# Metrijske karakteristike neinvazivnih biomarkera pri procjeni stupnja hidriranosti organizma kod vrhunskih boksača juniora

**Zubac, Damir**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2016**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Kinesiology / Sveučilište u Splitu, Kineziološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:221:123294

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-25**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Faculty of Kinesiology, University of Split

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KINEZIOLOŠKI FAKULTET
POSLIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI DOKTORSKI STUDIJ

**DAMIR ZUBAC**

# METRIJSKE KARAKTERISTIKE NEINVAZIVNIH BIOMARKERA PRI PROCJENI STUPNJA HIDRIRANOSTI ORGANIZMA KOD VRHUNSKIH BOKSAČA JUNIORA

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

Split, srpanj 2016.

## SAŽETAK

Natjecatelji u olimpijskim, ali i srodnim borilačkim sportovima nastoje naglim i nekontroliranim smanjenjem tjelesne mase doseći nižu težinsku kategoriju i ostvariti natjecateljsku prednost. Najčešće, smanjenje ukupne tjelesne mase ostvaruje se na račun dinamičnoga smanjenja volumena izvanstanične tekućine. Takva praksa dovodi organizam u stanje akutne dehidracije koja pritom može izazvati brojne zdravstvene komplikacije, uključujući i smrt mladih sportaša. Stoga se važnost problematike mjerenja stupnja hidriranosti organizma ne ogleda isključivo sa stajališta potencijalno umanjenih funkcionalno-fizioloških kapaciteta sportaša, nego preventivnoga djelovanja zbog ugroženosti zdravstvenoga statusa. Trenutačno, u znanstvenoj literaturi postoji velika rasprava o metrijskim karakteristikama neinvazivnih pokazatelja (biomarkera) korištenih pri mjerenju i interpretaciji stupnja hidriranosti organizma sportaša. Stoga, temeljni je cilj ovoga istraživanja ispitati metrijske karakteristike višekratnih neinvazivnih pokazatelja stupnja hidriranosti organizma kod vrhunskih boksača juniorskoga uzrasta u stvarnim uvjetima pripremnoga kampa. U ovoj studiji prikupljeno je šezdeset devet uzoraka urina i analizirano putem terenskih i laboratorijskih metoda paralelno s procjenom ukupnoga udjela vode u tijelu i tjelesne mase, dan-za-dan pristupom tijekom tri uzastopna dana. Cjelokupan je unos markonutrijenata i vode dokumentiran tijekom istraživanja. Uzorak ispitanika sačinjen je od vrhunskih boksača juniorskoga uzrasta (n=23, dob 17.3±1.9 godina, tjelesne visine 1.75±0.08 m, tjelesne mase 66.8±11.8 kg, 8.3±2.3 % udjela masti u tijelu, 7.1±0.9 iskustva u boksu), isključivo nacionalnih prvaka Rusije, Srbije i Bosne i Hercegovine. Temeljem različitosti u antropometrijskim karakteristikama ispitanici su podijeljeni u dvije homogene skupine (laki/teški). Temeljna se spoznaja ove studije ogleda u opaženoj velikoj varijabilnosti i nedosljednosti urinarnih pokazatelja stupnja hidriranosti organizma (laboratorijskih i terenskih, u rasponu: ICC=0.38 - 0.58) unatoč stabilnoj tjelesnoj masi (ICC=0.99, CV<1 %) i primjerenom unosu markonutrijenata i vode. *Post hoc* analize utvrdile su uniforman porast u vrijednostima osmolaliteta urina ($U_{OSM}$) kod obje skupine ispitanika, između prvoga i trećeg mjerenja za 11.2±12.8 % ($p<0.001$, $\eta^2=0.4$) kod lakih boksača, i 19.9±22.7 % ($p<0.001$, $\eta^2=0.5$) kod teških boksača, dok su vrijednosti specifične težine urina ($S_{TU}$) porasle za 0.5±0.4 %, ($p<0.01$, $\eta^2=0.4$), isključivo kod teških boksača. Nalazi konkurentne valjanosti i medicinskih dijagnostičkih modela pokazuju uniformno slaganje i visoku povezanost urinarnih indikatora (r=0.87; p<0.001;

