiče na energetska homeostazu kod vrhunskih sportista tokom treninga.

Ključne reči: adiponektin, masno tkivo, sportisti, trening.

mechanical protection, it releases biologically active and diverse cytokines, called adipokines (2). Adiponectin, an

adipocyte-derived protein (3), plays a significant role in metabolic disorders, such as obesity, type 2 diabetes, coronary heart disease and metabolic syndrome (4, 5) due to its insulin sensitizing, anti-inflammatory and anti-atherogenic properties (6). Structurally, adiponectin contains three distinguishable domains: an N-terminal sequence, a collagenous region and a globular domain structurally similar to complement 1q (7). It belongs to a family of proteins that form characteristic multimers. Adiponectin exists in a wide range of multimer complexes in plasma and combines via its collagen domain to create 3 major oligomeric forms: a low-molecular weight (LMW) trimer, a middle-molecular weight (MMW) hexamer and high-molecular weight (HMW) 12- to 18-mer adiponectin (8, 9). Several investigations support the hypothesis that HMW adiponectin is a more active form of the protein and has a more relevant role in insulin sensitivity and in protecting against diabetes (10). AdipoR₁ and AdipoR₂, mediate the metabolic actions of adiponectin through phosphorylation and activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) (11). The AMPK activation stimulates phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase, fatty acid oxidation and glucose uptake in myocytes and reduces enzymes involved in gluconeogenesis in liver, leading to reduction of glucose levels. Adiponectin also increased the expression levels of peroxisome proliferator-activated receptors- α (PPAR- α) *in vivo*, increasing fatty acid combustion and energy consumption, which led to decreased triglyceride content in the liver and skeletal muscle and thus increased insulin sensitivity (12).

There is a sexual dimorphism in the circulating levels of adiponectin. Females have higher plasma adiponectin levels (16.6 ± 5 mg/ml) than males (7.9 ± 0.5 mg/ml), suggesting that sexual hormones regulate the production of adiponectin (13). Plasma adiponectin level is affected by multiple factors: gender, aging, obesity-linked diseases (insulin resistance, diabetes mellitus type 2 and atherosclerosis), lifestyle, including exercise. It is well documented that exercise or regular physical activity has beneficial effects on metabolic and cardiovascular diseases (14). Considering previous literature, it is unclear whether exercise increases adiponectin in circulation and its receptors in insulin-sensitive tissues (15). Complicating interpretation of the existing data is dependent on multiple factors, including the pathological condition, types (endurance vs resistance exercise), intensity (low, moderate and intense) and duration of exercise (acute vs chronic, short-term vs long-term) and sex. For example, in healthy, young subjects, it seemed that both acute and chronic aerobic exercise did not alter plasma level of adiponectin (16). However, exercise in combination with diet-induced weight loss (17), significantly increases plasma adiponectin levels in both obese and insulin-resistant subjects. Furthermore, recent

data suggest that exercise training might modulate the expression of AdipoR₁ and AdipoR₂ in PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) in young men (18). On the other hand, there is a fact that a relationship between exercise and increased adiponectin levels was not observed in the majority of randomized controlled trials (16). Only moderate-high intensity resistance training, not low intensity, increased plasma adiponectin in inactive subjects, suggesting that the intensity of exercise may be an important factor in the expression of adiponectin.

From the point of view of the intensity of exercise, what are the possible mechanisms by which adiponectin might influence energy homeostasis during heavy training in elite athletes? Vigorous training program represents a physical stress condition in which heavy changes in energy expenditure might increase adiponectin concentration in athletes, but a number of different hormones are known to be immediately altered during intense exercise (19), such as insulin, catecholamines, and cortisol (20), and they may affect adiponectin levels via suppressed adiponectin gene expression (20).

Adiponectin influences metabolic adaptations that would prove beneficial to the endurance of athletes, but there aren't many studies that have investigated the response of this hormone to training in a population of athletes and how adiponectin is regulated during cumulative exercise.

In professional cyclists, adiponectin significantly increased during the cycling race and recovery periods (21), when compared to the baseline. Lombardi G. et al (21) found adipokines trends were clearly related to the power output and the energy expenditures. In another study about adiponectin, significant increases were observed in cumulative exercise (22) within 5 days of commencing the race of cyclists, with these elevated values failing to return to baseline levels after 3 days of recovery, suggesting that adiponectin can serve to monitor training loads and the establishment of individual limit values.

In a study with graded treadmill walk/run protocol in trained runners (23), significant increases in post-exercise levels of adiponectin were elicited. On the other hand, no significant changes were noted in serum adiponectin levels during an ultra-marathon endurance race (24).

Jurimae et al. (25) found a significant reduction in adiponectin levels immediately after-high intensity rowing exercise and correction in plasma volume expansion, but adiponectin was significantly increased above the resting value after the first 30 min of recovery (uncorrected for plasma volume + 19.3%; corrected for plasma volume + 20.0%). Adiponectin does not change throughout the prolonged training period in elite male rowers (26). Jurimae J et al. observed differences in the study (27) of ad-

iponectin responses before and after the training period in SEL (selected) and N-SEL (not selected) rowers for the national team. Decreased postexercise adiponectin values in N-SEL rowers, with lower performance capacity, may be indicative of the inadequate recovery of these athletes. In the same study (27), the acute effects of volume-extended rowing training produced significantly greater adiponectin levels in the athletes selected for a national team immediately and 30 min post-exercise. Significant increases in plasma adiponectin concentration occurred, in response to maximal exercise after completion of the high-intensity interval rowing training but not after traditional ergometer (28).

No significant difference was found in total adiponectin and/or HMW oligomers in long-term effects of high physical training in professional male water polo players (29). In this study, (29) a direct relationship was found between total adiponectin and monocytes, that could represent a mechanism by which adiponectin participates in exercise-induced anti-inflammatory functions and/or cardiovascular health.

Serum adiponectin levels were significantly higher in X/X genotype than R/R or R/X genotype of α -actinin-3 (ACTN3) in rugby players (30). This may be useful information when determining the individual responses of anti-atherogenic markers to exercise.

Elite rhythmic gymnasts (RGs) constitute a unique metabolic model and they are prone to developing Anorexia Athletica. The possible role of salivary adiponectin levels as a predictive factor of reproductive dysfunction and bone mass acquisition in elite RGs was evaluated.

In a study by Roupas ND et al. (31) no association of salivary adiponectin levels was documented with either

reproductive function or bone mass acquisition. Parm A.-L et al. (32) found that adiponectin and ghrelin levels did not predict increases in measured bone mineral density (BMD) value in rhythmic gymnasts. In elite rhythmic gymnasts salivary adiponectin is upregulated after chronic intensive exercise and negative energy balance, while salivary adiponectin is suppressed after short term intensive anaerobic exercise (33).

Adiponectin significantly increased, when compared to the baseline, in young female handball and basketball players (16.7 ± 7.8 vs 21.0 ± 9.8 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0.001$) after intensive fitness and speed exercise (34). Plasma adiponectin remained unchanged during long-term moderate aerobic exercise in young female handball and basketball players (34) and in elite female water polo athletes throughout a season (35).

Conclusion

Adiponectin is secreted by adipocytes and has been implicated in the regulation of energy homeostasis. Vigorous training program represents a physical stress condition in which heavy changes in energy expenditure might increase adiponectin concentration in athletes. Adiponectin concentration presents a delayed increase (30 min) after short-term intense performance by trained athletes, male and female. It seems that adiponectin concentrations do not change in response to long-term exercise. Adiponectin can serve to monitor training loads and the establishment of individual limit values. Further studies are needed to clarify possible mechanisms by which adiponectin might influence energy homeostasis during heavy training in elite athletes.

Literature

1. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2548-56.
2. Aldhahi W, Hamdy O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep* 2003; 3: 293-8.
3. Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 2003; 278: 9073-85.
4. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999; 100: 2473-76.
5. Salmenniemi U, Ruotsalainen E, Pihlajamäki J, Vauhkonen I, Kainulainen S, Punnonen K et al. Multiple abnormalities in glucose and energy metabolism and coordinated changes in levels of adiponectin, cytokines, and adhesion molecules in subjects with metabolic syndrome. *Circulation* 2004; 110: 3842-48.
6. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005; 96: 939-949.
7. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995; 270: 26746-49.
8. Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL, Garvey WTC. Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. *Diabetes* 2006; 55: 249-9.
9. Ebinuma H, Miyazaki O, Yago H, Hara K, Yamauchi T, Kadowaki T. A novel ELISA system for selective measurement of human adiponectin multimers by using proteases. *Clin. Chim. Acta.* 2006;372(1-2):47-53.
10. Fisher FFM, Fisher ME, Trujillo W, Hanif AH, Barnet PG, McTernan P, Kumar S et al. Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males. *Diabetologia*. 2005; 48: 1084-7.
11. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 2002; 8: 1288-95.
12. Evans RM, Barish GD, Wang YX. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat. Med.* 2004; 10: 355-61.
13. Xu A, Chan KW, Hoo RL, Wang Y, Tan KC, Zhang J et al. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 18073-80.
14. Ivy JL. Role of exercise training in the prevention and treatment of insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Sports Med.* 1997; 24 (5): 321-36.

15. Röhling M, Herder C, Stemper T, Müssig K. Influence of Acute and Chronic Exercise on Glucose Uptake. *J Diabetes Res.* 2016; 2016: 2868652.
16. Simpson AK, Fiatarone Singh MA. Effects of Exercise on Adiponectin: A Systematic Review *Obesity* 2008; 16: 241–56.
17. Ryan AS. Insulin resistance with aging: effects of diet and exercise. *Sports Med.* 2000; 30 (5): 327-46.
18. Lee SH, Hong HR, Han TK, Kang HS. Aerobic training increases the expression of adiponectin receptor genes in the peripheral blood mononuclear cells of young men. *Biol. Sport* 2015; 32:181-186
19. Kraemer RR, Aboudehen K, Carruth A, Durand R, Acevedo E, Hebert E. Adiponectin responses to continuous and progressively intense intermittent exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2003; 35: 1320-5.
20. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 2001; 507: 142-6.
21. Lombardi G, Lanteri P, Graziani R, Colombini A, Banfi G, Corsetti R. Bone and Energy Metabolism Parameters in Professional Cyclists during the Giro d'Italia 3-Weeks Stage Race *PLoS One.* 2012; 7(7): e42077.
22. Voss SC, Nikolovski Z, Bourdon PC, Alsayrafi M, Schumacher YO. The effect of cumulative endurance exercise on leptin and adiponectin and their role as markers to monitor training load. *Biol Sport.* 2016; 33 (1): 23-8.
23. Kraemer RR, Aboudehen KS, Carruth AK. Adiponectin responses to continuous and progressively intense intermittent exercise. *MedSci Sports Exerc* 2003; 35: 1320-5.
24. Roupas ND, Mamali I, Maragkos S, Leonidou L, Armeni AK, Markantes GK, et al. The effect of prolonged aerobic exercise on serum adipokine levels during an ultra-marathon endurance race. *Hormones* 2013, 12(2): 275-82.
25. Jurimae J, Purge P, Jurimae T. Adiponectin is altered after maximal exercise in highly trained male rowers. *Eur J Appl Physiol* 2005; 93: 502-5.
26. Jürimäe J, Purge P, Jürimäe T. Effect of prolonged training period on plasma adiponectin in elite male rowers. *Horm Metab Res.* 2007; 39 (7): 519-23.
27. Jurimae J, Purge P, Jurimae T. Adiponectin and stress hormone responses to maximal sculling after volume-extended training season in elite rowers. *Metabolism* 2006; 55: 13-9.
28. Shing CM, Webb JJ, Driller MW, Williams AD, Fell JW. Circulating adiponectin concentration and body composition are altered in response to high-intensity interval training. *J Strength Cond Res.* 2013; 27 (8): 2213-8.
29. Nigroa E, Sangiorgiob D, Scudiero O, Monaco ML, Polito R, Villonee G et al. Gene molecular analysis and Adiponectin expression in professional Water Polo players. *Cytokine* 2016; 81: 883.
30. Shinsuke N, Mami F, Kokoro T, Sachiko F, Akihiko U, Yasuharu K. et al: ACTN3 gene R577X polymorphism associated with high-density lipoprotein, cholesterol and adiponectin in rugby players. *Endocrine Practice.* Rapid Electronic Article in Press AACE 2016; DOI:10.4158/EP15963. OR
31. Roupas ND, Maïmoun L, Mamali I, Coste O, Tsouka A, Mahadea KK et al. Salivary adiponectin levels are associated with training intensity but not with bone mass or reproductive function in elite Rhythmic Gymnasts. *Peptides.* 2014; 51: 80-5.
32. Parm A.-L, Jürimäe J, Saar M, Pärna K, Tillmann V, Maasalu K. et al. Bone mineralization in rhythmic gymnasts before puberty: no longitudinal associations with adipocytokine and ghrelin levels. *Horm Res Paediatr.* 2012; 77 (6): 369-75.
33. Roupas ND, Maïmounb L, Mamalia I, Costeb O, Tsoukaa A, Kunal Mahadeaf K. et al. The influence of intensive physical training on salivary adipokine levels in Elite Rhythmic Gymnasts. *Horm Metab Res.* 2012; 44 (13): 980-6.
34. Plinta R, Olszanecka-Glinianowicz M, Drosdzol-Cop A, Chudek J, Skrzypulec-Plinta V. The effect of three-month pre-season preparatory period and short-term exercise on plasma leptin, adiponectin, visfatin, and ghrelin levels in young female handball and basketball players. *J Endocrinol Invest.* 2012; 35 (6): 595-601.
35. Varamenti EI, Kyparos A, Veskokoukis AS, Bakou M, Kalaboka S, Jamurtas AZ. et al. Oxidative stress, inflammation and angiogenesis markers in elite female water polo athletes throughout a season. *Food Chem Toxicol.* 2013; 61: 3-8.

Eritropoetin između terapije i dopinga – dve strane medalje

Erythropoietin between therapy and doping – two sides of the same coin

Ana Ostojić¹, Jasna Trbojević-Stanković², Dejan Nešić^{1,3}

¹ Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

² Department of Dialysis, Clinical Hospital Center “Dr Dragiša Mišović”, Belgrade

³ Institute of Medical Physiology “Richard Burian”, Serbia

Sažetak

Eritropoetin je hormon koji se kod odraslih stvara pretežno u bubrežima, a u manjoj meri i u jetri, kao odgovor na hipoksiju. Primarno stimuliše eritropoezu u koštanoj srži i deluje antiapoptozno, antiinflamatorno i citoprotektivno. Stvara se lokalno i deluje i u mnogim drugim, nehematopoetskim tkivima, ispoljavajući u njima i svoj proangiogeni potencijal. Eritropoetin se vezuje za citokinski receptor koji eksprimiraju ciljne ćelije, prekursori eritrocita, ali i neuroni, ćelije glije, endotelne ćelije, kardiomiociti, miociti i dr. Pronalaskom sintetskih formi eritropoetina, krajem osamdesetih godina prošlog veka, značajno je unapređeno lečenje bolesnika sa anemijom usled hroničnih bolesti, najčešće renalne insuficijencije. Anemija u hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji je multifaktorska, ali u najvećoj meri posledica manjka eritropoetina. Do sada su razvijene tri generacije stimulatora eritropoeze, koji se razlikuju u ugljenohidratnom delu, veličini, polu-životu u cirkulaciji, načinu primene i dozi. I pored značajno poboljšanog kvaliteta života anemičnih bolesnika, postoje ozbiljni, potencijalno ugrožavajući efekti ove terapije. Sinteza rekombinovanog humanog eritropoetina, s druge strane, otvorila je nove mogućnosti i za zloupotrebu u sportu, u domenu krvnog dopinga. Davanje eritropoetina zdravim sportistima podiže njihov aerobni kapacitet i poboljšava izdržljivost i rezultate, posebno u aerobnim disciplinama. Time se ozbiljno narušava sportski duh, ali i ozbiljno ugrožava zdravlje sportista. U upotrebi su različiti testovi za otkrivanje nedozvoljenih supstanci, ali je uspeh ovih metoda još uvek ograničen. Uporedo se stalno razvijaju i pronalaze drugi načini zloupotrebe u sportu, poput novijih, različitih modela genetskog dopinga. Zbog svega navedenog razvoj novih modela antidoping testova i bolja zdravstvena kontrola sportista i dalje predstavljaju veliki izazov.

Ključne reči: eritropoetin, eritropoeza, anemija, sportisti, doping

Abstract

Erythropoietin is a hormone that promotes the formation of red blood cells by the bone marrow. In adults it is mainly produced by the kidneys as a response to hypoxia. Besides its main role, it also acts as antiapoptotic, anti-inflammatory and cytoprotective agent. Furthermore, it is produced in many non-hematopoietic tissues where it acts locally, stimulating angiogenesis. Erythropoietin binds cytokine receptors on target cells, such as erythrocyte precursor cells, neurons, glial and endothelial cells, cardiomyocytes, myocytes etc. The discovery of synthetic erythropoietin forms, in the late eighties of the last century, has significantly improved treatment outcome of patients with anaemia related to chronic diseases, especially chronic renal failure. Renal anaemia is multifactorial, but predominantly a consequence of erythropoietin deficiency. Today, three generations of erythropoiesis stimulating agents are available, differing in glycosylation pattern, molecular size, half-life and modes of administration and dosage. In anaemic patients this therapy significantly improves their quality of life, but may also have serious, potentially dangerous adverse effects. Synthesis of recombinant human erythropoietin, on the other hand, has improved possibilities for manipulations in sport, in the field of blood doping. Erythropoietin administration in athletes increases their maximum oxygen consumption capacity, improves endurance and performance, especially in aerobic exercise. This seriously undermines the spirit of sport, and also endangers athletes' health. Different anti-doping tests have been developed and used, still with limited success. At the same time, new illicit ways of malpractice are developing, such as various models of gene doping. Therefore, providing new models of anti-doping tests and strategies, together with better health control of athletes, still remains a considerable challenge.

Key words: erythropoietin, erythropoiesis, anaemia, athletes, doping

Introduction

Erythropoietin (EPO) is a cytokine for erythrocyte precursors in the bone marrow. It is also a 30400 daltons glycoprotein hormone, with peptide core of 165 amino-acids for receptor binding, and carbohydrate portion (40% of the total molecule) necessary for *in vivo* survival of the hormone (1, 2). In adults EPO is mainly produced by the kidneys and, to a much lesser extent of up to 10% by the liver (3). Erythropoietin is produced mostly by interstitial, intertubular fibroblasts in renal cortex and outer medulla, but also in peritubular capillary cells (1, 4). Some studies suggest possible role of proximal tubular cells in EPO production (5). In liver, EPO producing cells are hepatocytes and perisinusoidal (Ito) cells (1, 6). Synthesis of EPO is hypoxia dependent, and physiological hypoxia appears during high altitude exposure, or strenuous exercise. Important role here play hypoxia inducible factors 1 and 2 (HIF 1 and 2) which induce erythropoietin gene transcription (1, 6). These are ubiquitinary enzymes, but HIF 2 is more present in kidney and liver cells, and hence more specific for EPO gene transcription (7, 8). Non-HIF pathways that can alter EPO production include kinase C, GATA-2, nuclear factor kappa B (NF κ B) pathways (7, 9). Baseline EPO concentration can raise up to 1000 fold in hypoxic conditions (10). In healthy individuals, reference EPO range is usually between 1 and 27 mU/ml, while patients with chronic kidney disease (CKD) can have much higher values, but inappropriately low related to the degree of anaemia, and with inadequate response to it because of the resistance (9).

The major effect of EPO is stimulation of erythropoiesis (3). Erythropoietin induces hematopoiesis and boosts the production of erythrocytes, rising their count after 3-4 weeks. Molecules of EPO bind to the EPO receptors, type 1 transmembrane proteins belonging to hematopoietic cytokine receptor superfamily, which are Janus tyrosine kinase 2 (JAK2) dependent, and undergo dimerization in response to EPO binding (1, 2). This is followed by activation of several signaling pathways, mostly JAK2/STAT5 pathway, and PI3K/Akt, but also by other signal molecules like MAP kinase, ERK1/2, protein kinase C and heat shock proteins (11, 12). Cytoplasmic protein hematopoietic cell phosphatase (HCP) terminates signal transduction (9).

First erythroid progenitor cell expressing EPO receptor is colony forming unit erythroid cell (CFU-E), which further proliferates and differentiates, until 16 mature erythrocytes occur (1, 10, 13). In the state of intensive erythropoiesis the need of iron for haemoglobin (Hb) synthesis is elevated. This is regulated by coordination between EPO and hepcidin, a hormone involved in iron homeostasis (14). Erythropoietin indirectly inhibits synthesis of hepcidin and its action, leading to iron transfer from intracellular storage into circulation, and increase of iron intestinal absorption (9, 14).

Beside its direct hematopoietic and antiapoptotic effects, EPO also acts as anti-inflammatory and cytoprotective agent (11). There are many non-hematopoietic (non-erythroid) tissues and organs, such as brain, retina, muscles, heart, lungs, spleen, uterus etc., where EPO is locally produced and where EPO receptors have been expressed as well (1, 8, 11, 15, 16). In these organs EPO exhibits all its effects except erythropoietic, reciprocated by proangiogenic stimulation (17, 18).

During the late eighties of the last century, synthetic forms of erythropoietin have been discovered. This revelation has significantly improved treatment options for patients with anaemia due to chronic disease, especially those with CKD and certain malignancies, but also in cases of peri-operative care and prematurity (19). Unfortunately, this was also recognized by some athletes and their practitioners, as much easier way to increase erythrocyte number and therefore tissue oxygenation and endurance.

Erythropoietin in renal anaemia treatment

Anaemia in renal insufficiency is multifactorial, but mainly a consequence of decreased erythropoietin production, due to EPO-producing fibroblasts transdifferentiation into myofibroblasts, predominantly collagen-secreting cells (7, 20). This occurs under the influence of proinflammatory cytokines, TNF α and TGF β . The amount of erythropoietin produced by the liver is inadequate for organism needs (20). Uremic toxins, deficiency of vitamin D, B₁₂, folate and iron, inflammation, shorter erythrocytes lifespan, gastrointestinal bleedings, also contribute to anaemia development (19, 21). Anaemia can occur already with decline of glomerular filtration rate to 40-50 ml/min (20). The severity of anaemia does not correlate directly with CKD stages, and usually does not depend upon the nature of renal disorder. Anaemia in CKD is normochromic, normocytic, defined as Hb concentration below 13g/dl for adult males and post-menopausal women, or as Hb below 12g/dl for pre-menopausal women (20, 22).

Synthesis of recombinant human erythropoietin (rHuEPO), enabled novel therapeutic options in clinical practice. Various glycosylation patterns of rHuEPO gave rise to alpha, beta, delta, and omega forms. So far, there are three generations of erythropoietin stimulating agents (ESA), administered by subcutaneous or intravenous route (19, 23). In 1989 epoetin alfa was synthesized, followed by epoetin beta, and these were the first generation agents, with shorter half-lives, and smaller molecular size in comparison with the following ESAs. Darbepoetin alfa is considered the second generation, with longer terminal half-life, while continuous EPO receptor activator (CERA) is the third

generation, with much longer half-life, which significantly increases the administration interval (23). An important issue, however, is resistance to ESA, developing in 10 to 20% of CKD patients, mainly because of proinflammatory cytokines that disrupt iron metabolism, inhibit erythroid progenitor cells, and reduce number and effect of EPO receptors, which altogether increases mortality risk (9, 24, 25). The major adverse effects of ESA therapy include hypertension, increase in blood viscosity, hypercoagulability and greater risk of thrombotic events, flu-like syndrome, hyperkalemia, erythroblastosis, iron deficiency, headache (11, 20). In patients with uncontrolled hypertension, or in patients with malignancies, ESA therapy is contraindicated, even though there are still controversies about possibility that rHuEPO enhances cancer progression (26, 27).

Physical activity and blood doping

Exercise has many beneficial effects on human organism. In aerobic disciplines, such as long-distance or treadmill running, cycling, cross-country skiing, the main factors determining performance are oxygen (O_2) delivery to exercising skeletal muscles and its use (28-30). Endurance training induces physiological changes that can improve exercise performance in terms of haematopoietic induction, which increases O_2 transport to muscles. This type of training and EPO both stimulate a shift in skeletal muscle, from a fast glycolytic to a slower oxidative phenotype, by inducing mitochondrial biogenesis, which also improves aerobic exercise capacity (28, 31, 32). Haemoglobin concentration rises because of increased erythrocytes mass, and decreased plasma volume during exercise (10). Altitude exposure is a well known legal stimulus of erythropoiesis.

Doping presents the use of drugs or methods to improve athletic performance. Erythropoietin improves performance in athletes primary by intensifying of erythropoiesis and raise of maximal O_2 uptake, usually between 6 and 12% (33). To improve endurance, some athletes went for blood manipulations, so called blood doping, first with blood transfusions in the 1970s and 1980s (although earliest reports in literature date back to 1945), and then rHuEPO abuse started, soon after its introduction to clinical practice (26, 29, 32, 34). Therefore, in 1990 the International Olympic Committee prohibited rHuEPO use in athletes (26, 35). The World Anti-Doping Agency (WADA) annually updates its List of Prohibited Substances and Methods, containing different categories, such as stimulants, steroids, gene doping, etc. According to some estimates, 3 to 7% of best endurance sport athletes use rHuEPO (36). Blood doping is defined by WADA as “*the misuse of certain techniques and/or substances to increase one’s red blood cell mass, which allows the body to transport more O_2 to muscles and therefore increase stamina and*

performance” (33). Apart from EPO, other agents are also misused to stimulate erythropoiesis, such as HIFs, even though they induce expression of more than 200 genes, beside EPO gene, or cobalt, although it has serious toxic effects, or prolyl hydroxylase inhibitors, HCP inhibitors, EPO mimetic peptides and recombinant fusion proteins of EPO (26, 31, 33). Several hormones may also stimulate EPO production, like thyroid hormone, growth hormone, testosterone, angiotensin II, prostanoids (29, 33). In 2002 Repoxygen, an agent consisting of viral vector that transfers the modified human EPO gene under the control of genes encoding HIF 1 and 2 was developed, and its use in athletes was prohibited in 2009 (36). In 2003 WADA defined gene doping as “*nontherapeutic use of cells, genes, genetic elements of modulation of gene expression, having the capacity to enhance athletic performance*”, and added it into List of prohibited practices (26, 36). In gene doping genetic material is incorporated into cells by viral or non-viral carriers and techniques, where the first ones are more efficient but also more cytotoxic. Beside all side effects of EPO overexpression, the main risk of gene doping is that gene transfer vectors can integrate at the “wrong site” in DNA, and lead to insertional mutagenesis, which may cause cancer or death (36).

Several tests to determine blood doping are used, direct and indirect, with limited success, using biological materials (blood and urine). Allogenic blood transfusion test is direct method, implemented in 2004, that uses blood group antisera to recognize different erythrocytes populations by flow cytometry (33, 37). Manipulations with autologous transfusions can still be detected only indirectly, like problematic technique of carbon-monoxide rebreathing, analysis of plastic residues following storage of some transfusions bags, or gene expression changes and proteomics, which are ongoing (29, 33). Methods for detecting rHuEPO misuse are direct and indirect. Direct method relies on different carbohydrate components - glycosylation patterns of endogenous and rHuEPO, detected by isoelectric focusing (IEF) or electrophoresis in urine (26, 38). This test, known as Lasne’s method, is adopted by WADA as a screen for rHuEPO in athletes. False-positive results can occur due to strenuous exercise proteinuria and cross-reactivity with anti-EPO antibodies, while false-negative results may arise especially with CERA, which exhibit low urinary excretion (35, 39, 40). Indirect methods are focused on measuring haematological parameters, and developing athlete biological passports (ABP), a software system based on monitoring doping biomarkers in athletes (26, 29, 33, 35). The main idea with ABP is that any kind of blood doping will change haematological and other parameters. It was first implemented in cycling and athletics, and then football, triathlon, etc. Markers of hematologic model considered

in ABP are hematocrit, Hb concentration, erythrocyte count, percentage and number of reticulocyte, mean corpuscular Hb concentration (MCHC), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular Hb mass (MCH), and some additional parameters referred to reticulocytes (33). Blood profiles are then evaluated by experts (29). For gene expression profiling direct methods, like DNA microarrays, proteomic profiling, and searching for transgenic proteins are used, and still developing, while potential indirect methods are also haematological and molecular “passports” of athletes (26, 36). Different ways to falsify doping test results are continuously developing, such as altitude training to conceal EPO misuse, or adding proteases to decompose erythropoietic proteins in urine samples, or simply covering up positive doping tests (33).

Conclusion

Erythropoietin is the main hormone that induces erythrocyte production. This was the guide and basis for synthesis of recombinant human erythropoietin forms, re-

sulting in significant improvement in anaemia treatment. On the other hand, this achievement attracted the attention of some athletes who have tried, and still try to find easier, illegal and unsporting ways to enhance their performance. While in cases of indicated medical treatment serious side effects of rHuEPO must be taken into account, there is no excuse for its abuse in sport, and potential health endangering. Simultaneously with development of anaemia-treating agents, better anti-doping tests and controls, and strategies to prevent cheating in sport have to be established. We hope that the upcoming Olympic Games in Rio will promote setting new records of athletes who respect basic Olympic motto - “Faster, Higher, Stronger”, but who also respect the principles of fair play and their own health. There is no doubt that pleiotropic actions of erythropoietin, and its misuse in sport are fields of medicine that still have to be, and will be investigated, but at the same time we all have responsibility to use those findings in a proper way, ensuring further progress of medical treatment, and disabling all potential attempts for its illegal use in sport.

References

- Sasaki R, Masuda S, Nagao M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000; 64(9): 1775-93.
- Pearl RG. Erythropoietin and organ protection: lessons from negative clinical trials. *Crit care.* 2014; 18(5): 526.
- Guyton AC, Hall JE. *Medicinska fiziologija*. 11. Izdanje. Beograd: Savremena administracija; 2008.
- Lacombe C, da Silva JL, Bruneval P, Fournier JG, Wendling F, Casadevall N, et al. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J Clin Invest.* 1988; 81(2): 620-23.
- Mujais SK, Beru N, Pullman TN, Goldwasser E. Erythropoietin is produced by tubular cells of the rat kidney. *Cell Biochem Biophys.* 1999; 30(1): 153-66.
- Tojo Y, Sekine H, Hirano I, Pan X, Souma T, Tsujita T, et al. Hypoxia signaling cascade for erythropoietin production in hepatocytes. *Mol Cell Biol.* 2015; 35(15): 2658-72.
- Kurt B, Kurtz A. Plasticity of renal endocrine function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015; 308(6): r455-66.
- Rabie T, Marti HH. Brain protection by erythropoietin: a manifold task. *Physiology (Bethesda).* 2008; 23: 263-74.
- Van der Putten K, Braam B, Jie KE, Gaillard CA. Mechanisms of disease: erythropoietin resistance in patients with both heart and kidney failure. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2008; 4(1): 47-57.
- Heuberger JA, Cohen Tervaert JM, Schepers FM, Vliegenthart AD, rotmans JI, Daniels JM et al. Erythropoietin doping in cycling: lack of evidence for efficacy and a negative risk-benefit. *Br J Clin Pharmacol.* 2013; 75 (6): 1406-21.
- Provatopoulou ST, Ziroyannis PN. Clinical use of erythropoietin in chronic kidney disease: outcomes and future prospects. *Hippokratia.* 2011; 15(2): 109-15.
- Suzuki N. Erythropoietin gene expression: developmental-stage specificity, cell-type specificity, and hypoxia inducibility. *Tohoku J Exp Med.* 2015; 235(3): 233-40.
- Nikolić I, Rančić G, Radenković G, Lačković V, Todorović V, Mitić D. *Embriologija čoveka: tekst i atlas*. 2. Izdanje. Beograd: Data Status; 2006.
- Gammella E, Diaz V, Recalcati S, Buratti P, Samaja M, Dey S, et al. Erythropoietin's inhibiting impact on hepcidin expression occurs indirectly. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015; 308(4): r330-5.
- Luo W, Hu L, Wang F. The protective effect of erythropoietin on the retina. *Ophthalmic Res.* 2015; 53(2): 74-81.
- Kim JH, Shim JK, Song JW, Song Y, Kim HB, Kwak YL. Effect of erythropoietin on the incidence of acute kidney injury following complex valvular heart surgery: a double blind, randomized clinical trial of efficacy and safety. *Crit care.* 2013; 17(5): r254.
- Ribatti D, Vacca A, Roccaro AM, Crivellato E, Presta M. Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest* 2003; 33(10): 891- 6.
- Giri P, Ebert S, Braumann UD, Kremer M, Giri S, Machens HG, et al. Skin regeneration in deep second-degree scald injuries either by infusion pumping or topical application of recombinant human erythropoietin gel. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 2565 - 79.
- Manojlović D, urednik. *Interna medicina I i II knjiga*. 5. Izdanje. Beograd: Zavod za udžbenike; 2009.
- Stojimirović B, Trbojević-Stanković J. *Anemije u bolestima bubrega*. Mihaljević b, stojimirović b, urednici. *Anemije*. Beograd: Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2007.
- Santoro D, Caccamo D, Lucisano S, Buemi M, Sebekova K, Teta D, et al. Interplay of vitamin d, erythropoiesis, and the renin-angiotensin system. *Biomed Research International*, Vol. 2015, article id 145828, 11 pages.
- Kidney disease: improving global outcomes (kdigo) anemia work group. *Kdigo clinical practice guideline for anemia in chronic kidney disease*. *Kidney Inter., suppl.* 2012; 2: 279-335.
- Hayat A, Haria D, Salify MO. Erythropoietin stimulating agents in the management of anemia of chronic kidney disease. *Patient Prefer Adherence.* 2008; 2: 195-200.
- Bamgbola OF. Pattern of resistance to erythropoietin-stimulating agents in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2011; 80(5): 464-74.
- Yilmaz MI, Solak Y, Covic A, Goldsmith D, Kanbay M. Renal anemia of inflammation: the name is self-explanatory. *Blood Purif.* 2011; 32(3): 220-5.
- John MJ, Jaison V, Jain K, Kakkar N, Jacob JJ. Erythropoietin use and abuse. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012; 16(2): 220-7.

27. Hedley BD, Allan AL, Xenocostas A. The role of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents in tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2011; 17(20): 6373-80.
28. Baker JM, De Lisio M, Parise G. Endurance exercise training promotes medullary hematopoiesis. *Faseb J.* 2011; 25(12): 4348-57.
29. Lundby C, Robach P, Saltin B. The evolving science of detection of 'blood doping'. *Br J Pharmacol.* 2012; 165(5): 1306-15.
30. Van Breda E, Benders J, Kuipers H. Little soldiers in their cardboard cells. *Br J Clin Pharmacol.* 2014; 77(3): 580-1.
31. Christensen B, Nellemann B, Larsen MS, Thams L, Sieljacks P, Vestergaard PF, et al. Whole body metabolic effects of prolonged endurance training in combination with erythropoietin treatment in humans: a randomized placebo controlled trial. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 305(7): e879-89.
32. Plumb JO, Otto JM, Grocott MP. 'Blood doping' from armstrong to prehabilitation: manipulation of blood to improve performance in athletes and physiological reserve in patients. *Extrem Physiol Med.* 2016; 5: 5.
33. Jelkmann W, Lundby C. Blood doping and its detection. *Blood.* 2011; 118(9): 2395-404.
34. Durussel J, Daskalaki E, Anderson M, Chatterji T, Wondimu DH, Padmanabhan N et al. Haemoglobin mass and running time trial performance after recombinant human erythropoietin administration in trained men. *Plos One.* 2013; 8(2): e56151.
35. Beullens M, Delanghe JR, Bollen M. False-positive detection of recombinant human erythropoietin in urine following strenuous physical exercise. *Blood.* 2006; 107(12): 4711-3.
36. Brzezińska E, Domańska D, Jegier A. Gene doping in sport - perspectives and risks. *Biol Sport.* 2014; 31(4): 251-9.
37. Ashenden M. Contemporary issues in the fight against blood doping in sport. *Haematologica.* 2004; 89(8): 901-3.
38. Lasne F, Martin L, Crepin N, De Ceaurriz J. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem.* 2002; 311(2): 119-26.
39. Lundby C, Achman-Andersen NJ, Thomsen JJ, Norgaard AM, Robach P. Testing for recombinant human erythropoietin in urine: problems associated with current anti-doping testing. *J Appl Physiol (1985).* 2008; 105(2): 417-9.
40. Lasne F, Martin L, Martin JA, De Ceaurriz J. Detection of continuous erythropoietin receptor activator in blood and urine in anti-doping control. *Haematologica.* 2009; 94(6): 888-90.

Oporavak srčane frekvencije – kratak pregled metodologije

Heart rate recovery – short review of methodology

Biljana Đurić¹, Slavica Suzić¹

¹Institute of Medical Physiology “Rihard Burjan”, Medical Faculty, University of Belgrade, Serbia

Contact: bilja.djuric@gmail.com

Abstract

Determination of the heart rate recovery (HRR) after the session of a physical activity, represents the valuable parameter for the investigation of autonomic balance and its dynamic in the general population, but also in the population of elite athletes. However, the methodology for its determination and analysis is still not entirely specified. It is necessary to define an adequate protocol of cardiopulmonary exercise test, by choosing an adequate ergometer (treadmill, ergo-bicycle or step bench). Organization of recovery period (active or passive), after the session of exercise is also very important, because its protocol interfered significantly with the value of HRR. Interpretation of obtained HRR values varies a lot, and researcher has freedom to choose the most adequate way, in accordance with the objectives of his study. Following paper represents a short review of determination, interpretation and analysis of HRR, followed by the latest recommendations.

Key words: heart rate recovery, cardiopulmonary exercise test, maximal oxygen uptake, autonomic balance

Sažetak

Praćenje oporavka srčane frekvencije nakon sesije fizičke aktivnosti (engl. *heart rate recovery, HRR*) predstavlja veoma značajan parametar koji možemo koristiti u cilju izučavanja balansa autonomnog nervnog sistema, kako u opštoj populaciji, tako i u populaciji vrhunskih sportista. Metodologija koja se koristi za određivanje i analizu *HRR*, međutim, još uvek nije adekvatno definisana. Prvenstveno je potrebno definisati adekvatan protokol testa opterećenja koji koristimo u svrhu određivanja *HRR*, a zatim i odabrati odgovarajući ergometar (tredmil, ergo – bicikl ili step – klupica). Potrebno je definisati i protokol perioda oporavka (da li će oporavak biti aktivan ili pasivan), budući da odabrani protokol značajno utiče na dobijene vrednosti *HRR*. Interpretacija dobijenih vrednosti *HRR* veoma varira od studije do studije, tako da istraživači imaju slobodu da izaberu način interpretacije koji najviše odgovara potrebama specifičnog istraživanja. Uzevši u obzir gore navedene činjenice, naš rad predstavlja jedan kratak pregled protokola koje možemo koristiti u određivanju, interpretaciji i analizi vrednosti *HRR*, prateći najnovije preporuke.

Ključne reči: oporavak srčane frekvencije, test fizičkog opterećenja, maksimalna potrošnja kiseonika, balans autonomnog nervnog sistema

Introduction

In recent years, determination of the heart rate recovery (HRR) after one session of the acute physical activity, represents a very powerful tool for the determination of the autonomic nervous system balance in the general population, but also in the population of elite athletes. The rapid recovery of the heart rate, interpreted through the high HRR value, indicates the high parasympathetic (PSY) tone, which represents a common finding in the population of elite athletes (1-3). Many studies have demonstrated that the drop in heart rate in the first minute of recovery (ΔHRR1) represents a good indicator of

PSY reactivation (1, 4, 5). The delay in recovery of heart rate is associated with adverse cardiovascular outcomes and occurrence of insulin resistance (4, 6). On the other hand, faster recovery of heart rate suggests a positive adaptation to specific training load and also provides us information about athletes' training status (7). Despite the increasing popularity, the methodology for determination and analysis of HRR is not entirely uniformed, and there is often the problem of comparing the results of different studies (8).

Cardiopulmonary exercise test in HRR methodology - opportunities and challenges

Analysis of several studies, in which HRR was estimated, have indicated that the first problem for the researchers is the choice of an adequate ergometer. The use of a treadmill is most preferred ergometer for cardiopulmonary exercise test, followed by the use of an ergo-bicycle and step-benches (1-3, 8). All of the subjects have reached higher values of maximal oxygen consumption ($\text{VO}_2 \text{ max}$), when treadmill was used as ergometer in comparison to the use of ergo-bicycle, which also led to the significant difference in HRR values (9). Although the use of a treadmill, shows the mentioned advantages, ergo-bicycle will be adequate choice when it is necessary for the subjects to remain as stable as possible during the cardiopulmonary exercise test (for example when echocardiography is performed). Beside the choice of adequate ergometer, the position of the subject during the test is also affecting the values of HRR, knowing that supine position accelerates HRR compared with the seated positions (10-12).

The estimated value of HRR is also determined by the level of physical activity used in the study Criteria, for the completion of the test: a plateau in $\text{VO}_2 \text{ max}$ despite the increased exercise intensity; respiratory exchange ratio value (RER max) ≥ 1.10 ; heart rate within 10 beats of the age predicted maximum ($220 - \text{age}$) or volitional fatigue (3). The use of submaximal cardiopulmonary exercise test (for example, the cardiopulmonary exercise test ends, when the 80% of predicted maximal heart rate is reached) requires a different set of standards for the value of HRR, since the value of the heart rate at which testing ends, depends on the age of subjects (4).

There are different ramp protocols on treadmill used in studies, but the Bruce protocol remains the most popular. However, if the maximal cardiopulmonary test is performed, the protocol itself, does not influence the value of the HRR (13). On the other hand, the recovery protocol after the session of physical exercise, influences significantly the value of HRR. In some studies, the active recovery protocol is used, in which the subject, after the completion of the test, continues with low grade physical activity (walking on the treadmill with the speed of 4km/h). Subjects that performed active recovery protocol have demonstrated lower HRR values in comparison to the subjects that had the immediate rest state after the maximal cardiopulmonary exercise test. A position that subjects occupy during the recovery period also affects the value of the HRR, with the faster recovery in the supine position (3, 8, 12).

Interpretation of HRR values

There is still no universal agreement about the most suitable method of interpretation of the heart rate recovery for the comparison of results obtained in different studies. The most commune is the interpretation of the HRR as the difference between maximal heart rate reached during maximal cardiopulmonary exercise test and the heart rate determined during the first, second or third minute of recovery (HRR1, HRR2, HRR3, respectively). HRR1 and HRR2 are widely used and validated through numerous studies as the adequate method for the interpretation of the autonomic balance (3, 14 - 16). Other method of heart rate recovery analysis includes the construction of HRR curve, using mathematical functions, such as exponential disintegration. The first order exponential curve represents an adequate parameter for displaying the dynamic changes in heart rate during recovery, but the complexity and time required for its development and interpretation, as well as the lack of validation through epidemiological studies, gives the priority to the HRR1 and HRR2 in the everyday clinical use (8, 17).

In the literature, there are different ways to interpret the value of HRR. In some studies, the HRR is presented as a continuous variable, while in others, subjects are allocated within the tertiles and quartiles based on the value of HRR (1,3,18). Within the epidemiological and clinical aspect, it is most important to define the value of HRR, that will indicate whether a subject is in a life-threatening condition or not. For HRR1, it is defined, that values lower than 12 min^{-1} and even lower than 17 min^{-1} represent the pathological finding, pointing to an imbalance of the autonomic nervous system. The degree of deviation of HRR1 value from the predefined cut off, is directly related to the frequency of adverse outcomes (8, 17).

Significantly higher values of heart rate recovery are observed in the population of elite athletes, compared to the general population (19, 20). The recovery of the heart rate is initially (during the first minute of the recovery) predominately conditioned by the activation of the parasympathetic part of the autonomic nervous system. Population of elite athletes is characterized with higher parasympathetic tone, so it is expected to find faster heart rate recovery in this population in comparison to the general population (1 - 3). However, in the population of elite athletes, we can observe significant differences in the heart rate recovery, caused by the type of physical activity performed by subjects. Elite athletes engaged with physical activity characterized by high dynamic component (cross-country skiing, marathon, basketball, cycling, etc.) express an increased parasympathetic tone and significantly higher values of HRR1 compared to the athletes engaged with physical activity, characterized by low dynamic component (gymnastics, martial arts, golf,

etc.). The most supportive hypothesis is that increased parasympathetic tone expresses a protective effect on the cardiovascular system, causing higher survival rate in the population of elite athletes (21). However, further investigation of this hypothesis is quite necessary.

Conclusion

Evaluation of HRR1 and HRR2 is a routine part of the cardiopulmonary exercise test. These parameters could

be easily measured and they provide valuable information about the balance and dynamic of the autonomic nervous system. Depending on the needs of the study, researchers can present these values as continuous variables or within adequate percentile groups. It is necessary to deal with the standardization of the methodology (protocol of the cardiopulmonary exercise test and recovery protocol after the session of the physical activity), so the results obtained in different studies could be compared with each other.

References

- Lahiri MK, Kannankeril PJ, Goldberger JJ. Assessment of autonomic function in cardiovascular disease: physiological basis and prognostic implications. *J Am Coll Cardiol*. 2008 May 6; 51(18):1725-33.
- Lamberts RP, Swart J, Capostagno B, Noakes TD, Lambert MI. Heart rate recovery as a guide to monitor fatigue and predict changes in performance parameters. *Scand J Med Sci Sports*. 2010 Jun; 20(3):449-57.
- Suzic L, Lazic J, Dekleva M, Soldatovic I, Leischik R, Suzic S, Radovanovic D, et al. Heart rate recovery in elite athletes: the impact of age and exercise capacity. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2015 Jul 4. doi: 10.1111/cpf.12271. [Epub ahead of print]
- Cole CR, Foody JM, Blackstone EH, Lauer MS. Heart rate recovery after submaximal exercise testing as a predictor of mortality in a cardiovascularly healthy cohort. *Ann Intern Med*. 2000; 132:552-5.
- Goldberger JJ, Le FK, Lahiri M, Kannankeril PJ, Ng J, Kadish AH. Assessment of parasympathetic reactivation after exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jun; 290(6):H2446-52.
- Jouven X, Empana JP, Schwartz PJ, Desnos M, Courbon D, Ducimetiere P. Heart rate profile during exercise as a predictor of sudden death. *New Engl J Med*. 2005; 352: 1951-1958.
- Bosquet L, Gamelin FX, Berthoin S. Reliability of postexercise heart rate recovery. *Int J Sports Med*. 2008 Mar; 29(3):238-43.
- Adabag S, Pierpont GL. Exercise heart rate recovery: analysis of methods and call for standards. *Heart*. 2013; 99(23):1711-2.
- Maeder MT, Ammann P, Rickli H, Brunner-La Rocca HP. Impact of the exercise mode on heart rate recovery after maximal exercise. *Eur J Appl Physiol*. 2009; 105: 247-55.
- Ranadive SM, Fahs CA, Yan H, Rossow LM, Agiovlasitis S, Fernhall B. Heart rate recovery following maximal arm and leg-ergometry. *Clin Auton Res*. 2011; 21:117-20.
- Shizukuda Y, Tripodi DJ, Smith KP, Arena R, Waclawiw MA, Rosing DR. Can we use heart rate recovery information generated by supine ergometry exercise? *Am J Cardiol*. 2006; 98:1297-8.
- Barak OF, Ovcin ZB, Jakovljevic DjJ, Lozanov-Crvenkovic Z, Brodie DA, Grujic NG. Heart Rate Recovery after Submaximal Exercise in Four Different Recovery Protocols in Male Athletes and Non-Athletes. *J Sports Sci Med*. 2011 Jun; 10(2): 369-375.
- Pierpont GL. Effect of exercise protocol ('warm-up') on post exercise heart rate recovery. *J Exerc Physiol Online/Am Soc Exerc Physiologist*. 2008; 11:38-44.
- Lipinski MJ, Vetrovec GW, Froelicher VF. Importance of the first two minutes of heart rate recovery after exercise treadmill testing in predicting mortality and the presence of coronary artery disease in men. *Am J Cardiol*. 2004; 93:445-9.
- Gorelik DD, Hadley D, Myers J, Froelicher V. Is there a better way to predict death using heart rate recovery? *Clin Cardiol*. 2006; 29:399-404.
- Tulumen E, Khalilayeva I, Aytemir K, Erqun Baris Kaya FE, Sinan Dveci O, Aksoy H, et al. The reproducibility of heart rate recovery after treadmill exercise test. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2011; 16:365-72.
- Pierpont GL, Stolpman DR, Gornick CC. Heart rate recovery post-exercise as an index of parasympathetic activity. *J Auton Nerv Syst*. 2000; 80:169-74.
- Vicente-Campos D, Martín López A, Nuñez MJ, López Chicharro J. Heart rate recovery normality data recorded in response to a maximal exercise test in physically active men. *Eur J Appl Physiol*. 2014 Jun; 114(6):1123-8.
- Imai K, Sato H, Hori M, Kusuoka H, Ozaki H, Yokoyama H, et al. Vagally mediated heart rate recovery after exercise is accelerated in athletes but blunted in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 1994; 24:1529-1535.
- Otsuki T, Maeda S, Iemitsu M, Saito Y, Tanimura Y, Sugawara J, et al. Postexercise heart rate recovery accelerates in strength-trained athletes. *Med Sci Sports Exerc*. 2007; 39(2):365-70.
- Nagashima J, Matsumoto N, Takagi A, Musha H, Chikaraishi K, Sagehashi M, et al. Dynamic component of sports is an important determinant factor of heart rate recovery. *J Cardiol*. 2011 Sep; 58(2):191-6.

The most common cause of sudden cardiac death in athletes

Najčešći uzročnici iznenadne srčane smrti kod sportista

Nikola Topalović¹, Sanja Mazić^{1,2}

¹ Institute of Medical Physiology "Rihard Burjan", Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

² Department of Sport Medicine, Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

Contact: topalovic21@yahoo.com

Sažetak

Pozitivan uticaj vežbanja na zdravlje kardiovaskularnog sistema dobro je poznat. Sportisti, koji su stalno fizički aktivni, smatraju se najzdravijim pripadnicima našeg društva, pa njihova iznenadna smrt tokom treninga ili takmičenja privlači pažnju celokupne javnosti. Retki, tragični događaji iznenadne srčane smrti (ISS) razlog su za postavljanje pitanja da li pored višestrukih pozitivnih postoje i negativni uticaji fizičkog vežbanja. Prvi slučaj ISS zabeležen je davne 490. godine p.n.e., kada je grčki vojnik Fidipid umro pošto je preneo vest o velikoj pobedi Grka nad Persijancima. Opasnost od ISS prepoznat je sredinom dvadesetog veka, a na našim prostorima je o ovoj temi počelo da se raspravlja nakon svetskog prvenstva u košarci, održanog u Ljubljani 1970. godine i iznenadne smrti reprezentativca Trajka Rajkovića. Jedan od važnijih ciljeva moderne sportske medicine je da se rizik od ISS kod sportista smanji na "neizbežnu retkost". Pod ISS može da se svrsta svaka neočekivana smrt uzrokovana iznenadnim zastojem rada srca. Pedo (*Pedoe*) je sve uzroke ISS u sportu podelio u tri kategorije:

- 1) potres srca (*commotio cordis*), koji nastaje tupim udarom u grudni koš sportiste, s posledičnim fatalnim poremećajem srčanog ritma;
- 2) ISS kod sportista mlađih od 35 godina zbog strukturne, urođene ili zapaljenjske bolesti srca u koje spadaju hipertrofična kardiomiopatija (najznačajniji uzročnik iznenadne srčane smrti), kongenitalne anomalije koronarnih arterija, aritmogena kardiomiopatija desne komore, miokarditis i druge; i
- 3) ISS kod sportista starijih od 35 godina koja najčešće nastaje zbog bolesti koronarnih arterija (dominantan rizik kod maratonaca i polumaratonaca).

Ključne reči: iznenadna srčana smrt, fizička aktivnost, sportisti, hipertrofična kardiomiopatija

Abstract

The positive impact of exercise on cardiovascular health is well known. Athletes, who are constantly physically active, are considered to be the healthiest members of our society. That is why their sudden death, during the training or competition, attracts the attention of the general public. Rarely, tragic events of sudden cardiac death (SCD) are the reason for questioning if by many positive there are also negative impact of physical exercise. The first case of SCD is recorded as far back as the year 490 BC, when the Greek soldier Pheidippides died after he conveyed news of the great victory of the Greeks over the Persians. Risk of SCD is recognized in the middle of the twentieth century. In our region, discussion about this issue began after the World Basketball Championship, which was held in Ljubljana in 1970, because of the sudden death of the national team member Trajko Rajkovic. One of the important goals of modern sports medicine is to reduce the risk of SCD in athletes to "inevitable rarity". Definition of SCD is considered to be any unexpected death due to sudden cardiac arrest. Pedo (*Pedoe*) has divided all causes of SCD in the sport into three categories:

- 1) Commotio cordis (agitation of the heart), which results from blunt impact to the athletes chest with consequent fatal disorder of heart rhythm;
- 2) SCD of athletes under the age of 35 because of structural, congenital and inflammatory heart disease, which includes hypertrophic cardiomyopathy as the most important cause of sudden cardiac death, congenital anomalies of the coronary arteries, arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, myocarditis and other;
- 3) SCD of athletes older than 35 years which is most common due coronary artery disease – atherosclerosis (the dominant risk in the marathon and half-marathon).

Key words: sudden cardiac death, physical activity, athletes, hypertrophic cardiomyopathy

Introduction

The positive impact of exercise on cardiovascular health is well known. Athletes, who are constantly physically active, are considered to be the healthiest members of our society. That is why their sudden death, during the training or competition, attracts the attention of the general public. Rarely, tragic events of sudden cardiac death (SCD) are the reason for questioning if by many positive there are also negative impact of physical exercise. The first case of SCD is recorded as far back as the year 490 BC, when the Greek soldier Philippides died after he conveyed news of the great victory of the Greeks over the Persians. Risk of SCD is recognized in the middle of the twentieth century. In our region, discussion about this issue began after the World Basketball Championship, which was held in Ljubljana in 1970, because of the sudden death of the national team member Trajko Rajkovic. Definition of SCD is considered to be any unexpected death due to sudden cardiac arrest (1). SCD is characterized by abrupt loss of consciousness within one hour of the occurrence of acute symptoms, with previous heart disease may exist but does not have to be necessarily the direct cause of death (1).

Epidemiology of SCD

Epidemiology and prevention of sudden cardiac death (SCD) of athletes is still a subject of a constant debate. Rarely, tragic events of sudden cardiac death (SCD) are the reason for questioning if by many positive there are also negative impact of physical exercise. So one of the important goals of modern sports medicine is to reduce the risk of SCD in athletes to "inevitable rarity". For individuals over 35 years, the undisputable reason of SCD is early onset of coronary arteries disease (CAD) (2,3,15). The incidence of SCD of younger (< 35 years old) athletes varies in different populations and is estimated at 0.5–4:100,000/year (2,4). Those large differences may be explained by diverse geographic prevalence of diseases leading to SCD of athletes but also by the methodology of registries. Cardiac societies have recently expressed concern about the quality of available data and addressed the need for large (international) registries (5). All available registries show that SCD is much more possible with male athletes (80–95% of all cases) (6). The other known risk factors of SCD are age and Afro-Caribbean origin (4,6). The most probable explanation of racial differences is the higher prevalence of hypertrophic cardiomyopathy (HCM) of Afro-Caribbean people (6). Age is strongly related with the development of CAD. When it comes to women athletes, SCD occurs nine times less compared to men. The literature cited following reasons: a small num-

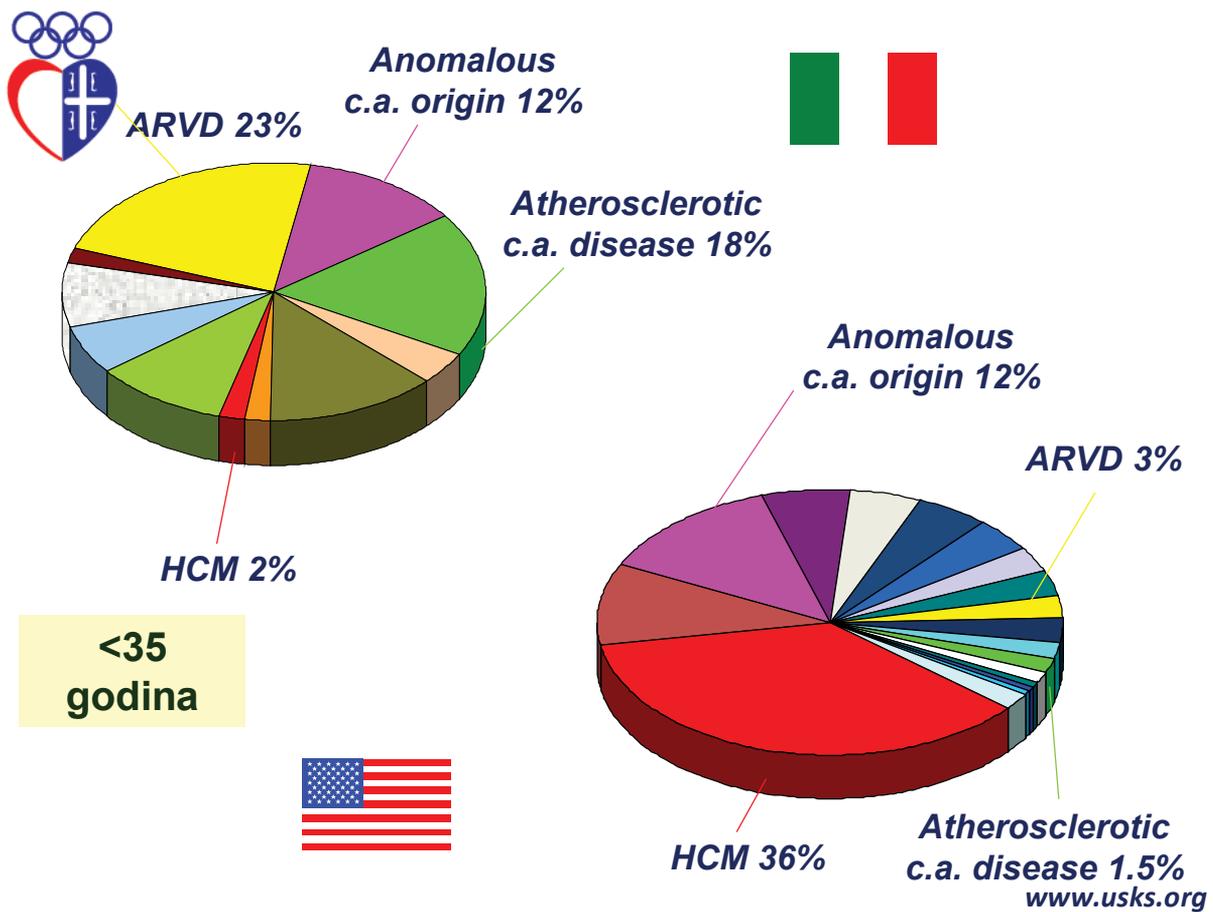
ber of women active in sports, a better adaptation of the cardiovascular system, the protective role of female sex hormones, less stressful demands in the competition as well as less frequent diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy among women in the overall population (7).

Etiology of SCD

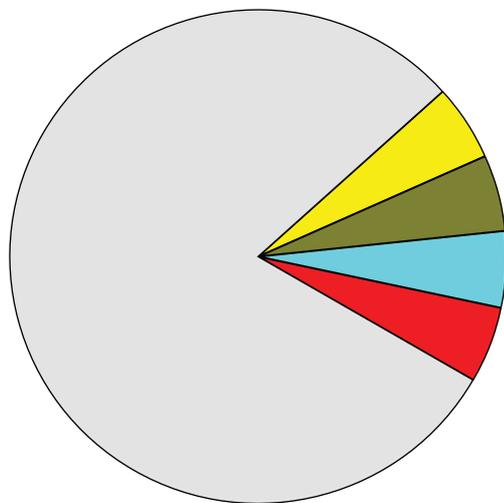
There are many causes of sudden cardiac death. Pedo (Pedoe) (8) shared all causes of SCD in the sport into three categories:

- 1) commotio cordis (agitation of the heart), which results from blunt impact to the athletes chest with consequent fatal disorder of heart rhythm;
- 2) SCD of athletes under the age of 35 because of structural, congenital and inflammatory heart disease, which includes hypertrophic cardiomyopathy as the most important cause of sudden cardiac death, congenital anomalies of the coronary arteries, arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, myocarditis and other; and
- 3) SCD of athletes older than 35 years which is most common due coronary artery disease (atherosclerosis), (the dominant risk in the marathon and half-marathon).

It is interesting that there is great heterogeneity in geographical terms of the most common causes of SCD. Due to the high percentage of American athletes with African origins, the HCM was and still is cited as the single most important cause of SCD, according to the largest registries from the United States (9). On the contrary, in the registry from Germany published in 2015, HCM was identified as a reason in only 5% of athletes. The most common cause of death of athletes under the age of 35 was myocarditis (10). In Italy, that was arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (23). Irrespective of the actual primary cause, the direct reason for cardiac arrest of athletes (both under and over 35 years) is ventricular arrhythmia. Therefore, widespread knowledge about basic life support and accessibility of automated external defibrillators is crucial, especially in athletic mass events. The French registry from 2011 showed that those two factors were most important in predicting the survival of SCD during exercise in the general population (11).



Picture 1. The most common cause of sudden cardiac death in athletes under the age of 35 in Italy and USA



- Coronary artery disease
- Left ventricular hypertrophy
- Mitral valve prolapse
- Unknown
- Acquired valve diseases

Picture 2. The most common cause of sudden cardiac death in athletes older than 35 years

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)

Hypertrophic cardiomyopathy represents a broad group of structural heart disease. It is the most common cause of sudden cardiac death in young athletes in America (4, 6). Inherited in an autosomal dominant, characterized by a high degree of penetrance genes, it is characterized by a distinct genetic heterogeneity, with more than 400 different mutations in any of the 11 different genes encoding protein synthesis sarcomeres (12). The most common mutations are in the genes in the chromosome number 14, which codes for the beta-myosin heavy chain (30%), followed by mutations in chromosomes number 1 for the cardiac troponin T (15-20%) and 11 for myosin binding protein C (10-15%), together with 15 for tropomyosin alpha (2-5%) (12, 13). The consequence of defective synthesis of these proteins is hypo-functional sarcomere with reduced power and speed of contraction, which leads to compensatory hypertrophy and proliferation of fibroblasts (13). Asymmetric hypertrophy of the heart, with a marked thickening of the left ventricular wall (15-50 mm; normally up to 13 mm) and hypertrophy of the inter-ventricular septum is characteristic of this disease (14). At the same time, there is no compensatory dilation of the ventricular cavity and a filling chamber is reduced in diastole. Dynam-

ic obstruction of the left ventricular HCM gives no clinical symptoms. Symptoms that suggest heart disease were described in only 20% of deaths of athletes with HCM, who were diagnosed with SCD. In most studies, the most common causes of SCD cited persistent ventricular tachycardia and ventricular fibrillation. Impaired cell structure, myocardial ischemia with the formation of scar tissue and interstitial proliferation of fibrous tissue are arrhythmogenic substrate for electrical instability of the myocardium (13). During clinical examination a person may be suspected HCM. Irregular pulse can be felt on the carotid artery and precordial auscultation can detect a strong aortic systolic murmur over the estuary, whose intensity increases during exercise (13). The best clinical diagnosis of HCM is a two-dimensional echocardiography. Diagnosis can be complemented by Holter ECG, which revealed abnormal findings in 75-95% of cases. Typical Holter ECG findings are: wide Q-wave, which indicates hypertrophy of the septum, negative T-wave, a sign of myocardial ischemia and increased QRS complex voltage (16).

Congenital anomalies of the coronary arteries (CACA)

Congenital anomalies of the coronary arteries (CACA), according to frequency, is the second most common cause of SCD of young athletes, after hypertrophic cardiomyopathy (17). The most common abnormality is the one of the left main coronary artery that comes out of the right sinus of Valsalva under brisk angle (17-19%) and passes between the confluence of the aorta and pulmonary artery (17). Other anomalies described in the literature are: abnormalities of the left coronary artery originating from a pulmonary artery, hypo plastic coronary arteries, congenital agenesis of the right coronary artery and the right coronary artery anomalies that start from the left sinus of Valsalva (17). During the physical activity myocardial hypo perfusion happens, due to the inability of the coronary arteries to adapt and provide adequate oxygenation of the myocardium. The symptoms of myocardial ischemia occur in one third of the athletes, and are more common with people with the right coronary artery anomalies. Ischemic changes, which indicate CACA (elevation and ST-segment depression, a wide Q-wave and T-wave inversion) are rarely detected by ECG, even with the athletes with symptoms (16-17).

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)

Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC) is a rare heart muscle disease, characterized by a

progressive myocardial dystrophy with fibro-fatty replacement (18). It is a genetically determined cardiomyopathy caused by heterozygous, or compound heterozygous mutations in genes, mostly encoding proteins of the desmosome complex (about 50 % of probands). Fatty infiltration leads to pseudo hypertrophy of myocardial wall, while he is thinned and weakened in the areas of fibrosis (18, 19). ARVC is clinically manifested tachyarrhythmia in chambers and hemodynamic disorders due to dysfunction of ventricular. The first symptoms usually manifest between 15 and 35 years and can range from a feeling of irregular and rapid heart rate, through weakness, fatigue and syncope (18, 19). Changes in ECG with most people showing left bundle branch block, negative T-wave and enlarged QRS complex on account of the extended S-wave in leads V1-V3. Typical but yet rare is the finding of the Y-wave at the end of the QRS complex (19).

Myocarditis

Acute myocarditis is a rare but potentially dangerous disease, usually caused by viruses (in more than half of the cases by Coxsackie B virus, adenovirus and herpes viruses) (20). Inflammation of the myocardium, lymphocyte infiltration and focal necrosis of tissue, which are determined on histopathological preparations, is a risk factor for electrical instability of the heart and the occurrence of arrhythmias (20). Usually, myocarditis is not accompanied by any symptoms, so SCD is the only manifestation of the disease. However, some patients may have evidence of viral infection, tachycardia, audible third heart sound, or gallop, an enlarged neck vein, peripheral edema and hepatomegaly, while on the chest X-ray observed cardiac enlargement (20). The most common abnormality in ECG seen in myocarditis is sinus tachycardia with non-specific ST segment and T wave changes (diffuse T wave inversion) (20). Physical activity during the acute phase of the disease leads to an increase in viral replication, pronounced myocardial necrosis and increased risk of SCD. That is why these athletes are prohibited to have any physical activity at least six months.

Comotio cordis

Comotio cordis is the sole cause of the SCD, which is not necessarily the result of congenital or acute heart disease (22). It occurs as a result of non-penetrative shock blunt projectile in the chest, or the collision of two bodies of athletes, without the injury of the ribs and heart (22). Low energy impact (with the exception of hockey puck) leads to the formation of ventricular arrhythmias if they occur during repolarization chamber in a sensitive period

of the cardiac cycle (21). In addition to the corresponding period of depolarization infarction, the occurrence of ventricular fibrillation are important and localization of stroke, force and speed of impact, as well as changes at the molecular level Na⁺ / K⁺ ATP-dependent channel (21). Although it rarely happens to the athletes, the danger of it is great, because death is almost instantaneous, and the mortality rate is higher than 90% (22).

Conclusion

Even though the subject of SCD has been present in medical literature for many years, there are many questions remaining, still unanswered. Even it's rare, SCD of young athletes is a tragic event that draws public attention and can be misinterpreted. They are worrying that the majority of athletes who died of SCD had no previous history of heart disease or early symptoms of disease before death. Therefore, the goal of sports medicine physicians in the future is better screening of all persons who engage in physical activity, in order to discover on time all the causes that can lead to sudden cardiac death, and to prevent it.

References

- Chandra N, Bastiaenen R, Papadakis M, Sharma S. Sudden cardiac death in young athletes: practical challenges and diagnostic dilemmas. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:1027-1040.
- Harmon KG, Drezner JA, Wilson MG, Sharma S. Incidence of sudden cardiac death in athletes: a state-of-the-art review. *Br J Sports Med* 2014;48:1185-1192.
- James J, Merghani A, Sharma S. Sudden death in Marathon runners. *Cardiac Electrophysiol Clin* 2013;5:43-51.
- Maron BJ, Doerer JJ, Haas TS, Tierney DM, Mueller FO. Sudden deaths in young competitive athletes: analysis of 1866 deaths in the United States, 1980-2006. *Circulation* 2009;119:1085-1092.
- Solberg EE, Borjesson M, Sharma S et al. Sudden cardiac arrest in sports: need for uniform registration: A Position Paper from the Sport Cardiology Section of the European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. *Eur J Prev Cardiol*, 2015.
- Maron BJ. Historical Perspectives on Sudden Deaths in Young Athletes With Evolution over 35 Years. *Am J Cardiol*. 2015;116(9): 1461-8.
- Berdowski J, De Beus MF, Blom M, Bardai A, Bots ML, Doevendans P, et al. Exercise-related out-of-hospital cardiac arrest in the general population: incidence and prognosis. *Eur Heart J* 2013;34:3616-3623.
- Pedoe DT. Sudden cardiac death in sport-spectre or preventable risk? *Br J Sport Med*. 2000; 34:137-40.
- Maron BJ, Haas TS, Murphy CJ et al. Incidence and causes of sudden death in U.S. college athletes. *J Am Coll Cardiol*, 2014; 63: 1636-1643.
- Bohm P, Scharhag J, Meyer T. Data from a nation wide registry on sports-related sudden cardiac deaths in Germany. *Eur J Prev Cardiol*, 2015.
- Marijon E, Tafflet M, Celermajer DS et al. Sports-related sudden death in the general population. *Circulation*, 2011; 124:672-681.
- Hipp AA, Heitkamp HC, Röcker K, Dickhuth HH. Hypertrophic cardiomyopathy – sports-related aspects of diagnosis, therapy, and sports eligibility. *Int J Sports Med*. 2014;25:20-6.
- Weissler-Snir A, Adler A, Williams L, Gruner C, Rakowski H. Prevention of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: bridging the gaps in knowledge.. *Eur Heart J*. 2016 Jul 1
- Oxborough D, Heemels A, Somauroo J, McClean G, Mistry P, Lord R, et al. Left and right ventricular longitudinal strain-volume/area relationships in elite athletes. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2016, in press.
- Chugh SS, Weiss JB. Sudden cardiac death in the older athlete.. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Feb 10;65(5):493-502.
- Brosnan M, La Gerche A, Kumar S, LoW, Kalman J, Prior D. Modest agreement in ECG interpretation limits the application of ECG screening in young athletes. *Heart Rhythm* 2015;12:130-6.
- Hill SF, Sheppard MN. A silent cause of sudden cardiac death especially in sport: congenital coronary artery anomalies. *Br J Sports Med*. 2014; 48: 1151-1156.
- Riele AS, Tandri H, Bluemke DA: Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC): cardiovascular magnetic resonance update. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2014;16: 50.
- Haugaa KH, Haland TF, Leren IS, Saberniak J, Edvardsen T. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, clinical manifestations, and diagnosis.. *Eurpace*. 2016 Jul;18(7):965-72.
- Pollack A, Kontorovich AR, Fuster V, Dec GW. Viral myocarditis--diagnosis, treatment options, and current controversies. *Nat Rev Cardiol*. 2015 Nov;12(11):670-80.
- Kumar K, Mandleywala SN, Gannon MP. Development of a Chest Wall Protector Effective in Preventing Sudden Cardiac Death by Chest Wall Impact (Commotio Cordis), *Clin J Sport Med*. 2016 Mar 24. In press.
- Vernuccio F, Grutta G, Fazio G. Sudden cardiac death in athletes: is it always not preventable? *Recent Prog Med*. 2014 Nov;105(11):410-4.
- Amati G, De Caterina R, Basso C. Sudden cardiac death in an Italian competitive athlete: Pre-participation screening and cardiovascular emergency care are both essential. *Int J Cardiol*. 2016 Mar 1;206:84-6.

Congenital long QT syndrome in children

Kongenitalni sindrom produženog QT intervala kod dece

Ivana Cerović¹, Jovan Košutić²

¹ Faculty of Medicine, University of Belgrade, Serbia

² Institute for Mother and Child Health Care of Serbia „Dr Vukan Čupić“

Apstrakt

Sindrom produženog QT intervala (engl. *long QT syndrome*, *LQTS*) je poremećaj repolarizacije komora miokarda koji se odlikuje produženjem QT intervala na elektrokardiogramu (EKG) i povećanim rizikom za nastanak ventrikularnih tahiaritmija i kardiogenih manifestacija. Može da bude stečeni ili kongenitalni, koji predstavlja skup kanalopatija usled mutacija u nekom od 15 do sada identifikovanih gena. Najčešći oblici kongenitalnog sindroma su LQT1, LQT2 i LQT3. Zbog produženja repolarizacije i, posledično, celog akcionog potencijala, stvaraju se uslovi za nastanak rane naknadne depolarizacije i izraženije transmuralne disperzije repolarizacije koje su, pojedinačno ili udruženo, osnova za nastanak *Torsades de pointes* ventrikularne tahikardije. Sindrom produženog QT intervala se klinički manifestuje palpitacijama, sinkopom, srčanim zastojem ili naprasnom srčanom smrću, a može da bude i asimptomatski. Provocirajući faktori za nastanak tegoba su specifični za određeni genotip. Ispitivanje LQTS obuhvata ličnu i porodičnu anamnezu sa naglaskom na karakteristične podatke (česte sinkope, iznenadna srčana smrt u porodici, nasledne aritmije), EKG u miru, test opterećenja i genetske analize, kao i druge dodatne metode (serijski EKG zapisi, 24h EKG holter, epinefrinski test). Za kliničko postavljanje dijagnoze koristi se Švarcov (Schwartz) skor, a kriterijumi za definitivno postavljanje dijagnoze zavise od Švarcovog skora, dužine QT intervala, postojanja mutacije i kliničke slike. Lečenje se zasniva na promeni životnih navika i terapiji β -blokatorima, a druge mogućnosti su ugradnja implantabilnog kardioverter-defibrilatora, permanentnog pejsmejkera ili hirurška simpatektomija. Sindrom produženog QT intervala je jedan od potencijalnih uzroka iznenadne srčane smrti koja čini 90% iznenadnih smrti mladih sportista. Kod dece sa LQTS preporuke za bavljenje sportom proizilaze iz preporuka za odrasle i podrazumevaju vrlo stroga ograničenja. Dalja istraživanja biće usmerena na bolje razumevanje genotip-fenotip korelacije kongenitalnih LQTS i očekuje se da će pružiti nove personalizovane terapijske mogućnosti i saznanja o ređim tipovima ovog sindroma, kao i jasnije preporuke za bavljenje fizičkom aktivnošću kod dece sa LQTS.

Ključne reči: sindrom produženog QT intervala, deca, genetika, fizička aktivnost

Abstract

Long QT syndrome (LQTS) is a cardiac repolarization disorder characterized by prolonged QT interval on the electrocardiogram (ECG) and increased propensity to ventricular tachyarrhythmias and cardiac events. LQTS might be acquired or congenital, which presents a group of channelopathies that occur due to mutation in one of 15 so far identified genes. The most frequent types of congenital LQTS are LQT1, LQT2 and LQT3. Prolonged or delayed repolarization leads to the increase of action potential duration which predisposes early afterdepolarization, as well as the amplification of transmural dispersion of repolarization, both contributing to the development of *Torsades de Pointes* ventricular tachycardia. Clinical manifestations of LQTS are palpitations, syncope, aborted cardiac arrest or sudden cardiac death, but it can also be asymptomatic. Trigger factors for symptoms are specific for certain genotype. LQTS examination includes thorough clinical and family history focused on distinctive data (repeated syncopes, cases of sudden cardiac death in the family, hereditary arrhythmias), resting ECG, exercise stress testing and genetic analysis, with additional methods (serial ECG records, 24h ECG Holter, epinephrine test). Clinical LQTS diagnosis is based on Schwartz's scoring system, while the criteria for final diagnosis of LQTS depend on Schwartz's score, QT interval duration, presence of pathogenic mutation and clinical symptoms. Treatment approach begins with lifestyle modifications and β -blockers therapy, while other options include implantable cardioverter-defibrillator, permanent pacemaker or surgical sympathectomy. Sudden cardiac death is the reason of 90% of sudden deaths in young athletes, while LQTS is one of its causes. Recommendations for physical activities in children with congenital LQTS arise from the ones for adults and they presume very strict limitations. Further researches are expected to advance the understanding of genotype-phenotype correlation of congenital LQTS and enable eventual genetically-guided personalized treatment, novel insight into rare LQTS types, as well as more precise recommendations for physical activity of LQTS children.

Key words: long QT syndrome, children, genetics, physical activity

Introduction

Long QT syndrome (LQTS) is a cardiac repolarization disorder characterized by prolonged QT interval on the electrocardiogram (ECG) and increased propensity to ventricular tachyarrhythmias (*Torsades de pointes* (TdP) tachycardia and ventricular fibrillation (VF)) (figure 1a). It can be asymptomatic or clinically manifested as palpitations, syncope, aborted cardiac arrest (ACA) or sudden cardiac death (SCD) (1). LQTS might be congenital or acquired, with potential causes including myocardial ischemia, cardiomyopathy, certain drug consumption (antiarrhythmics, antibiotics, antidepressives, antipsychotics, etc), hypokalemia or hypomagnesaemia (2). Congenital LQTS presents a group of monogenic, predominantly autosomal-dominant (A-D) channelopathies or other proteinopathies, denominated as LQT1-LQT15, according to 15 so far identified genes known to be associated with LQTS (table 1) (3). The estimated prevalence of 1:2000 subjects is supposed to be even greater on the behalf of subclinical forms, while about 50% of eventually symptomatic LQTS patients experience their first cardiac event by the age of 12 (4). Also, in 10% of cases of sudden infant death syndrome (SIDS) is proven a LQTS-gene mutation (5).

Genetic and molecular basis

In 75% of non-acquired LQTS is found a causal mutation (6), out of which 85% are inherited and the remaining occur *de novo* (7). The most common forms are LQT1, LQT2 and LQT3, constituting about 90% of genetically proven cases (1). These mutations cause alterations in specific ion channels which participate in action potential, leading to the delay of repolarization process.

LQT1, the most common form present in about 45% of genotyped patients, arises from the loss of function in KCNQ1 gene, which encodes α -subunit of the slow activating potassium channel, responsible for slow delayed rectifier potassium current (IKs) (7). LQT2, with frequency of 35-40%, stems due to mutation in KCNH2 gene, encoding the α -subunit of potassium channel responsible for rapid delayed rectifier potassium current (IKr) (7). There are two mechanisms mediating the reduction of repolarizing current and ensuing delayed repolarization in potassium channel mutations: 1) trafficking defect, when mutant subunits are not transported or incorporated properly in tetrameric channel; and 2) formation of defective channels, resulting in >50% reduction in channel current (8). On the other hand, LQT3 results from gain-of-function mutation in SCN5A gene which encodes rap-

Table 1. Congenital LQTS genes, affected proteins and ion currents (3).

LQTS type	Gene	Protein	Protein function	Current	Frequency (%)
LQT1	KCNQ1	Kv7.1	α -subunit IKs channel	↓ IKs	40–55
LQT2	KCNH2	Kv11.1	α -subunit IKr channel	↓ IKr	30–45
LQT3	SCN5A	Nav1.5	α -subunit INa channel	↑ INa	5–10
LQT4	ANKB	Ankyrin	Adaptor protein	↓ Coordination of Ncx, Na/K ATPase	Rare
LQT5	KCNE1	MinK	β -subunit IKs channel	↓ IKs	Rare
LQT6	KCNE2	MiRP1	β -subunit IKr channel	↓ IKr	Rare
LQT7	KCNJ2	Kir2.1	α -subunit IK1 channel	↓ IK1	Rare
LQT8	CACNA1C	Cav1.2	α -subunit ICaL channel	↑ ICa	Rare
LQT9	CAV3	Caveolin 3	Component of caveolae (co-localizes with Nav1.5)	↑ INa	Rare
LQT10	SCN4B	β 4-subunit	β -subunit INa channel	↑ INa	Very rare
LQT11	AKAP9	Yotao	Mediates Kv7.1 phosphorylation	↓ IKs	Very rare
LQT12	SNTA1	Syntrophin- α 1	Regulates INa channel function	↑ INa	Very rare
LQT13	KCNJ5	Kir3.4	Subunit KACH channel	↓ IK-ACh	Very rare
LQT14	CALM1	Calmodulin 1	Calmodulin	Dysfunctional Ca ²⁺ signaling	Rare
LQT15	CALM2	Calmodulin 2	Calmodulin	Dysfunctional Ca ²⁺ signaling	Rare

idly inactivating sodium channel, so the channel fails to close properly; continuous inward leakage of sodium ions prolongs plateau phase and therefore delays repolarization (8).

Mechanisms of ventricular tachyarrhythmias development

Ventricular myocardium is comprised of at least three electrophysiologically and functionally distinct cell types - epicardial, M and endocardial cells, which show electrical heterogeneity in the form of transmural dispersion of repolarization (TDR), under baseline conditions (9). Prolonged or delayed repolarization leads to the increase of action potential duration (APD) which, due to higher intracellular concentration of calcium, during phases 2 or 3 of action potential, predisposes early afterdepolarization (EAD) (10). Agents that prolong APD produce preferential prolongation of the M cell action potential than of the epicardial or endocardial cells, leading to the amplification of TDR (11). That creates a vulnerable window for the development of reentry phenomenon as well as EAD, both contributing to the development of TdP (figure 1b) (11). Depending on the duration, TdP can progress to ventricular fibrillation or cardiac arrest.