$A_{UC}$=0.95, p<0.01), ali i razliku u odnosu na ukupni udio vode u tijelu (r=0.06, p=0.45, r=-0.13, p=0.53, pojedinačno). Promotrena je univerzalno visoka stopa hipohidriranosti organizma ($S_{TU}$=1.028±0.003 g•mL$^{-1}$, $U_{OSM}$=1036±158 mOsmol•kg$^{-1}$), uniformno kod svih ispitanika, što dovodi u pitanje valjanost interpretacije do sada postavljenih kriterija i referentnih vrijednosti prilikom procjene deficita vode u tijelu sportaša. Ipak, usprkos porastu u vrijednostima koncetracije urina, ukupan unos markonutrijenata (35±4 kcal•kg$^{-1}$) i vode (~3.0 L) bio je stabilan tokom provedbe studije. Predstavljeno istraživanje nije potvrdilo hipotezu o utjecaju povišene mišićne mase na dijagnostičku točnost $S_{TU}$ (r=0.14, p=0.51), dok metrijske karakteristike i utjecaj ukupnih proteina u urinu iz maloga uzorka (r=0.11; p=0.59) na dijagnostičku točnost $S_{TU}$ dan-za-dan pristupom ostaju dvosmisleni. Temeljem prikazanih podataka moguće je izvesti zaključke: (i) predstavljena studija opovrgava generalno prihvaćenu teoriju, ali primjenu osmolaliteta urina kao *zlatnoga standarda* prilikom procjene ukupnoga deficita u tijelu, (ii) otvoreno kritizira korištenje presječnih studija čiji je cilj bio utvrđivanje metrijskih karakteristika pokazatelja stupnja hidriranosti organizma na uzorku natjecatelja iz borilačkih sportova, (iii) otvara problematiku različitosti mehanizama ostvarenja koncentriranoga urina u odnosu na dijagnostičku točnost procjene. Daljnje su studije potrebne da bi se detaljno razložili uzročni mehanizmi visoke varijabilnosti opažene u vrijednostima koncentracije urina kao posljedica odgovora bubrežnoga sustava uslijed visokointenzivnih priprema u borilačkim sportovima. Čini se kako općeprihvaćeni neinvazivni dehidracijski biomarkeri iz urina ukazuju na druga fiziološka stanja i kompenzacijske mehanizme osim isključivog deficita vode u tijelu. Neovisno o izboru tehnike mjerenja, trenutačno ne postoji u potpunosti ispravan i točan pristup problematici i interpretaciji prikupljenih podataka, što je i pokazano statističko-metodološkim pristupom ove studije.

Ključne riječi: Dehidracija, borilački sportovi, urin, mjerni instrumenti

**ZAHVALA**

Istraživanje je u potpunosti provedeno tijekom pripremnoga boksačkog kampa u Subotici, Republika Srbija uz pomoć kolege Tomislava Antelja, prof. i osoblja laboratorija Human Lab Subotica. Osobita zahvala mojim supervizorima, dr. Boštjanu Šimuniču i dr. Shawndi A. Morrisonu, s Univerza na Primorskem, Znanstveno-Raziskovalno Središće, Institut za Kineziološke Raziskave, Koper, Republika Slovenija, koji su nesebično posvetili svoje vrijeme i uvelike unaprijedili moje poglede na znanost u razdoblju od 2014. do 2016. godine. Također, zahvaljujem dr. Urošu Marušiču, dr. Toši Maršiću, Nikoli Sivriću, dr. med., Srđanu Vujičiću, mag cin., Vedranu Markotiću, dr. med., Anamariji Sivrić, Marku Ćorluki i Milanu Đukiču.

**Mentori:**

doc. dr. sc. Hrvoje Karninčić

doc. dr. sc. Vladimir Ivančev, dr. med.

# SADRŽAJ

SAŽETAK ..... II
ZAHVALA ..... IV
LISTA GRAFOVA ..... VII
SIMBOLI I SKRAĆENICE ..... IX
POGLAVLJE I ..... 1
UVOD ..... 1
Razvojni aspekti boksa ..... 1
Fiziološke osnove regulacija balansa tjelesnih tekućina i odaziv združenoga mehanizma na deficit vode u tijelu sportaša ..... 3
Odgovor bubrežnoga sustava na sportsku aktivnost i vježbanje ..... 5
Čimbenici povezanosti nagloga svojevoljnog smanjenja tjelesne mase i posljedične akutne dehidracije ..... 8
Osobitosti mjerenja i interpretacije stupnja hidriranosti organizma ..... 10
Dehidracijski dijagrami ..... 14
Pregled dosadašnjih istraživanja u okviru predložene problematike ..... 17
POGLAVLJE II ..... 20
METODE I POSTUPCI ..... 20
Ciljevi i svrha istraživanja ..... 20
Hipoteze: ..... 21
Uzorak ispitanika ..... 21
Uzorak varijabli ..... 22
Antropometrijske karakteristike ..... 22
Uzorkovanje urina ..... 23
Bioelektrična impedanca: ..... 23
Protokol istraživanja ..... 24
Preliminarna mjerenja ..... 24
Unos markonutrijenata i vode ..... 25
Metode obrade podataka ..... 26
POGLAVLJE III ..... 28