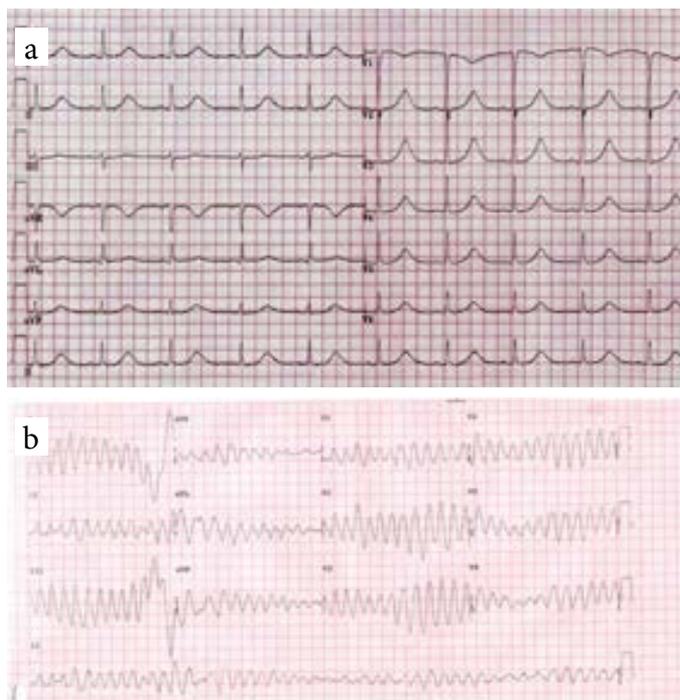


Figure 1. Representative ECG findings: a) prolonged QT interval; b) Torsades de pointes.

Clinical presentation

The most frequent symptoms of LQTS are palpitations and syncope. However, it can be an accidental ECG finding in an asymptomatic patient, while ACA or SCD as the first manifestation of the disease occur in 1-3% (3). Clinical presentation depends on inheritance pattern, genetic polymorphism, penetrance and modifier genes, as well as the age, gender, environmental factors and therapy (3).

Congenital LQTS can be phenotypically classified into four syndromes. The most common is A-D inherited Romano-Ward syndrome, which may result from a mutation in any of LQTS genes and it has the widest range of cardiac manifestations (7). Jervell and Lange-Nielsen (JLN) syndrome is a rare autosomal recessive (A-R) disease caused by homozygous mutation in *KCNQ1*, associated with congenital deafness and very severe form of LQTS (12). Andersen-Tawil syndrome, known as LQT7, is a rare A-D condition characterized by hypokalemic periodic paralysis, ventricular tachyarrhythmias and a variety of dysmorphic features (13). Timothy syndrome (LQT8) is the consequence of *CACNA1c* gene mutation, manifested with LQTS, facial dysmorphism, syndactylia and neurocognitive insufficiency (14).

Specific triggers are associated with certain LQTS types. Physical exertion, especially swimming, and emotional stress contribute to LQT1 symptoms, due to the lack of compensatory IKs increase in adrenergic stimulation (15). Possible explanations for the particular role of swimming include concomitant activation of sympathetic and parasympathetic autonomic system precipitating premature ventricular contractions, as well as QT interval prolongation due to cold-water face immersion, which both contribute to genetically caused IKs-deficiency (16). Most events in LQT2 and LQT3 are provoked by acute arousal/auditory stimulation or rest without arousal, respectively (17). Nevertheless, comorbidity of epilepsy with LQT2 due to *KCNH2* expression in brain makes their differential diagnosis very important for therapeutic approach (18).

Diagnostic methods and criteria for LQTS

The diagnostic process begins with a thorough clinical and family history, focused on distinctive data about palpitations, repeated syncopes and their circumstances, „seizures“ despite antiepileptic therapy, cases of SCD in the family or hereditary arrhythmias (7). Certain number of LQTS is revealed due to previous diagnosis of a family member.

Resting ECG with QT interval duration measurement remains crucial for the diagnosis. QT interval is usually corrected for heart rate using the Bazett's formula,

QTc=QT/√RR, expressed in milliseconds (ms), measured in leads II and V5/V6, with the longest value being used (18). Since there is no cut-off QTc value for LQTS, different authors give their references. According to the latest recommendations by the American College of Cardiology, the American Heart Association and the Heart Rhythm Society (AHA/ACCF/HRS) from 2009, prolonged QTc is considered ≥450ms for adult male and ≥460ms for adult female (19), while another study suggests borderline QTc≥470ms for adult female and ≥460ms for children under the age of 15 (table 2) (20). However, single ECG assessment could not be reliable, since 2.5% of healthy population may have a mildly prolonged QT interval and 25% of genotype-positive LQTS patients have normal QT interval, especially LQT1 (21). Besides, T wave morphology may help differentiate diverse types of LQTS (22). Usual ECG findings in fetal and neonatal LQTS are bradycardia and atrioventricular block (23).

Table 2. Suggested Bazett-corrected QTc values for diagnosing QT prolongation [ms] (19).

Rating	1–15 years	Adult male	Adult female
Normal	<440	<430	<450
Borderline	440–460	430–450	450–470
Prolonged	460	450	470

Exercise stress testing (EST) may help identifying abnormal QT prolongation during exercise or in the recovery, as well as the level of physical activity allowed to patients with LQTS. Pediatric population is characterized by more gradual deceleration in heart rate in recovery phase compared to the adults (24). The same study indicates that prolonged QT interval at peak exercise, in early (1-min) and late (7-min) recovery phase occurs in LQT1, while initial shortening and afterwards prolongation of QT interval in late recovery phase suggest LQT2 (24). QTc threshold value of ≥460ms in late recovery phase in children strongly refers to the LQTS and greater separation in the QTc intervals between the late and early recovery phases favors the diagnosis of LQT2 (24).

Additional diagnostic methods include serial ECG records, 24h ECG Holter and epinephrine test (8). Moreover, genetic analysis, which can confirm approximately 75% of phenotypically expressed LQTS, still remains to be widely established for clinical use (25). Negative genetic test does not exclude the diagnosis, whereas positive result may influence treatment decisions.

Considering the diagnostic adversity, *Schwartz et al* defined the scoring system (last revision in 2011), which assign points for ECG findings, clinical and family history (table 3) (26). Patients with Schwartz score ≥3.5, in the absence of secondary cause for QT prolongation, are di-

agnosed as LQTS (26). Although it would miss the latent LQTS patients, this system presents the basis of clinical LQTS diagnosing.

Table 3. Schwartz Score for LQTS diagnosis (updated in 2011) (25).

	Points
ECG findings	
QTc	
>480 ms	3
460–470 ms	2
450 (male) ms	1
4-min recovery QTc after exercise test ≥480 ms	1
Torsades de pointes	2
T-wave alternans	1
Notched T wave in 3 leads	1
Low heart rate for age	0.5
Clinical history	
Syncope	
With stress	2
Without stress	1
Congenital deafness	0.5
Family history	
Family members with definite LQTS	1
Unexplained sudden cardiac death <age 30 among immediate family members	0.5

QTc is calculated by Bazett’s formula. Low heart rate for age means resting heart rate below the 2nd percentile for age.

Expert consensus published in 2013 defined criteria for the diagnosis of LQTS, which include: 1) Schwartz’s score ≥ 3.5 in the absence of a secondary cause for QT prolongation; 2) presence of pathogenic mutation in one of the LQTS genes; 3) QTc ≥ 500 ms in repeated 12-lead ECG in the absence of a secondary cause for QT prolongation; 4) QTc between 480 and 499 ms in repeated 12-lead ECGs in a patient with unexplained syncope, in the absence of a secondary cause for QT prolongation and pathogenic mutation (27).

Risk stratification

Risk assessment for a life-threatening cardiac event has the main role in the treatment planning. Higher risk of cardiac manifestations have boys under the age of 15 with LQT1, while for LQT2 and LQT3 in that age the risk is equal for both genders (28). Over 15 years old females are at higher risk in LQT1 and LQT2, and possible explanation for this sex distribution lies in sex hormones, inhibitory effect of estrogen on IKr and stimulatory effect of testosterone on IKs, with ensuing prolongation and shortening of APD, respectively (29). Furthermore, LQT3 patients have lower incidence of any type of cardiac event,



CPR - cardiopulmonary resuscitation.
TdP - Torsades de Pointes

Figure 2. Suggested risk stratification scheme for aborted cardiac arrest or sudden cardiac death in LQTS patients(30).

but followed with much higher lethality (3). Baseline QTc ≥ 500 ms is an independent risk factor (19). The history of syncope and their frequency is one of the most powerful predictors of subsequent serious cardiac events in adolescents (30). Considering all the facts, LQTS risk groups for life-threatening cardiac event may be categorized as high, intermediate and low (figure 2) (31). However, since the phenotypic expression is time-dependent and age specific, it requires continuous risk assessment in affected patients.

Therapeutic consideration

As previously mentioned, treatment approach relays on risk assessment and it might be complex. The initial phase involves lifestyle modifications - avoiding competitive sport and extreme exertion, for LQT1 patients even non-competitive swimming (31); prompt electrolyte disorder corrections in diarrhea or vomiting; avoidance of medications known to prolong the QT interval (7). For patients with LQT2 is recommended preclusion of acoustic stimulation, such as alarm clock (17).

The first-line medical therapy involves β -blockers. They are presumed to act indirectly, through attenuation of cardiovascular adrenergic tone (7). The most effective have shown to be propranolol (2-4mg/kg/day) and nadolol (1-1.5 mg/kg/day) (32). Widely used in LQT1 and LQT2, lately has been indicated protective role of β -blockers in LQT3 (33). They should be administered to all intermediate and high risk patients and according to some authors even to low-risk individuals (8). Possible adjunctive therapy might be oral K⁺ supplementation, especially in LQT2 patients, whereas mexiletine and ranolazine effects for

LQT3 patients are still estimated in trials (34). However, in patients with repetitive cardiac events, a more invasive therapy should be considered.

Implantable cardioverterdefibrillator (ICD) is indicated for high-risk patients, post-cardiac arrest cases or those with numerous arrhythmic syncopal episodes who remain symptomatic despite β -blocker therapy, intolerance or contraindication for β -blockers, as well as JLN patients (27).

Left cervicothoracic sympathetic denervation (LCSD) is a surgical procedure of heart denervation by resection of left stellate ganglion and T2-T4 thoracic ganglia, introduced as treatment option even before medications (35). It is currently used for patients intolerant or irresponsive to β -blockers, patients in whom ICD implantation is unfeasible or who receive multiple ICD shocks (7).

Permanent pacemaker implantation is the last possible therapeutic option, combined with β -blocker therapy in patients with sinus bradycardia or pause-dependent TdP, but long-term follow-up studies still indicate an inappropriately high rate of SCD afterwards (36). Recent reports analyze focal radiofrequency ablation and gene-specific LQTS therapies as prospective therapeutic alternatives which appear to be promising.

Recommendation for sport participation for children with LQTS

It is proven in over 90% cases that cardiovascular diseases are the most important cause of sudden death in young athletes (37). Furthermore, incidence of SCD in young athletes is 2.5 times higher than the average rate of SCD (38). LQTS contributes with 2% in sudden cardiac death of young athletes in European population (38).

There are no official recommendations for physical activities in children with congenital LQTS, so they arise from the ones for adults. Cut-off values for prolonged QTc in athletes are >470 ms for men and >480 ms for women (39). The latest Bethesda recommendations for individuals with LQTS are: 1) for patients who experienced cardiac arrest or LQTS-precipitated syncopal episode are allowed only sports with low static and low dynamic intensity (class IA); 2) activities for asymptomatic patients with baseline QT prolongation should be restricted to class IA sport, except for genetically proven LQT3; 3) genotype-positive/phenotype-negative patient may be allowed to participate in competitive sports, except swimming for LQT1; 4) LQTS patients with an ICD/pacemaker should be restricted to class IA activities (table 4) (39). Considering such strict limitations, *Aziz et al* examined the consequences of neglecting the official recommendations and have not proven any cardiac event in LQTS children who

Table 4. Classification of sports (36).

	A. Low dynamic	B. Moderate dynamic	C. High dynamic
I Low static	Bowling Cricket Golf Riflery	Fencing Table tennis Tennis (doubles) Volleyball Baseball ^a /softball ^a Field events (jumping) Figure skating ^a	Badminton Race walking Running (marathon) Cross-country skiing (classic) Squash ^a Basketball ^a Biathlon
II Moderate static	Auto racing ^{a,b} Diving ^b Equestrian ^{a,b} Motorcycling ^{a,b} Gymnastics ^a Karate/Judo ^a Sailing Archering	Lacrosse ^a Running (sprint)	Ice hockey ^a Field hockey ^a Rugby ^a Soccer ^a Cross-country skiing(skating) Running (mid/long) Swimming Tennis (single) Team handball ^a Boxing ^a
III High static	Bobsledding ^{a,b} Field events (throwing) Luge ^{a,b} Rock climbing ^{a,b} Waterskiing ^{a,b} Weight lifting ^a Windsurfing ^{a,b}	Body building ^a Downhill skiing ^{a,b} Wrestling ^a Snow boarding ^{a,b}	Canoeing, Kayaking Cycling ^{a,b} Decathlon Rowing Speed skating Triathlon ^{a,b}

a - danger of bodily collision; b - increased risk if syncope occurs

were on beta-blocker therapy or with implanted ICD (40). These results suggest that the initial limitations might be too harsh, which implicates the need for further analysis.

Conclusion

Previous investigations of LQTS have broadened our knowledge, but have also raised many questions about the pathogenesis, diagnosis and treatment of these syndromes. Further genetic researches are expected to advance the understanding of genotype-phenotype correlation, provide novel insight into rare LQTS types and enable eventual genetically-guided personalized treatment in future. The relation between physical activity and LQTS manifestations is widely proven, since the first phase of LQTS treatment is avoiding competitive sport . Considering the differences among LQTS types, it is reasonable to presume more precise recommendations for physical activity of LQTS children.

References:

- Amin AS, Pinto YM, Wilde AA. Long QT syndrome: beyond the causal mutation. *J Physiol.* 2013 Sept; 591(17):4125-39.
- Kallergis EM, Goudis CA, Simantirakis EN, Kochiadakis GE, Vardas PE. Mechanisms, risk factors, and management of acquired long QT syndrome: a comprehensive review. *Scientific World Journal.* 2012;2012:212178
- Mizusawa Y, Horie M, Wilde AA. Genetic and clinical advances in congenital long QT syndrome. *Circ J.* 2014 Dec; 78(12):2827-33.
- Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L, Pedrazzini M, Besana A, Bosi G et al. Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation.* 2009 Nov; 120:1761-7.
- Arnestad M, Crotti L, Rognum TO, Insolia R, Pedrazzini M, Ferrandi C et al. Prevalence of long-QT syndrome gene variants in sudden infant death syndrome. *Circulation.* 2007 Jan; 115:361-7.
- Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Effect of clinical phenotype on yield of long QT syndrome genetic testing. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Feb; 47:764-8.
- Brenyo AJ, Huang DT, Aktas MK. Congenital long and short QT syndromes. *Cardiology.* 2012 April; 122(4):237-47.
- Goldenberg I, Moss AJ. Long QT Syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2008 June; 51(24):2291-300.
- Antzelevitch C, Shimizu W, Yan GX, Sicouri S, Weissenburger J, Nest-erenko VV et al. The M cell: its contribution to the ECG and to normal and abnormal electrical function of the heart. *J Cardiovasc Electro-physiol.* 1999 Aug; 10:1124-52.
- Amin AS, Asghari-Roodsari A, Tan HL. Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch.* 2010 Jul; 460:223-37.
- Antzelevitch C. The Role of Spatial Dispersion of Repolarization in Inherited and Acquired Sudden Cardiac Death Syndromes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Oct; 293(4):2024-38.
- Schwartz PJ, Spazzolini C, Crotti L, Bathen J, Amlie JP, Timothy K et al. The Jervell and Lange-Nielsen syndrome: natural history, molecular basis, and clinical outcome. *Circulation.* 2006 Feb; 113: 783-90.
- Sansone V, Tawil R. Management and treatment of Andersen-Tawil syndrome (ATS). *Neurotherapeutics.* 2007 Apr; 4:233-7.
- Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R et al. Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell.* 2004 Oct 1; 119(1):19-31.

15. Wu J, Naiki N, Ding WG, Ohno S, Kato K, Zang W-J et al. A molecular mechanism for adrenergic-induced long QT syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2014 March; 63(8):819-27.
16. Choi G, Kopplin LJ, Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. Spectrum and frequency of cardiac channel defects in swimming-triggered arrhythmia syndromes. *Circulation*. 2004 Oct; 110(15):2119-24.
17. Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C et al. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation*. 2001 Jan; 103:89-95.
18. Johnson JN, Hofman N, Haglund CM, Cascino GD, Wilde AA, Ackerman MJ. Identification of a possible pathogenic link between congenital long QT syndrome and epilepsy. *Neurology*. 2009 Jan; 72:224 - 231.
19. Rautaharju PM, Surawicz B, Gettes LS, Bailey JJ, Childers R, Deal BJ et al. AHA/ACCF/HRS recommendations for the standardization and interpretation of the electrocardiogram. Part IV: the ST segment, T and U waves, and the QT interval. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Mar; 53(11):982-91.
20. Goldenberg I, Moss AJ, Zareba W. QT interval: how to measure it and what is "normal." *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2006 Mar; 17:333-6.
21. Goldenberg I, Horr S, Moss AJ, Lopes CM, Barsheshet A, McNitt S et al. Risk for life-threatening cardiac events in patients with genotype-confirmed long-QT syndrome and normal-range corrected QT intervals. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Jan; 57:51-9.
22. Moss AJ, Zareba W, Benhorin J, Locati EH, Hall WJ, Robinson JL et al. ECG T-wave patterns in genetically distinct forms of the hereditary long QT syndrome. *Circulation*. 1995 Nov; 92:2929-34.
23. Sumitomo N. Clinical Features of Long QT Syndrome in Children. *Circ J*. 2016 Feb; 80(3):598-600.
24. Aziz PF, Wieand TS, Ganley J, Henderson J, Patel AR, Iyer VR et al. Genotype- and mutation site-specific QT adaptation during exercise, recovery, and postural changes in children with long-QT syndrome. *J Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2011 Dec; 4(6):867-73.
25. Tester DJ, Ackerman MJ. Genetics of long QT syndrome. *Methodist Debaque Cardiovasc J*. 2014 Jan-Mar; 10(1):29-33.
26. Schwartz PJ, Crotti L, Insolia R. Long-QT syndrome: from genetics to management. *CircArrhythmElectrophysiol*. 2012 Aug; 5(4):868-77.
27. Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C et al. Heart Rhythm Society; European Heart Rhythm Association; Asia Pacific Heart Rhythm Society. Executive summary: HRS/EHRA/APHRS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes. *Europace*. 2013 Oct; 15(10):1389-406.
28. Locati EH, Zareba W, Moss AJ, Schwartz PJ, Vincent GM, Lehmann MH et al. Age- and sex-related differences in clinical manifestations in patients with congenital long-QT syndrome: findings from the International LQTS Registry. *Circulation*. 1998 Jun; 97:2237-44.
29. Abelsira G, Bachelot A, Badilini F, Koehl L, Lebot M, Favet C et al. Complex influence of gonadotropins and sex steroid hormones on QT interval duration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 May; jc20161877.
30. Hobbs JB, Peterson DR, Moss AJ, McNitt S, Zareba W, Goldenberg I et al. Risk of aborted cardiac arrest or sudden cardiac death during adolescence in the long-QT syndrome. *JAMA*. 2006 Sep; 296:1249-54.
31. Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Benhorin J et al. Effectiveness and limitations of beta-blocker therapy in congenital long-QT syndrome. *Circulation*. 2000 Feb; 101:616-23.
32. Chockalingam P, Crotti L, Girardengo G, Johnson JN, Harris KM, Van der Heijden JF et al. Not all beta-blockers are equal in the management of long QT syndrome types 1 and 2: Higher recurrence of events under metoprolol. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Nov; 60: 2092-9.
33. Wilde A, Kaufman E, Shimizu W, Moss A, Benhorin J, Lopes CM et al. Sodium channel mutations, risk of cardiac events, and efficacy of beta-blocker therapy in type 3 long QT syndrome. *Heart Rhythm*. 2012; 9: S321.
34. Antzelevitch C, Burashnikov A, Sicouri S, Belardinelli L. Electrophysiologic basis for the antiarrhythmic actions of ranolazine. *Heart Rhythm*. 2011 Aug; 8:1281-90.
35. Schwartz PJ, Priori SG, Cerrone M, Spazzolini C, Odero A, Napolitano C et al. Left cardiac sympathetic denervation in the management of high-risk patients affected by the long-QT syndrome. *Circulation*. 2004 Apr; 109:1826-33.
36. Passman R, Kadish A. Sudden death prevention with implantable devices. *Circulation*. 2007 Jul; 116(5):561-71.
37. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy and other causes of sudden cardiac death in young competitive athletes, with considerations for preparticipation screening and criteria for disqualification. *Cardiol Clin*. 2007 Aug; 25(3):399-414, vi.
38. Corrado D, Basso C, Rizzoli G, Schiavon M, Thiene G. Does sports activity enhance the risk of sudden death in adolescents and young adults? *J Am Coll Cardiol*. 2003 Dec 3; 42(11):1959-63.
39. 36th Bethesda Conference: Eligibility Recommendations for Competitive Athletes With Cardiovascular Abnormalities. Task force 7: Arrhythmias. Zipes DP, Ackerman MJ, Estes NA 3rd, Grant AO, Myerburg RJ, Van Hare G et al. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Apr; 45:1354-63.
40. Aziz PF, Sweeten T, Vogel RL et al. Sports Participation in Genotype Positive Children With Long QT Syndrome. *JACC Clin Electrophysiol*. 2015 Mar-Apr; 1(1-2):62-70.

Uticaj finasterida na anksioznost kod pacova

The effect of finasteride on anxiety in rats

Dolika Vasović¹, Dušan Mladenović^{1,2}

¹Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

²Mentor: Institut za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović”

Kontakt: dolika.vasovic@gmail.com

Sažetak

Uvod: Tradicionalni neurobiološki koncept etiologije anksioznih poremećaja zasnovan je na monoaminičkoj hipotezi, prema kojoj je poremećaj prouzrokovan deficitom serotoničkoj, odnosno noradrenergičkoj transmisiji u funkcionalno važnim delovima mozga. Skorašnje studije su ukazale na značaj uloge gama aminobuterne kiseline (GABA) u nastanku ovog poremećaja. Blokodom 5 α -reduktaze u mozgu, finasterid (FIN) inhibira sintezu alopregnanolona (ALLO) i tetrahydrodeoksi-kortikosterona (THDOC) na dozno zavisani način i preusmerava progesteron u alternativne metaboličke puteve čime menja GABA-ergičku transmisiju i utiče na emocionalno stanje.

Cilj: Cilj ovog rada bio je da ispita uticaj finasterida, kao modulatora GABA-ergičke transmisije, na anksioznost kod pacova.

Materijal i metode: Mužjaci pacova Vistar (*Wistar*) soja podeljeni su u dve grupe. Prva, kontrolna grupa tretirana je 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom, a druga grupa je tretirana finasteridom (150 mg/kg). Dnevne doze FIN-a (50 mg/kg) administrirane su intraperitonealno tokom tri uzastopna dana. Anksioznost je procenjena 24 časa nakon primene poslednje doze FIN-a „uzdignutim plus lavirintom” i testom „svetlo-tama”.

Rezultati: U testu „uzdignuti plus lavirint” ukupno vreme provedeno u otvorenim kracima lavirinta nije se značajno razlikovalo kod životinja iz grupe tretirane FIN-om u odnosu na životinje iz kontrolne grupe ($p > 0,05$). Nije uočena ni značajna razlika između dve grupe u broju prelazaka iz jednog kraka u drugi preko centralne platforme ($p > 0,05$). U testu „svetlost-tama” vreme koje su životinje iz FIN grupe provodile u svetlom delu kutije bilo je značajno kraće u odnosu na isti parametar registrovan kod životinja iz kontrolne grupe ($p < 0,05$).

Zaključak: Finasterid ispoljava anksigeno dejstvo kod pacova koje se prvenstveno ispoljava anksioznošću od svetlog prostora. Finasterid nema značajan uticaj na anksioznost od otvorenog prostora.

Ključne reči: Anksioznost, finasterid, neurosteroidi, GABA, pacovi

Abstract

Introduction: The traditional neurobiological concept of the etiology of anxiety disorders is based on the monoamine hypothesis, which suggests that mood disorders are caused by a deficiency in serotonin or noradrenaline transmission at functionally important receptors in the brain. Recent studies have provided strong evidence that gamma-aminobutyric acid (GABA) is involved in the pathophysiology of the anxiety as well. By blocking 5 α -reductase in the brain, finasteride (FIN) inhibits the synthesis of alopregnanolone (ALLO) and tetrahydrodeoxy-corticosterone (THDOC) in a dose-dependent manner and redirects progesterone to alternative metabolic pathways, the effects that change GABAergic transmission and affect the emotional state.

Aim: The aim of this study was to investigate the effect of finasteride as GABAergic transmission modulator, on anxiety in rats.

Materials and methods: Male *Wistar* rats were divided into the groups: 1. control treated with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin; 2. finasteride-treated, FIN (150 mg/kg). Daily doses of FIN (50 mg/kg) were administered intraperitoneally during three days. The level of anxiety was measured 24 hours after the administration of the last dose of FIN using elevated plus maze and light-dark test.

Results: In the elevated plus maze, the total time spent in the open arms was not significantly different in FIN compared to control group ($p > 0.05$). In addition, there was no significant difference in the number of crossings from one arm to the other via the central platform in FIN vs. control group ($p > 0.05$). In the light-dark test, the time that animals, from FIN group spent in the light part of the box, was significantly lower compared to the same parameter recorded in animals from the control group ($p < 0.05$).

Conclusion: Finasteride exerts anxiogenic effects in rats, dominantly causing bright space anxiety-like behavior. Finasteride has no significant effect on the open space anxiety-like behavior.

Key words: Anxiety, finasteride, neurosteroids, GABA, rats

Uvod

Anksiozni poremećaji predstavljaju grupu nepsihotičnih mentalnih poremećaja kod kojih je anksioznost jedini ili vodeći simptom, a koja nije uzrokovana organskim oboljenjima mozga ili drugim psihijatrijskim poremećajima (1). Anksioznost predstavlja formu patološkog straha koju karakteriše osećaj unutrašnje uznemirenosti, uplašenosti i zabrinutosti u odsustvu ili u nesrazmeri sa objektivnom opasnošću. Tri glavne manifestacije anksioznosti su: opšta anksioznost (strepnja, teskoba), fobije i panični poremećaji (1, 2).

Tradicionalni neurobiološki koncept etiologije anksioznih poremećaja zasnovan je na monoaminergičkoj hipotezi, prema kojoj je poremećaj prouzrokovan deficitom serotonergičke, odnosno noradrenergičke transmisije u funkcionalno važnim delovima mozga (2, 3). Skorašnje studije su ukazale na značajne uloge glutamata i gama aminobuterne kiseline (GABA) u nastanku ovog poremećaja (3, 4).

Neurosteroidi su steroidne komponente, sintetisane u mitohondrijama glijalnih ćelija i neurona, koje svoju aktivnost ostvaruju vezivanjem za posebno neurosteroidno mesto na GABA_A receptorskom kompleksu. Prvi korak u sintezi neurosteroida predstavlja transport holesterola u mitohondrije astrocita. Holesterol se transportuje u mitohondrije pomoću multiproteinskog kompleksa u čijem sastavu se nalazi i translokatorski protein (TSPO) koji prenosi holesterol sa spoljašnje na unutrašnju mitohondrijsku membranu (5, 6). Nakon transporta holesterol se u mitohondrijama pod dejstvom monooksigenaze zavisne od citohroma P450 prevodi u pregnenolon, koji se zatim u glatkom endoplazmatskom retikulumu pod dejstvom enzima 5 α -reduktaze i 3 α -hidroksisteroid dehidrogenaze konvertuje u neurosteroide alopregnanolon (ALLO) i 3 α -5 α -tetrahydrodeoksikortikosteron (THDOC) (6, 7). Ovi neurosteroidi deluju kao pozitivni alosterni modulatori GABA_A receptora. Dosadašnje studije ukazuju na značajnu ulogu neurosteroida u regulaciji unosa hrane, seksualnog ponašanja, agresivnosti, telesne temperature i arterijskog pritiska (8). Pokazano je takođe da ALLO i THDOC ispoljavaju anksiolitičko i antidepresivno dejstvo (9).

Finasterid (FIN), inhibitor 5 α -reduktaze, primenjuje se u terapiji hiperplazije prostate (10) i androgene alopecije (11). Ovaj inhibitor smanjuje unos etanola kod miševa kod kojih se razvila zavisnost (12), izaziva hiperalgeziju (13), deluje proepileptogeno (14, 15) i poboljšava tok hepatične encefalopatije (HE) (16). Blokadam 5 α -reduktaze u mozgu FIN inhibira sintezu ALLO i THDOC i preusmerava progesteron u alternativne metaboličke puteve, čime menja GABA-ergičku transmisiju. Na ovaj način FIN modulira emocionalno stanje i potencijalno može da utiče na ponašanje vezano za anksioznost (17).

Cilj ovog rada je stoga bio da se ispita uticaj finasterida na anksioznost kod pacova.

Materijal i metode

Korišćene supstance

Finasterid i 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrin su nabavljeni od Sigma Aldrich Co., SAD.

Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su sprovedeni na odraslim mužjacima pacova Vistar (*Wistar*) soja, mase 170-200 g, koji su nabavljeni iz vivarijuma Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Životinje su čuvane pojedinačno, u kavezima od pleksiglasa (55 x 35 x 30 cm) u standardnim laboratorijskim uslovima (temperatura 22 \pm 2°C, relativna vlažnost vazduha 50%, 12/12 h ciklusi svetlost/tama, sa svetlom uključenim u 9 h), pri čemu su im voda i hrana bili dostupni *ad libitum*. Sve eksperimentalne procedure su bile u skladu sa Direktivom Evropskog parlamenta (2010/63/EU) i odobrene od strane Etičkog komiteta Univerziteta u Beogradu (dozvola broj 1891/2).

U cilju ispitivanja uticaja FIN-a na anksioznost, životinje (n = 20) su podeljene na kontrolnu grupu (n = 10), tretiranu 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinom i grupu tretiranu finasteridom (150 mg/kg, n = 10). Dnevne doze FIN-a (50 mg/kg) administrirane su tokom tri uzastopna dana. Doza FIN-a je određena na osnovu ranije studije koja je pokazala da ova doza snižava nivo ALLO u plazmi i mozgu za 66% i 80% u toku 24 h (18). Finasterid je rastvoren u 20% rastvoru 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrina u 0,9% natrijum-hlorida (NaCl). Sve supstance su primenjene intraperitonealno. Anksioznost je procenjena 24 h nakon primene poslednje doze FIN-a „uzdignutim plus lavirintom“ (engl. *elevated plus maze*) i testom „svetlo-tama“ (engl. *light-dark test*). Oba testa se zasnivaju na konfliktu između urođenog straha glodara prema otvorenom prostoru i težnje životinje da ispita novi prostor u kome se nalazi.

Uzdignuti plus lavirint

„Uzdignuti plus lavirint“ (UPL) je izvođen u lavirintu uzdignutom na stalak visine 50 cm, koji se sastoji od četiri kraka. Dva naspramna kraka (50 x 10 x 40 cm) zatvorena su bočnim zidovima, dok su druga dva (50 x 10 cm) otvorena. U centru se nalazi platforma (10 x 10 cm) na koju se inicijalno postavlja eksperimentalna životinja glavom okrenutom ka zatvorenom kraku. Ponašanje životinje je praćeno u toku 5 minuta i registrovano digitalnom kamerom (*Logitech C210*, SAD) postavljenom iznad lavirinta. Kao pokazatelji anksioznosti u ovom testu određivani su

ukupno vreme koje životinja provodi u otvorenim kracima i broj prelaza iz zatvorenih u otvorene krake.

Test „svetlo-tama”

Test arenu čine dva odeljka: svetli i tamni. Svetli deo test kutije (27 x 27 x 27 cm, sve bele površine) povezan je sa tamnim delom (27 x 18 x 27 cm, sve crne površine) otvorom dimenzija 8 x 8 cm (*Elunit*, Beograd, Srbija). Životinja se spušta u centar svetlog dela gde se narednih 5 minuta digitalnom kamerom snima njeno ponašanje. Kao pokazatelj anksioznosti u ovom testu određivano je ukupno vreme koje životinja provodi u svetlom delu test kutije.

Statistička analiza

Vremena provedena u svetlim kracima lavirinta („uzdignuti plus lavirint“) i u svetlom delu kutije (test „svetlo-tama“) prikazana su kao medijana sa 25. i 75. percentilom u zagradi, dok je broj prelaza iz jednog kraka lavirinta u drugi preko centralne platforme prikazan kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Kako je Kolmogorov-Smirnovljevim testom procenjeno da vremena provedena u otvorenim kracima lavirinta i svetlom delu kutije ne podležu normalnoj raspodeli, za procenu statističke značajnosti razlika korišćen je neparametarski Man-Vitni (*Mann-Whitney*) U test. Za procenu statističke značaj-

nosti razlika u broju prelazaka životinje iz jednog kraka u drugi korišćen je Studentov t test, s obzirom na normalnost raspodele ovih podataka. Statistička analiza obavljena je kompjuterskim programom *SPSS15.0*, a razlika je smatrana statistički značajnom ako je $p < 0,05$.

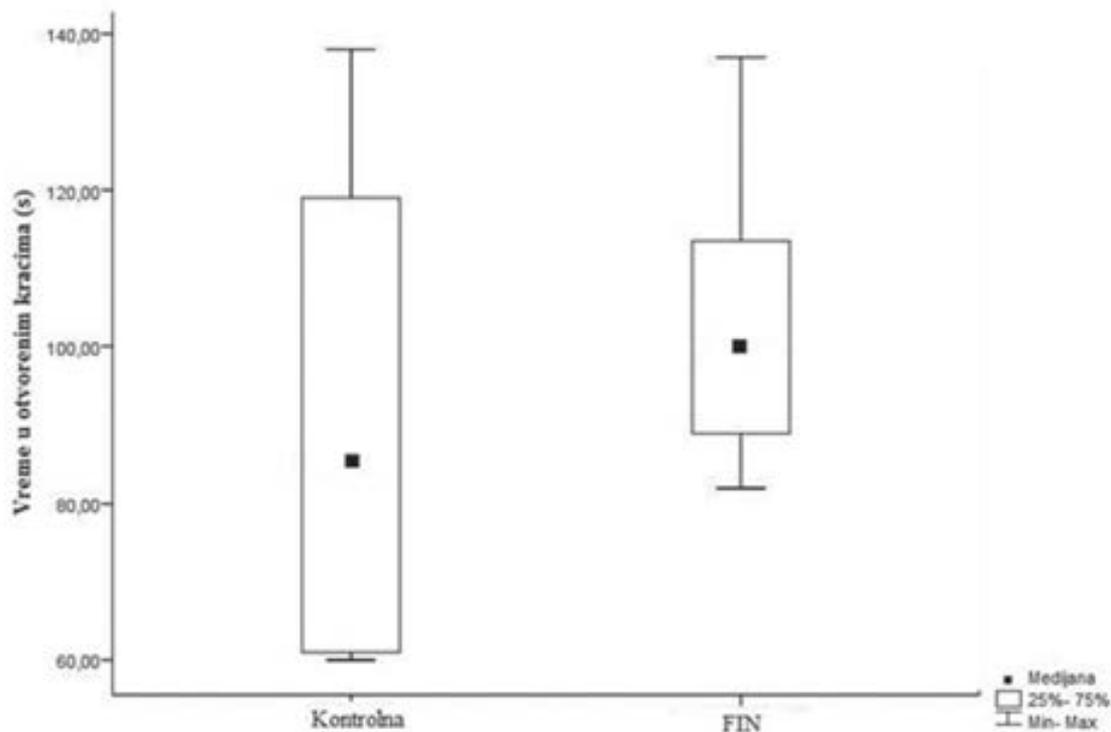
Rezultati

Uzdignuti plus lavirint

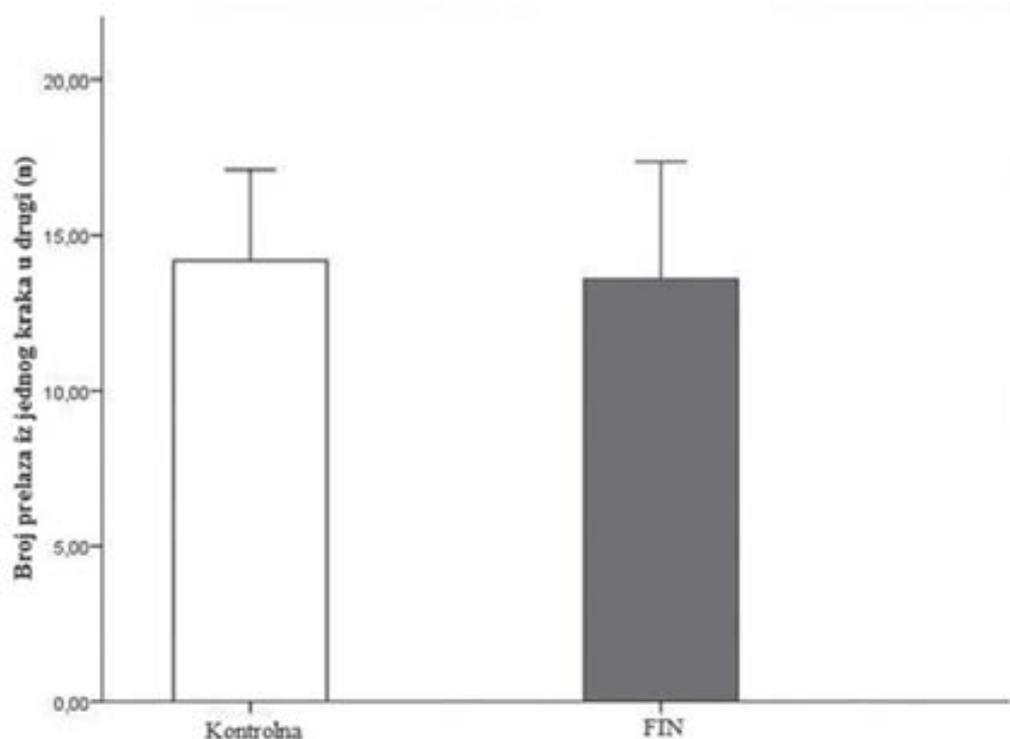
Rezultati dobijeni testom „uzdignuti plus lavirint“ prikazani su na **Grafikonu 1**. Ukupno vreme provedeno u otvorenim kracima lavirinta nije se značajno razlikovalo kod životinja iz FIN grupe [100,0 (89,0 i 113,5)] u odnosu na životinje iz kontrolne grupe [85,5 (63,25 i 114,5)] ($p > 0,05$). Nije uočena ni značajna razlika u broju prelazaka iz jednog kraka u drugi preko centralne platforme između životinja iz FIN ($13,6 \pm 3,8$; $p > 0,05$) i kontrolne grupe ($14,2 \pm 2,9$; **Grafikon 2**).

Statistička značajnost razlike utvrđena je Man-Vitni U testom ($*p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu).

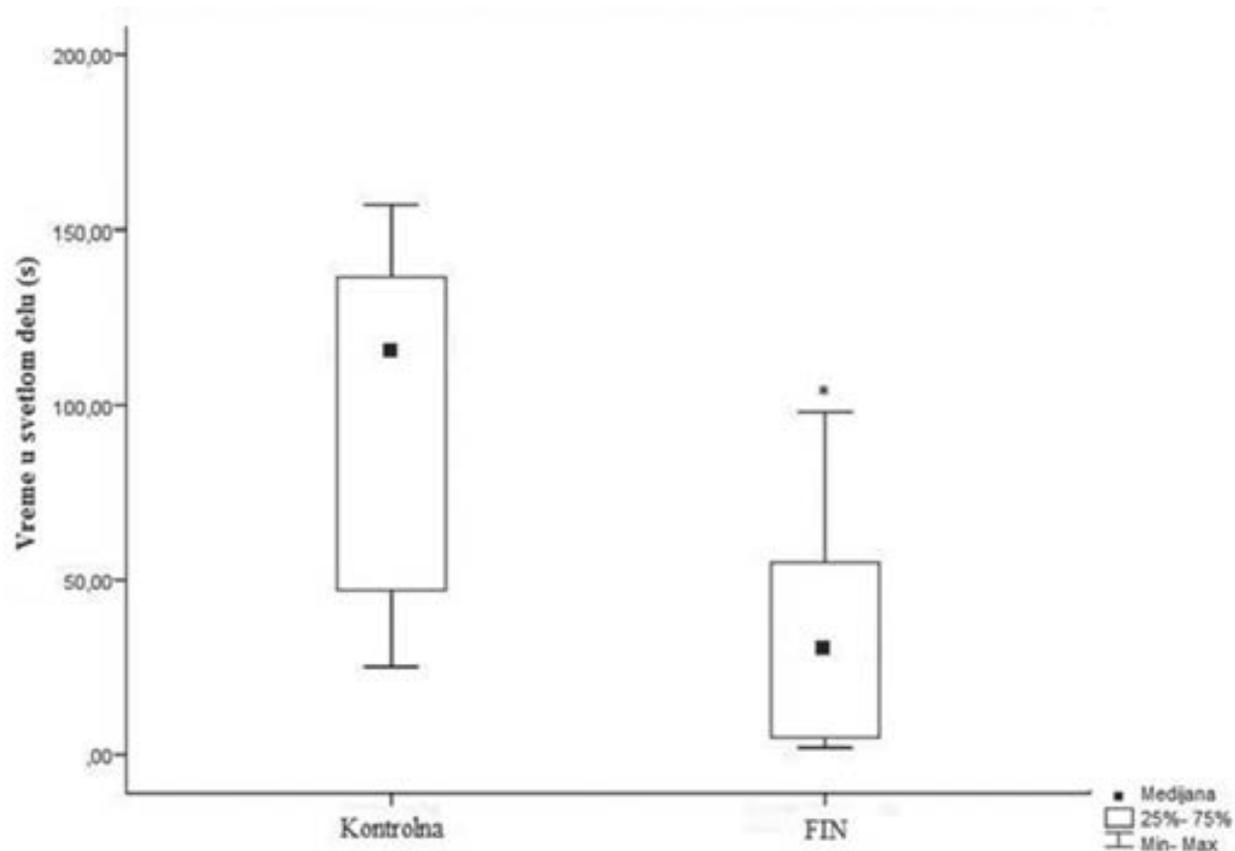
Za procenu statističke značajnosti razlika korišćen je Studentov test. Za detaljnije informacije videti **Grafikon 1**.



Grafikon 1. Ukupno vreme koje životinja provodi u svetlim kracima lavirinta u testu „uzdignuti plus lavirint“ kod životinja iz kontrolne i grupe tretirane finasteridom. Dnevne doze FIN-a (50 mg/kg) administrirane su tokom tri uzastopna dana. Anksioznost je procenjivana 24 h nakon primene poslednje doze FIN-a u lavirintu koji se sastoji od dva otvorena (50 x 10 cm) i dva zatvorena kraka bočnim zidovima (50 x 10 x 40 cm), povezana centralnom platformom (10 x 10 cm). Ukupno trajanje testa je 5 min.



Grafikon 2. Broj prelazaka iz jednog kraka u drugi u testu „uzdignuti plus lavirint” kod životinja iz kontrolne i FIN grupe.



Grafikon 3. Ukupno vreme koje životinja provodi u svetlom delu kutije u testu svetlost-tama kod životinja iz kontrolne i FIN grupe. Test se izvodi u kutiji koja se sastoji iz svetlog (27 x 27 x 27 cm, sve bele površine) i tamnog odeljka (27 x 18 x 27 cm, sve crne površine), međusobno povezanih otvorom (8 x 8 cm). Ukupno trajanje testa je 5 min.

Test „svetlo-tama“

Rezultati dobijeni testom „svetlo-tama“ prikazani su na **Grafikonu 3**. Vreme koje su životinje iz FIN grupe provodile u svetlom delu kutije [30,5 (5,5 i 53,0)] bilo je statistički značajno kraće u odnosu na isti parametar registrovan kod životinja iz kontrolne grupe [115,5 (50,0 i 133,25)] ($p < 0,05$).

Statistička značajnost razlike utvrđena je Man-Vitni U testom ($*p < 0,05$ u odnosu na kontrolnu grupu).

Diskusija

U skladu sa važnom ulogom koju GABA ima u funkcionisanju centralnog nervnog sistema (CNS), sintetisan je veliki broj supstanci koje moduliraju GABA-ergički sistem i na taj način utiču na najrazličitije procese: anksioznost, san, učenje i pamćenje, koordinaciju pokreta, mišićni tonus i epileptogenu aktivnost (19). Do danas je otkriveno čak 14 veznih mesta za različite ligande na GABA_A receptorima, uključujući mesta za barbiturate, benzodiazepine, alkohole, neurosteroidne, anestetike, blokatore kanala i jona cinka (Zn²⁺) (19). Aktivacija GABA_A receptora koji sadrže α_2 i/ili α_3 podjedinicu prvenstveno doprinosi anksiolitičkom i, u velikoj meri, miorelaksantnom dejstvu (20).

Rezultati testa „svetlo-tama“ u našoj studiji ukazuju da FIN ispoljava anksigeno dejstvo (grafikon 3), što se najverovatnije može objasniti njegovom modulacijom GABA-ergičke transmisije posredstvom neurosteroida. Sve je više dokaza koji govore u prilog činjenici da endogeni neurosteroidi imaju važnu ulogu u patogenezi nekih psihijatrijskih poremećaja, uključujući anksiozne poremećaje i depresiju (21, 22). Rezultati više kliničkih studija pokazuju da primena FIN-a u lečenju androgene alopecije uzrokuje pojavu anksiozno/depresivne simptomatologije kod pacijenata, koja je praćena značajnim promenama u koncentraciji neuroaktivnih steroida u likvoru i serumu u odnosu na zdrave kontrole (23, 24). Tako je u likvoru ovih pacijenata zapažen pad koncentracije progesterona (PROG), dihidroprogesterona (DHP), tetrahidroprogesterona (THP), dihidrotestosterona (DHT) i ALLO, dok je nivo pregnenolona (PREG), testosterona (T) i 3 α -diola bio značajno viši u odnosu na zdravu populaciju. S druge strane, u serumu je uočen porast PREG, T, 3 α -diola, 3 β -diola i 17 β -estradiola i pad koncentracije DHP i THP u odnosu na zdrave kontrole (24). Osim toga, dosadašnje studije ukazuju na to da se koncentracija ALLO i THDOC u serumu i likvoru pacijenata koji boluju od depresije snižava, kao i da nivo ALLO u likvoru negativno korelira sa Hamiltonovom skalom depresije (engl. *Hamilton depression rating scale*, HAM-D skor), pokazateljem težine

depresivne epizode (25). I eksperimentalne studije, slično našoj, ukazuju na anksigeno dejstvo FIN-a, potencijalno posredovano modulacijom sinteze neurosteroida. Rani postnatalni tretman pacova FIN-om od 6. do 15. dana doводи do ispoljavanja anksioznog ponašanja kod adultnih životinja (26), dok primena PROG kod ovarijektomisanih ženki pacova ispoljava anksiolitički efekat sličan onom koji se dobija nakon primene benzodiazepina (BDZ) (27).

Tačan mehanizam anksigenog dejstva FIN-a nije poznat, ali glavnu ulogu imaju inhibicija sinteze i povećanje razgradnje neurosteroida. Finasterid na dozna zavisan način inhibira sintezu ALLO i THDOC blokiranjem 5 α -reduktaze u CNS-u, a preusmerava i progesteron u alternativne metaboličke puteve, kao što je njegova redukcija pod dejstvom 20 α -hidroksisteroid dehidrogenaze. Usled ove reakcije nivo 20 α -dihidroprogesterona nakon lečenja FIN-om raste, dok se nivoi progesterona i deoksikortikosterona u mozgu ne menjaju (28). Uočeno je da aktivnost 20 α -hidroksisteroid dehidrogenaze u humanoju populaciji poseduje aldo-keto reduktaza 1C1, koja takođe inaktivira ALLO, što predstavlja potencijalni dodatni mehanizam anksigenog dejstva FIN-a (29). Nivo ALLO u mozgu se smanjuje i usled hidrosilacije progesterona pomoću izoformne 2D monooksigenaze zavisne od citohroma P450 (30). Neke studije takođe pokazuju da anksigeno dejstvo FIN-a može da bude uzrokovano i direktnom modulacijom GABA-ergičke transmisije usled promene kvaternerne strukture GABA_A receptora. Rani postnatalni tretman pacova FIN-om uzrokuje povećanje ekspresije α_4 i δ subjedinice GABA_A receptora u hipokampusu (26). Zanimljivo je da ovi pacovi u adultnom uzrastu ispoljavaju paradoksalno anksiozno ponašanje nakon primene PROG, što ukazuje na kompleksnost interakcije neurosteroida i GABA_A receptora u modulaciji anksioznosti i na potencijalno dvojne efekte FIN-a u zavisnosti od uzrasta u kome se primenjuje.

Za razliku od testa „svetlo-tama“, test „uzdignuti plus lavirint“ u našoj studiji nije pokazao anksigeno dejstvo FIN-a (grafikoni 1 i 2). Iako se oba testa koriste za procenu anksioznosti, u nekim studijama su takođe dali oprečne rezultate (31). Miševi kojima je uklonjen gen za kalcineurin provode kraće vreme u svetlom odeljku kutije u testu „svetlo-tama“, ali istovremeno značajno duže vreme provode u otvorenim kracima lavirinta u odnosu na divlji soj životinja (31). Ovo se može objasniti činjenicom da ova dva testa ispituju različite aspekte anksioznosti kod glodara: test „svetlo-tama“ ispituje anksioznost od svetlog prostora, a „uzdignuti plus lavirint“ anksioznost od otvorenog prostora. Tako naša studija ukazuje da FIN prvenstveno izaziva anksioznost od svetlog, a ne i od otvorenog prostora. Suprotno našoj studiji, neke studije su pokazale da FIN nakon systemske ili intrahipokampalne admini-

stracije izaziva i anksioznost od otvorenog prostora kod pacova (32, 33). Ova diskrepanca se najverovatnije može objasniti različitim dozama FIN-a korišćenim u ovim studijama, a dobro je poznato da FIN inhibira sintezu neurosteroida na dozno zavisani način.

Na osnovu rezultata naše studije može se zaključiti da FIN ispoljava anksiogeno dejstvo kod pacova, koje se prvenstveno ispoljava anksioznošću od svetlog prostora. Finasterid nema značajan uticaj na anksioznost od otvorenog prostora.

Literatura

- Belzer K, Schneier FR. Comorbidity of anxiety and depressive disorders: issues in conceptualization, assessment, and treatment. *J Psychiatr Pract.* 2004; 10(5):296-306.
- Kugaya A, Sanacora G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. *CNS Spectr.* 2005; 10(10):808-19.
- McEwen BS, Chattarji S, Diamond DM, Jay TM, Reagan LP, Svenningsson P, et al. The neurobiological properties of tianeptine (Stablon): from monoamine hypothesis to glutamatergic modulation. *Mol Psychiatry.* 2010; 15:237-49.
- Martin EI, Ressler KJ, Binder E, Nemeroff CB. The neurobiology of anxiety disorders: brain imaging, genetics, and psychoneuroendocrinology. *Psychiatr Clin North Am.* 2009; 32(3):549-75.
- Ahboucha S, Butterworth RF. The neurosteroid system: implication in the pathophysiology of hepatic encephalopathy. *Neurochem Inter.* 2008; 52:575-87.
- Ahboucha S, Gamrani H, Baker G. GABAergic neurosteroids: the "endogenous benzodiazepines" of acute liver failure. *Neurochem Inter.* 2012; 60:707-14.
- Hu J, Zhang Z, Shen W-J, Azhar S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab.* 2010; 7:47.
- Do Rego JL, Seong JY, Burel D, Leprince J, Luu-The V, Tsutsui K, et al. Neurosteroid biosynthesis: enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. *Front Neuroendocrinol.* 2009; 30:259-301.
- Bitran D, Shiekh M, McLeod M. Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABA_A receptors. *J Neuroendocrinol* 1995;7(3):171
- Rick FG, Saadat SH, Szalontay L, Block NL, Kazzazi A, Djavan B, et al. Hormonal manipulation of benign prostatic hyperplasia. *Curr Opin Urol.* 2013; 23:17-24.
- Azzouni F, Zeitouni N, Mohler J. Role of 5 α -reductase inhibitors in androgen-stimulated skin disorders. *J Drugs Dermatol.* 2013; 12: 30-5.
- Ford MM, Nickel JD, Finn DA. Treatment with and withdrawal from finasteride alter ethanol intake patterns in male C57BL/6J mice: potential role of endogenous neurosteroids? *Alcohol.* 2005; 37:23-33.
- Duborija-Kovacevic N, Jakovljevic V, Sabo A, Tomic Z. Anti-nociceptive and anti-inflammatory properties of 5 α -reductase inhibitor finasteride in experimental animals. *Eur J Drug Metab Pharmacokin.* 2008; 33:181-6.
- Reddy DS, Kim HY, Rogawski MA. Neurosteroid withdrawal model of perimenstrual catamenial epilepsy. *Epilepsia.* 2001; 42:328-36.
- Biagini G, Panuccio G, Avoli M. Neurosteroids and epilepsy. *Curr Opin Neurol.* 2010; 23:170-6.
- Mladenović D, Hrnčić D, Petronijević N, Jevtić G, Radosavljević T, Rašić-Marković A, et al. Finasteride improves motor, EEG, and cellular changes in rat brain in thioacetamide-induced hepatic encephalopathy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014; 307(9):G931-40.
- Ugale RR, Sharma AN, Kokare DM, Hirani K, Subhedar NK, Chopde CT. Neurosteroid allopregnanolone mediates anxiolytic effect of etifoxine in rats. *Brain Res.* 2007; 1184:193-201.
- Finn DA, Ford MM, Wiren KM, Roselli CE, Crabbe JC. The role of pregnane neurosteroids in ethanol withdrawal: behavioral genetic approaches. *Pharmacol Ther.* 2004; 101:91-112.
- Korpi ER, Grunder G, Lüddens H. Drug interactions at GABAA receptors. *Prog Neurobiol.* 2002; 67:113-59.
- Rudolph U, Möhler H. Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44: 475-98.
- Melcangi RC, Caruso D, Abbiati F, Giatti S, Calabrese D, Piazza F, et al. Neuroactive steroid levels are modified in cerebrospinal fluid and plasma of post-finasteride patients showing persistent sexual side effects and anxious/depressive symptomatology. *J Sex Med.* 2013; 10(10):2598-603.
- Uzunova V, Sheline Y, Davis JM, Rasmusson A, Uzunov DP, Costa E, et al. Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:3239-44.
- Arca E, Açıköz G, Taitan HB, Köse O, Kurumlu Z. An Open, Randomized, Comparative Study of Oral Finasteride and 5% Topical Minoxidil in Male Androgenetic Alopecia. *Dermatology.* 2004; 209:117-25.
- Caruso D, Abbiati F, Giatti S, Romano S, Fusco L, Cavaletti G, et al. Patients treated for male pattern hair with finasteride show, after discontinuation of the drug, altered levels of neuroactive steroids in cerebrospinal fluid and plasma. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015; 146:74-9.
- Romeo E, Ströhle A, Spalletta G, di Michele F, Hermann B, Holsboer F, et al. Effects of antidepressant treatment on neuroactive steroids in major depression. *Am J Psychiatry.* 1998; 155:910-3.
- Modol L, Casas C, Navarro X, Llidó A, Vallée M, Pallarès M, et al. Neonatal finasteride administration alters hippocampal α 4 and δ GABA_AR subunits expression and behavioural responses to progesterone in adult rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014; 17(2):259-73.
- Reddy DS, O'Malley BW, Rogawski MA. Anxiolytic activity of progesterone in progesterone receptor knockout mice. *Neuropharmacology.* 2005; 48:14-24.
- Mukai Y, Higashi T, Nagura Y, Shimada K. Studies on neurosteroids XXV. Influence of a 5 α -reductase inhibitor, finasteride, on rat brain neurosteroid levels and metabolism. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31:1646-50.
- Usami N, Yamamoto T, Shintani S, Ishikura S, Higaki Y, Katagiri Y, et al. Substrate specificity of human 3(20) α -hydroxysteroid dehydrogenase for neurosteroids and its inhibition by benzodiazepines. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25:441-5.
- Funae Y, Kishimoto W, Cho T, Niwa T, Hiroi T. CYP2D in the brain. *Drug Metab Pharmacokin.* 2003; 18:337-49.
- Miyakawa T. Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:8987-92.
- Rhodes ME, Frye CA. Inhibiting progesterone metabolism in the hippocampus of rats in behavioral estrus decreases anxiolytic behaviors and enhances exploratory and antinociceptive behaviors. *Cogn Affect Behav Neurosci.* 2001; 1(3):287-96.
- Hirani K, Sharma AN, Jain NS, Ugale RR, Chopde CT. Evaluation of GABAergic neuroactive steroid 3 α -hydroxy-5 α -pregnane-20-one as a neurobiological substrate for the anti-anxiety effect of ethanol in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2005; 180(2):267-78.
- Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice. *J Vis Exp.* 2008; (22):1088.

Polimorfizam gena za 3-fosfoglicerat dehidrogenazu kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde

3-Phosphoglycerate Dehydrogenase Gene Polymorphism amongst Patients with Thyroid Gland Cancer

Jelena Pjevalica¹, Nevena Popovac¹, Momčilo Ristanović^{1,2}

¹ Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

² Institut za humanu genetiku

Kontakt: jelenapjevalica@yahoo.com

Sažetak

Uvod: Karcinom štitne žlezde je jedan od ređih karcinoma u muškoj populaciji, zastupljen u svega 2% svih maligniteta, ali je najčešći karcinom endokrinog sistema i odgovoran je za 95% novih slučajeva svake godine. Novija istraživanja su pokazala uticaj naslednih i faktora sredine na nastanak ovog oboljenja. Povećana ekspresija gena za 3-fosfoglicerat dehidrogenazu (3-PHGDH) jedan je od faktora koji doprinose onkogenezi jer povećava proliferaciju ćelija.

Cilj: Cilj studije je poređenje učestalosti polimorfizma gena za 3-PHGDH kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde u odnosu na genotip zdravih muškaraca.

Materijal i metode: Studija je obuhvatila 80 muškaraca sa karcinomom štitne žlezde koji su lečeni u Centru za endokrinu hirurgiju Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije i 100 zdravih muškaraca - dobrovoljaca. Genomska DNK je izolovana metodom isolvavanja. Genotip pacijenata je određen lančanom reakcijom polimeraze (engl. polymerase chain reaction, PCR), metodom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP) i gel-elektroforezom.

Rezultati: Rezultati istraživanja su pokazali da postoji statistički veoma značajna razlika između genotipa obolelih od karcinoma štitne žlezde i grupe zdravih muškaraca kod rs541503 polimorfizma gena za 3-PHGDH ($\chi^2 = 38,924$; $p = 0,001$). Kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde najčešći genotip je TT, a u kontrolnoj grupi TC. Učestalost glavne frekvencije alela (engl. major allele frequency, MAF(C)) u kontrolnoj grupi u našoj studiji iznosila je 0,61. Kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde MAF(C) je bila skoro dvostruko manja i iznosila je 0,31. Poređenje učestalosti alela u grupi pacijenata sa karcinomom štitne žlezde u odnosu na kontrolnu grupu pokazalo je statistički veoma značajnu razliku ($\chi^2 = 18,1159$; $p = 0,001$).

Zaključak: C alel bi mogao da predstavlja protektivni faktor za sprečavanje nastanka karcinoma štitne žlezde. Osobe sa TT genotipom imaju šest puta veću šansu da dobiju karcinom štitne žlezde u odnosu na osobe sa CC genotipom.

Ključne reči: gen za PHGDH, karcinom štitne žlezde, PCR, RFLP.

Abstract

Introduction: Thyroid gland cancer is a rare malignancy in the male population, accounting for up to 2% of all cancers, but it is the most common cancer of the endocrine system, making up to 95% of all estimated new endocrine cancer cases each year. Recent studies suggested an important role of both environmental and genetic factors in cancerogenesis. 3-Phosphoglycerate dehydrogenase (3-PHGDH) gene overexpression is associated with pathogenesis of human cancer and contributes to cell proliferation.

Aim: To assess the association of PHGDH gene polymorphism in the group of patients with thyroid gland cancer and the control group of healthy men.

Materials and methods: The study encompassed 80 men diagnosed with thyroid gland cancer in Center for Endocrine Surgery, Clinic for Endocrinology, Diabetes and Metabolic Diseases, Clinical Center of Serbia and 100 healthy male volunteers. The DNA was isolated from the peripheral blood with solting out method. The genotypes of 3-PHGDH polymorphism were determined by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Gel-electrophoresis was used to separate DNA fragments.

Results: There was a statistically highly significant difference between frequencies for genotype distribution of rs541503 polymorphism in patients with thyroid gland cancer and healthy volunteers ($\chi^2 = 38.924$; $p=0.001$). We found that in patients with thyroid gland cancer, the most common genotype is TT and in the control group TC. Major Allele Frequency (MAF (C)) in the control group in our study was 0.61. In patients with carcinoma of the thyroid gland MAF (C) was almost twice lower at 0.31. Allele frequencies in a group of patients with thyroid gland carcinoma compared to the control group showed a statistically significant difference ($\chi^2 = 18.1159$; $p = 0.001$).

Conclusion: C allele could be a protective factor in the prevention of the thyroid gland cancer. People with TT genotype are six times more likely to develop thyroid cancer compared to those with the CC genotype.

Key words: PHGDH gene, thyroid gland cancer, PCR, RFLP.

Uvod

Karcinom štitne žlezde zastupljen je u svega 2% svih malignih tumora, sa incidencijom od 1 do 8 na 100 000 stanovnika. Iako redak, ovo je najčešći karcinom endokrinog sistema i odgovoran je za 95% novih slučajeva svake godine. Podaci iz savremene literature ukazuju na postepeno povećanje njegove incidencije (1).

Prosečna starost u vreme postavljanja dijagnoze karcinoma štitne žlezde iznosi 45 godina. Kod žena se dijagnoza najčešće postavlja između 35. i 49. godine života, a kod muškaraca između 40. i 55. godine života. Žene obolevaju 2-3 puta češće nego muškarci (1).

Mehanizmi koji uzrokuju nastanak ovog karcinoma su izuzetno složeni jer u tom procesu učestvuje veliki broj gena. Potreban je niz mutacija da bi došlo do postepene transformacije normalne ćelije u malignu (1).

Proizvod gena za 3-fosfoglicerat dehidrogenazu (PHGDH) uključen je u sintezu aminokiseline L-serin. L-serin je neesencijalna aminokiselina koja se dobija iz 3-fosfoglicerata, intermedijera glikolize, a 3-fosfoglicerat dehidrogenaza je enzim koji katališe prvi korak ove reakcije (2). Ovo je glavni put sinteze L-serina i prisutan je u mozgu, testisima i bubrezima, ali i u ćelijama koje brzo proliferišu. L-serin ima bitnu ulogu u metabolizmu jer služi kao prekursor za sintezu aminokiselina glicina, cisteina, selenocisteina, a pošto se konvertuje u piruvat, može se koristiti u glukoneogenezi i lipogenezi (3, 4). Gen za 3-fosfoglicerat dehidrogenazu sastoji se iz 12 egzona i nalazi se na kratkom kraku hromozoma 1 (1p12) (3-5). U tumorskim ćelijama je dokazana pojačana ekspresija gena za 3PHGDH (5). Jedan od mehanizama koji pojačava ovu aktivnost je povećanje broja kopija gena za 3PHGDH (5). Istraživanja su dokazala prisustvo duplikacija gena za 3PHGDH u regionu 1p12 kod različitih malignih tumora (5).

Novija istraživanja su pokazala da je povećana ekspresija 3PHGDH gena jedan od glavnih faktora koji doprinosi nastanku malignog melanoma. Ekspresija proteina ovog gena je dokazana imunohistohemijski u 21% uzoraka malignog melanoma. Metodom fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) otkriveni su duplikati istog gena kod 21 od 42 uzorka kod kolorektalnog karcinoma u pericentromernom regionu prvog hromozoma (5). Supresija gena za 3PHGDH u ćelijskim kulturama sa povećanom ekspresijom gena za 3PHGDH imala je za posledicu smanjenje ćelijske proliferacije i smanjenu sintezu serina (6).

Polimorfizam na nivou jednog nukleotida (engl. single nucleotide polymorphism, SNP) rs541503 ogleda se u alteraciji T->C na poziciji 301 u genu za PHGDH, pri čemu je nemutirani (divlji) alel (engl. wild type, wt) T, a mutirani C (5, 6). Na osnovu podataka iz literature opisane su

promene na nivou jednog nukleotida koje se odnose na region rs541503 kod malignog melanoma i kolorektalnog kancera. Još uvek nema objavljenih rezultata koji dovode u vezu rs541503 polimorfizam PHGDH gena sa onkogenom karcinoma štitne žlezde.

Cilj našeg istraživanja je bio da se utvrdi zastupljenost rs541503 polimorfizma gena za 3PHGDH kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde i uporedi sa genotipom zdravih muškaraca kontrolne grupe.

Materijal i metode

Ispitanici

Ispitivanu grupu je činilo 80 muškaraca obolelih od karcinoma štitne žlezde, koji su lečeni u Centru za endokrinu hiruriju Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije u toku 2013. godine. Kontrolnu grupu je činilo 100 zdravih muškaraca. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta KCS.

Izolacija DNK

Genetičke analize su obavljene na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta. Svim ispitanicima je uzet uzorak od 5 mL venske krvi dobijen venepunkcijom, a genomska DNK izolovana je metodom isoljavanja prema prethodno opisanoj proceduri (7).

Lančana reakcija polimeraze (PCR reakcija)

Lančana reakcija polimeraze je rađena u termocikleru Applied Biosystems 2720. Za ovu metodu su korišćeni prajmeri koji ograničavaju region od 416 baznih parova (bp), u kome se nalazi polimorfno mesto T301C.

Sekvence prajmera su bile:

- sense-prajmer: 5'-TGA AGG TCC TGT GTG TGC TCT G-3'
- antisense-prajmer: 5'-TGA CTC CAG ACG CTA CTG CTC A-3'

Lančana reakcija polimeraze je izvođena u zapremini od 25 µL, koja je sadržala 16 µL vode, 2,5 µL 10 x PCR pufera, 2 µL 25 mM MgCl₂, 1 µL 10 mM dNTP, 25 mM prajmere (po 1 µL svakog), 0,5 µL *Taq* polimeraze i 1 µL gemomske DNK ispitanika. Uslovi PCR su bili: početna denaturacija od 3 min na 94 °C, 30 ciklusa koji su se sastojali od 30 s na 94 °C, 55 s na 66 °C i 30 s na 72 °C i završna ekstenzija 5 min na 72 °C.

Metoda polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata (RFLP metoda)

Restrikcija PCR proizvoda je obavljena na 37 °C tokom noći. Restrikciona smeša se sastojala iz 5 µL PCR proizvoda, 2 µL 10 x Tango pufera, 12,5 µL vode i 0,5 µL MspI restrikcionog enzima (10 u/µL).

Elektroforeza na agaroznom gelu

Proizvodi PCR reakcije su proveravani gel-elektroforezom na 2% agaroznom gelu koji je obojen bojom SYBR-Safe i posmatrani su na UV transluminatoru (model Viler Lourmat TFX 20M). Na isti način je rađena i analiza restrikcionih fragmenata (slika 1).

U slučaju postojanja TT genotipa uočava se jedna traka dužine 416 bp. Kod TC genotipa dobijaju se tri fragmenta dužine od 416 bp, 217 bp i 199 bp, ali se zbog nedovoljnog razdvajanja fragmenata od 217 bp i 199 bp, na gelu uočava kao jedinstvena traka. Kod CC genotipa se iz istog razloga može videti jedan fragment dužine od oko 200 bp (koji predstavlja fragmente od 217 bp i 199 bp).



Slika 1. Analiza gela: kolone gledano sleva nadesno: marker (MAR =1000 bp), negativna kontrola (NEG), TC genotip-heterozigot (amplifikati od 416 bp i 200 bp), TT genotip (amplifikati od 416 bp) i CC genotip (oko 200 bp).

Statistička obrada podataka

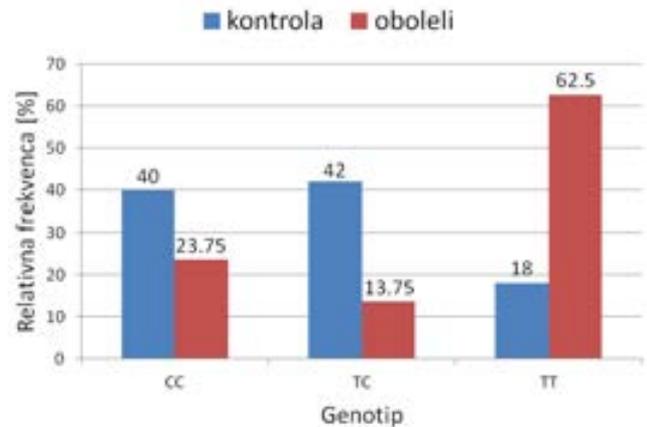
Za procenu razlike u učestalosti alela i genotipova među grupama korišćeni su χ^2 test i multivarijantna logistička regresija. Statistički značajna razlika je ustanovljena na nivou verovatnoće od 95%.

Rezultati

Prosečna starosna dob pacijenata sa karcinomom štitne žlezde je bila 61,06 godina. U kontrolnoj grupi je prosečna starosna dob bila 38,46 godina.

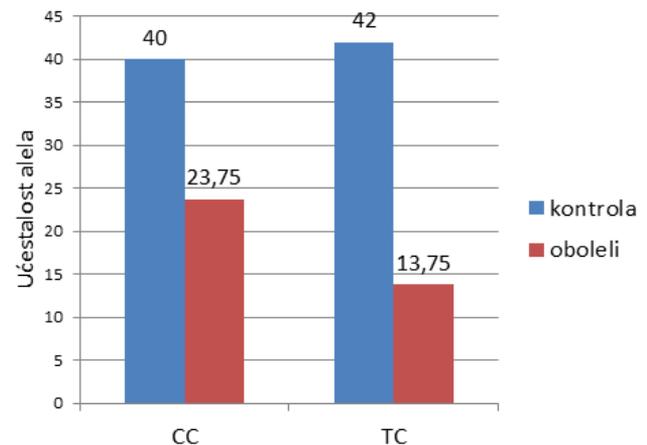
Procentualna zastupljenost genotipova CC, TC i TT u kontrolnoj grupi je 40%, 42% i 18%, dok je procentualna

zastupljenost istih genotipova u grupi pacijenata sa karcinomom štitne žlezde 23,75%, 13,75% i 62,5%. U kontrolnoj grupi najveću učestalost ima genotip TC, a najmanju TT. Kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde utvrđena je najveća učestalost genotipa TT, a najmanja genotipa TC (grafikon 1). Poređenje učestalosti genotipova u grupi pacijenata sa karcinomom štitne žlezde u odnosu na kontrolnu grupu pokazalo je statistički veoma značajnu razliku ($\chi^2 = 38,924$; $p = 0,001$).



Grafikon 1. Zastupljenost genotipova u kontrolnoj grupi i među pacijentima sa karcinomom štitne žlezde.

Učestalost glavne frekvencije alela (engl. *Major Allele Frequency*, MAF(C)) u kontrolnoj grupi u našoj studiji iznosila je 0,61. Kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde MAF(C) je bila skoro dvostruko manja i iznosila je 0,31 (grafikon 2). Poređenje učestalosti alela u grupi pacijenata sa karcinomom štitne žlezde u odnosu na kontrolnu grupu pokazalo je statistički veoma značajnu razliku ($\chi^2 = 18,1159$; $p = 0,001$).



Grafikon 2. Zastupljenost alela u kontrolnoj grupi i među pacijentima sa karcinomom štitne žlezde.

Ako se za ispitivanje povezanosti genotipa i starosti ispitanika sa obolevanjem od karcinoma štitne žlezde prime-

ni multivarijantna logistička regresija, tada osobe sa TT genotipom (nakon prilagođavanja na starost ispitanika) imaju šest puta veću šansu da obole od karcinoma štitne žlezde u odnosu na osobe sa CC genotipom (**tabela 1**).

Tabela 1. Multivarijantna logistička regresija za zavisnu varijablu karcinom štitne žlezde.

	b	p	OR (95% IP)
genotip			
CC			1 (referentna kategorija)
TC	-0,56	0,487	0,57 (0,12-2,76)
TT	1,76	0,022	5,80 (1,29-26,01)
starost	0,28	< 0,001	1,32 (1,21-1,43)

Diskusija

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da postoji statistički veoma značajna razlika u učestalosti genotipova i alela između ispitanika i kontrolne grupe. Najčešći genotip među kontrolama je bio TC, dok je kod pacijenata sa karcinomom štitne žlezde najčešći genotip bio TT. Učestalost MAF(C) u kontrolnoj grupi bila je gotovo dvostruko veća u odnosu na grupu pacijenata sa karcinomom štitne žlezde.

Podaci iz literature dovode u vezu povećanu ekspresiju gena za 3-fosfoglicerat dehidrogenazu u ćelijama malignog melanoma, ezofagusnog kancera, kancera dojke i kolorektalnog kancera i genotipa TT (6, 8, 9). Ektopična ekspresija PHGDH gena u epitelnim ćelijama može da dovede do morfoloških i funkcionalnih promena koje predisponiraju malignu transformaciju (10, 11). U regionu 1p12 nalazi se još nekoliko gena kandidata za koje se pretpostavlja da mogu doprineti kancerogenezi (4-6). Ovo je prva studija u Srbiji koja je imala za cilj da utvrdi udruženost polimorfizma gena za PHGDH sa karcinomom štitne žlezde. Rezultati naše studije su pokazali da je učestalost alela C skoro dvostruko manja u grupi pacijenata sa karcinomom štitne žlezde u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno da osobe sa genotipom TT imaju 6 puta veću šansu da dobiju rak štitne žlezde u odnosu na osobe sa genotipom CC. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodno urađenom sličnom studijom istog polimorfizma kod kolorektalnog karcinoma (12). Ovakvi rezultati idu u prilog istraživanjima kojima bi se bliže objasnila veza između alela C, metabolizma serina i nastanka karcinoma.

Iako je karcinom štitne žlezde češći kod žena, mi smo izveli studiju sa uzorcima dobijenim od muškaraca zato što je to najčešći endokrini tumor u muškoj populaciji i zato što smo imali adekvatnu kontrolnu grupu u vreme izvođenja studije.

Na osnovu iznetih podataka utvrdili smo da postoji izvesna veza između polimorfizma gena za PHGDH i karcinoma štitne žlezde, a u toku je opsežnija studija koja ima za cilj jasnije utvrđivanje ove veze, kao i utvrđivanje korelacije životnih navika, biohemijskih markera, histopatološkog i fizikalnog nalaza sa ovim genskim polimorfizmom.

Literatura

1. World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (WCRF/AICR). Second Expert Report: Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. American Institute for Cancer Research, Washington, DC; 2007; 280-288.
2. Voet D, Voet J. Biochemistry- 4th edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Inc. 2010; 1071-1072.
3. Tabatabaie L, Koning TJ, Geboers AJ, van den Berg IE, Berger R, Klomp LW. Novel mutations in 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) are distributed throughout the protein and result in altered enzyme kinetics. Hum Mutat. 2009 May; 30(5):749-56.
4. Pind S, Slominski E, Mauthe J, Pearlman K, Swoboda KJ, Wilkins JA, et al. V490M, a common mutation in 3-phosphoglycerate dehydrogenase deficiency, causes enzyme deficiency by decreasing the yield of mature enzyme. J Biol Chem. 2002 Mar 1; 277(9):7136-43.
5. Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattiaini KR, Bass AJ, et al. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. Nat Genet. 2011 Jul 31; 43(9):869-74.
6. Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, et al. Functional Genomics Reveal That the Serine Synthesis Pathway Is Essential in Breast Cancer. Nature. 2011 Aug 18; 476(7360):346-50.
7. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucl Acid Res. 1988 Feb 11; 16(3):1215.
8. Antonov A, Agostini M, Morello M, Minieri M, Melino G, Amelio I. Bioinformatics analysis of the serine and glycine pathway in cancer cells. Oncotarget. 2014 Nov 30; 5(22):11004-13.
9. Labuschagne C, van den Broek NJ, Mackay GM, Vousden KH, Maddocks OD. Serine, but Not Glycine, Supports One-Carbon Metabolism and Proliferation of Cancer Cells. Cell Rep. 2014 May 22; 7(4):1248-58.
10. Luo J. Cancer's sweet tooth for serine. Breast Cancer Res. 2011; 13(6):317.
11. Liu J, Guo S, Li Q, Yang L, Xia Z, Zhang L et al. Phosphoglycerate dehydrogenase induces glioma cells proliferation and invasion by stabilizing forkhead box M1. J Neuro-oncol. 2013 Feb; 111(3):245-55.
12. Ristanovic M, Novakovic I, Rovcanin B, Trifunovic J, Krivokapic Z. 3-phosphoglycerate dehydrogenase polymorphism in male patients with colorectal carcinoma. In: Lyonnet S, Schmidtke J, Brunner H, Houge G, Kääriäinen H, Read A, del Picchia J, editors. European Journal of Human Genetics. European Human Genetics Conference 2013; June 8 - 11, 2013; Paris, France. France: nature publishing group; June 2013. p. 287.

Ispitivanje kvaliteta i antimikrobne aktivnosti gajenog nevena, *Calendula officinalis* L.

Investigation of quality and antimicrobial activity of cultivated marigold flowers *Calendula officinalis* L.

Katarina Gurzulov¹, Mirjana Marčetić², Dragana Božić³

¹ Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

² Katedra za farmakognoziju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

³ Katedra za mikrobiologiju i imunologiju, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Kontakt: kacagurzulov@gmail.com

Sažetak

Uvod: Cvast nevena, *Calendula officinalis* L., *Asteraceae*, tradicionalno se koristi za lečenje kožnih bolesti. Cvast nevena sadrži triterpenske saponine, karotenoide, flavonoide i etarsko ulje. Ekstrakti i etarsko ulje cvasti nevena pokazuju antiinflamatornu, antioksidantnu i antimikrobnu aktivnost.

Cilj rada: Cilj rada je bio ispitivanje kvaliteta cvasti gajenog nevena, *Calendulae flos*, upoređivanje sadržaja flavonoida u cvasti i jezičastim cvetovima, kao i utvrđivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata i tradicionalne masti na bazi nevena.

Materijal i metode: Biljni materijal je prikupljen iz privatnih bašti u Kikindi, Mokrinu i Vrnjačkoj Banji tokom septembra i novembra 2015. godine. Ispitivanje kvaliteta je obuhvatalo makroskopsku i mikroskopsku analizu i određivanje specifičnog kvaliteta prema monografiji Evropske farmakopeje 7.0. Identifikacija flavonoida je izvršena metodom tečne hromatografije pod visokim pritiskom (HPLC). Antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata (1:20) i tradicionalnih masti na bazi jezičastih cvetova ili celih cvasti ispitivana je na šest standardnih laboratorijskih sojeva agar-difuzionim matodom.

Rezultati: Makroskopske i mikroskopske karakteristike i sadržaj flavonoida (2,0-2,76%) u jezičastim cvetovima gajenog nevena odgovarali su zahtevima propisanom u *Ph.Eur. 7.0*. Izdvojeni jezičasti cvetovi (2,76 ± 0,01%) sadržali su veću koncentraciju flavonoida od celih cvasti (1,68 ± 0,0%). U jezičastim cvetovima su uočene i razlike u sadržaju flavonoida tokom septembra (2,76 ± 0,01%) i novembra (1,45 ± 0,01%), dok se u celim cvetovima koncentracija nije značajno menjala. U svim ispitivanim uzorcima identifikovani su 3-O-heterozidi kvarcetina i izoramnetina. Antimikrobno delovanje su pokazali etanolni ekstrakti jezičastih i celih cvetova, kao i tradicionalne masti. Tradicionalna mast na bazi jezičastih cvetova pokazala je izraženiji antimikrobni efekat od masti na bazi celih cvasti.

Zaključak: Ispitivanje kvaliteta je pokazalo da cvast gajenog nevena odgovara zahtevima *Ph.Eur.7.0*. Jezičasti cvetovi su sadržali više flavonoida od celih cvasti nevena. Ekstrakti i tradicionalna mast na bazi jezičastih cvetova pokazali su antimikrobnu aktivnost, što potvrđuje dugogodišnju upotrebu nevena.

Ključne reči: cvast nevena, *Calendula officinalis*, flavonoidi, antimikrobna aktivnost

Abstract

Introduction: Marigold flower, *Calendula officinalis* L., *Asteraceae*, is traditionally used to treat skin diseases. Marigold flowers contain triterpenoid saponins, carotenoids, flavonoids and essential oil. Extracts and essential oil exhibit anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial activity.

Aim: The aim of the study was to investigate quality of cultivated *Calendulae flos*, to compare flavonoids content in inflorescence and ligulate florets and to determine antimicrobial activity of extract and traditional ointment based on marigold.

Material and Methods: Plant material was collected from private gardens in Kikinda, Mokrin and Vrnjacka Banja during September and November 2015. Quality investigation included: macroscopic and microscopic analysis and determination of the specific quality according to the monograph of European Pharmacopoeia 7.0. The identification of flavonoids was carried out by HPLC. Antimicrobial activity of ethanol extracts (1:20) and traditional ointment based on ligulate florets or whole inflorescences was tested against six standard laboratory strains by agar-diffusion method.