REZULTATI ..... 28
Rezultati preliminarnih mjerenja ..... 28
Antropometrijske karakteristike ..... 29
Unos makronutrijenata i vode ..... 29
Pouzdanost ..... 29
Valjanost ..... 30
Dijagnostička točnost ..... 31
Stopa hipohidriranosti ..... 31
TABLICE I GRAFOVI ..... 32
POGLAVLJE IV ..... 43
RASPRAVA ..... 43
Pouzdanost ..... 43
Utjecaj tjelesnoga vježbanja i sustavnoga treninga na akutni odgovor endokrinoga sustava. 47
Akutne i kronične promjene stupnja hidriranosti organizma ..... 49
Valjanost ..... 53
Konkurentna valjanost ..... 53
Dijagnostička točnost ..... 56
Remeteći faktori preciznosti u procjeni stupnja hidriranosti organizma ..... 57
Utjecaj mišićne mase na dijagnostičku točnost dehidracijskih biomarkera urina ..... 58
Stopa hipohidriranosti organizma ..... 59
Praktična razmatranja, perspektive i primjenjivost ..... 61
Sažetak praktičnih aplikacija ..... 63
ZAKLJUČAK ..... 64
SUMMARY (IN ENGLISH) ..... 66
REFERENCE ..... 68
Dodatak ..... 77

## LISTA TABLICA

Tablica 1. Antropometrijske karakteristike ispitanika .....32
Tablica 2. Analiza pouzdanosti neinvazivnih biomarkera stupnja hidriranosti .....33
Tablica 3. Unos makronutrijenata i vode .....34
Tablica 4. Medicinski dijagnostički model .....34

## LISTA GRAFOVA

Graf 1. Bonfferroni Post hoc za parametar $S_{TU}$.....35
Graf 2. Bonfferroni Post hoc za parametar $U_{OSM}$.....36
Graf 3. Linearna povezanost $S_{TU}$ i udjela mišićne mase i ukupnih proteina u urinu .....37
Graf 4. Linearna povezanost $U_{OSM}$, ukupnih proteina u urinu i udjela vode u tijelu .....38
Graf 5. Linearna povezanost višekratnih indikatora stupnja hidriranosti organizma .....39
Graf 6. Bland-Altman grafikon (eng. *plot*) .....40
Graf 7. ROC krivulja.....41
Graf 8. Stopa hipohidriranosti.....42

## LISTA DIJAGRAMA

Dijagram 1. Preduvjeti stvaranja koncentriranoga urina uslijed visoko intenzivnoga vježbanja ..14
Dijagram 2. Preduvjeti stvaranja koncentriranoga urina uslijed minimalnoga deficita vode .....15
Dijagram 3. Preduvjeti stvaranja koncentriranoga urina uslijed visoke razine deficita vode .....16

*Jednom mjeri za sebe,*
*drugi put za svoju savjest,*
*treći put za recenzente.*

*A. V. Hill*

## SIMBOLI I SKRAĆENICE

| | |
|---|---|
| ACSM - | Američka Udruga Sportske Medicine |
| AIBA- | Međunarodna Boksačka Federacija |
| AVP/ADH- | Vazopresin/Anti-diuretski hormon |
| BIA- | Biolektrična impedanca |
| BP- | Bubrežni protok krvi |
| HTT- | Hidrostatski transkapliarni tlak |
| NCAA - | Krovna organizacija Sveučilišnog sporta u SAD |
| NATA- | Nacionalni savez sportskih trenera u SAD |
| ROC- | *Receiver open characteristic curve* |
| MOO- | Međunarodni Olimpijski Odbor |
| MGF- | Minutna glomerularna filtracija |
| $T_M$- | Tjelesna masa |
| SH- | Stupanj hidriranosti |
| $S_{TU}$- | Specifična težina urina |
| OPEN- | Otvorena platforma kliničke prehrane |
| PKB- | Protok krvi kroz bubreg |
| URT- | Upitnik o redukciji tjelesne mase |
| $U_{OSM}$- | Osmolalitet urina |
| $U_P$- | Ukupni proteini u urinu |
| VAA- | Vazokonstrikcija aferente arteriole |
| VP- | Volumen-plazme |