Results: Macroscopic and microscopic characteristics and content of flavonoids (2.0-2.76%) in the ligulate florets of cultivated marigold corresponded to the requirements of *Ph. Eur. 7.0*. Separated ligulate florets (2.76 ± 0.01%) contained a higher concentration of flavonoids than whole inflorescence (1.68 ± 0.0%). Also, in ligulate florets differences were found in the flavonoids content during September (2.76 ± 0.01%) and November (1.45 ± 0.01%), while in whole inflorescences concentration didn't significantly change. In all tested samples 3-O-heterosides of quercetin and isoramnetin were identified. The ethanol extracts of ligulate florets, whole inflorescence as well as traditional ointments showed the antimicrobial activity. The traditional ointment based on ligulate florets showed stronger antimicrobial effect than the ointment based on full inflorescences.

Conclusion: Quality investigation showed that cultivated marigold flowers meet the requirements of *Ph. Eur. 7.0*. Ligulate florets contained more flavonoids than whole inflorescences. Extracts and traditional ointment based on ligulate florets showed antimicrobial activity, which confirmed long-term use of marigold.

Key words: marigold flowers, *Calendula officinalis*, flavonoids, antimicrobial activity

Uvod

Današnja farmacija i medicina pored velikog broja sintetičkih lekova, sve više pažnje poklanjaju prirodnim izvorima lekovitih supstanci, na prvom mestu lekovitim biljkama. Neven je široko korišćena lekovita biljka u farmaceutskim proizvodima, kozmetici, parfemima i ishrani (1).

Rod *Calendula* L. obuhvata 15-20 vrsta, koje se javljaju u mediteranskoj oblasti i na Kanarskim ostrvima. U Flori Srbije su opisane dve vrste: *Calendula officinalis* L. i *C. arvensis* (Vaill.) L.

Neven, *Calendula officinalis*, jednogodišnja je zeljasta, ređe višegodišnja biljka, visoka 30-50 cm sa dugačkim vretenastim korenom. Stabljika je uglasta i kratko maljava, a listovi živozeleni, uglavnom sa celim obodom. U donjem delu stabljike listovi su lopatičasti, dugački i suženi u obliku drške, dok su u gornjem delu stabljike sedeći, duguljasto lancetasti do jajasti. Cvetne glavice su velike 2-5 cm u prečniku, u vreme cvetanja krute i uspravne. Listići involukruma su lancetasti sa trepljastim dlakama. Cvasti su žute ili narandžaste, pojedinačne i svojstvenog mirisa. Središnji cvetovi su dvopolni, cevasti i neplodni. Obodni cvetovi su u 1-3 reda, mnogobrojni ženski i plodni. Vrsta *C. officinalis* je verovatno poreklom sa Mediterana, a gaji se po baštama i parkovima (2).

Cvasti nevena sadrže karotenoide (flavoksantin, lutein, rubiksantin, β -karoten, γ -karoten i likopen), triterpenske saponine (derivate oleanolne kiseline i glukuronske kiseline), triterpenske alkohole, flavonoide (izoramnetin-3-O-rutinozid, izoramnetin-3-O-rutinozilramnozid, izoramnetin-3-O-glukozid, izoramnetin-3-O-diglukozid, izokvercitrin, rutin i kvercetin-3-O-rutinozilramnozid), etarsko ulje, tanine i polisaharide (3-7). 3-O-glucoside.

Cvet i, ređe, nadzemni deo biljke u cvetu (*Calendulae flos et herba*) tradicionalno su se primenjivali kao blag anti-septik za spoljašnju i unutrašnju primenu. U obliku čaja, tinkture ili masti upotrebljavali su se za lečenje mnogih kožnih bolesti, naročito impetiga (8). Koristili su se kod konjunktivitisa, neredovnih menstruacija, varikoznih vena i hemoroida (9-10).

Ranija ispitivanja su pokazala da etanolni i metanolni ekstrakti cvasti nevena deluju antiinflamatorno, vazoprotektivno, antimikrobno, spazmolitično i antioksidantno, a vodeni ekstrakti ispoljavaju i antiholinesterazni efekat (11-13).

U monografiji Evropske Agencije za lekove navodi se primena tradicionalnih biljnih lekova na bazi cvasti nevena *Calendulae flos* za simptomatsko lečenje blagih inflamacija kože (poput opekotina od sunca), manjih rana i inflamacija usne duplje. Cvast nevena se primenjuje u vidu infuza, tečnih ekstrakata ili polučvrstih preparata (DER 1:5-1:20) koji se tradicionalno izrađuju od svinjske ili biljne masti (14).

Cilj ovog rada je ispitivanje kvaliteta cvasti gajenog nevena iz privatnih bašti u Kikindi, Mokrinu i Vrnjačkoj Banji, kao i utvrđivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata i tradicionalne masti na bazi nevena.

Materijal i metode

Biljni materijal

Cvasti nevena su prikupljene iz privatnih bašti u Kikindi, Mokrinu i Vrnjačkoj Banji tokom septembra 2015. godine i u Kikindi tokom novembra 2015. godine. Drogu predstavljaju cvasti odvojene od čašične lože i sami jezičasti cvetovi sakupljeni u krajnjim fazama cvetanja biljke. Droga je osušena u tankom sloju, na sobnoj temperaturi.

Makroskopska i mikroskopska analiza

Uzorci jezičastih cvetova iz Kikinde, Mokrina i Vrnjačke Banje (septembar 2015) bili su analizirani organoleptički.

Nakon usitnjavanja droge izvršeno je posmatranje i fotografisanje praška u opštem reaktivu prema Tucakovu pod svetlosnim mikroskopom *Olympus BX41*.

Izrada etanolnih ekstrakata i tradicionalne masti nevena

U radu su ispitivani tradicionalno primenjivani etanolni ekstrakti i mast na bazi cvasti nevena, koje kao tradicionalne biljne lekove navodi i Evropska agencija za lekove (14). Suvi jezičasti cvetovi (0,5 g) ili cele cvasti nevena (0,5 g) ekstrahovani su postupkom maceracije sa po 10 mL 70% etanola. Posle 24 časa ekstrakti su filtrirani i korišćeni za dalje ispitivanje.

Tradicionalna mast na bazi nevena izrađena je prema usmenom predanju stanovnika Kikinde. Postupak se zasniva na blagom kuvanju jezičastih cvetova nevena (Kikinda, septembar 2015), ubranih po suvom i sunčanom vremenu između 12 i 14 časova, u domaćoj svinjskoj masti. Zagrevanje je izvršeno u vodenom kupatilu, bez velikog pregrevavanja masti kako bi se sačuvala aktivne komponente cvasti nevena (40-60°C). Prema tradicionalnom predanju, u rastopljenu mast (130 g) stavljeno je 4 g svežih jezičastih cvetova i mešano 5-10 min (mast 1). Nakon 24 časa stajanja mast je ponovo otopljena i proceđena. Osim tradicionalne masti od svežeg uzorka (Kikinda, novembar 2015) izrađene su još dve masti navedenim postupkom: iz 12 g svežih jezičastih cvetova nevena i 130 g svinjske masti (mast 2) i iz 12 g svežih celih cvasti nevena i 75 g svinjske masti (mast 3).

Određivanje flavonoida u cvasti nevena, *Calendulae flos*

Određen je sadržaj flavonoida u uzorcima sa različitih lokaliteta (Kikinda, Mokrin i Vrnjačka Banja) i komercijalnom uzorku (Čaj od cveta nevena, *Calendulae flos*, Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“). Ispitivan je i sadržaj flavonoida u celim cvastima (Kikinda) i izdvojenim jezičastim cvetovima, prikupljenih tokom septembra i novembra 2015. godine (Kikinda).

Sadržaj flavonoida u drogi određivan je spektrofotometrijski prema propisu monografije Evropske farmakopeje 7.0 (European Pharmacopoeia 7.0) za *Calendulae flos* i zasnivalo se na građenju žutih helatnih kompleksa flavonoidnih aglikona sa aluminijum-hloridom (15). Zagrevano je 0,8 g droge sa 20 mL acetona, 1 mL 5 g/L rastvora urotropina i 7 mL hlorovodonične kiseline. Oslobođeni aglikoni su nakon ceđenja preuzeti etilacetatom. Dodavano je 1,0 mL reagensa aluminijum-hlorida i izmerena apsorbanacija nastalog kompleksa na 425 nm.

Analiza flavonoida pomoću tečne hromatografije pod visokim pritiskom

Analiza tečnom hromatografijom pod visokim pritiskom (HPLC) izvršena je pomoću aparata Agilent 1100. Korišćena je kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, veličine čestica 5 µm). Identifikacija je vršena pomoću fotodiodnog detektora (engl. *photodiode array detector*, DAD) (370 nm). Kao ispitivani uzorci korišćeni su etanolni ekstrakti i etilacetatni ekstrakti flavonoidnih aglikona. Ispitivanje je sprovedeno uz odgovarajući gradijentni protok mobilne faze (0,8 mL/min, 25 °C); mobilna faza A: voda/fosforna kiselina (H₃PO₄) (99,97:0,03), pH = 2,75 i mobilna faza B: 10% A u acetonitrilu. Gradijentni protok je bio: 0 min 90% A, 10% B; 5-15 min 75% A, 25% B; 20 min 70% A, 30% B; 25 min 50% A, 50% B; 30 min 30% A, 70% B i 35 min 90% A, 10% B. Identifikacija komponenti izvršena je poređenjem ultraljubičastih (UV) spektara i retencionih vremena sa odgovarajućim standardima.

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etanolnih ekstrakata nevena i tradicionalnih masti na bazi nevena

Antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata nevena i tradicionalnih masti na bazi nevena ispitana je agar-difuzionom metodom (16). Ispitivanje je izvršeno na šest standardnih laboratorijskih sojeva: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 i *Candida albicans* ATCC 10259 (Quick-stick, Microbiologics, USA).

Sojevi su kultivisani u triptikaza soja bujonu preko noći. Inokulum je napravljen od suspenzije prekonocne kultu-

re bakterija/gljivica i podešen na gustinu od 0,5 po Mekerland (*McFarland*) standardu. Agar-difuzioni metod je izveden na Miler-Hinton (*Mueller-Hinton*) agaru (Torlak, Beograd) za bakterije i Saburo (*Sabouraud*) agaru (Torlak, Beograd) za gljivice. Aplikovano je po 50 µL masti na bazi nevena (prethodno otopljene na temperaturi od 40°C), odnosno po 50 µL etanolnih ekstrakata. Kao negativna kontrola su korišćeni 70% etanol i svinjska mast. Nakon 24 časa kultivacije u aerobnim uslovima na 35°C očitane su zone inhibicije rasta u mm. Svaki eksperiment je ponovljen četiri puta.

Rezultati

Makroskopska i mikroskopska analiza

Makroskopskom analizom cvasti nevena uočeno je da su jezičasti cvetovi žuti ili narandžastožuti, sa 3 zupca na vrhu, dok su cevasti cvetovi oko 5 mm dugi i sa žutom ili narandžastocrvenom krunicom, nagorkog ukusa i slabog mirisa. Analizirani uzorci nevena iz privatnih bašti u Kikindi, Mokrinu i Vrnjačkoj Banji odgovarali su zahtevima navedenim u monografiji *Ph. Eur. 7.0* za *Calendulae flos* (15).

Mikroskopskom analizom cvasti nevena u prašku utvrđene su sledeće karakteristike: mehaničke višecelijske dlake, žlezdane dlake sa dvoćelijskom glavicom, bodljikava okruglasta polenova zrna i kristali kalcijum-oksalata, koji su odgovarali zahtevima navedenim u monografiji *Ph. Eur. 7.0* za *Calendulae flos* (15) (Tabela 1).

Sadržaj flavonoida u cvasti nevena, *Calendulae flos*

Određivan je sadržaj flavonoida u cvasti nevena sa različitih lokaliteta (Tabela 2). Sadržaj ukupnih flavonoida u svim ispitivanim uzorcima iznosio je 1,45-2,76%, što je odgovaralo zahtevima navedenim u monografiji *Ph. Eur. 7.0*, koja propisuje minimalnu koncentraciju ukupnih flavonoida u cvasti nevena (0,4%) (15). Koncentracija flavonoida se nije značajno razlikovala u uzorcima jezičastih cvetova gajenog nevena i u komercijalnom uzorku. Iz dobijenih rezultata ustanovljeno je da su izdvojeni jezičasti cvetovi sakupljeni u septembru (2,76 ± 0,01%) sadržali veću koncentraciju flavonoida od celih cvasti (1,68 ± 0,00%). U jezičastim cvetovima tokom septembra sadržaj flavonoida je bio veći nego u novembru, dok se u celim cvetovima koncentracija nije značajno menjala. Veća koncentracija flavonoida tokom septembra verovatno je u korelaciji sa klimatskim uslovima u tom periodu.

Tabela 1. Mikroskopska analiza cvasti nevena u prašku sa različitih lokaliteta

Lokalitet	Kikinda	Mokrin	Vrnjačka Banja
Boja praška	Narandžast	Žut	Tamnonarandžast
Karakteristični fragmenti	Kapi ulja narandžaste boje	Kapi ulja žutonarandžaste boje	Kapi ulja tamno narandžaste boje
	Višećelijske mehaničke dlake	Višećelijske mehaničke dlake	Višećelijske mehaničke dlake
	Žlezdane dlake	Žlezdane dlake	Žlezdane dlake
	Okruglasta polenova zrna	Okruglasta polenova zrna	Okruglasta polenova zrna
	Delovi parenhima	Delovi parenhima	Delovi parenhima
		Sprovodni elementi sa kalcijum-ok-salatom	Sprovodni elementi sa kalcijum-oksalatom

Tabela 2. Sadržaj flavonoida (%) u cvasti nevena sa različitih lokaliteta i u komercijalnom uzorku

	Kikinda		Mokrin	Vrnjačka Banja	Komercijalni uzorak
	Septembar	Novembar		Septembar	-
Jezičasti cvetovi	2,76 ± 0,01	1,45 ± 0,01	2,00 ± 0,06	2,16 ± 0,01	2,28 ± 0,01
Cele cvasti	1,68 ± 0,00	1,46 ± 0,00	-	-	-

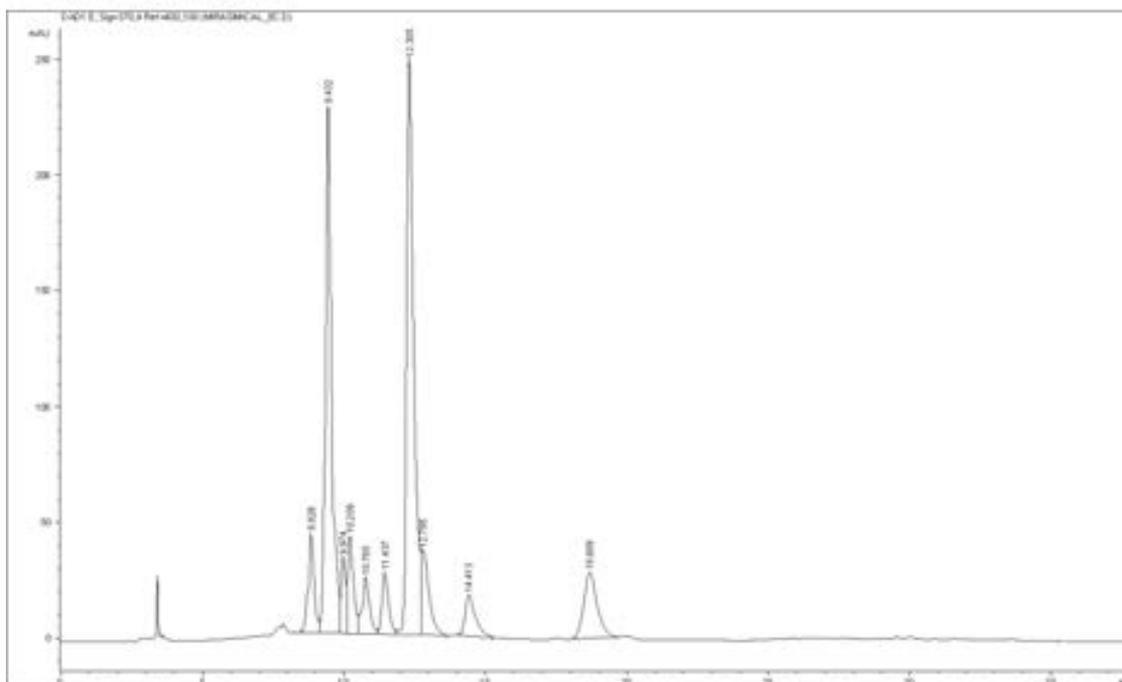
Analiza flavonoida pomoću HPLC metode

Analizom etanolnih ekstrakata cvasti ili jezičastih cvetova HPLC metodom identifikovano je prisustvo flavonoida 3-O-heterozida izoramnetina i kvercetina. U etilacetatnim ekstraktima su, nakon kisele hidrolize heterozida, dokazani flavonoidni aglikoni kvercetin ($t_r = 26,7$ min) i izoramnetin ($t_r = 29,4$ min) (**Grafikon 1**). Kvercetin i izoramnetin su identifikovani u uzorcima jezičastih cve-

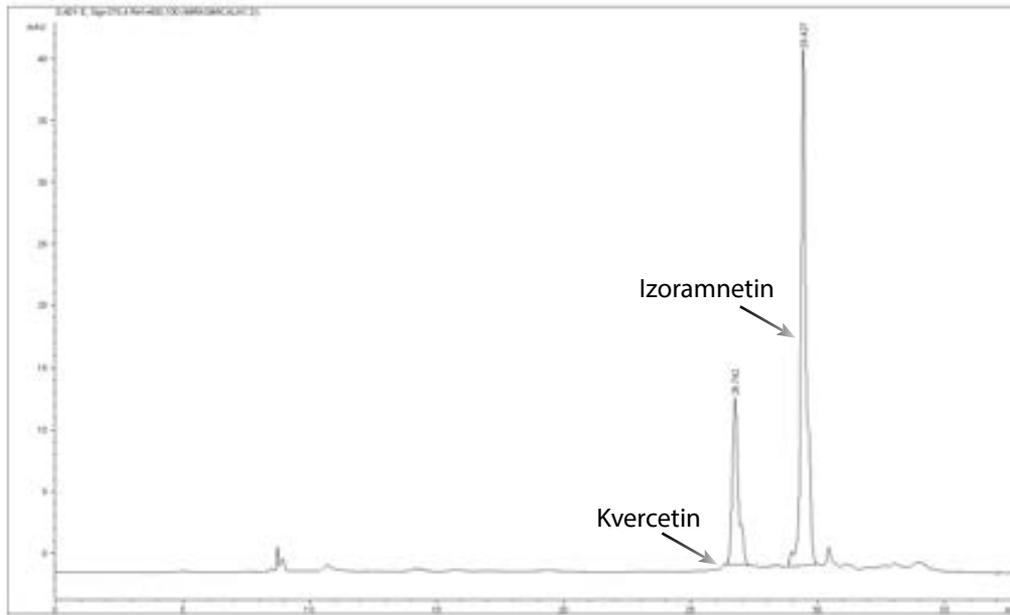
tova nevena sa svih lokaliteta. Hromatogram etanolnog ekstrakta na 370 nm HPLC metodom prikazan je na **Grafikonu 2**.

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etanolnih ekstrakata i tradicionalnih masti na bazi nevena

Etanolni ekstrakti jezičastih cvetova i celih cvasti, kao i tradicionalne masti na bazi jezičastih cvetova nevena



Grafikon 1. HPLC hromatogram etanolnog ekstrakta jezičastih cvetova nevena (1:20) na 370 nm (Kikinda, septembar 2015). Pikovi sa retencionim vremenima od 8,9 do 19,3 min odgovaraju 3-O-heterozidima izoramnetina i kvercetina.



Grafikon 2. HPLC hromatogram etilacetatnog ekstrakta jezičastih cvetova nevena nakon hidrolize heterozida na 370 nm (Kikinda, septembar 2015).

pokazali su antimikrobno delovanje na ispitivane sojeve (Tabela 3.). Etanolni ekstrakti smanjuju rast bakterija *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* i *B. subtilis*. Tradicionalna mast na bazi jezičastih cvetova (3%) inhibirala je rast mikroorganizama *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* i *B. subtilis*. Mast sa većim sadržajem jezičastih cvetova (9%) pokazala je, međutim, slabije antimikrobno delovanje i inhibirala rast bakterija *S. epidermidis*, *E. faecalis* i *P. aeruginosa*, dok je na *B. subtilis* ispoljila bakteriostatski efekat. Mast celih cvasti nevena je pokazala najslabiju aktivnost, inhibirala je samo rast soja *S. epidermidis*. Sve ispitivane masti i etanolni ekstrakti nisu inhibirali rast *C. albicans*.

Diskusija

Sadržaj flavonoida u cvasti nevena, *Calendulae flos*

Ispitivani uzorci su sadržali znatno višu koncentraciju flavonoida (1,45-2,76%) od ranijih istraživanja, gde je sadržaj flavonoida u uzorcima cvasti nevena iz osam evropskih država i Brazila iznosio od 0,21 do 0,68%. (17-18). U prethodnim ispitivanjima, ekstrakti lista i cvasti nevena pokazali su relativno nisku antioksidantnu aktivnost. Ekstrakti različite polarnosti lista ili cvasti nevena (konc. 250-1000 µg/mL) inhibirali su 2,4-11,8% 2,2-difeni-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala i pokazali 7,4-42,2% ukupne redukcionne sposobnosti u testu sposobnosti redukcije

Tabela 3. Antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata i masti na bazi jezičastih cvetova ili celih cvasti nevena izražena kao zona inhibicije (mm)

Mikroorganizam	Zona inhibicije (mm)						
	Etanolni ekstrakt (DER 1:20)		Mast 1	Mast 2	Mast 3	Kontrola	
	jezičasti ^a	cele cvasti	3% ^c	9% ^c	16% ^c	Etanol	Mast
<i>S. aureus</i>	22,0 ± 1,4 ^b	23,5 ± 0,7 ^b	13,5 ± 1,0	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	22,5 ± 0,7 ^b	20,5 ± 0,7 ^b	11,0 ± 0,8	12,0 ± 1,2	14,3 ± 2,4	15,5 ± 0,7 ^b	0
<i>E. faecalis</i>	20,5 ± 0,7 ^b	20,0 ± 0,0 ^b	13,0 ± 1,8	9,25 ± 0,5	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	20,5 ± 0,7 ^b	19,5 ± 0,7 ^b	11,0 ± 1,2	11,5 ± 1,3	0	0	0
<i>B. subtilis</i>	22,5 ± 0,7 ^b	23,5 ± 2,1 ^b	10,8 ± 1,5	9,5 ± 1,0 ^b	0	0	0
<i>C. albicans</i>	0	0	0	0	0	17,0 ± 1,41	0

^a jezičasti cvetovi *C. officinalis*; ^b zone smanjenog rasta; ^c sadržaj jezičastih cvetova ili celih cvasti u masti

feri jona (engl. *Ferric reducing ability of plasma, FRAP*) Najbolja aktivnost uočena je kod ekstrakata sa najvećim sadržajem polifenola i flavonoida i verovatno postoji korelacija između sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida i antioksidantnog delovanja (13).

Analiza flavonoida pomoću HPLC metode

Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim ispitivanjima, gde su utvrđeni heterozidi izoramnetina i kvercetina: rutin, izoramnetin-3-O-rutinozid, 3-O-glukozid izoramnetina, izokvercitrin, kao i kafena, hlorogenska i galna kiselina (7,19).

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etanolnih ekstrakata i tradicionalnih masti na bazi nevena

Etanolni ekstrakti jezičastih cvetova i celih cvasti, kao i tradicionalna mast na bazi jezičastih cvetova nevena (3%) pokazali su isti spektar antimikrobnog delovanja, dok je mast sa većim sadržajem jezičastih cvetova (9%) pokazala slabije antimikrobno delovanje. Razlog za ovakvu aktivnost je verovatno vreme uzorkovanja cvasti nevena, jer je mast sa 9% jezičastih cvetova izrađena od svežeg uzorka iz novembra, a tradicionalna mast sa 3% cvetova od svežeg uzorka iz septembra. Mast celih cvasti nevena pokazala je najslabiju antimikrobnu aktivnost, verovatno zbog korelacije sa sadržajem flavonoida u celim cvastima nevena.

Prethodno objavljeni radovi su pokazali da etanolni ekstrakti cvasti nevena inhibiraju rast mikroorganizama *S. aureus* (19 mm), *B. subtilis* (10 mm), *B. cereus* (10 mm), *E. faecalis* (15 mm), *P. aeruginosa* (10 mm), *Escherichia coli* (14 mm), *Klebsiella pneumoniae* (14 mm), *K. aerogenes* (12 mm) i gljivica *Candida albicans* (9 mm), *Aspergillus flavus* (7 mm) i *A. niger* (9 mm) (11). U istraživanju etanolnih ekstrakata celih cvasti nevena Gojala (*Goyal*) i Matura (*Mathur*) uočena je aktivnost na sojeve *E. coli* (29,4 mm), *P. aeruginosa* (19,2 mm), *C. albicans* (25,6 mm) i *C. pa-*

rapsiosis (26,4 mm) (20). Varijacije u antimikrobnoj aktivnosti etanolnih ekstrakata cvasti nevena u prethodno objavljenim radovima verovatno su posledica različitih ekoloških uslova staništa na kojima su biljke rasle, vreme prikupljanja biljnog materijala, postupaka ekstrakcije, kao i različitih izvora mikroorganizama. Prethodnim istraživanjima Efstratiu (*Efstratiou*) i sar. pokazano je da je metanol bolji rastvarač za ekstrakciju polifenola. Potvrđeno je i da metanolni i etanolni ekstrakti pokazuju antimikrobnu aktivnost, kao i da metanolni ekstrakt cvasti nevena pokazuje veću antimikrobnu aktivnost od etanolnog ekstrakta cvasti nevena (11). Antimikrobno delovanje se verovatno zasniva na aktivnosti flavonoida. Flavonoidna frakcija izolovana iz cvasti nevena inhibirala je rast sojeva *S. aureus*, *Sarcina lutea*, *E. coli*, *K. pneumoniae* i *C. monosa* (21). Iako je u prethodnim istraživanjima uočena antifungalna aktivnost na različite vrste roda *Candida*, u našem ispitivanju etanolni ekstrakti i mast na bazi nevena nisu pokazali delovanje na gljivicu *C. albicans*. S obzirom na to da antimikrobna aktivnost tradicionalnih masti na bazi nevena nije prethodno ispitivana, rezultati dobijeni u ovom radu su važni i za dalje usmeravanje u istraživanju ovakvih tradicionalnih preparata.

Zaključak

Na osnovu makroskopske i mikroskopske analize i određivanja sadržaja flavonoida utvrđeno je da cvast gajenog nevena odgovara zahtevima *Ph. Eur. 7.0*. Ispitivanje sadržaja flavonoida u jezičastim cvetovima ili celoj cvasti nevena prikupljenih tokom septembra pokazalo je da jezičasti cvetovi sadrže više flavonoida od celih cvasti. U novembarskom uzorku, međutim, nije postojala značajna razlika u sadržaju flavonoida. Etanolni ekstrakti i tradicionalne masti na bazi jezičastih cvetova pokazale su antimikrobnu aktivnost na ispitivane sojeve, što potvrđuje dugogodišnju upotrebu nevena u vidu tradicionalnih i farmaceutskih proizvoda.

Literatura

- Gazim ZC, Rezende CM, Fraga SR, Svidzinski TI, Cortez DA. Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (*Asteraceae*) growing in Brazil. *Braz J Microby.* 2008; 39:61-63.
- Gajic M. Rod *Calendula* L. In: Josifović M, editor. Flora SR Srbije VII. Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti; 1975. pp. 170-172.
- Pintea A, Bele C, Andrei S, Socaciu C. HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis.* 2003; 47:37-40.
- Della Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar S, Isaac O. The role of triterpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Medica.* 1994; 60:516-520.
- Vidal-Ollivier E, Elias R, Faure F, Babadjamian A, Crespin, F, Balansard G, et al. Flavonol Glycosides from *Calendula officinalis* flowers. *Planta Medica.* 1989; 55:73-74.
- Bilia AR, Salvini D, Mazzi G, Vincieri FF. Characterization of calendula flower, milk-thistle fruit, and passion flower tinctures by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Chromatographia.* 2001; 53:210-215.
- Butnariu M, Coradini CZ. Evaluation of Biologically Active Compounds from *Calendula officinalis* flowers using spectrophotometry. *Chem Cent J.* 2012; 6:35.
- Tucakov J. Lečenje biljem, 5th ed. Beograd: Rad; 1990. p.514.
- Wichtl M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. 3rd ed. Stuttgart: Medpharm Scientific Publisher; 1994. p.446.
- Arora D, Rani A, Sharma A. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacogn Rev.* 2013; 7(14):179-187.
- Efstratiou E, Hussain AI, Nigam PS, Moore JE, Ayub MA, Rao JR. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complement Ther Clin Pract.* 2012;18(3):173-176.
- Leporatti ML, Ivancheva S. Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *J Ethnopharmacol.* 2003; 87(2-3): 123-142.

13. Ercetin T, Senol FS, Orhan IE, Toker G. Comparative assessment of antioxidant and cholinesterase inhibitory properties of the marigold extracts from *Calendula arvensis* L. and *Calendula officinalis* L. *Ind Crops Prod.* 2012; 36:203–208.
14. European Medicines Agency. Community Herbal Monograph on *Calendula officinalis* L., flos. London: Doc. Ref. EMEA/HMP-C/179281/2007Corr.1.; 2008.
15. Council of Europe. European Pharmacopoeia. 7th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2010.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seventeenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S17. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
17. Raal A, Kirsipuu K. Total flavonoid content in varieties of *Calendula officinalis* L. originating from different countries and cultivated in Estonia. *Nat Prod Res.* 2011; 25(6):658–662.
18. Honório IC, Bonfim FP, Montoya SG, Casali VW, Leite JP, Cecon PR. Growth, development and content of flavonoids in calendula (*Calendula officinalis* L.). *Acta Sci Agron.* 2016; 38(1):69-75.
19. Matysik G, Wójciak-Kosior M, Paduch R. The influence of *Calendulae officinalis* flos extracts on cell cultures, and the chromatographic analysis of extracts. *J Pharm Biomed Anal.* 2005; 38(2):285-92.
20. Goyal M, Mathur R. Antimicrobial effects of *Calendula officinalis* against human pathogenic microorganisms. *J Herbal Med Tox.* 2011; 5(1):97-101.
21. (21) Ríos JL, Recio MC, Villar A. Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. *J Ethnopharmacol.* 1987; 21:139–152.

Protektivni uticaj N-acetil-L-cisteina na efekte stimulacije metioninom u kolonu pacova

Protective impact of N-acetyl-L-cysteine on methionine stimulatory effects in rat colon

Lara Hadži Tanović¹, Dušan Todorović¹, Marija Stojanović^{1,2}, Ljiljana Šćepanović^{1,2}, Dragan Đurić^{1,2}

¹ Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

² Institut za medicinsku fiziologiju "Rihard Burijan"

Kontakt: laralaki95@gmail.com

Sažetak

Uvod: Metionin je sumporsta esencijalna aminokiselina koja, prema brojnim studijama, ima ulogu da smanji zapaljenje izazvano promenama u debelom crevu i inhibira važne puteve u razvoju brojnih gastrointestinalnih poremećaja. Suphronično opterećenje ovom aminokiselinom, međutim, dovodi do oksidativnog stresa koji je potencijalni uzročnik oboljenja brojnih organa, između ostalog i digestivnog trakta. N-acetil-L-cistein je prirodni antioksidans koji utiče na neke od važnih signalnih puteva, a poseduje i potencijalnu terapijsku ulogu u lečenju promena na kolonu.

Cilj: Ispitati uticaj N-acetil-L-cisteina na histološke parametre kolona pacova nakon suphroničnog opterećenja metioninom.

Materijal i metode: Eksperimenti su izvedeni na pacovima Vistar albino (*Wistar albino*) muškog pola, telesne mase 160 g i starosti 15-20 dana. U eksperimentu su korišćene 24 životinje podeljene u 3 grupe, sa po osam životinja u svakoj grupi. Prvoj, kontrolnoj grupi (K) aplikovan je *i.p.* natrijum-hlorid (NaCl), drugoj metionin (M grupa), a trećoj metionin + N-acetil-L-cistein (N grupa). Pacovi su nakon 21. dana lečenja žrtvovani i dobijeni su uzorci tkiva kolona. U sve tri navedene grupe analizirane su histološke promene u kolonu.

Rezultati: Opterećenje metioninom dovodi do statistički veoma ($p < 0,01$) značajnog uvećanja dubine kripti u kolonu pacova, debljine lamine muskularis mukoze, debljine tunike mukoze, kao i gustine ćelija lamine proprije tunike mukoze u poređenju sa kontrolnom grupom, dok primena N-acetil-L-cisteina pokazuje veoma ($p < 0,01$) značajno smanjenje ovih histoloških parametara u odnosu na M grupu.

Zaključak: N-acetil-L-cistein ima značajno protektivno dejstvo na promene u kolonu pacova izazvane opterećenjem metioninom.

Ključne reči: N-acetil-L-cistein, metionin, kolon, pacov

Abstract

Introduction: Methionine is an essential sulfuric amino acid, which, according to numerous studies, has a role in the reduction of inflammation, caused by changes in colon, and inhibits important pathways in the development of numerous gastrointestinal disorders. However, subchronic methionine loading leads to oxidative stress, which is a potential cause of disease of numerous organs, digestive tract being one of them. N-acetyl-L-cysteine is a natural antioxidant, which affects some of the important signaling pathways and has a potential therapeutic role in treatment of colon disorders.

Aim: To examine the influence of N-acetyl-L-cysteine on histological parameters of rat colon, after subchronic methionine load.

Material and methods: Experiments were conducted on 15-20 days old male (*Wistar albino*) rats, weighing 160 g. There were used 24 animals in the experiment, divided into 3 groups, with eight animals per group. First, control group (K), received NaCl, second group received methionine (M group), while third group received methionine + N-acetyl-L-cysteine (N group). The rats were sacrificed after 21 day and tissue samples of colon were obtained. In all of the three groups, changes of histological parameters of rat colon were analyzed.

Results: Methionine load leads to statistically significant increase ($p < 0.01$) in crypt depth of rat colon, lamina muscularis mucosae thickness, the mucosal thickness and increase in lamina propria cell density compared to control, while N-acetyl-L-cysteine application showed statistically significant decrease ($p < 0.01$) of these histological parameters compared to M group.

Conclusion: N-acetyl-L-cysteine has a significantly protective effect on methionine load induced changes in rat colon.

Key words: N-acetyl-L-cysteine, methionine, colon, rat

Uvod

Metionin je esencijalna aminokiselina koja u reakcijama transmetilacije daje homocistein (Hcy) i cistein (Cis). Potrebna količina metionina u organizmu održava se zahvaljujući remetilaciji homocisteina (1). Homocistein je semiesencijalna aminokiselina koja sadrži sumpor i ima značajnu ulogu u metabolizmu prekursora nukleinskih kiselina (2). Metionin je važan metil donor za većinu bioloških reakcija metilacije. Ova aminokiselina je takođe prekursor za sintezu cisteina, koji igra ključnu ulogu u održavanju funkcije proteina i redukciono-oksidativnog (skr. redoks) statusa ćelije. Metionin služi i kao indirektni prekursor glutationa (GSH), taurina i neorganskog sumpora, koji su važni celularni antioksidansi (3).

Promene u metabolizmu metionina mogu da dovedu do povećanja koncentracije homocisteina (hiperhomocisteinemija), koja proizvodnjom slobodnih radikala pokreće zapaljenjske procese i oksidativni stres. Brojne studije su pokazale povezanost povišene koncentracije homocisteina sa razvojem mnogih bolesti, kao što su kardiovaskularna oboljenja, hronična bubrežna insuficijencija i cerebrovaskularni poremećaji (4, 5). Pored toga, oksidativni stres, kao značajan parametar hiperhomocisteinemije, predstavlja jedan od ključnih faktora u patogenezi gastrointestinalnih bolesti mukoze, kao što su ulcerozni kolitis i rak debelog creva povezan sa kolitisom. Zabeleženo je da su kod pacijenata sa inflamatornim oboljenjem creva (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD), nivoi Hcy u plazmi i sluznici debelog creva povećani (6, 7). Pored svoje osnovne funkcije varenja i apsorpcije, crevna sluznica čini odbrambenu barijeru od otrovnih i štetnih materija, na taj način štiteći pojedinca od različitih antigena inflamatorne reakcije. Eksperimentalni dokazi iz životinjskih modela ukazuju na to da je izmenjena funkcija crevne barijere potencijalni uzrok za nastanak intestinalne i ekstraintestinalne inflamacije.

Inflamatorne bolesti creva, uključujući Kronovu bolest (engl. *Crohn's disease*, CD) i ulcerozni kolitis (engl. *ulcerative colitis*, UC), složeni su poremećaji koje karakterišu hronična, lokalna i sistemska inflamacija, kao i spontani relapsi (8). Veliki broj dokaza pokazuje da se, kao posledica inflamirane sluznice, u većem broju proizvode oksidativni derivati i reaktivne vrste kiseonika (engl. *reactive oxygen species*, ROS), koji mogu da učestvuju u patogenezi IBD (9, 10). Imajući u vidu strukturnu i funkcionalnu sličnost između vaskularnih endotelnih i crevnih epitelnih ćelija, pretpostavili smo da je povišen nivo Hcy u plazmi i sluznici kolona uključen u patofiziološki proces IBD preko uticaja na crevnu permeabilnost.

U borbi protiv slobodnih radikala, izazvanih oksidativnim stresom, značajnu ulogu igraju dva antioksidansa:

glutation, koji predstavlja jedan od krajnjih proizvoda metionina i N-acetil-L-cistein (NAC). N-acetil-L-cistein je aminotiolna kiselina, koja predstavlja sintetički proizvod L-cisteina, a značajan je prekursor za sintezu glutationa. Dosadašnja istraživanja pokazuju protektivno, antiinflamatorno i antioksidativno dejstvo NAC na eksperimentalno izazvan kolitis kod pacova (11, 12). N-acetil-L-cistein može da utiče na nekoliko signalnih puteva, uključujući apoptozu, angiogenezu, rast ćelija, redoks regulisanu gensku ekspresiju i inflamatorni odgovor (13, 14). Studija sprovedena na humanoju populaciji pokazala je da primena NAC poboljšava oksidativni status pacijenata posle hirurških zahvata u abdomenu, što ukazuje na značaj kliničke primene ove supstance (15). Cilj ovog rada bio je da ispita uticaj NAC na histološke promene u tkivima digestivnog trakta pacova u uslovima suphronične stimulacije metioninom.

Materijal i metode

Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćeni mužjaci Vistar albino (*Wistar albino*) pacova, telesne mase oko 160 g i starosti 15-20 dana na početku eksperimenta (Vivarijum Vojnomedicinske akademije u Beogradu). Pacovi su čuvani pojedinačno u transparentnim kavezima od pleksiglasa sa dnom obloženim šuškom, hranom i vodom dostupnom *ad libitum* i konstantnim ambijentalnim uslovima (temperatura $21 \pm 2^\circ\text{C}$; vlažnost $55 \pm 5\%$; ciklus svetlo-tama na 12 h sa početkom svetlog perioda u 7:30 h).

Eksperimentalni protokol

Pacovima je 21 dan intraperitonealno aplikovan metionin. Životinje su podeljene u tri grupe (sa po 8 životinja u grupi) i tretirane su prema sledećem režimu: 1. kontrolna grupa - K (0,9% NaCl 1 mL/dan); 2. metionin - M (0,8 mmol/kg/tm/dan); 3. metionin (0,8 mmol/kg/tm/dan) + NAC - N (50 mg/kg/tm/dan) (39). Vrednosti homocisteina su određivane pre početka i na kraju eksperimenta. Posle 21. dana tretmana životinje su žrtvovane giljotinom za pacove, a potom je hirurški izolovan kolon. Tkiva za histošku analizu su odlagana u pripremljene posude sa formalinom i čuvane su na sobnoj temperaturi.

Histološka analiza

Uzorci tkiva kolona su fiksirani u 4% pufersanom rastvoru formalina i kalupljeni u parafinu. Analiza ovih tkiva je rađena na preparatima bojenim hematoksilinom/eozinom. Za analizu je korišćen svetlosni mikroskop *Olympus BX41 sa Olympus C5060-ADU "wide zoom"* kamerom. Uz pomoć kompjuterskog morfometrijskog pro-

Originalni radovi

grama Fiji izvršena su merenja histoloških parametara na fotografijama histoloških preparata (16). Merene su dimenzije sledećih parametara (izražene u μm): dubina kripti, debljina lamine muskularis mukoze, debljina tunike mukoze, debljina zida kolona i gustina ćelija u lamini proprijii tunike mukoze (izražena kao broj ćelija $0,1 \text{ mm}^2$).