# POGLAVLJE I

# UVOD

## Razvojni aspekti boksa

Boks je olimpijski borilački sport u kojem su natjecatelji zastupljeni u deset različitih težinskih kategorija. Svjetska boksačka federacija AIBA okuplja 196 različitih zemalja članica sa svih kontinenata pod čijim je patronatom i održano prvo službeno natjecanje u boksu na Olimpijskim igrama 1904. godine u St. Louisu (SAD). Prvi su povijesni dokazi, crteži i zapisi o *šakanju* nastali prije nešto više od 3000 godina i datiraju iz staroga Egipta, Grčke, Perzije, Indije, Kine, Tajlanda i Burme. Postoje teorije kako se primitivni oblici *šakanja* pojavljuju čak 6000 godina prije Krista u Etiopiji (Chaabène i sur., 2015). Primitivni su oblici *šakanja* imali prije svega za cilj samoobranu i samozaštitu, a u kasnijim fazama, nastankom prvih civilizacija, *šakanje* poprima oblik nadmetanja i razonode (Hrastinski, 1992). Trenutačno prevladavaju teorije kako se *šakanje* u Europskoj kulturi i civilizaciji pojavilo u Mikeni i proširilo na Spartu i Atenu. U Sparti *šakanje* postaje sastavni dio obrazovanja, a u Ateni je dio vojne obuke. Razvojem antičkih Olimpijskih igara, a zatim i sustavnih vježbaonica pojavljuju se prvi organizirani oblici pripreme za natjecanje o čemu svjedoče zapisi kako je preteča današnje boksačke vreće proistekla iz nekoga od atenskih gimnaziuma. Borbe su se odvijale golim rukama, bez vremenskih ograničenja, a u kontekstu je ove studije važno naglasiti kako natjecatelji nisu bili podijeljeni u težinske kategorije. Pod utjecajem grčke kulture, izuzetno cijenjena vještina *šakanja* širi se u Rim gdje ima ulogu razonode i zabave za puk. Zbog surovosti i brutalnosti ondašnjih *šakačkih* natjecanja, a pod utjecajem Katoličke crkve u srednjem vijeku, *šakačka* vještina pada u zaborav. Zapis Serminija iz 1425. godine svjedoči o *šakačkom* srazu dvojice gondolijera Venecije i predstavlja jedan od prvih spomena boksačkih natjecanja u Europi. Vrijedno je istaknuti, u čast pobjede nad Turcima, 28. rujna 1571. u Splitu je priređeno *šakanje* za one koji se *šakaju* i to je ujedno i prvi zapis o boksačkom natjecanju na našem tlu (Hrastinski, 1992).

Ipak, prvi poznati i službeno zabilježeni meč u listu *Protestant Mecury* datira iz siječnja 1681. godine i govori o *šakačkom* dvoboju nepoznatih natjecatelja. Engleski *šakači* nose zasluge za razvoj i evoluciju boksa uvođenjem pravila u brutalne obračune. Prvi je ring postavljen 1719. godine u školi Jamesa Figa u Londonu. Zapisi iz toga doba također svjedoče o nepostojanju vremenskih ograničenja u trajanja borbe ni podjele na težinske kategorije. Dodatni zamah u razvoju boksa tijekom 18. stoljeća u Engleskoj donosi takozvani *Nagradni boks* gdje su članovi aristokracije podupirali borbe pojedinaca iz nižega staleža. Jack Broton prvi je 1747. godine uveo rukavice, a više je od stoljeća prošlo do sljedećih preinaka pravila. Epohalnu reformu u vidu sistematizacije pravila boksa 1865. godine donosi markiz od Quinesberrya (Hrastinski, 1992). Predstavlja vremenska ograničenja za trajanje rundi, normira dimenzije ringa, uloge sekundanata i sl. Prilikom je prvenstva Engleske 1867. uslijedila i dopuna pravila u vidu prve podjele boksača na težinske kategorije i to prema sljedećim propozicijama: laka do 63.5 kg, srednja od 63.5 do 71.67 i teška preko 71.70 kg s ciljem uspostavljanja jednakopravnosti natjecatelja. Od tada, nekontrolirano smanjenje tjelesne mase postaje uobičajena prednatjecateljska praksa, dio tradicije i svjetonazora boksača (Hall i Lane, 2001). Prema svemu ranije navedenom, pravila markiza od Quinesberrya mogu se smatrati pretečom i jednim od glavnih čimbenika koji su doveli do razvoja dragovoljnoga, naglog i nekontroliranog smanjivanja tjelesne mase kod suvremenih boksača. Profil suvremenoga boksača današnjice u preglednom članku dokumentirali su Chaabène i sur. (2015). Autori navode iznimne metaboličke (vrijednosti koncentracije laktata 13.6±2.3 $mmol \bullet L^{-1}$; bikarbonata 13.2±1.9 $mmol \bullet L^{-1}$) i kardiorespiratorne zahtjeve (vrijednosti primitka kisika 69.0 $ml^{-1} \bullet kg^{-1} \bullet min^{-1}$) prilikom treninga i natjecanja kod vrhunskih olimpijskih boksača, popraćene dobro razvijenom mišićnom jakosti i anaerobnom snagom. Navedene kvalitete autori ističu kao ključne komponente natjecateljske uspješnosti u boksu, no ranije navedene važne funkcionalno-fiziološke karakteristike mogu biti umanjene uslijed nagle i nekontrolirane redukcije tjelesne mase. Prema Reljiću i sur. (2013-2015) naglo i nekontrolirano smanjenje tjelesne mase kod mladih boksača Njemačke odvija se isključivo na račun redukcije izvanstanične tekućine i dovodi organizam u stanje akutne dehidracije, te posljedično izaziva štetne hematološke i hormonalne promjene u organizmu (poput umanjenja koncentracije ukupne mase hemoglobina od ~4%). Stoga, analitička točnost mjerenja, ali i interpretacija stupnja hidriranosti organizma ogledaju se kao iznimno važna problematika i postaju temeljni predmet ovoga istraživanja.

# Fiziološke osnove regulacija balansa tjelesnih tekućina i odaziv združenoga mehanizma na deficit vode u tijelu sportaša

Voda je medij krvotoka, osigurava primjerenu funkciju brojnih fizioloških procesa kod ljudi i temeljni je sastojak ljudskoga tijela ponajprije zbog udjela od ~73 % nemasne tjelesne mase. Točnije, ~30-35 % ukupne tjelesne mase čini unutarstanična tekućina, ~20-25 % je intersticijska tekućina, a 5 % je krvna plazma (Hall i Guyton, 2010). Nedvojbeno, izraz *stupanj hidriranosti* odnosi se na sadržaj vode u tijelu, ali funkcionalno uključuje volumen, sastav i preraspodjelu tekućine u ljudskom tijelu (Cotter i sur., 2014). Nadzorni mehanizmi u ljudskom organizmu na veoma precizan način reguliraju dinamičku ravnotežu volumena tjelesnih tekućina, koja je nužna za primjerenu staničnu funkciju i očuvanje volumena krvne plazme i osmolalnost izvanstanične tekućine (Sims i sur., 2008). Čak i tijekom perioda stabilnosti tjelesne mase, konstantan protok tekućine pod utjecajem promjena osmotskoga i hidrostatskog gradijenta diktira kretanje vode kroz različite odjeljke tijela (Kalman i Lepeley, 2010). Usprkos općepoznatom značaju očuvanja homeostaze tjelesnih tekućina, redukcija tjelesne mase na račun smanjenja volumena izvanstanične tekućine, volumena krvne plazme i volumena krvi ogleda se kao najbrža i najučestalija praksa prilikom manipulacije tjelesnom masom izražene u prednatjecateljskom periodu u borilačkim sportovima (Petterson i Berg, 2014a., Reljić i sur., 2015a). Nedavna istraživanja u borilačkim (Pallares i sur., 2016; Rivera-Brown i sur., 2012; Sommerfiled i sur., 2016), ali i ostalim sportovima (Arnaoutis i sur., 2015) ukazuju na univerzalno visoku stopu hipohidriranosti organizma ispitanika (~80-90 %) temeljem analize koncentriranosti urinarnih pokazatelja. Iako povišena očitovanje vrijednosti koncentriranog urina nije isključivi pokazatelj stupnja hidriranosti organizma, takav je pristup prilikom mjerenja i interpretacije hidriranosti organizma trenutačno najrasprostranjeniji u sportskoj praksi i znanstvenoj literaturi (Zubac i sur., 2016a). Ipak, ostaje otvoreno istraživačko pitanje u kojoj mjeri visoka koncentriranost urinarnih indikatora zrcali isključivi deficit vode u tijelu sportaša i posljedičnu redukciju ukupne tjelesne mase. Sukladno problematici studije, autor smatra nužnim predstaviti temeljne mehanizme regulacije i balansa tjelesnih tekućina sukladno medicinskoj fiziologiji i ukazati na osobitosti i specifičnosti prilagodbe organizma kod proučavanoga uzorka ispitanika. Sljedećege poglavlje postavlja si za cilj razjasniti temeljne funkcije združenih mehanizama u nadzoru nad volumenom tjelesnih tekućina i sposobnosti bubrega ostvarenja koncentriranog urina.