Statistička analiza

Statistička analiza podataka izvršena je upotrebom kompjuterskog programa *GraphPad Prism 5*. Od metoda analitičke statistike za poređenje numeričkih obeležja posmatranja između dve grupe korišćen je Studentov t-test. Vrednost $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom, a vrednost $p < 0,01$ veoma značajnom. Vrednosti ispitivanih parametara su izražene kao srednja vrednost \pm standardna greška.

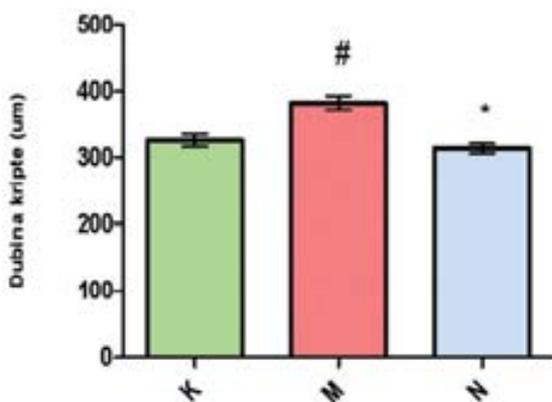
Rezultati

Dubina kripti u kolonu pacova

Opterećenje metioninom dovodi do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) porasta dubine kripti ($M = 382,4 \pm 11,5 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 325,8 \pm 9,6 \mu\text{m}$) – povećanje za 17,4% u odnosu na K. Primenom NAC u uslovima opterećenja metioninom došlo je do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) smanjenja dubine kripti ($N = 313 \pm 8,6 \mu\text{m}$) – smanjenje za 18,06% u odnosu na M (Grafikon 1).

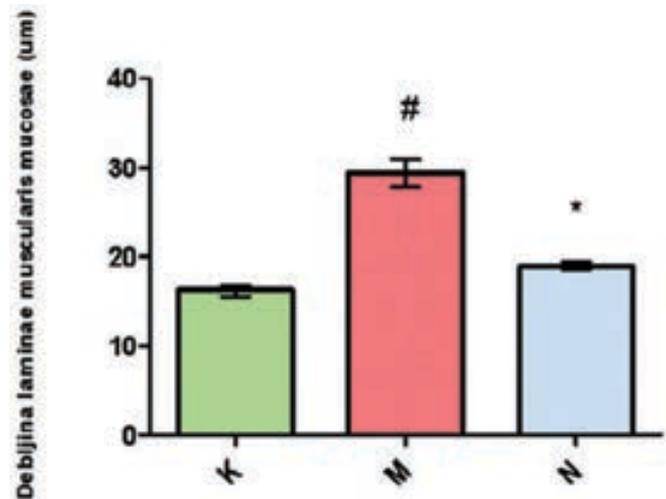
Debljina lamine muskularis mukoze kolona pacova

Opterećenje metioninom dovodi do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) porasta debljine lamine muskularis mukoze u kolonu pacova ($M = 29,4 \pm 1,6 \mu\text{m}$) u odnosu na



Grafikon 1. Dubina kripti kolona pacova usled opterećenja metioninom (M) i primenom N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom (N) #Statistički visoko značajan ($p < 0,01$) porast dubine kripti u odnosu na kontrolnu grupu (K). *Statistički visoko značajan ($p < 0,01$) smanjenje dubine kripti u odnosu na M. Vrednosti su testirane Studentovim t testom.

kontrolnu grupu ($K = 16,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$) – povećanje za 81,5% u odnosu na K. Primenom NAC u uslovima opterećenja metioninom došlo je do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) smanjenja debljine lamine muskularis mukoze kolona ($N = 19 \pm 0,5 \mu\text{m}$) – smanjenje za 34,5% u odnosu na M (Grafikon 2).



Grafikon 2. Debljina lamine muskularis mukoze pacova usled opterećenja metioninom (M) i primenom N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom (N) #Statistički veoma značajan ($p < 0,01$) porast debljine lamine muskularis mukoze u odnosu na kontrolnu grupu (K). *Statistički veoma značajno ($p < 0,01$) smanjenje debljine lamine muskularis mukoze u odnosu na M. Vrednosti su testirane Studentovim t-testom.

Debljina tunike mukoze kolona pacova

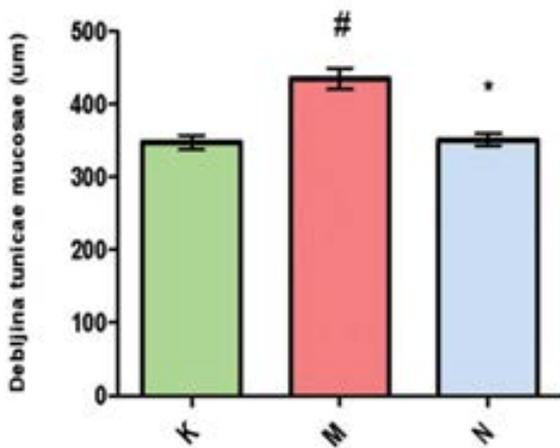
Opterećenje metioninom dovodi do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) porasta debljine tunike mukoze kolona pacova ($M = 435,2 \pm 14,4 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 347,4 \pm 9,7 \mu\text{m}$) – povećanje za 25,6% u odnosu na K. Primenom NAC u uslovima opterećenja metioninom došlo je do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) smanjenja debljine tunike mukoze kolona pacova ($N = 352 \pm 9,1 \mu\text{m}$) – smanjenje za 19,08% u odnosu na M (Grafikon 3).

Ukupna debljina zida kolona pacova

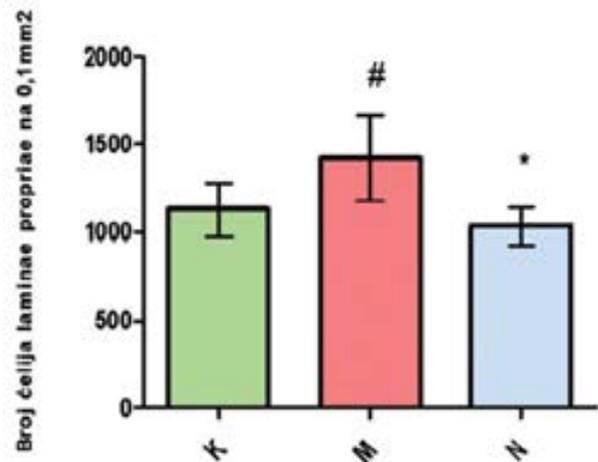
Opterećenje metioninom nije dovelo do statistički značajnih promena ukupne debljine zida kolona pacova ($M = 722,7 \pm 90,8 \mu\text{m}$) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 705,0 \pm 69,6$) – povećanje za 2,5% u odnosu na K (Grafikon 4).

Gustina ćelija u lamini proprijii tunike mukoze kolona pacova

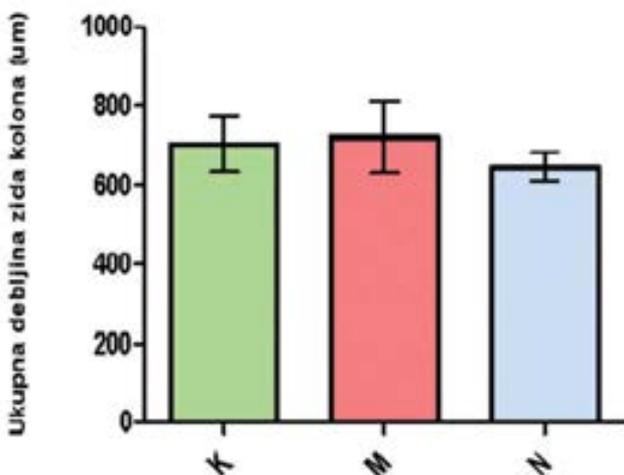
Opterećenje metioninom dovodi do statistički veoma značajne ($p < 0,01$) promene gustine ćelija u lamini proprijii tunike mukoze kolona pacova ($M = 1419 \pm 56$ ćelija/ mm^2) u odnosu na kontrolnu grupu ($K = 1126 \pm 28$ ćelija/



Grafikon 3. Debljina tunike mukoze kolona pacova usled opterećenja metioninom (M) i primenom N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom (N) #Statistički veoma značajan ($p < 0,01$) porast debljine tunike mukoze u odnosu na kontrolnu grupu (K). *Statistički veoma značajno ($p < 0,01$) smanjenje debljina tunike mukoze u odnosu na M. Vrednosti su testirane Studentovim t-testom.



Grafikon 5. Broj ćelija lamine proprije kolona pacova usled opterećenja metioninom (M) i primenom N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom (N) #Statistički veoma značajan ($p < 0,01$) porast broja ćelija lamine proprije u odnosu na kontrolnu grupu (K). *Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje broja ćelija lamine proprije u odnosu na M. Vrednosti su testirane Studentovim t-testom.



Grafikon 4. Debljina zida kolona pacova usled opterećenja metioninom (M) i primenom N-acetil-L-cisteina u uslovima opterećenja metioninom (N). Opterećenje metioninom ne dovodi do statistički značajnih promena ukupne debljine zida kolona pacova u odnosu na kontrolnu grupu (K). Vrednosti su testirane Studentovim t-testom.

mm²) – povećanje za 26,0% u odnosu na K. Primenom NAC u uslovima opterećenja metioninom došlo je do statistički značajnog ($p < 0,05$) smanjenja gustine ćelija u lamini propriji tunike mukoze kolona pacova ($N = 996,16 \pm 55$ ćelija/mm²) – smanjenje za 29,8% u odnosu na M (**Grafikon 5**).

Diskusija

In vitro i *in vivo* studija na pacovima pokazala je alteraciju parametara oksidativnog stresa nakon primene metionina

(17). Oksidativni stres ima važan uticaj na zapaljenje preko aktiviranja redoks osetljive transkripcije faktora poput nuklearnog faktora kB (NF - kB) i aktivatora proteina 1, koji regulišu ekspresiju ključnih gena tako što kodiraju proinflamatorne medijatore i zaštitne antioksidativne proteine (18). Rezultati našeg rada zabeležili su značajan porast vrednosti histoloških parametara u M u odnosu na K grupu kolona pacova, pa možemo pretpostaviti da je jedan od uključenih mehanizama i oksidativni stres.

Pokazano je da interleukin 6 (IL-6) i faktor nekroze tumora (TNF-a) igraju važnu ulogu u patogenezi inflamatornog oboljenja creva (19). Ovi proinflamatorni citokini utiču na aktiviranje i angažovanje inflamatornih ćelija pojačavajući proizvodnju drugih proinflamatornih citokina, aktivirajući faktore nuklearne transkripcije i promovišući održavanje inflamatornog odgovora (20). Najveći uticaj metionina u našoj studiji zabeležen je u debljini zida lamine muskularis mukoze kolona pacova, gde je došlo do statistički veoma značajnog ($p < 0,01$) porasta (za 81,5%) u M u odnosu na K grupu. Porast vrednosti u odnosu na kontrolnu grupu primećen je i u dubini kripti kolona pacova, debljini tunike mukoze i gustini ćelija lamine proprije tunike mukoze, što potvrđuje hipotezu naše studije.

Kao što smo već pomenuli, promene u metabolizmu metionina dovode do oksidativnog stresa i zapaljenjskih procesa. N-acetil-L-cistein se koristi kao antioksidant *in vivo* i *in vitro* (21), što nas je navelo da preispitamo njegove efekte. On deluje kao direktni ROS sakupljač, a indirektno poseduje antioksidativno dejstvo. Prethodne studije su pokazale zaštitni efekat NAC protiv toksičnosti hemikalija, usled svoje dvostruke uloge kao nukleofila i -SH donora (22).

U našem eksperimentu NAC pokazuje najveće promene u okiru lamine muskularis tunike mukoze kolona pacova, koja pokazuje statistički veoma značajno smanjenje za 34,5% u grupi N u odnosu na M. Ovaj podatak ukazuje da se NAC uključuje u zaštitu protiv štetnih oksidansa, ali takođe otvara pitanje antiinflamatornog svojstva ove aminokiseline. Antioksidativni kapacitet NAC pokazan je i u modelu hroničnog oštećenja jetre kod pacova (23). Statistički značajne promene zapazili smo i u okviru dubine kripte, debljine tunike mukoze i gustine ćelija lamine proprije tunike mukoze kolona pacova. Primenom NAC dokazali smo da ova aminokiselina utiče na smanjenje povećanih histoloških parametara kolona, potencijalno izazvanih oksidativnim stresom.

Literatura

- Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: Pathways and regulation. *Eur J Pediatr.* 1998;157:40-44.
- Brosnan JT, Brosnan ME. The Sulfur-Containing Amino Acids: An overview. *J Nutr.* 2006;136:1636-1640.
- Jordao AA, Domenici FA, Lataro RC, Portari GV, Vannucchi H. Effect of methionine load on homocysteine levels, lipid peroxidation and DNA damage in rats receiving ethanol. *Braz J ourl of Pharm Sci.* 2009;45(4):709-714.
- Kang SS, Wong PWK, Malinow MR. Hyperhomocyst(e)inemia as a risk factor for occlusive vascular disease. *Ann Rev Nutr.* 1992;12:279-298.
- Lentz SR. Homocysteine and vascular dysfunction. *Life Sci.* 1997;61:1205-1215.
- Morgenstern I, Raijmakers MT, Peters WH, Hoensch H, Kirch W. Homocysteine, cysteine, and glutathione in human colonic mucosa: elevated levels of homocysteine in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2003;48(10):2083-2090.
- Danese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scaldaferrri F, Fedeli G et al. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2005;11(46):7227-7236.
- Stadnicki A, Colman RW. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2003;51:149-155.
- Keshavarzian A, Morgan G, Sedghi S, Gordon JH, Doria M. Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut.* 1990;31:786-790.
- Millar AD, Rampton DS, Chander CL, Claxson AW, Blades S, Coumbe A, Panetta J, Morris CJ, Blake DR. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut.* 1996;39:407-415.
- Nosál'ová V, Cerná S, Bauer V. Effect of N-acetylcysteine on colitis induced by acetic acid in rats. *Gen Pharmacol.* 2000;35(2):77-81.
- Uraz S, Tahan G, Aytekin H, Tahan V. N-acetylcysteine expresses powerful anti inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats. *Scand J Clin Lab Invest.* 2013;73(1):61-66.
- Sadowska AM, Manuel-y-Keenoy B, De Backer WA. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: Discordant in vitro and in vivo dose-effects. *Pulm Pharmacol Ther.* 2007;20:9-22.
- Arakawa M, Ito Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases. *Basic and clinical pharmacology. Cerebellum.* 2007;6:308-314.
- Kuyumcu A, Akyol A, Buyuktuncer Z, Ozmen MM, Besler HT. Improved oxidative status in major abdominal surgery patients after N-acetyl cysteine supplementation. *Nutr J.* 2015;14:4-8.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-682.
- Costa MZ, da Silva TM, Flores NP, Schmitz F, da Silva Scherer EB, Viau CM, et al. Methionine and methionine sulfoxide alter parameters of oxidative stress in the liver of young rats: in vitro and in vivo studies. *Mol Cell Biochem.* 2013;384(1-2):21-28.
- Keshavarzian A, Morgan G, Sedghi S, Gordon JH, Doria M. Role of reactive oxygen metabolites in experimental colitis. *Gut.* 1990;31:786-790.
- Pedespan L. Febrile seizures. *Arch Pediatr* 2007;14:394-398.
- Steering Committee on Quality Improvement and Management. Febrile Seizures: Clinical Practice Guideline for the Long-term Management of the Child with Simple Febrile Seizures. 2008;121(6):1281-1286.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004;134:489-492.
- Sridharan S, Nalini R, Shyamala DCS. In vitro evaluation of the anticancer effect of N-acetylcysteine on oral carcinoma cell line. *Indian J Pharmacol.* 2001;33:343-349.
- Demiroren K, Dogan Y, Kocamaz H, Ozercan IH, Ilhan S, Ustundag B et al. Protective effects of L-carnitine, N-acetylcysteine and genistein in an experimental model of liver fibrosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2014;38(1):63-72.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata možemo da zaključimo da NAC ima značajno protektivno dejstvo na promene u kolonu pacova izazvane opterećenjem metioninom. Ova činjenica govori u prilog eventualnoj kliničkoj primeni NAC u terapiji bolesti digestivnog trakta.

ZAHVALNOST:

Zahvalnost Ministarstvu za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Srbije, koje je podržalo ovu studiju. Projekat broj 175043

Osetljivost sojeva grupe B streptokoka, izolovanih kod trudnica u Beogradu, na antibiotike

The sensitivity to antibiotics of strains of group B streptococcus isolates from pregnant women in Belgrade

Luka Jovanović¹, Katarina Isailović¹, Vera Mijač^{1,2}

¹ Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

² Mentor: Institut za mikrobiologiju i imunologiju

Sažetak

Uvod: Streptokok grupe B je značajan humani patogen koji kolonizuje vaginu i jedan je od najznačajnijih izazivača rane neonatalne sepse i meningitisa. U mnogim zemljama se sprovode skrining trudnica i intrapartalna upotreba antibiotika. Rezistencija streptokoka grupe B na linkozamide (klindamicin) i makrolide predstavlja značajan problem jer su oni terapija drugog izbora kod alergije na penicilin.

Cilj: Naš cilj je bio određivanje rezistencije streptokoka grupe B na antibiotike i detekcija fenotipova makrolidne rezistencije na uzorku dobijenom od trudnica na teritoriji Beograda.

Materijal i metode: U istraživanje je uključeno 105 izolata. Uzorci vaginalnih briseva od trudnica iz porodilišta Ginekološko-akušerske klinike „Narodni front“ i Ginekološko-akušerske klinike Kliničkog centra Srbije presejavani su na krvni i Miler Hinton agar radi daljih bakterioloških analiza i izrade antibiograma.

Rezultati: Rezistencija na makrolide nađena je kod 30,4% izolata, a na klindamicin kod 23,8%. Nađena je velika učestalost rezistencije na tetracikline (88,6%). Dominantan fenotip rezistencije je bila izazvana udružena rezistencija na makrolide i linkozamide (MLS) (62,4%).

Zaključak: Velika učestalost makrolidne rezistencije kod nas ukazuje na značaj daljeg praćenja ove pojave kod streptokoka grupe B.

Ključne reči: Streptokok grupe B, makrolidna rezistencija, trudnice

Abstract

Introduction: Group B streptococcus (GBS) is a significant human pathogen. GBS colonizes the vagina and it is one of the most important causes of early neonatal sepsis and meningitis. In many countries, screening of pregnant women and intrapartal use of antibiotics are common practice. Macrolide and lincosamide resistant strains of GBS are a significant problem, because these antibiotics are the second line therapy in case of penicillin allergy.

Aim: Our aim was to investigate the frequency of antibiotic resistant strains of GBS and to detect macrolide resistance phenotypes in GBS strains obtained from pregnant women in Belgrade.

Material and Methods: 105 GBS isolates were obtained from vaginal swabs of pregnant women attending two Gynecology and Obstetrics Centers in Belgrade. The isolates were tested for antimicrobial susceptibility pattern and D test were performed on Mueller Hinton agar.

Results: Macrolide and lincosamide resistance was found in 30.4 %, and 23.8 % of isolates, respectively. There was a high frequency of tetracycline resistant strains (88.6 %). Most frequent macrolide resistant phenotype was iMLSb (macrolide and inducible lincosamide resistance) (62.4%).

Conclusion: The results of our study indicate that there is a high level of macrolide resistance among GBS isolates in Serbia and the active surveillance is needed.

Key words: Group B streptococcus, macrolide resistance, pregnancy

Uvod

Streptokok grupe B (GBS) značajan je humani patogen. Kolonizuje vaginu i predstavlja jedan od najznačajnijih izazivača rane sepse i meningitisa kod novorođenčadi. Od 3,6% do 36% trudnica u Evropi kolonizovano je GBS-

om, a u južnoj Evropi učestalost kolonizacije kreće se od 6,5% do 32% (1). U mnogim zemljama se sprovodi rutinski skrining trudnica na GBS kolonizaciju vagine između 35. i 37. nedelje gestacije. Trudnice pozitivne na GBS će intrapartalno primiti intravensku dozu antibiotika (4 sata pre samog porođaja) (2). Terapija izbora u ovom slučaju



Šema 1. Mehanizmi nastanka makrolidne rezistencije kod streptokoka grupe B

je penicilin, a ukoliko su pacijentkinje alergične, sa malim rizikom od anafilakse, kao lek izbora preporučuju se cefalosporini. Ukoliko postoji rizik od anafilakse terapija izbora je klindamicin ili makrolidi (2).

U mnogim zemljama postoji klinički značajan problem rezistencije na makrolide i izazvane rezistencije na klindamicin, tako da su sadašnji stavovi Centra za kontrolu bolesti i prevenciju SAD (engl. *Center for Disease Control and Prevention*, CDC) da se svakoj trudnici u sklopu testiranja na GBS radi i D-test, kojim se detektuju fenotipovi rezistencije streptokoka na makrolide (Šema 1): M (rezistencija postoji samo na makrolide), izazvani MLSb (rezistencija na linkozamide u prisustvu makrolida i rezistencija na makrolide) i konstitutivni MLSb (rezistencija na linkozamide i u odsustvu makrolida, uz rezistenciju na makrolide) (2).

Autori iz Južne Afrike pominju i L-fenotip, koji se karakteriše izolovanom rezistencijom na klindamicin (linkozamide) (3).

Cilj ovog rada je ispitivanje učestalosti rezistentnih sojeva GBS-a izolovanih kod trudnica na teritoriji Beograda, registrovanim u dva najveća porodilišta u Srbiji (Ginekološko-akušerska klinika Kliničkog centra Srbije i Ginekološko-akušerska klinika „Narodni front“) i detekcija profila makrolidne rezistencije.

Materijal i metode

U periodu od 6.8.2015. do 31.12.2015. godine prikupljeno je 105 sojeva GBS-a izolovanih iz vaginalnih briseva trudnica između 35. i 37. nedelje gestacije na Ginekološko-akušerskoj klinici Kliničkog centra Srbije (GAK KCS) i GAK „Narodni front“ u Beogradu. Izolati GBS-a su potom slati u Nacionalnu referentnu laboratoriju za streptokok u Beogradu, gde su presejavani na krvni agar radi daljih analiza. Ispitivanje antimikrobne rezistencije je rađeno na Miler Hinton agaru sa dodatom 5% ovčije krvi metodom disk difuzije. Testirani antibiotici su bili penicilin, eritromicin, klindamicin, norfloksacin, tetraciklin i vankomicin (*Bio Rad*, SAD). Rađen je i D-test prema preporukama CDC (2). To je modifikacija disk difuzi-

onog metoda antibiograma i izvodi se tako što su tablete eritromicina i klindamicina postavljane na 15 mm radi detekcije eventualne izazvane rezistencije na klindamicin. D-testom je bilo moguće detektovati 3 fenotipa makrolidne rezistencije GBS-a: M, inducibilni i konstitutivni MLSb fenotip. Rezultati disk difuzije su interpretirani prema CLSI standardima (Institut za kliničke i laboratorijske standarde) (4) (2015).

Rezultati

Među testiranim sojevima 32 su bila rezistentna na makrolide (30,4%). Rezistencija na klindamicin je nađena kod 24 soja (23,8%), na norfloksacin kod 2%, dok je rezistencija na tetracikline bila prisutna kod čak 88,6% sojeva. Svi izolati su bili osetljivi na peniciline i cefalosporine. Registrovano je 29,5% multirezistentnih sojeva (klasična definicija multirezistentnosti je da je ispitivani soj *in vitro* pokazao rezistenciju na tri ili više klasa antibiotika) (5).

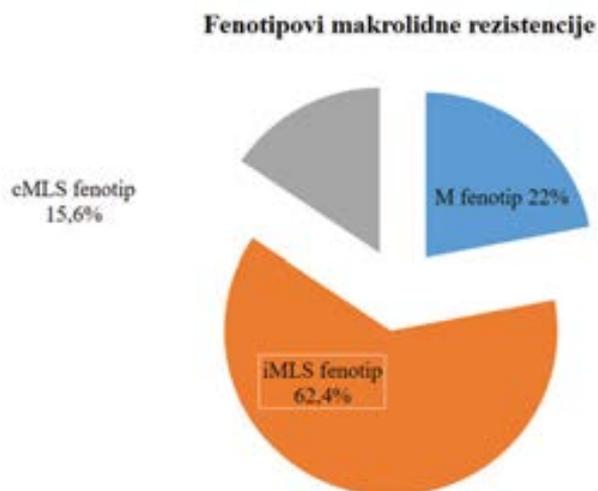
Dominantan fenotip makrolidne rezistencije bio je MLSb, koji je uočen kod 78% rezistentnih sojeva (Grafikon 1): iMLSb fenotip je bio češći od cMLSb fenotipa (62,4% iMLSb i 15,6% cMLSb). M-fenotip je uočen kod 22% rezistentnih sojeva. Interesantno je da je 85% sojeva, registrovanih kao cMLSb fenotip, bilo korezistentno i na tetracikline.

Diskusija

Svi sojevi su bili osetljivi na peniciline i cefalosporine, zbog čega bi se ovi lekovi preporučili kao terapija prvog izbora kada god je to moguće.

U ovoj studiji je uočeno da je skoro trećina ispitivanih uzoraka rezistentna na makrolide, pri čemu je najčešći iMLSb fenotip.

U Evropi se učestalost rezistencije na eritromicin i klindamicin razlikuje od zemlje do zemlje. Prosečna vrednost učestalosti makrolidne rezistencije u Evropi iznosi oko 16% (6). Više stope rezistencije na makrolide i klindamicin prisutne su u zemljama Južne i Istočne Evrope: (Portugal: 23% i 18%) (7), (Španija: 13% i 12%) (8), (Poljska: od



Grafikon 1. Stope učestalosti fenotipova makrolidne rezistencije streptokoka grupe B

18-25% i 12-20%) (6,9), (Rumunija: 19% i 18%) (10), (Italija: 14,5% i 8,2%) (11). Učestalost rezistencije u Holandiji (8% rezistentnih sojeva na makrolide i 7% rezistentnih sojeva na klindamicin) (12) i Nemačkoj (11% i 4,7%) (13), međutim, značajno je niža od evropskog proseka. Sa učestalošću rezistencije na makrolide i klindamicin od 30,4% i 23,8% Srbija je značajno iznad evropskog proseka. U Srbiji dominira izazvani MLSb fenotip, dok s druge strane u svim evropskim zemljama dominira cMLSb fenotip (6-12). Treba da se napomene da je obrađivan uzorak mali i daleko od reprezentativnog za celu zemlju. Stoga je možda realna učestalost cMLSb fenotipa mnogo veća, što

Literatura:

- Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008; 87: 260-271.
- Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010; 59: 1–34.
- John Y. Bolukaoto, Charles M. Monyama, Martina O. Chukwu, Sebotse M. Lekala, Maphoshane Nchabeleng, Motlatji R. B. Maloba et al. Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* isolated from pregnant women in Garankuwa, South Africa. *BMC Res Notes.* 2015; 8:364.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 25th Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA:CLSI; 2015.
- Critchley IA, Draghi DC, Sahn DF, Thornsberry C, Jones ME, Karlowsky JA. Activity of daptomycin against susceptible and multidrug-resistant Gram-positive pathogens collected in the SECURE study (Europe) during 2000–2001. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 639–649.
- Pruss A, Galant K, Giedrys-Kalemba S. Analysis of screening tests for *Streptococcus agalactiae* in pregnant women from the West Pomeranian region, *Ginekolog Pol.* 2015; 86: 616-621.
- Florindo C, Damiao V, Silvestre I. Epidemiological surveillance of colonising group B *Streptococcus* epidemiology in the Lisbon and Tagus Valley regions, Portugal (2005 to 2012): emergence of a new epidemic type IV/clonal complex 17 clone. *Euro Surveill.* 2014; 19(23).
- Gonzalez JJ, Andreu A. Multicenter Study of the Mechanisms of Resistance and Clonal Relationships of *Streptococcus agalactiae* Isolates Resistant to Macrolides, Lincosamides, and Ketolides in Spain. *Antimicrob Agent Chemother.* 2005; 49: 2525-2527.
- Sadowy E, Matynia B, Hryniewicz W. Population structure, virulence factors and resistance determinants of invasive, non-invasive and colonizing *Streptococcus agalactiae* in Poland. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 1907-1914.
- Usein CR, Petrini A, Georgescu R. Group B streptococcus colonization of Romanian women: phenotypic traits of isolates from vaginal swabs. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 2009; 68: 235-239.
- De Francesco MA, Caracciolo S, Gargiulo F, Manca N. Phenotypes, genotypes, serotypes and molecular epidemiology of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31: 1741-1747.
- Muller AE, Valkenburg-van den Berg AW, Kreft D. Low rate of carriage of macrolide-resistant group B streptococci in pregnant women in The Netherlands. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008; 137: 17-20.
- Schoening T. E, Wagner J and Arvand M. Prevalence of erythromycin and clindamycin resistance among *Streptococcus agalactiae* isolates in Germany. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11: 579-582.
- Giovanetti E, Brenciani A, Lupidi R. Presence of the tet(O) gene in erythromycin and tetracycline-resistant strains of *Streptococcus pyogenes* and linkage with either the *mef(A)* or the *erm(A)* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Sep;47(9):2844-9.
- Gray KJ, Bennett SL, French N, Phiri AJ, Graham SM. Invasive group B *Streptococcal* infection in infants, Malawi. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:223–9.

bi odgovaralo podacima dobijenim u drugim evropskim zemljama. Da bi se to dokazalo potrebno je nastaviti istraživanje na većem uzorku.

Mora se, međutim, naglasiti značaj rutinskog izvođenja D-testa u izradi antibiograma kod skrininga trudnica na GBS jer je to jedini način da se ustanovi stvarna vrednost stope učestalosti sojeva GBS-a na klindamicin. Kako je u našem uzorku dominantan bio iMLSb fenotip, mnogi sojevi bi ostali neprepoznati kao rezistentni na klindamicin da nismo uradili ovaj test.

Značaj učestalosti rezistencije na tetracikline je u tome što postoji mogućnost prenosa gena za MLSb fenotipove i tetraciklinsku rezistenciju na istom plazmidu (14).

Skoro sve studije urađene na ovu temu beleže jako veliku učestalost rezistencije na tetracikline (86,8%; 94,5%; 96%) (7,15), pa naš rezultat od 88,6% sojeva rezistentnih na tetraciklin nije iznenađujuć.

Zaključak

Učestalost rezistencije na makrolide i linkozamide (klindamicin) značajno je veća u Srbiji nego u drugim evropskim zemljama. Zbog svega navedenog, naši rezultati ukazuju na to da postoji realna potreba za kontinuiranim praćenjem ove pojave na nivou cele zemlje i organizacijom skrininga trudnica u poslednjem trimestru trudnoće zbog medicinskih indikacija, ali i radi praćenja trenda makrolidne rezistencije kod grupe B streptokoka.

Uporedna analiza pokazatelja efektivnosti laparoskopske i otvorene apendektomije kod dece

Comparative analysis of effectiveness parameters of laparoscopic and open appendectomy in children

Mašinka Petrović¹, Ana Petakov¹, Sanja Sinđić-Antunović²

¹ Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

² Mentor: Univerzitetska dečja klinika, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Srbija

Kontakt: masapetrovic198@gmail.com

Sažetak

Uvod: Akutna upala crvuljka jedna je od najčešćih indikacija za hitnu hiruršku intervenciju u dečjem uzrastu. Od kraja XIX veka primenjuje se otvorena hirurška metoda apendektomije, a poslednjih tridesetak godina alternativna metoda je laparoskopska apendektomija. Među hirurzima ne postoji konsenzus koja je metoda pogodnija za lečenje akutne upale crvuljka kod dece.

Cilj rada: Cilj istraživanja je da se uporednom analizom operativnog i postoperativnog toka laparoskopske u odnosu na otvorenu apendektomiju ustanovi prednost jedne od ove dve metode u lečenju akutnog apendicitisa dečjeg uzrasta.

Materijal i metode: Studija obuhvata 330 dece sa akutnim apendicitisom. Bolesnici su podeljeni u 2 grupe: operisane metodom otvorene apendektomije (OA) i operisane metodom laparoskopske apendektomije (LA). Analizirani parametri su: metod operacije, pol i uzrast bolesnika, intraoperativni nalaz, trajanje operacije, dužina hospitalizacije, intraoperativne i postoperativne komplikacije, preoperativne vrednosti leukocita, trajanje primene antibiotika i terapije bola.

Rezultati: Od 330 dece sa akutnim apendicitisom, 255 (77%) operisano je metodom OA, a 75 (23%) metodom LA. U intraoperativnom nalazu kod LA kataralni apendicitis je statistički značajno učestaliji (61%, $p < 0,05$), dok je flegmonozni značajno češći nalaz kod OA (49%, $p < 0,05$). Prosečno trajanje hirurške intervencije je 61 minut kod LA i 38 minuta kod OA. Trajanje hospitalizacije posle obe hirurške metode iznosi 4,2 dana. Antibiotička terapija traje sve vreme hospitalizacije. Terapija bola traje u proseku 1,3 dana posle LA i 1,5 dana posle OA.

Zaključak: Značajno veći broj dece, posebno sa uznapredovalim formama akutnog apendicitisa, operisano je metodom OA. Manji broj dece i blaže forme akutnog apendicitisa tretirani su metodom LA. Ukupna dužina trajanja hospitalizacije, kao i trajanje antibiotske i terapije bola kraći su kod dece operisane metodom LA.

Ključne reči: Apendicitis, otvorena apendektomija, laparoskopska apendektomija, deca

Abstract

Introduction: Acute appendicitis is one of the most common indications for urgent surgical intervention in children. An open appendectomy has been applying since the end of the XIX century, but for the last thirty years, laparoscopic appendectomy became an alternative. There is no consensus among surgeons, which method is suitable for pediatric patients.

Aim: The aim of the research is to establish which of these two methods has therapeutic advantages in children, analyzing comparatively their operative and postoperative course in the treatment of acute appendicitis.

Material and methods: The study includes 330 children with acute appendicitis. Patients were divided into 2 groups: operated by the method of open appendectomy (OA) and laparoscopic surgery (LA). Analyzed parameters were: methods of operation, age and sex of patients, intraoperative findings, duration of surgery, length of hospital stay, intraoperative and postoperative complications, preoperative levels of leukocytes, duration of antibiotic therapy and pain therapy.

Results: In total of 330 children with acute appendicitis, 255 (77%) were operated by OA and 75 (23%) by LA. Catarrhal appendicitis is significantly more frequent intraoperative finding in LA (61%, $p < 0.05$), while phlegmonous is in OA (49%, $p < 0.05$). Mean operative time is 61 minutes in LA, compared with 38 minutes in OA. Mean length of hospital stay is 4.2 days after both operative techniques. Antibiotic treatment lasts as the hospital stay. Mean length of pain treatment is 1.3 days after LA and 1.5 days after OA.

Conclusion: More children and especially with severe forms of acute appendicitis were treated by OA. Lesser number of patients and less severe forms of acute appendicitis were treated by LA. Total length of hospital stay, antibiotic and pain therapy are shorter in laparoscopic comparing to OA.

Key words: Appendicitis, open appendectomy, laparoscopic appendectomy, children

Uvod

Apendicitis ili akutna upala crvuljka jedna je od najčešćih indikacija za hitnu hiruršku intervenciju u pedijatrijskoj populaciji (1). Incidencija apendicitisa do 4. godine života je 1-2/10000 dece godišnje, a od 10. do 17. godine života je i do 25/10000 dece godišnje (2, 3). Dijagnoza se postavlja u pedijatrijskim hirurškim ambulancama, na osnovu karakteristične kliničke slike, fizikalnog pregleda i laboratorijskih parametara, a dopunjuje je ultrazvučni pregled (4). Lečenje akutnog apendicitisa podrazumeva hirurško odstranjenje obolelog crvuljka. Retko se leči konzervativno, samo primenom antibiotika (5).

Hirurška metoda otvorene apendektomije (OA) prvi put je primenjena još u XIX veku, kroz rez u donjem desnom kvadrantu. Ova metoda uspešno se koristi i danas. Osamdesetih godina prošlog veka uvedena je i laparoskopjska apendektomija (LA), koja postaje alternativa u operativnom lečenju akutne upale crvuljka. Od tada se mnogo debatuje o tome koja je hirurška metoda za odstranjenje upaljenog crvuljka pogodnija za pacijenta (6).

Otvorena metoda apendektomije izvodi se vekovima na sličan način, otvaranjem trbušne duplje kroz mali rez u donjem desnom kvadrantu trbuha, kroz koji se direktno pristupa izmenjenom crvuljku. To je tehnika sa kojom su dobro upoznati gotovo svi hirurzi pa se obično izvodi brzo, a sama operacija traje relativno kratko vreme.

Laparoskopija podrazumeva vizuelizaciju organa trbuha pomoću teleskopa, izvodi se kroz nekoliko postupnih procedura, a rad olakšava insuflacija gasa ugljen-dioksida (CO₂) u trbušnu duplju. Operacija se izvodi pomoću dugačkih instrumenata koji se uvode kroz tri incizije na prednjem trbušnom zidu, značajno manjih dimenzija u odnosu na rez kod otvorene metode. Ceo proces operativnog toka se posmatra i prati putem monitora. Laparoskopjska hirurgija se svrstava u red minimalno invazivnih hirurških tehnika zbog male traume abdominalnog zida i intraabdominalnih organa. Kontinuiranim treninzima hirurškog osoblja, razvojem instrumenata, komponenti, naročito svetlosti, optike, fiberoptičke transmisije, insuflacije gasa, video opreme, ali i anesteziološkog monitoringa, primena LA je bezbednija i sve učestalija u dečjem uzrastu (7).

Iako je LA stekla popularnost kod mnogih hirurga, drugi ostaju skeptični prema zameni jednostavne metode kakva je OA. Kritika LA uključuje povećanje troškova operacije, pre svega zbog korišćenja neophodnih laparoskopjskih instrumenata, duže trajanje operacije i zabrinutost zbog veće mogućnosti za nastanak postoperativnih komplikacija, naročito posle perforativnog apendicitisa. Zagovornici LA tvrde da prednost postupka uključuje poboljšano zarastanje rana, smanjenje postoperativnog bola, kraći boravak u bolnici i raniji povratak uobičajenim aktivnostima (6).

U današnjem trenutku izbor metode zavisi od ličnog izbora hirurga, kliničkog iskustva i raspoloživosti opreme.

U pedijatrijskoj populaciji operacija crvuljka jeste jedna od najčešćih hitnih operacija, ali prednosti LA u poređenju sa OA još uvek nisu u potpunosti definisane, posebno u pogledu smanjenja postoperativnih komplikacija, ranije mobilizacije bolesnika, kraćeg trajanja hospitalizacije itd. (6). Veliki broj radova, studija pojedinačnih zdravstvenih ustanova, metaanaliza, randomizovanih, pa čak i nacionalnih studija daje različita mišljenja koja se odnose na upoređivanje prednosti i nedostataka ove dve metode (8). Trenutno među dečjim hirurzima ne postoji konsenzus u pogledu prednosti LA nad OA.

Cilj sprovedenog istraživanja je da se uporednom analizom operativnog i postoperativnog toka kod dece operisane metodom LA u odnosu na OA ustanovi prednost jedne od njih u lečenju akutnog apendicitisa dečjeg uzrasta.

Materijal i metode

Sprovedenim istraživanjem retrospektivno su analizirani podaci dobijeni iz istorija bolesti 330 dece uzrasta do 18 godina kod kojih je postavljena dijagnoza akutnog apendicitisa, a koji su potom operisani metodom OA ili LA u dvogodišnjem periodu od 2010. do 2015. godine na odeljenju abdominalne i laparoskopjske hirurgije Centra za dečju hirurgiju Univerzitetske dečje klinike (UDK) u Beogradu.

Ispitanici su podeljeni u 2 grupe: na operisane metodom otvorene apendektomije (OA) i operisane laparoskopjski (LA). Parametri koji su analizirani uključuju: vrstu operacije, pol i uzrast bolesnika, intraoperativni nalaz, dužinu trajanja operacije, dužinu hospitalizacije, intraoperativne i postoperativne komplikacije, vrednosti leukocita pre operacije, dužinu trajanja primene antibiotika i dužinu trajanja terapije bola.

Na osnovu operativnog nalaza bolesnici su praćeni u pogledu postojanja kataralnog, flegmonoznog i gangrenoznog oblika apendicitisa. U studiju nisu uključeni bolesnici sa perforativnim apendicitisom s obzirom da takvih nije bilo u grupi LA, kao i da bismo, radi adekvatnog tumačenja i validnosti rezultata, postigli odgovarajuću komparativnost između dve ispitivane grupacije bolesnika u pogledu opserviranih parametara. Iz analize su isključena i deca kod koje je usputno odstranjen apendiks u sklopu druge hirurške intervencije, kao i bolesnici koji su operisani u drugim zdravstvenim ustanovama, a premešteni na UDK zbog postoperativnih komplikacija.

Statistička analiza

Podaci dobijeni istraživanjem su obrađeni metodama deskriptivne i analitičke statistike i prikazani su tabelarno i grafički. Za testiranje značajnosti razlike posmatranih varijabli korišćeni su χ^2 test i Fišerove (Fisher) tablice kontingencije. Statistička značajnost je definisana na nivou $p < 0,05$. Baza podataka je formirana u programu *Microsoft Office Excel*. Statistička obrada podataka urađena je uz pomoć *SPSS* softvera 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

Rezultati

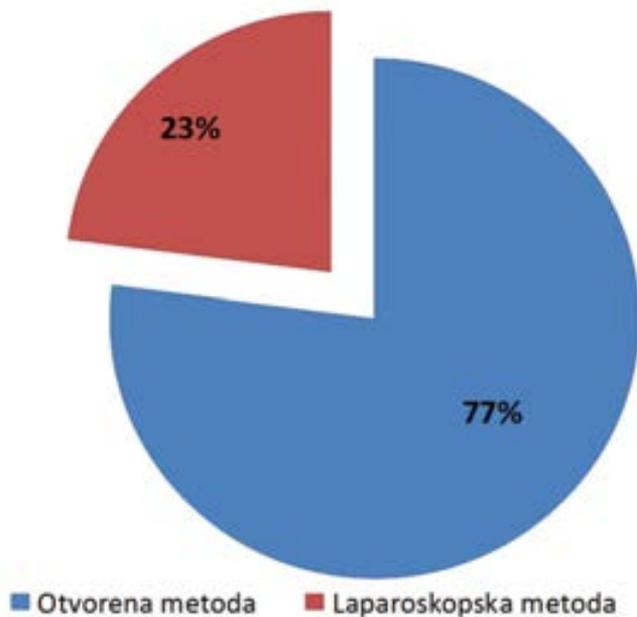
Na odeljenju abdominalne i laparoskopske hirurgije UDK je u periodu između 2010. i 2015. godine operisano 330 dece zbog akutne upale crvuljka. Otvorenim metodom (OA) operisano je 255 (77%), a LA je preduzeta kod 75 (23%) dece (**Grafikon 1**). Broj operisanih bolesnika metodom OA značajno je veći u odnosu na broj operisanih LA, sa visokom statističkom značajnošću ($p < 0,05$).

Operativna apendektomija je primenjena kod 132 (52%) dece muškog, u odnosu na 123 (48%) dece ženskog pola, dok je LA preduzeta kod 28 (37%) dece muškog, u odnosu na 47 (63%) ženskog pola. Odnos distribucije po polu i primenjenih metoda operacija OA i LA pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika među ispitivanim grupama ($p > 0,05$), kao i da je LA češće primenjivana kod devojčica (**Tabela 1**).

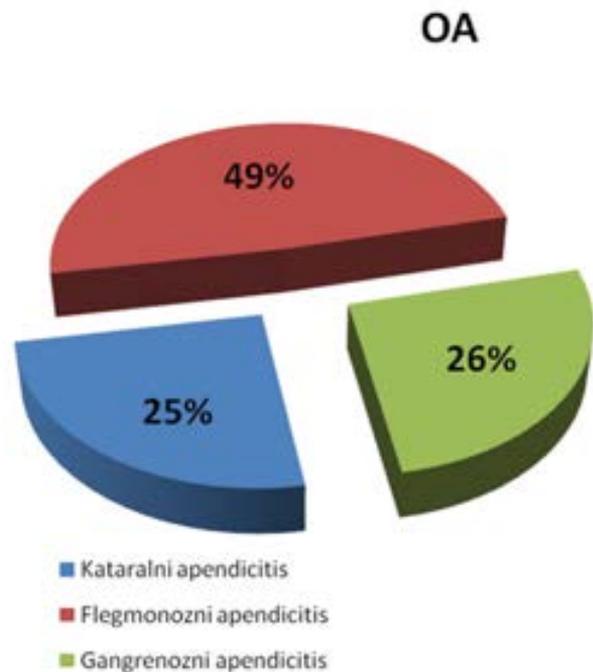
Starost dece u grupi OA je u rangu od 1 do 18 godina, u proseku $11 \pm 3,9$ godina, dok se kod LA kreće od 4 do 18 godina, sa prosekom od $12 \pm 3,9$ godina, tako da ne postoji statistički značajna razlika među ispitivanim grupama u odnosu na uzrast ispitanika ($p > 0,05$) (**Tabela 1**).

U grupi operisanih metodom OA od ukupno 255 dece, kataralni oblik zapaljenja crvuljka imalo je 64 (25%) dece, flegmonozni 125 (49%), a gangrenozni 66 (26%) (**Grafikon 2**).

Od ukupno 75 dece operisane metodom LA, kataralni apendicitis je imalo njih 46 (61%), flegmonozni 20 (27%),



Grafikon 1. Učestalost primene OA vs. LA kod dece

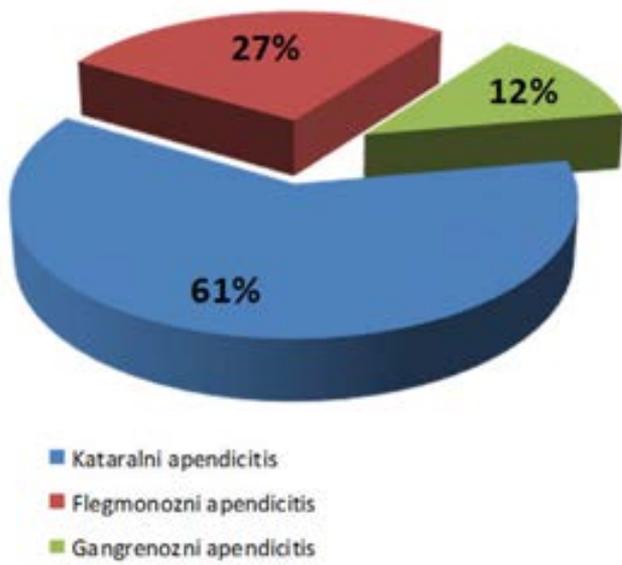


Grafikon 2. Intraoperativni nalaz kod otvorene apendektomije

Tabela 1. Distribucija bolesnika po polu i uzrastu

Pol	%	OA n = 255	%	LA n = 75	%	$p < 0,05$
Muški (160)	48	132	52	28	37	$p > 0,05$
Ženski (170)	52	123	48	47	63	
Starost, god. (SV \pm SD)		$11 \pm 3,9$		$12 \pm 3,9$		$p > 0,05$
(min/max)		(1-18)		(4-18)		

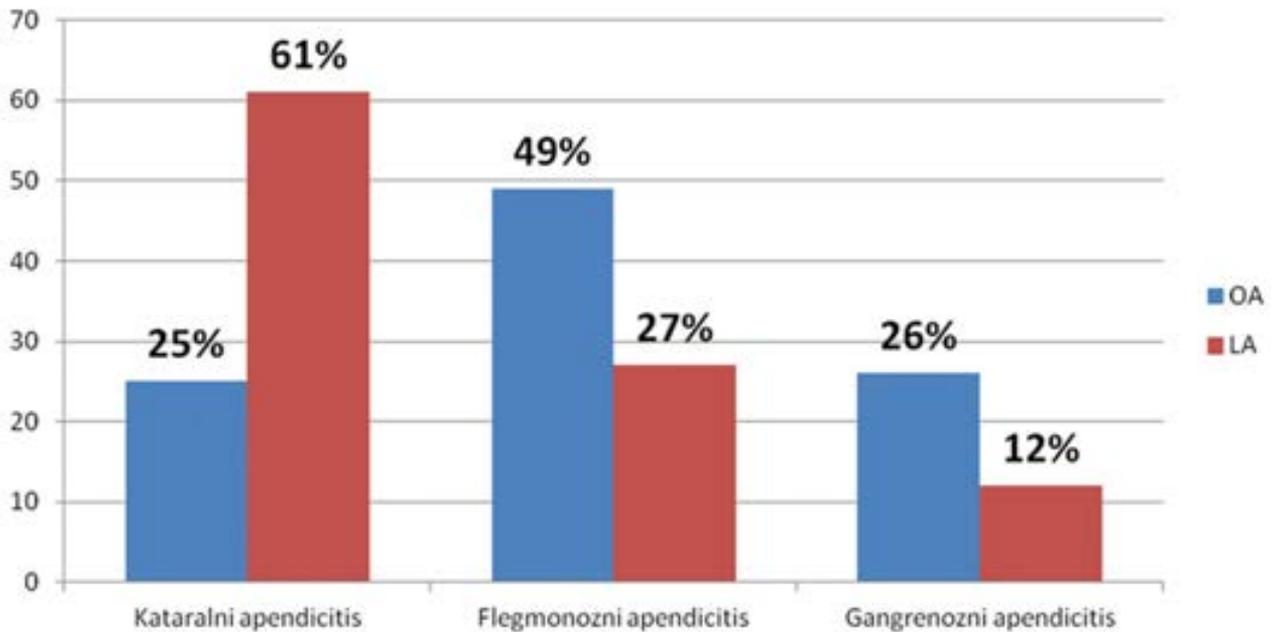
SV – standardna varijacija; SD – standardna devijacija



Grafikon 3. Intraoperativni nalaz kod laparoskopske apendektomije

a gangrenozni 9 (12%) (**Grafikon 3**). Statistički značajno veći ($p < 0,05$) broj kataralnog apendicitisa prevlađuje u intraoperativnom nalazu kod metode LA, dok je flegmonozni apendicitis najčešći nalaz kod OA ($p < 0,05$). Naši rezultati pokazuju da su deca sa kataralnim stadijumom najčešće operisana metodom LA, dok su deca sa težim formama akutnog apendicitisa daleko češće operisana metodom OA (**Grafikon 4**).

Kod dece operisane metodom OA prosečno vreme trajanja operacije je 38 ± 16 minuta, u odnosu na grupu dece operisane LA, kod kojih je prosečno trajanje operacije bilo 61 ± 16 minuta. Dužina hospitalizacije kod bolesnika operisanih metodom OA je $4,2 \pm 4,1$, dok je kod operisanih LA $4,2 \pm 1,7$ dana. U našoj seriji bolesnika dužina trajanja operacije metodom OA je kraća u odnosu na metodu LA, dok je dužina hospitalizacije u proseku ista. S obzirom na SD, ukupna dužina hospitalizacije nešto je kraća posle LA, ali u oba slučaja bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$) (**Tabela 2**).

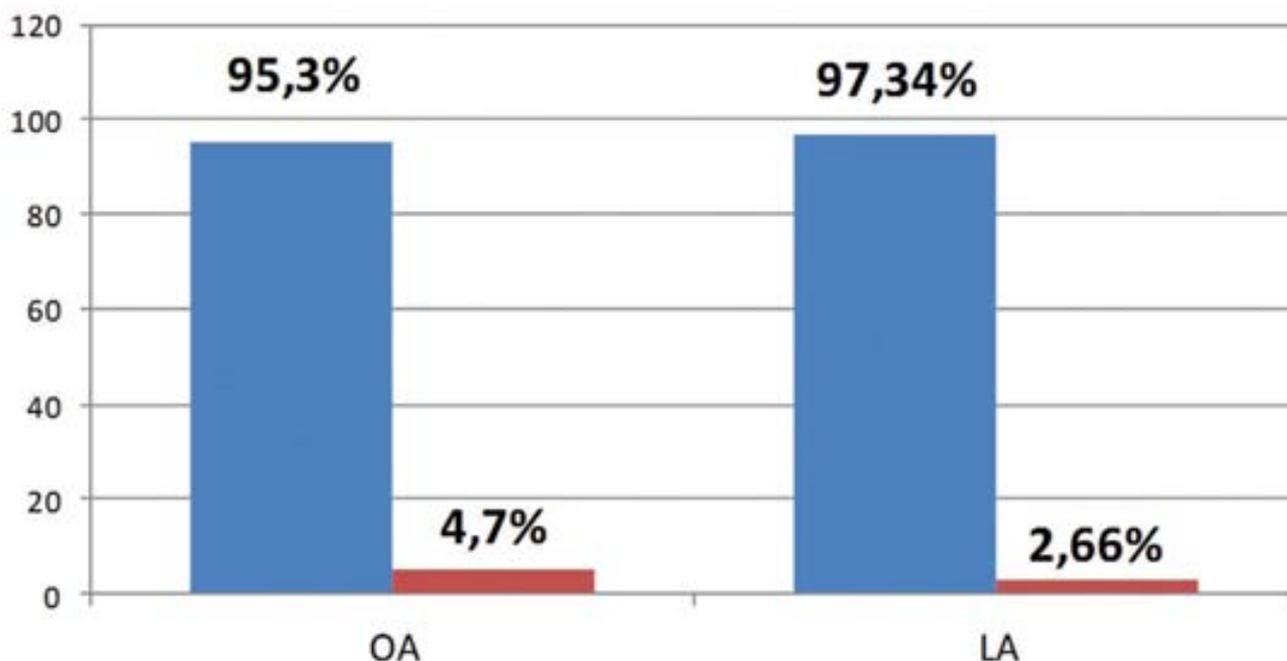


Grafikon 4. Intraoperativni nalaz kod otvorene u odnosu na laparoskopsku apendektomiju

Tabela 2. Trajanje operacije i dužina hospitalizacije kod OA vs. LA

	OA n = 255	LA n = 75	p
Trajanje operacije (min, SV ± SD)	38 ± 16	61 ± 16	$p > 0,05$
(min/max)	30-120 min	45-120 min	
Dužina hospitalizacije (dani, SV ± SD)	$4,2 \pm 4,1$	$4,2 \pm 1,7$	$p > 0,05$
(min/max)	2-20 dana	3-8 dana	

SV – standardna varijacija; SD – standardna devijacija

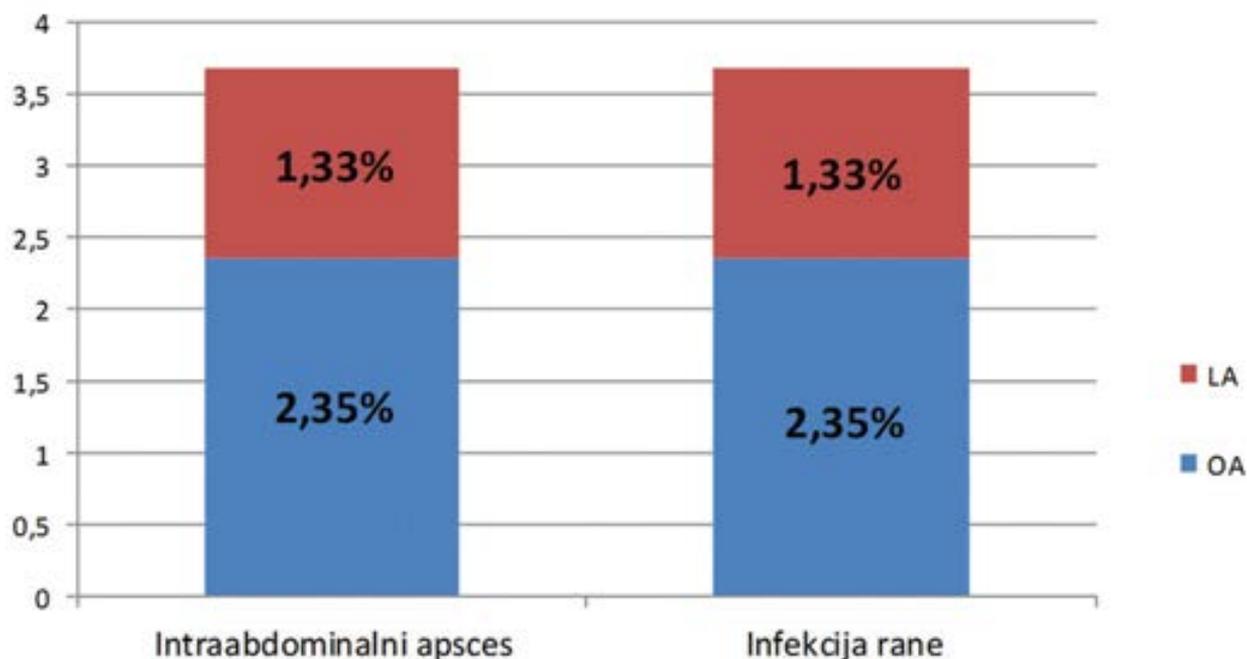


Grafikon 5. Incidencija komplikacija kod OA vs. LA

Kod ukupno 330 operisanih postoperativne komplikacije, u smislu nastanka intraabdominalnog apscesa i infekcije operativne rane, bile su prisutne kod samo 14 (4%) bolesnika. Od toga, 12 (4,7%) komplikacija se javilo u grupi operisanih metodom OA i 2 (2,66%) u grupi operisanih metodom LA (Grafikon 5). U grupi operisanih metodom OA bilo je 6 (43%) bolesnika sa intraabdominalnim apscesom nakon operacije i 6 (43%) sa infekcijom operativne rane. Kod dece operisane metodom LA, retke

komplikacije su se odnosile na intraabdominalni apsces kod 1 deteta (7%) i infekciju operativne rane takođe kod 1 deteta (7%) (Grafikon 6). Ustanovljeno je da ne postoji statistički značajna razlika između praćenih grupa bolesnika u odnosu na incidenciju i vrstu komplikacija operativnog lečenja ($p > 0,05$).

Prosečan broj leukocita kod operisanih bolesnika metodom OA je $13,4 \pm 6,8$ ($\times 10^9/L$), a metodom LA je $12,5 \pm 4,7$ ($\times 10^9/L$). Prosečna vrednost leukocitoze kod operi-



Grafikon 6. Distribucija komplikacija prema vrsti kod OA vs. LA

sanih bolesnika metodom OA je nešto viša u odnosu na bolesnike operisane metodom LA, ali bez statistički značajne razlike ($p > 0,05$).

Antibiotska, kao i terapija bola, uključene su kod gotovo svih operisanih bolesnika, bez obzira na vrstu hirurške intervencije. Antibiotička terapija je primenjivana sve vreme trajanja hospitalizacije, kako posle OA (u proseku $4,2 \pm 4,1$ dan), tako i posle LA (u proseku $4,2 \pm 1,7$ dana), dok je terapija bola primenjivana posle OA $1,5 \pm 0,9$ dana i nešto kraće posle LA ($1,3 \pm 0,5$ dana). U oba slučaja nema statistički značajne razlike među ispitivanim grupama ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Diskusija

Laparoskopska apendektomija, kao minimalno invazivna tehnika, od uvođenja u hiruršku praksu postala je sve više primenjivana metoda u lečenju akutne upale crvuljka. Studije pokazuju značajno i dramatično povećanje primene LA tokom poslednje decenije u svim starosnim dobima, od 22% operisanih 1998. godine do 70% operisanih ovom metodom 2007. godine (10). Uprkos tome, u pedijatrijskoj populaciji još uvek ne postoje decidirani stavovi da li je metoda LA superiornija u odnosu na metodu OA.

Retrospektivna kohortna studija u Južnoj Kaliforniji, koja je obuhvatila 12 regionalnih bolnica i 7000 operisane dece metodom LA, gde su deca analizirana po polu, godinama starosti i incidenciji komplikacija, pokazala je da, u odnosu na metodu OA, nema statistički značajne razlike između ispitivanih grupa u odnosu na pol, ali da postoji statistički značajna razlika u odnosu na uzrast, tj. da su značajno starija deca operisana metodom LA ($p < 0,001$) (9). U zaključku iste, ali i drugih studija, navodi se da je primena metode LA kod dece praćena manjom

incidencijom postoperativnih komplikacija, kao i kraćim boravkom u bolnici (11, 12).

Rezultati naše studije koji se odnose na distribuciju ispitanika po polu i godinama starosti pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa, ali da je češća operacija crvuljka metodom LA kod devojčica. Dužina boravka u bolnici naših ispitanika nešto je kraća posle LA, ali bez statistički značajne razlike u odnosu na trajanje hospitalizacije posle OA. Naše istraživanje takođe ukazuje na to da ne postoji statistički značajna razlika u odnosu na incidenciju i vrstu komplikacija operativnog lečenja, mada treba uzeti u obzir da je razlika u procentu postoperativnih komplikacija (apscesa i infekcija operativne rane) bazirana na veoma malom uzorku, kao i da se OA primenjuje kod znatno težih i uznapredovalih formi apendicitisa, kada je verovatnoća pojave komplikacija i inače znatno veća nego kod blagih (kataralnih) formi apendicitisa koje prevladavaju kod LA.

U brojnim studijama se navodi da je vreme trajanja operacije duže kod LA i objašnjava se time da uzrok leži u neiskustvu hirurga u primeni nove tehnike, ili nedovoljnom broju hirurga koji se obučavaju u laparoskopskoj hirurgiji. Sa iskustvom prosečno vreme laparoskopske operacije izjednačava se sa metodom OA (13). Rezultati metaanalize, koja je obuhvatila 23 komparativne studije (retrospektivne, prospektivne i randomizirane) i ukupno 6477 operisane dece u periodu od 1992. do 2004. godine, pokazali su da nema značajnije razlike u dužini trajanja operacije između LA i OA (19). Rezultati naše studije pokazuju da je dužina trajanja operacije metodom OA nešto kraća u odnosu na metodu LA, ali bez statistički značajne razlike.

Studija metaanalize 44 randomizovane kontrolisane studije, objavljen je na engleskom jeziku u periodu od 1990.

Tabela 3. Vrednosti leukocita, dužina trajanja primene antibiotika i terapije bola kod OA vs. LA

	OA n = 255	LA n = 75	p
Le ($\times 10^9/L$)	$13,4 \pm 6,8$	$12,5 \pm 4,7$	$p > 0,05$
min/max	(4-27,9 $\times 10^9/L$)	(4,9-28,9 $\times 10^9/L$)	
Antibiotik	252 (99%)	73 (97%)	
Antibiotska terapija (dani, SV \pm SD)	$4,2 \pm 4,1$	$4,2 \pm 1,7$	$p > 0,05$
(min/max)	2-20 dana	3-8 dana	
Analgetik	255 (100%)	75 (100%)	
Terapija bola (dani, SV \pm SD)	$1,5 \pm 0,9$	$1,3 \pm 0,5$	$p > 0,05$
(min/max)	2-5 dana	1-3 dana	

SV – standardna varijacija; SD – standardna devijacija

do 2009. godine, koja obuhvata decu i odrasle operisane metodama LA ili OA, navodi u zaključku da LA metoda obezbeđuje značajne prednosti u odnosu na OA, uključujući kraće trajanje hospitalizacije, manji postoperativni bol, raniji postoperativni oporavak i nižu stopu komplikacija. Tokom trajanja navedene studije uočen je trend smanjenja razlike u operativnom vremenu između ovih metoda (14).

Mnoge studije su se bavile i pitanjem da li je LA prikladan ili čak poželjan izbor kada se dijagnostikuje komplikovana forma, kao što je perforativni apendicitis. U zaključku studije sprovedene na 177 dece navodi se da LA može da se smatra altrernativnom tehnikom OA u lečenju komplikovanih apendicitisa kod dece, uključujući perforativni apendicitis i apendicitis sa apscesom. Ova studija je uporedila i broj leukocita kao laboratorijski parametar u proceni težine zapaljenja, koji je veći kod uznapredovalih formi apendicitisa, i nije uočena statistički značajna razlika u njihovoj vrednosti između ove dve grupe pacijenata (12).

Između ispitivanih grupa bolesnika obuhvaćenih našom studijom postoji statistički značajna razlika u pogledu intraoperativnog nalaza kod izbora operativnih metoda. Značajno veći broj operisanih metodom LA imao je kataralni oblik zapaljenja crvuljka, dok su flegmonozni i gangrenozni oblik apendicitisa najčešći nalaz kod OA.

Prosečna vrednost leukocitoze kod naših bolesnika ope-

risanih metodom OA nešto je viša u odnosu na bolesnike operisane metodom LA i, mada bez statistički značajne razlike, može se objasniti težom kliničkom slikom i nalažom uznapredovalih formi apendicitisa kod metode OA.

Antibiotik i analgetik su uključeni kod gotovo svih operisanih bolesnika, bez obzira na vrstu hirurške intervencije. Antibiotička terapija je primenjivana sve vreme trajanja hospitalizacije, kako posle OA, tako i posle LA, dok je terapija bola primenjivana nešto kraće posle LA, u oba slučaja bez statistički značajne razlike.

Zaključak

Primena OA na Univerzitetškoj dečjoj klinici u Beogradu značajno je više zastupljena u odnosu na LA. Laparoskopija se pretežno primenjuje kod lakših formi apendicitisa sa blažom kliničkom slikom, dok se OA češće primenjuje kod uznapredovalih formi akutne upale crvuljka sa težom kliničkom slikom. Značajna razlika u primeni ovih metoda u odnosu na pol i uzrast ne postoji, osim što se LA češće primenjuje kod devojčica. Ukupna dužina trajanja hospitalizacije, kao i trajanje antibiotske i terapije bola, kraći su kod dece operisane metodom LA. Ne postoji statistički značajna razlika između praćenih grupa bolesnika u odnosu na incidenciju i vrstu komplikacija operativnog lečenja. S obzirom na pokazane rezultate, LA se može preporučiti kao metoda izbora u lečenju akutnog apendicitisa dečjeg uzrasta.

Literatura

- Kokoska ER, Murayama KM, Silen ML, Miller TA, Dillon PA, Weber TR. A state-wide evaluation of appendectomy in children. *Am J Surg*, 1999; 537-40.
- Rothrock SG, Pagane J. Acute appendicitis in children: Emergency Department Diagnosis and Management. *Ann Emerg Med*, 2000; 36:39-51.
- Reynolds SL, Jaffe DM. Diagnosing abdominal pain in a pediatric emergency department. *Pediatr Emerg Care*, 1992; 8(3):126-28.
- Flum DR. Acute Appendicitis - Appendectomy or the "Antibiotics First" Strategy. *N Engl J Med*, 2015; 1937-43.
- Aziz O, Athanasiou T, Tekkis PP, Purkavastha S, Haddow J, Malinovski V. et al. Laparoscopic versus open appendectomy in children: a meta-analysis. *Ann Surg*, 2006; 243(1):17-27.
- Gans SL, Berci G. Peritoneoscopy in infants and children. *J Pediatr Surg* 1973; 8(3):399-405.
- Semm K. Endoscopic appendectomy. *Endoscopy*, 1983; 15(2):59-64.
- Darzi SA, Munz Y. The impact of minimal invasive surgical techniques. *Annu Rev Med*, 2004; 55:223-37.
- Chung RS, Rowland DY, Li P, Diaz J. A meta-analysis of randomized controlled trials of laparoscopic versus conventional appendectomy. *Am J Surg*, 1999; 177(3):250-56.
- Sauerland S, Jaschinski T, Neugebauer EA. Laparoscopic versus open surgery for suspected appendicitis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010; 6(10):CD001546.
- Ortega AE, Hunter JG, Peters JH, Swanstrom LL, Schirmer B. A prospective, randomized comparison of laparoscopic appendectomy with open appendectomy: Laparoscopic Appendectomy Study Group. *Am J Surg*, 1995; 169(2):208-12.
- Azaro EM, Amaral PC, Ettinger JE, Souza EL, Fortes MF, Alcantara RS et al. Laparoscopic versus open appendectomy: a comparative study. *JLS*, 1999; 3(4):279-83.
- Heikkinen TJ, Haukipuro K, Hulkko A. Cost-effective appendectomy: open or laparoscopic? A prospective randomized study. *Surg Endosc*, 1998; 12(10):1204-08.
- Ignacio RC, Burke R, Spencer D, Bissell C, Dorsainvil C, Lucha PA. Laparoscopic versus open appendectomy: what is the real difference? Results of a prospective randomized double-blinded trial. *Surg Endosc*, 2004; 18(2):334-37.
- Gorenoi V, Dintsios CM, Schönermark MP, Hagen A. Laparoscopic vs. open appendectomy: systematic review of medical efficacy and health economic analysis. *GMS Health Technol Assess*, 2007; 29(2):Doc22.
- Jen HC, Shew SB. Laparoscopic versus open appendectomy in children: Outcomes comparison based on a statewide analysis. *J Surg Res*, 2010; 161(1):13-17.
- Esposito C, Borzi P, Valla JS, Mekki M, Nouri A, Becmeur F. et al. Laparoscopic versus open appendectomy in children: a retrospective comparative study of 2,332 cases. *World J Surg*, 2007; 31(4):750-55.
- Lee SL, Yaghoubian A, Kaji A. Laparoscopic vs Open Appendectomy in Children: Outcomes Comparison Based on Age, Sex, and Perforation Status. *Arch Surg*, 2011; 146(10):1118-21.
- Kehagias I, Karamanakis SN, Panagiotopoulos S, Panagopoulos K, Kalfarentzos F. Laparoscopic versus open appendectomy: Which way to go? *World J Gastroenterol*, 2008, 14:4909-14.
- Li X, Zhang J, Sang L, Zhang W, Chu Z, Li X. et al. Laparoscopic versus conventional appendectomy—a meta analysis of randomized controlled trials. *BMC Gastroenterology*, 2010; 10:129.

21. Tsai CC. Lee SY. Huang FC. Laparoscopic versus open appendectomy in the management of all stages of acute appendicitis in children: a retrospective study. *Pediatr Naonatonol*, 2012; 289-94.

Uticaj različitih karakteristika treninga na oporavak srčane frekvencije kod vrhunskih sportista

Influence of different characteristics of sport on heart rate recovery in elite athletes

Radovan Anđić¹, Biljana Đurić^{1,2}, Slavica Suzić^{1,2}

¹ Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

² Institut za medicinsku fiziologiju "Rihard Burijan"

Kontakt: andjic.radovan@gmail.com

Sažetak

Uvod: Kao jedna od prednosti redovne fizičke aktivnosti navodi se niža srčana frekvencija u miru i njen brži oporavak nakon testa maksimalnog opterećenja, kao posledica jačeg parasimpatičkog (vagusnog) tonusa. Oporavak srčane frekvencije se koristi kao pouzdan parametar fizičke utreniranosti, ali i u prognostičke svrhe kao parametar rizika za obolavanje od kardiovaskularnih bolesti.

Cilj: Cilj ove studije je da pokaže postojanje statistički značajnih razlika u oporavku srčanih frekvencija nakon maksimalnog opterećenja i razlike frekvencija u mirovanju između različitih grupa vrhunskih sportista.

Materijal i metode: Ovom studijom je obuhvaćeno 575 odraslih (23,1 ± 4,3 godina) sportista muškog pola, podeljenih u četiri grupe sportova: sportove veštine, snage, mešovitih disciplina i izdržljivosti. Svi ispitanici su izveli maksimalni, progresivni kardiopulmonalni test fizičkim opterećenjem na traci za trčanje. Oporavak srčane frekvencije u prvom ($\Delta HRR1$) i trećem minutu ($\Delta HRR3$) definisan je razlikom maksimalne srčane frekvencije i frekvencije u prvom, odnosno trećem minutu po okončanju vežbanja.

Rezultati: Statistički značajno niže vrednosti srčane frekvencije u mirovanju zabeležene su u grupi izdržljivosti (56,2 ± 10,6 min⁻¹) u odnosu na grupe sportova veština, snage i mešovitih disciplina (62,9 ± 11,4; 61,5 ± 10,0; 59,9 ± 10,4 min⁻¹) (p = 0,05). I $\Delta HRR1$ je bio značajno viši u grupi izdržljivosti (33,5 ± 14,3 min⁻¹) u odnosu na grupe sportova veštine, snage i mešovitih disciplina (24,3 ± 10,9; 25,5 ± 11,2; 27,8 ± 15,6 min⁻¹) (p = 0,05). Vrednosti $\Delta HRR3$ su bile značajno više u grupi snage, mešovitih disciplina i izdržljivosti (74,8 ± 14,3; 79,5 ± 12,7; 79,4 ± 12,6 min⁻¹) u odnosu na grupu veština (67,3 ± 16,1 min⁻¹) (p = 0,05).

Zaključak: Treniranje sportova iz grupe izdržljivosti najviše doprinosi smanjenju srčane frekvencije u mirovanju i brzini njenog oporavka u prvom minutu nakon vežbanja zbog prevladavajućeg parasimpatičkog tonusa.

Ključne reči: srčana frekvencija, oporavak, trening, sportisti

Abstract

Introduction: One of the benefits of regular physical activity is lower resting heart rate and its faster recovery after maximal exercise test, as a result of a stronger parasympathetic (vagal) tone. Heart rate recovery is used as reliable parameter for prescription of the training program and also in prognostic purposes as a parameter of risk for developing cardiovascular diseases.

Aim: The purpose of this study is to show significant differences in heart rate recovery after maximal exercise test and resting heart rate among different groups of elite athletes.

Material and Methods: This study subjected 575 adult (23.1 ± 4.3 years), male athletes divided into four sport groups: skill, power, mixed and endurance. Every subject performed progressive, maximal cardiopulmonary exercise test on a treadmill. Heart rate recovery in first ($\Delta HRR1$) and third ($\Delta HRR3$) minute was calculated as a difference of maximal heart rate and heart rate in the first and the third minute after cessation of exercise, respectively.

Results: Compared to skill, power and mixed group (62.9 ± 11.4; 61.5 ± 10.0; 59.9 ± 10.4 min⁻¹ respectively), significantly lower values of resting heart rate are recorded in the endurance group (56.2 ± 10.6 min⁻¹) (p = 0,05). Also, $\Delta HRR1$ was significantly higher in the endurance group (33.5 ± 14.3 min⁻¹) compared to skill, power and mixed group (24.3 ± 10.9; 25.5 ± 11.2; 27.8 ± 15.6 min⁻¹ respectively) (p = 0,05). Values of $\Delta HRR3$ were significantly higher in power, mixed and endurance groups (74.8 ± 14.3; 79.5 ± 12.7; 79.4 ± 12.6 min⁻¹ respectively) compared to skill group (67.3 ± 16.1 min⁻¹) (p = 0,05).

Conclusion: Training endurance group of sports has the most contribution to lower resting heart rate and faster recovery of heart rate in the first minute after exercising, due to dominant parasympathetic tone.

Key words: heart rate, recovery, sport, athletes

Uvod

Srčana frekvencija (engl. *Heart rate*, HR) u fiziološkim uslovima, definisana kao broj srčanih ciklusa u jednom minutu (min^{-1}), određena je aktivnošću sinoatrijalnog (SA) čvora, koja je modulirana od strane autonomnog nervnog sistema. Brojne studije ukazuju da je dinamika srčane frekvencije tokom vežbanja inicijalno modulirana inaktivacijom parasimpatikusa, a kasnije aktivacijom simpatikusa, dok se potpuno suprotno dešava tokom oporavka (1-4). Oporavak srčane frekvencije (engl. *Heart rate recovery*, HRR) u prvim minutima nakon fizičke aktivnosti validan je i pouzdan pokazatelj parasimpatičke aktivnosti. S druge strane, njegovo praćenje je jeftino i neinvazivno, zbog čega je u širokoj kliničkoj upotrebi (4-6). Oporavak srčane frekvencije je moćan, nezavisan prognostički marker i promenljiv faktor rizika, kako u populaciji zdravih, tako i u populaciji obolelih (6, 7). Brži oporavak srčane frekvencije ima protektivno dejstvo na srce i smanjuje rizik za obolevanje od kardiovaskularnih bolesti (8). Postoje naučne pretpostavke da se oporavak srčane frekvencije može dovesti u vezu sa glavnim komponentama sindroma insulinske rezistencije (9).

Dobro je poznato da je bolja fizička kondicija usko povezana sa bržim oporavkom srčane frekvencije. To je posledica funkcionalne adaptacije srca usled redovne fizičke aktivnosti (3, 10-14). Oporavak srčane frekvencije se koristi i za praćenje treninga i procenu kondicije (15-17). Osim fizičke utreniranosti, oporavak srčane frekvencije nakon vežbanja zavisi i od drugih faktora: zamora, pola, uzrasta, pripadnosti etničkim grupama, vrste i načina vežbanja (12, 14, 18-20). Ograničen je, međutim, broj podataka iz literature koji ilustruju razlike u dinamici srčane frekvencije u populaciji vrhunskih sportista koji se bave raznim tipovima sporta.

Cilj ove studije je da ispita u kojoj grupi sportova je oporavak srčane frekvencije u prvom i trećem minutu nakon maksimalnog opterećenja najbrži, kao i koja grupa ima najnižu srčanu frekvenciju u mirovanju. Pretpostavka je da će srčana frekvencija u mirovanju biti značajno manja, odnosno njen oporavak u prvom i trećem minutu nakon vežbanja značajno veći u grupi sportista koji se bave sportovima izdržljivosti u odnosu na grupe sportista se bave sportovima veštine, mešovitih disciplina i snage.

Materijal i metode

Protokol ove studije preseka je odobren od strane Institucionalnog nadzornog odbora za medicinsku etiku. Svi ispitanici su detaljno upoznati sa protokolom ispitivanja i svi su potpisali pismenu saglasnost.

U ispitivanju je učestvovalo 575 vrhunskih sportista iz 30 različitih sportskih disciplina, muškog pola, prosečne

starosti od $23,1 \pm 4,3$ godine. Ispitanici su klasifikovani u 4 grupe, u skladu sa preovlađujućim karakteristikama treninga (Mičelova klasifikacija modifikovana po Kaseliju (21)):

1. grupa veština (engl. *skill*) - primarno tehničke aktivnosti ($n = 87$), npr.: umetnička gimnastika, karate, tekvondo, jedrenje, golf, stoni tenis;
2. grupa sportova snage (engl. *power*) - primarno izometrijske aktivnosti ($n = 68$), npr.: dizanje tegova, rvanje, trčanje kratkih distanci;
3. grupa mešovitih disciplina (engl. *mixed*) - kombinacija izometrijskih i izotoničnih aktivnosti ($n = 304$), npr.: fudbal, košarka, vaterpolo, tenis, odbojka;
4. grupa sportova izdržljivosti (engl. *endurance*) - primarno izotonične aktivnosti ($n = 116$), npr.: veslanje, kajak, trčanje dugih distanci i maraton, plivanje, biciklizam, triatlon i pentatlon.

Kriterijumi za uključivanje: muškarci koji se profesionalno bave sportom bar 5 godina, starosti od 18 do 35 godina, i koji treniraju najmanje 10 sati nedeljno tokom tekuće sezone i učestvovali su na takmičenju od internacionalnog ili nacionalnog značaja.

Kriterijumi za isključivanje: prisustvo kardiovaskularnih ili drugih oboljenja, navika pušenja, nemogućnost da se izvede test maksimalnog opterećenja, zloupotreba steroida ili drugih lekova.

Testiranje se sprovodilo između 9:30 i 11:00 pre podne, a započeto je popunjavanjem standardizovanog sportsko-medicinskog upitnika koji sadrži 36 pitanja, a tiče se lične, porodične i anamneze po sistemima. Upitnik je obezbedio informacije o tome kojim sportom i kojom disciplinom se ispitanik bavi, kada je počeo da vežba, koliko puta dnevno i nedeljno vežba, kao i o trajanju pojedinačnih treninga. Na kraju upitnika svaki ispitanik je svojim potpisom potvrdio validnost iznetih podataka.

Svi ispitanici su podvrgnuti antropometrijskim ispitivanjima, fizikalnom pregledu i urađen im je elektrokardiogram (EKG). Potom su svi izveli kardiopulmonalni test fizičkim opterećenjem (CPET). Sve navedeno je obavljeno istog jutra u kontrolisanim, laboratorijskim uslovima: temperatura komfora ($18-22\text{ }^{\circ}\text{C}$), pri atmosferskom pritisku od 760 mm Hg i relativnoj vlažnosti vazduha od 30 do 60%. Ovi parametri su kontinuirano praćeni tokom testiranja. Ispitanici su imali lak obrok najmanje dva sata pre testa.

Telesna visina (TV), izražena u centimetrima, merena je pomoću standardnog laboratorijskog visinometra (*Seca 214 Portable Stadiometer, Cardinal Health, USA*). Telesna masa (TM), izražena u kilogramima, kao i procenat telesnih masti (BF) izmereni su pomoću bioimpedancijskog analizatora telesnog sastava (*BC-418 Segmental Body Composition Analyzer, Tanita, USA*).

Pre izvođenja svakog testa rađena je kalibracija protočnog senzora i senzora za kiseonik i ugljen-dioksid (pomoću šprica poznate zapremine i pomoću poznate gasne mešavine). Svi ispitanici su izveli maksimalni, progresivni protokol na traci za trčanje (T200; COSMED Ltd, Rome, Italy). Protokoli su individualno prilagođeni svakom ispitaniku na osnovu prethodnog upitnika, koji obezbeđuje uvid u fizičke mogućnosti ispitanika. Test je obuhvatio 3 faze: fazu odmora (ispitanici stoje mirno u trajanju od 3 minuta), test fazu i fazu oporavka (aktivnu fazu tokom koje ispitanici hodaju brzinom od 4 km/h na ravnoj traci tokom 1 minuta, nakon čega sede mirno na stolici najmanje 2 minuta). Analiza razmene gasova rađena je metodom „dah po dah“ (COSMED Ltd Italy), uz kontinuirano praćenje dvanaestokanalnim EKG-om. Srčana frekvencija je određena na osnovu EKG zapisa. Krvni pritisak meren je ručno: neposredno pred fizičko opterećenje, na svaka tri minuta tokom opterećenja, neposredno nakon prestanka opterećenja i tokom perioda oporavka (u prvom minutu, a potom nakon svakog drugog minuta). Postizanje maksimalnog opterećenja je definisano ostvarivanjem najmanje 2 od 4 kriterijuma:

1. postizanjem platoa u VO_2 max uprkos povećanju opterećenja;
2. vrednošću respiratornog količnika (RERmax) $\geq 1,10$;
3. srčanom frekvencijom unutar 10 otkucaja manja od predviđene maksimalne frekvencije (220 – broj godina);
4. psihofizičkim zamorom.

Oporavak srčane frekvencije u prvom ($\Delta HRR1$), odnosno trećem minutu ($\Delta HRR3$) određen je razlikom maksimalne srčane frekvencije ostvarene tokom fizičkog opterećenja i srčane frekvencije u prvom, odnosno trećem minutu po okončanju fizičkog opterećenja.

Svi podaci su prikazani korišćenjem standardne deskriptivne statistike, a iskazani su kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Razlike aritmetičkih sredina između grupa sportista predstavljene su korišćenjem „One-

way ANOVA“ testa sa „Bonferroni Post Hock“ analizom, tj. Kruskal-Valisovog (Kruskal-Wallis) testa u zavisnosti od normalnosti raspodele podataka. Za podatke obrađene Kruskal-Valisovim neparametarskim testom kod kojih je odbačena nulta hipoteza rađen je Man-Vitnijev (Mann-Whitney) U test, kojim je ispitivana značajnost razlike aritmetičkih sredina između grupa sportista po principu svaka sa svakom. Sve statističke analize izvršene su pomoću *Statistic package for social sciences 15 (SPSS15)* programa.

Rezultati

U **Tabeli 1** prikazane su osnovne antropometrijske i demografske karakteristike ispitanika po grupama. Grupe sportista snage ($25,5 \pm 3,8$ godina) i veštine ($24,2 \pm 4,5$ godina) statistički su značajno starije u odnosu na grupu mešovitih disciplina ($22,2 \pm 4,1$ godina), dok je grupa sportista snage značajno starija i u odnosu na grupu izdržljivosti ($23,1 \pm 4,1$ godina) ($p < 0,05$). Grupa mešovitih disciplina ($190,4 \pm 10,2$ cm) ima statistički značajno veću telesnu visinu od grupe izdržljivosti ($186,4 \pm 7,3$ cm) ($p < 0,05$). Obe grupe imaju statistički značajno veću telesnu visinu od grupe veština ($183,5 \pm 7,1$ cm), odnosno sve tri navedene grupe sportista imaju statistički značajno veću telesnu visinu u odnosu na grupu snage ($180,0 \pm 8,3$ cm) ($p < 0,05$). Grupa mešovitih disciplina ($87,0 \pm 13,4$ kg) ima statistički značajno veću telesnu masu u odnosu na grupu veština ($81,8 \pm 12,7$ kg) i grupu izdržljivosti ($81,4 \pm 9,1$ kg), dok ne postoji značajna razlika između drugih grupa ($p < 0,05$). Procenat telesnih masti najveći je u grupi veština ($13,7 \pm 7,0$ %), a najmanji u grupi izdržljivosti ($8,4 \pm 3,6$ %) ($p < 0,05$). Grupa mešovitih disciplina ($12,5 \pm 4,4$ godina) i grupa veština ($11,6 \pm 5,8$ godina) statistički značajno duže treniraju u odnosu na grupu izdržljivosti ($9,9 \pm 4,7$ godina), a grupa mešovitih disciplina pokazuje i značajno duži sportski staž u odnosu na grupu snage ($11,2 \pm 4,6$ godina) ($p < 0,05$).

Tabela 1. Osnovni demografski i antropometrijski parametri po grupama

	Svi ispitanici n = 575	Veštine n = 87	Snaga n = 68	Mešovite n = 304	Izdržljivost n = 116
Uzrast (godine) ^a	23,1 \pm 4,3	24,2 \pm 4,5 [#]	25,5 \pm 3,8 ^{*,§}	22,2 \pm 4,1 ^{*,&}	23,1 \pm 4,1 ^{&}
Telesna visina (cm) ^b	187,3 \pm 9,8	183,5 \pm 7,1 ^{&,#,§}	180,0 \pm 8,3 ^{*,#,§}	190,4 \pm 10,2 ^{*,&,#,§}	186,4 \pm 7,3 ^{*,&,#}
Telesna masa (kg) ^b	84,8 \pm 13,4	81,8 \pm 12,7 [#]	84,9 \pm 17,9	87,0 \pm 13,4 ^{*,§}	81,4 \pm 9,1 [#]
Procenat masti (%) ^b	9,8 \pm 3,6	13,7 \pm 7,0 ^{&,#,§}	10,0 \pm 4,8 ^{*,§}	9,2 \pm 4,6 [^]	8,4 \pm 3,6 ^{*,&}
Godine treniranja ^b	11,7 \pm 4,8	11,6 \pm 5,8 [§]	11,2 \pm 4,6 [^]	12,5 \pm 4,4 ^{&,#,§}	9,9 \pm 4,7 ^{*,#}

^a Testirano pomoću One-Way Anova testa, ^b Testirano pomoću Man-Vitni U testa;

^{*} $p < 0,05$ u odnosu na ispitanike koji pripadaju grupi veština, [#] $p < 0,05$ u odnosu na ispitanike koji pripadaju grupi sportova snage, [^] $p < 0,05$ u odnosu na ispitanike koji pripadaju grupi mešovitih disciplina, [§] $p < 0,05$ u odnosu na ispitanike koji pripadaju grupi sportova izdržljivosti;

Vrednosti srčane frekvencije u mirovanju (neposredno pre testa opterećenja), maksimalne srčane frekvencije (neposredno nakon vežbanja), kao i oporavak srčanih frekvencija nakon prvog i trećeg minuta oporavka, prikazani su po grupama u **Tabeli 2**. Srčana frekvencija u miru u grupi izdržljivosti ($56,2 \pm 10,6 \text{ min}^{-1}$) statistički je značajno niža u odnosu na grupe sportova veštine ($62,9 \pm 11,4 \text{ min}^{-1}$), snage ($61,5 \pm 10,0 \text{ min}^{-1}$) i mešovitih disciplina ($59,9 \pm 10,4 \text{ min}^{-1}$), među kojima nema značajnih razlika ($p = 0,05$). Analizom maksimalne srčane frekvencije utvrđeno je da grupa izdržljivosti ($184,9 \pm 11,0 \text{ min}^{-1}$) ne pokazuje značajne razlike u odnosu na ostale grupe, ali da grupa mešovitih disciplina ($187,4 \pm 9,9 \text{ min}^{-1}$) pokazuje statistički značajne razlike (veća je) u odnosu na grupu snage ($180,8 \pm 12,9 \text{ min}^{-1}$) i grupu veština ($182,9 \pm 13,0 \text{ min}^{-1}$) ($p < 0,05$). Oporavak srčane frekvencije u prvom minutu nakon maksimalnog opterećenja statistički je značajno brži u grupi izdržljivosti ($33,5 \pm 14,3 \text{ min}^{-1}$) u odnosu na ostale tri grupe, među kojima nema značajnijeg statističkog odstupanja ($p < 0,05$). U grupama snage ($74,8 \pm 14,3 \text{ min}^{-1}$), mešovitih disciplina ($79,5 \pm 12,7 \text{ min}^{-1}$) i izdržljivosti ($79,4 \pm 12,6 \text{ min}^{-1}$) međusobno nema značajne razlike u oporavku srčane frekvencije u trećem minutu nakon maksimalnog opterećenja, ali sve tri grupe imaju značajno brži oporavak u odnosu na grupu veština ($67,3 \pm 16,1 \text{ min}^{-1}$) ($p < 0,05$).

Diskusija

Uprkos razlikama u godinama, sve ispitanike možemo svrstati u populaciju mladih vrhunskih sportista (uzrasta od 18 do 35) (22, 23).

Poznato je da postoji značajna razlika u oporavku srčane frekvencije između sportista i fizički neaktivnih osoba (kontrole) (3, 12), a ovom studijom su pokazane razlike u oporavku srčanih frekvencija, ali i razlike frekvencija u mirovanju i maksimalnih frekvencija između različitih

grupa (podela na osnovu preovlađujućih karakteristika treninga) vrhunskih sportista. Pokazano je da grupa izdržljivosti ima značajno niže vrednosti srčane frekvencije u miru u odnosu na preostale tri grupe. S obzirom na niže vrednosti srčane frekvencije u miru, a bez značajne razlike u maksimalnoj srčanoj frekvenciji, sportisti koji vežbaju izdržljivost imaju veći raspon za povećanje u toku fizičke aktivnosti, označen kao rezerva srčane frekvencije (24). Osim toga, oporavak srčane frekvencije u prvom minutu nakon maksimalnog fizičkog opterećenja značajno je brži u grupi izdržljivosti u odnosu na preostale tri grupe. Za razliku od srčane frekvencije u mirovanju i oporavka srčane frekvencije u prvom minutu nakon maksimalnog fizičkog opterećenja, koje su potvrdile hipotezu da se grupa izdržljivosti statistički značajno razlikuje u odnosu na ostale, opovrgnuta je hipoteza da grupa izdržljivosti ima značajno veći oporavak srčane frekvencije u trećem minutu nakon testa opterećenja. Naime, u grupama snage, mešovitih disciplina i izdržljivosti međusobno nema značajne razlike u oporavku srčane frekvencije u trećem minutu nakon maksimalnog opterećenja, ali sve tri grupe imaju značajno veći oporavak u odnosu na grupu veština. Dobijeni podaci mogu se objasniti činjenicom da je na početku vežbanja srčana frekvencija u porastu zbog smanjenja parasimpatičkog tonusa, a kasnije, sa porastom intenziteta vežbanja zbog pojačane aktivacije simpatikusa (25). S druge strane, po prestanku vežbanja nagli pad srčane frekvencije u prvom minutu uslovljen je brzom aktivacijom parasimpatikusa, a kasnije i inaktivacijom simpatikusa (1, 26).

Slično ovoj, studija Vinsent-Kamposa (*Vincente-Campos*) i sar. ispitala je vrednosti srčane frekvencije i njen oporavak nakon maksimalnog opterećenja kod sportista (27). Podaci ove studije, međutim, imaju značajno veće vrednosti ΔHRR1 i ΔHRR3 ($28,1 \pm 14,5$ za ΔHRR1 i $77,1 \pm 14,1$ za ΔHRR3 u odnosu na $15,2 \pm 8,4$ za ΔHRR1 i $64,6 \pm 2,1$ za ΔHRR3). I brojne druge studije su analizirale dinamiku

Tabela 2. Dinamika srčanih frekvencija po grupama

	Svi ispitanici n = 575	Veštine n = 87	Snaga n = 68	Mešovite n = 304	Izdržljivost n = 116
HR u miru ^b	$59,8 \pm 10,7$	$62,9 \pm 11,4^s$	$61,5 \pm 10,0^s$	$59,9 \pm 10,4^s$	$56,2 \pm 10,6^{*,\&,\#}$
Maksimalna HR ^a	$185,4 \pm 11,2$	$182,9 \pm 13,0^\#$	$180,8 \pm 12,9^\#$	$187,4 \pm 9,9^{*,\&}$	$184,9 \pm 11,0$
ΔHRR1^a	$28,1 \pm 14,5$	$24,3 \pm 10,9^s$	$25,5 \pm 11,2^s$	$27,8 \pm 15,6^s$	$33,5 \pm 14,3^{*,\&,\#}$
ΔHRR3^b	$77,1 \pm 14,1$	$67,3 \pm 16,1^{\&,\#,\$}$	$74,8 \pm 14,3^*$	$79,5 \pm 12,7^*$	$79,4 \pm 12,6^*$

HR u miru – srčana frekvencija u miru, maksimalna HR – maksimalna srčana frekvencija, ΔHRR1 – oporavak srčane frekvencije u prvom minutu nakon sesije fizičke aktivnosti, ΔHRR3 – oporavak srčane frekvencije u trećem minutu nakon sesije fizičke aktivnosti;

^a Testirano pomoću One-Way Anova testa, ^b Testirano pomoću Man-Vitni U testa;

* $p < 0,05$ u odnosu na ispitanike koji pripadaju grupi veština, ^s $p < 0,05$ u odnosu na ispitanike koji pripadaju grupi sportova snage, [#] $p < 0,05$ u odnosu na ispitanike koji pripadaju grupi mešovitih disciplina, ^{\$} $p < 0,05$ u odnosu na ispitanike koji pripadaju grupi sportova izdržljivosti

oporavka srčane frekvencije, ali zbog razlika u protokolima studija rezultati nisu pogodni za upoređivanje (13, 16, 26).

S obzirom na to da je oporavak srčane frekvencije uslovljen aktivnošću parasimpatikusa, može se reći da grupa izdržljivosti ima značajno veći parasimpatički tonus u odnosu na ostale grupe sportista [3, 28]. Dominantan parasimpatički tonus može se objasniti povećanom sintezom azot-monoksida, koji facilitira vagalnu holinergičku transmisiju, uz istovremenu inhibiciju simpatičkog uticaja na srce, što je pokazano na zamorcu kome je trenirana izdržljivost (29). Tokom treninga, posebno treninga izdržljivosti, drastično se povećava protok i posleđično dolazi do trenja (engl. *shear-stress*) ćelija krvi i plazme o endotel krvnih sudova, što rezultira oslobađanjem velike količine azot-monoksida koji facilitira parasimpatičku transmisiju (30).

Brži oporavak srčane frekvencije u prvom i trećem minutu nakon maksimalnog fizičkog opterećenja, koji ukazuje na jači parasimpatički tonus, ima protektivno dejstvo na kardiovaskularni sistem, iako tačan mehanizam ovog dejstva nije poznat (8). Oporavak srčane frekvencije je pokazatelj stepena utreniranosti i mogao bi da ukaže

na nepravilno vežbanje, poput previše treniranja (engl. *overtraining*) i dehidracije (17). Istraživanja Heffernana (*Heffernan*) i sar. pokazuju da se treniranjem izdržljivosti ubrzava oporavak srčane frekvencije, ali i da 4 nedelje po prestanku treniranja ove promene iščezavaju (31). Sve navedeno, zajedno sa činjenicom da su srčana frekvencija i njen oporavak nakon fizičke aktivnosti pouzdani parametri, čije pribavljanje je jeftino i neinvazivno, iziskuje potrebu da se oporavak srčane frekvencije definiše kao pokazatelj fizičke utreniranosti.

Zaključak

Koristeći srčanu frekvenciju i njen oporavak kao parametre parasimpatičke holinergičke aktivnosti, ova studija je pokazala da postoje male, ali statistički značajne razlike između različitih grupa sportova. Manje vrednosti srčane frekvencije u mirovanju i njen brži oporavak u prvom minutu nakon testa maksimalnog opterećenja u grupi sportova izdržljivosti u odnosu na preostale tri grupe sportova jasno ukazuje na dominantniji parasimpatički tonus.

Literatura

- Arai Y, Saul JP, Albrecht P, Hartley LH, Lilly LS, Cohen RJ et al. Modulation of cardiac autonomic activity during and immediately after exercise. *Am J Physiol.* 1989; 256: H132–H141.
- Perini R1, Orizio C, Comandè A, Castellano M, Beschi M, Veicsteinas A. Plasma norepinephrine and heart rate dynamics during recovery from submaximal exercise in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1989; 58: 879–883.
- Imai K, Sato H, Hori M, Kusuoka H, Ozaki H, Yokoyama H, et al. Vagally mediated heart rate recovery after exercise is accelerated in athletes but blunted in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 24: 1529–1535.
- Pierpont GL, Stolpman DR, Gornick CC. Heart rate recovery post-exercise as an index of parasympathetic activity. *J Auton Nerv Syst.* 2000; 80: 169–174.
- Cole CR, Blackstone EH, Pashkow FJ, Snader CE, Lauer MS. Heart-rate recovery immediately after exercise as a predictor of mortality. *N Engl J Med.* 1999; 341: 1351–1357.
- Lahiri MK, Kannankeril PJ, Goldberger JJ. Assessment of autonomic function in cardiovascular disease: physiological basis and prognostic implications. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51: 1725–1733.
- Billman GE. Aerobic exercise conditioning: a nonpharmacological anti-arrhythmic intervention. *J Appl Physiol.* 2002; 92: 446–454.
- Saxena A, Minton D, Lee DC, Sui X, Fayad R, Lavie CJ, et al. Protective role of resting heart rate on all-cause and cardiovascular disease mortality. *Mayo Clinic Proceedings.* 2013; 12: 1420–1426.
- Lind L, Andren BC. Heart rate recovery after exercise is related to the insulin resistance syndrome and heart rate variability in elderly men. *Am Heart J.* 2002; 144:666–672.
- Hagberg JM, Hickson RC, Ehsani AA, Holloszy JO. Faster adjustment to and recovery from submaximal exercise in the trained state. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1980; 48: 218–224.
- Darr KC1, Bassett DR, Morgan BJ, Thomas DP. Effects of age and training status on heart rate recovery after peak exercise. *Am J Physiol.* 1988; 254: H340–H343.
- Otsuki T, Maeda S, Iemitsu M, Saito Y, Tanimura Y, Sugawara J, et al. Postexercise heart rate recovery accelerates in strength-trained athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39: 365–370.
- Boullosa DA, Tuimil JL, Leicht AS, Crespo-Salgado JJ. Parasympathetic modulation and running performance in distance runners. *J Strength Cond Res.* 2009; 23: 626–31.
- Daanen HA, Lamberts RP, Kallen VL, Jin A, Van Meeteren NL. A systematic review on heart-rate recovery to monitor changes in training status in athletes. *Int J Sports Physiol Perform.* 2012; 7: 251–260.
- Buchheit M, Gindre C. Cardiac parasympathetic regulation: respective associations with cardiorespiratory fitness and training load. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291: H451–H458.
- Borresen J, Lambert MI. Autonomic control of heart rate during and after exercise: measurements and implications for monitoring training status. *Sports Med.* 2008; 38: 633–646.
- Lamberts RP, Swart J, Capostagno B, Noakes TD, Lambert MI. Heart rate recovery as a guide to monitor fatigue and predict changes in performance parameters. *Scand J Med Sci Sports.* 2010; 20: 449–457.
- Maeder MT, Ammann P, Rickli H, Brunner-La Rocca HP. Impact of the exercise mode on heart rate recovery after maximal exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2009; 105: 247–255.
- Antelmi I, Chuang EY, Grupi CJ, Latorre Mdo R, Mansur AJ. Heart rate recovery after treadmill electrocardiographic exercise stress test and 24-hour heart rate variability in healthy individuals. *Arq Bras Cardiol.* 2008; 90: 380–385.
- Ostojic SM, Markovic G, Calleja-Gonzalez J, Jakovljevic DG, Vucetic V, Stojanovic MD. Ultra short-term heart rate recovery after maximal exercise in continuous versus intermittent endurance athletes. *Eur J Appl Physiol.* 2010; 108: 1055–1059.
- Caselli S, Di Paolo FM, Pisciocchio C, Di Pietro R, Quattrini FM, Di Giacinto B, et al. Threedimensional echocardiographic characterization of left ventricular remodeling in Olympic athletes. *Am J Cardiol.* 2011; 108(1): 141–7.
- Corrado D, Basso C, Schiavon M, Pelliccia A, Thiene G. Pre-participation screening of young competitive athletes for prevention of sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol.* 2008;9;52(24):1981–9.
- Corrado D, Pelliccia A, Bjørnstad HH, Vanhees L, Biffi A, Borjesson M, et al. Study Group of Sport Cardiology of the Working Group of Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology and the Working Group of Myocardial and Pericardial Diseases of the European Society of Cardiology.

- Cardiovascular pre-participation screening of young competitive athletes for prevention of sudden death: proposal for a common European protocol. Consensus Statement of the Study Group of Sport Cardiology of the Working Group of Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology and the Working Group of Myocardial and Pericardial Diseases of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2005;26(5):516-24
24. Al-Ani M, Robins K, al-Khalidi AH, Vaile J, Townend J, Coote JH. Isometric contraction of arm flexor muscles as a method of evaluating cardiac vagal tone in man. *Clin Sci (Lond)*. 1997;92(2):175-80.
 25. Robinson B, Epstein S, Beiser G, Braunwald E. Control of heart rate by the autonomic nervous system: studies in man on the interrelation between baroreceptor mechanisms and exercise. *Circ Res*. 1966;19:400-11.
 26. Bosquet L, Gamelin FX, Berthoin S. Reliability of postexercise heart rate recovery. *Int J Sports Med*. 2008 r;29(3):238-43.
 27. Vicente-Campos D, Martin Lopez A, Nunez MJ, Lopez Chicharro J. Heart rate recovery normality data recorded in response to a maximal exercise test in physically active men. *Eur J Appl Physiol*. 2014;114(6):1123-8.
 28. Coote JH. Recovery of heart rate following intense dynamic exercise. *Exp Physiol*. 2010;95(3):431-40.
 29. Mohan RM, Choate JK, Golding S, Herring N, Casadei B, Paterson DJ. Peripheral pre-synaptic pathway reduces the heart rate response to sympathetic activation following exercise training: role of NO. *Cardiovasc Res*. 2000;47(1):90-8.
 30. Busch R, Strohbach A, Pennewitz M, Lorenz F, Bahls M, Busch MC, et al. Regulation of the endothelial apelin/APJ system by hemodynamic fluid flow. *Cell Signal*. 2015 24;27(7):1286-1296.
 31. Heffernan KS, Fahs CA, Shinsako KK, Jae SY, Fernhall B.. Heart rate recovery and heart rate complexity following resistance exercise training and detraining in young men. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(5):H3180-6.



CALL FOR PAPERS

UNITED IN SCIENCE

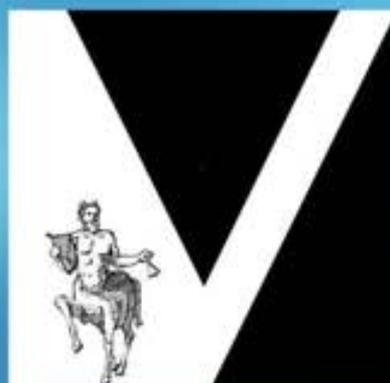


Medicinski podmladak / Medical Youth

BIOMEDICAL SCIENTIFIC JOURNAL FOR STUDENTS AND YOUNG RESEARCHERS since 1949

medicinskpodmladak@med.bg.ac.rs

And



Chiron

THE FIRST STUDENT SCIENTIFIC JOURNAL OF VETERINARY MEDICINE IN SERBIA

hiron.fvm@gmail.com

PUBLISH OR PERISH!

MEDICINSKI PODMLADAK

naučni časopis za studente i mlade istraživače



MEDICAL YOUTH

scientific journal for students and young researchers

Dear authors,

Below, you will find brief instructions on how to prepare your text. Should you have any questions, please do not hesitate to contact us on:

medicinskipodmladak@med.bg.ac.rs or
podmladak.med.bg@gmail.com.

Thank you for the time and effort you have chosen to dedicate to young researchers. We are proud to be standing on the shoulders of giants!

Medicinski podmladak is an international peer-reviewed journal publishing scientific research papers written by college and PhD students of biomedical sciences (medicine, dental medicine, pharmaceuticals, molecular biology, biochemistry, etc). The first edition was published in 1949, which makes our journal one of the oldest and most esteemed students' journals in Europe. Our current goal is to connect young researchers from all over the world and to guide them in their first steps towards success within the world of science.

Medicinski podmladak publishes:

- **original papers** written by college students (in IM-RaD form),
- **mini-review articles**, written by PhD students as a brief summary of some interesting points of their thesis,
- **review articles**, written by esteemed scientists.

Issues are published 4 times per year: in March, June, September and December. Each issue has a specific theme, concerning an important topic in various fields of clinical and biomedical sciences.

WRITING AND FORMATING OF ARTICLES

Conditions to be fulfilled

Medicinski podmladak considers and publishes papers that have not been published (partially or *in extenso*) or papers not sent for publishing or within the review process. By sending your paper and signing the cover letter, authors confirm that paper presents original work and that scientific process has been done according to ethical principles.

For authors of original articles, as well as mini review article, there is one more condition has to be fulfilled: Each student has to have a mentor. Mentor is supposed to have at least one paper as the first author, published in journal registered on JCR list with impact factor above 1.

Text format

Your paper may be submitted as DOC or DOCX format.

Paper may be written in Serbian or English language, depending on author's decision.

Size of the article **should not exceed 3000 words (original articles), 2500 (mini review articles), 3500 words (review article)**, not including title page, abstracts in Serbian and in English language, references, as well as supplement.

It is necessary that text is written: on a paper A4 size, with double line spacing, 2.5 cm margins. Choose *Times New Roman* for your letters font, letters' size 12 pt, left alignment of the text (do not choose *Justify*), and each new paragraph indented for 1 cm. Do not use bolded letters in your text.

Structure :

Every submitted paper must contain:

1. Title page
2. Abstract (written both in Serbian and English)
3. Main text
4. References
5. Supplementary files

1. Title page

Title page contains title of your work only, both in Serbian and English (NOTE: if an author is not a native Serbian speaker, Editorial board will provide all the necessary translations). Title page does not contain names of authors and mentors (referring to original and mini review articles), their titles, as well as institutions where the research was done, or cities, countries, or any other information that could connect the paper to the authors, mentors and institutions.

Title should be typed in Capital letters, BOLDDED and size 12 pt.

2. Abstract

Abstract is written both in Serbian and in English language (*Sažetak/Abstract*). It may contain up to 300 words (not including subtitles and key words). The text of the abstract should be organized according to author's decision. The abstract also should include 3 to 5 key words. They will be used for online search and they will influence your paper's visibility and chance to be quoted.

The text of the Abstract/*Sažetak* should contain:

Introduction/*Uvod*

Aim/*Cilj*

Material and methods/*Materijal i metode*

Results/*Rezultati*

Conclusion/*Zaključak*

Key words/*Ključne reči*

If your article is CASE REPORT Abstract/*Sažetak* should contain:

Introduction/*Uvod*

Aim/*Cilj*

Case presentation/*Prikaz slučaja*

Conclusion/*Zaključak*

Key words/*Ključne reči*

Key words (3-5) should be chosen wisely. They will be used for online search and will influence your paper's visibility and chance to be quoted.

3. Text

a) Structure of the original article

Original paper may have IMRaD structure (Introduction, Methods, Results and Discussion) or case report structure (which are structured with the agreement of the Editorial Board).

INTRODUCTION contains literature data on presented issue. Overview of familiar facts must not be too long and must clearly justify the reasons for the research. Basic hypothesis and the aim are presented as the last paragraph within the introduction.

MATERIAL AND METHODS elaborate in details observation or experiments performed, so that other researchers could repeat described research according to the description. List number, age, gender and other characteristics of subjects, if the subject is human population. If experiments are performed on animals, list species, number, age, gender and other characteristics of animals. List names of methods used in research process and exact names of appliance (model, manufacturer). When listing names of medications, use generic names and registered names in brackets. Do not forget to note application

method (i.m., i.v., etc.). Describe statistical methods used for results processing. Use SI measurement units.

RESULTS should be presented in logical order in text, tables and illustrations. Each of supplementary files contains appropriate textual elaboration, without repeating the entire content of tables and illustrations. Cover and overview significant findings only. Tables must be in black and white.

DISCUSSION contains of the analysis of results obtained with the overview of results previously published by other authors. Do not solely repeat your results, analyze them and compare to already known findings. The last paragraph should be your conclusion. Avoid claims and conclusions not fully supported by the results.

b) Structures of mini review and review articles

The contributor has the freedom to organize the body of the text as he/she considers as the most appropriate for the topic.

4. References

All references listed must be cited in the text, and all text citations must have a reference listed. References must be numbered according to their first appearance in the text. Identify references in the text, tables and legends with Arabian numbers in round brackets ().

Example: „...number your references like this (1).“

Medicinski podmladak uses *Vancouver* reference style. Here are some basic rules.

1. When multiple references are cited together, use a hyphen to indicate a series of inclusive numbers. Use commas to indicate a series of non-inclusive numbers.

Example: Multiple clinical trials (5-8) show...
Multiple clinical trials (5, 8, 10) show...
Multiple clinical trials (5-8, 10) show...

2. Standard format for referencing Books is:

Author Surname Initials. Title: subtitle. Edition (if not the first). Place of publication: Publisher; Year.

Example: Seferovic PM, Spodick DH, Maisch B, editors. *Pericardiology: Contemporary Answers to Continuing Challenges*. Beograd: Nauka; 2000.

More than six authors/editors:

Example: Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al., editors. *Harrison's principles of internal medicine*. 17th ed. New York: McGraw Hill; 2008.

NOTE: If there are more than 6 authors, list only the first six authors followed by "et al".

Book chapter:

Example: Maisch B, Ristic AD, Funck R. Dilated cardiomyopathies and congestive heart failure. In: Singal PK, Dixon IMC, Kirshenbaum LA, Dhalla NS, editors. Cardiac Remodeling and Failure. Boston-Dordrecht-London: Kluwer Academic Publishers; 2003. p.35-65.

3. Standard format for Journal Articles is:

Author Surname Initial. Title of article. Title of journal, abbreviated. Date of publication: Volume Number(Issue Number): Page Numbers.

Example: Haas AN, de Castro GD, Moreno T, Susin C, Albandar JM, Oppermann RB, et al. Azithromycin as a adjunctive treatment of aggressive periodontitis: 12 months randomized clinical trial. J Clin Periodontol. 2008 Aug; 35(8):696-704.

Further details with more examples you may find on these links:

https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html
http://library.vcc.ca/downloads/VCC_VancouverStyle-Guide.pdf

5. Supplementary files

When talking about your supplementary files and artwork, *Medicinski podmladak* allows up to 8 supplementary files. Artwork is numbered according to their first appearance in the text. Write in the text as well where your artwork should be placed (example Graph 1; Table 1.) and place your artwork where it helps the best understanding and text reading. The editorial board will adjust it during the preparation for printing. We will do our best to keep the artwork at the suggested place. However, some changes may be made if the format doesn't allow any other position.

NOTE: Each supplementary file, besides placing it in the text, you have to send separately in original format. This is necessary so that in printed version your supplementary file would be appropriately shown without losing quality.

Medicinski podmladak prints artwork in black and white and in RGB (red, green, blue). Supported types of artwork are: EPS, PDF, TIFF or Microsoft Office files (Word, PowerPoint, Excel).

There are some conditions to be fulfilled for your artwork in order to print them in the best quality possible.

- EPS format

EPS format is vector based. A vector image does not use pixels in images but mathematical expressions (graphs, bar charts, chemical formulae, etc.). Line weights range from 0.10 pt to 1.5 pt.

- TIFF (bitmap) format

This is the artwork type commonly used for graphs and charts. A bitmap is an image format that defines an image only in terms of black and white (not gray). Images should have a minimum resolution of 1000 dpi. Images should be tightly cropped.

- Grayscale images in TIFF format

Grayscale images are distinct from black-and-white images, which in the context of computer imaging are images with only two colors, black and white. Grayscale images have many shades of gray in between. Images should have a minimum resolution of 300 dpi. Images should be tightly cropped.

- CMYK images in TIFF format

Images should have a minimum resolution of 300 dpi. Images should be tightly cropped.

To see how to change dpi in an image, we recommend this instruction:

<http://www.rideau-info.com/photos/changedpi.html>
<http://convert.town/image-dpi>

The width of your image may be between minimal size and single column size, equal to single column width, 1.5 columns or double column (full width). For *Medicinski podmladak* that is:

minimal size = 40 mm
 single column width = 87 mm
 1.5 columns width = 130 mm
 double column width = 181 mm

From submitting your paper to publishing

Articles written according to this instruction should be sent via e-mail with fulfilled cover letter.

After submitting your paper, you will receive confirmation mail. Received paper is sent to reviewers. Two acknowledged reviewers will review each paper. Authors do not know who the reviewers are. The same holds true for the reviewers, that does not know the identity of authors.

After the review process is finished, suggestions are forwarded to authors so that corrections could be made. After corrections, the paper is returned to the Editorial Board. Advisory Board of the journal makes the final decision whether or not the paper should be published. The final decision will be announced to the first author via e-mail.

Thank you for choosing *Medicinski podmladak!*

NAJSTARIJI STUDENTSKI NAUČNI ČASOPIS U JUGOISTOČNOJ EVROPI - put ka uspehu -



Medicinski podmladak je međunarodni, recenzirani, stručni i naučni časopis za studente i mlade istraživače koji ima najstariju tradiciju u jugoistočnoj Evropi. Časopis su pokrenuli najbolji studenti Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu davne 1949. godine i od tada Podmladak, kako mu skraćeno tepamo, redovno i u kontinuitetu izlazi.

U uvodnoj reči prve sveske Medicinskog podmlatka članovi prve redakcije su, između ostalog, vizionarski zapisali: „Naučne grupe u kojima naši drugovi i drugarice produbljuju stečeno znanje, odigraće veoma značajnu ulogu jer će iz njihovih redova poteći mnogi naučni i nastavni kadrovi. Otuda pojava Medicinskog podmlatka nije samo smotra dosadašnjih rezultata i uspeha, već će ona služiti i kao podstrek za nova pregnuća.“ Rodonačelnik savremene onkologije u Beogradu, prof. Ksenofon Šahović, dodao je: „Svaki student Medicinske velike škole treba da čita ovaj časopis. Svaki student treba da sarađuje u njemu. On treba da bude izraz i simbol stremljenja naših studenata. On treba da posluži kao instrument zblizenja i saradnje sa ostalim studentima drugih medicinskih, farmaceutskih i stomatoloških fakulteta.“ Dakle, časopis je nastao kao izraz volje i težnje studenata medicine da se uključe u naučno-istraživački rad fakulteta, da bi ubrzo pospešio i saradnju sa drugim fakultetima u Jugoslaviji.

Osnivač časopisa je Medicinski fakultet u Beogradu. Prvo sedište redakcije bilo je u prostorijama tadašnje IV interne klinike u Pasterovoj 14. Ta redakcija je na dobrovoljnoj osnovi, samopregorno i entuzijatski organizovala redovno publikovanje časopisa. Brojevi su izlazili i na svaka dva meseca. Kvalitetom se uveliko prevazišla prvobitna zamisao da se u njemu štampaju samo studentski radovi, pa već 1954. godine u Medicinskom podmlatku pored rubrike „Originalni radovi“ postoje i druge rubrike: „Opšti pregled“, „Preventivna medicina“, „Prikazi“, „Problemi studija i nastave“, „Bibliografija“ i rubrika „Podsetnik“, gde po prvi put nastavnici objavljuju tekstove koji bi pomagali studentima u pripremanju ispita. O entuzijizmu

tih generacija studenata medicine svedoče naše stranice: „Zar nije neophodno da se i na ovaj način, još za vreme studija, stiče ona divna navika da se o svemu razmišlja sopstvenom glavom, da se opšte priznate istine proveravaju i potvrđuju sopstvenim zapažanjima, da se snaga sopstvenog razmišljanja stavlja iznad tehnike i mašina na koje se mladi lekari više nego što je potrebno oslanjaju. Pomagati ovakav rad, koji svakome ko se njime bavi donosi beskrajno mnogo uživanja kad je podstican zdravom ambicijom i lišen koristoljublja, znači vaspitavati ljude, oplemenjivati ih.“

Godine su prolazile ne prekidajući kontinuitet rada Medicinskog podmlatka. Kao što to obično biva, uz nova iskustva počeli su i prvi osvrti na probleme, koji će u radu pratiti kasnije redakcije. Šetalo Jožef, urednik Medicinskog podmlatka 1969. godine piše: „Stručni kongresi su naši najveći ali i jedini izvor originalnih stručnih radova. Ostaje i dalje otvoreno pitanje kako stimulisati studente na samostalan rad, kako im omogućiti još bolji i masovniji pristup klinikama i institutima. Nadamo se da ćemo u budućnosti u saradnji i uz razumevanje Škole i njenih institucija uspeti da nađemo rešenje i za ovaj problem.“ Započinje intenzivna saradnja sa Farmakološkim institutom Medicinskog fakulteta, a javlja se ideja o integraciji svih medicinskih fakulteta u zemlji. Već 1969. godine, studentima Medicinskog fakulteta u Beogradu i Novom Sadu pridružili su se i studenti Stomatološkog fakulteta u Beogradu. U narednim godinama ideje Podmlatka su širene čitavom Jugoslavijom, te je časopis pripadao studentima medicine Beograda, Ljubljane, Niša, Novog Sada, Rijeke i Skoplja. Izdavani su zajednički brojevi sa redakcijama stručnih časopisa medicinara Sarajeva i Zagreba. Tako je Medicinski podmladak prerastao okvire Beograda i Beogradskog univerziteta.

Osamdesetih godina obim časopisa uvećan je izdavanjem odgovarajućih dodataka – supplementum-a časopisa. Jedno od poznatijih izdanja bilo je Opšta patologija tumora profesora Vladimira Kanjuha 1980. godine, koje je korišćeno kao udžbenik iz onkologije, kada je ovaj predmet prvi put i uveden u redovnu nastavu. Sve intenzivnije su se

u saradnju sa Medicinskim podmlatkom uključivali profesori sa svih katedri, tako da je danas kooperacija na zavidnom nivou, sa ciljem da podstakne studente medicine na naučnoistraživački rad, ali i da ih informiše o najnovijim dostignućima iz oblasti biomedicinskih i javnozdravstvenih nauka i pruži literaturu za pripremanje nekih ispitnih pitanja manje obrađenih u zvaničnim udžbenicima.

Nesrećne okolnosti u našem okruženju sprečile su pokretanje međunarodnog časopisa studenata medicine čije sedište je trebalo da bude u Beogradu, upravo zbog ugleda našeg *Medicinskog podmlatka*. Časopis se održao i u teškim vremenima socijalnih rastakanja i ratnih zbivanja. Istraživačka bujica studenata medicine Univerziteta u Beogradu i njihovih učitelja, progresivno je rasla. Tako je ovaj časopis i u vremenima sankcija studentima našeg fakulteta bio svetionik za praćenje savremenih dostignuća medicinske nauke i podsticaj za neprekidnost naučnoistraživačkog i publikacijskog rada studenata. I sve to, dobrovoljnim radom.

Osnovni zadatak koji smo dobili od naših prethodnika trudimo se da ispunjavamo i danas: da *Podmladak* doprinese vaspitanju mladog lekarskog naraštaja, stvaranju ličnosti visoke moralne snage, izgradnji stručnjaka dejalektičara, a pre svega da studente medicine, pod mentorstvom svojih učitelja, uvede u lepote i tajne naučnoistraživačkog rada. To je cilj kome stremi i današnja redakcija, svesna veličine nasleđa svojih prethodnika, ali i sa željom da ostavi nove podsticaje generacijama koje dolaze.

Urednici *Medicinskog podmlatka*:

1949. Dušan Đurić
 1950/51. Ljubodrag Mihajlović
 1952/53. Milorad Radetić
 1954. Ljubiša Rakić
 1955. Jovan Bijelić
 1956/57/58. Dragoljub Jovanović
 1959. Ljubomir Stefanović
 1960. Ljubomir Erić
 1961. Aleksandar Anđelković
 1962. Jovan Kačaki
 1962. Danilo Zdravković
 1963. Mirjana Petrović
 1963. Danica Sabovljević
 1964/65. Boško Kukolj
 1966. Slobodan Imširagić
 1966. Ljubomir Crevar
 1967. Žarko Martinović
 1968. Jožef Šetalo
 1969/70/71/72. Branislav Donfried
 1973. Miroslav Vrbanić
 1974. Miroslav Radojković
 1974/75. Ljiljana Mirković
 1976. Pavle Pavlović
 1976/77. Gordana Vujanić
 1978. Slaviša Ćurčić
 1979/80. Živko Perišić
 1981. Ljiljana Planić
 1981. Zoran Vukašinić
 1982. Zorica Živković
 1983/84. Snežana Jovanović
 1985/86. Snežana Andrejević
 1987. Svetlana Anić
 ...
 1997. Marija Marinković
 1998. Lidija Tasić
 1999/2000. Dejan Nešić
 2001/02. Nebojša Đurišić
 2003/04/05. Milorad Grujičić
 2005/06. Milica Maksimović
 2007/08. Tijana Ralić
 2009/10. Miloš Maksimović
 2011. Milan Marinković
 2012. Miloš Branković
 2013. Nebojša Marković
 2014/15. Stefan Barišić
 2015, 2016. Brankica Dimitrijević



Vaš prvi korak u svetu nauke.



“If we could give every individual the right amount of nourishment and exercise, not too little and not too much, we would have found the safest way to health”

Hippocrates (460 - 370 B.C.)