Bubrezi predstavljaju temeljni nadzorni organ koji uravnava dinamičku ravnotežu vode i elektrolita, ali i glavni put za uklanjanje metaboličkih razgradnih proizvoda, unešenih tvari, lijekova i hormonskih metabolita (Hall i Guyton, 2010). Prema medicinskoj fiziologiji i anatomiji bubreg parni organ smješten retroperitonealno i ima ključnu ulogu u održavanju homeostaze ljudskoga organizma. Iako ima relativno malu masu (približno 150 g), protok je krvi kroz bubreg velik, kroz oba bubrega u zdravoga čovjeka iznosi 1100 $mL \bullet min^{-1}$, odnosno 22 % srčanoga minutnog volumena. Osnovna je funkcionalna jedinica bubrega nefron (Hall i Guyton, 2010). Prema istim autorima, bubreg ima oko milijun nefrona i svaki je od njih sposoban u fiziološkim uvjetima autonomno stvarati urin. Nefroni se ne mogu stvarati ni iznova regenerirati, a dijelimo ih na kortikalne i jukstamedularne nefrone. Jukstamedularni nefroni, za razliku od kortikalnih, imaju duge Henleove petlje koje uranjaju duboko u srž i praćene su specijaliziranim peritubularnim kapilarama nazvanim *vasa recta* i upravo regionalna razlika u građi nefrona omogućuje stvaranje koncentriranoga urina (Hall i Guyton, 2010). Primarni kompenzacijski odgovor na velike oscilacije tjelesne tekućine je pod nadzorom bubrega, koji posjeduje iznimnu sposobnost mijenjanja relativnih udjela vode i otopljenih tvari u mokraći kao odgovor na različite podražaje (tjelesna aktivnost, prehrana, utjecaj okoliša). Bubrezi troše veliki udio kisika na opsežnu aktivnu reapsorpciju natrija u bubrežnim kanalićima, izraženo po jedinici mase, što je približno dva puta više potrošnje kisika nego mozak. Stoga, bubreg možemo promatrati kao organ s visokom metaboličkom aktivnošću. Svrha velikoga protoka krvi, osim opskrbe hranjivim tvarima, je i oslobađanje od otpadnih tvari, ali i održavanje velike minutne glomeruralne filtracije (MGF) koja je prijeko potrebna za točan nadzor nad volumenom tjelesnih tekućina i koncentracijom njihovih sastojaka. Snažan se mehanizam MGF-a i bubrežnoga protoka krvi u bubrezima naziva autoregulacija i odvija se preko tubuloglomerularne povratne sprege i miogene autoregulacije (Hall i Guyton, 2010).

Stvaranje i izlučivanje koncentrirnog urina temeljna je uloga buburega prilikom deficita vode u tijelu i povišene osmolalnosti izvanstanične tekućine, pritom osmotska koncentracija može doseći vrijednosti ~1400 $mOsmol \bullet kg^{-1}$. Proces koncentriranja omogućuje reapsorpciju natrija i ostalih eletkrolita kroz tubularni epitel u međustaničnu tekućinu. S obzirom na ionski gradijet tvari, procesi se odvijaju aktivnim ili pasivnim prijenosom. Točnije, pojedine se tvari, kao što je natrij, prenose primarnim aktivnim prijenosom koristeći energiju natrij/kalij ATP-azne

crpke, a glukoza se reapsorbira sekundarno aktivnim prijenosom zbog ionskoga gradijenta. Volumeni izvanstanične tekućine i plazme, te izlučivanje urina kontroliraju se kao zasebni dijelovi temeljnoga mehanizma povratne sprege i nastoje spriječiti trajno nakupljanje vode i soli u organizmu (Armstrong, 2005; Hall i Guyton, 2010). Bubrežnu ekskreciju vode nadzire antidiuretski hormon (vazopresin), koji uslijed deficita vode u tijelu inklinira snažan odgovor kaskadnih komepenzacijskih mehanizama. Primarno, intersticij visoke osmolarnosti ostvaruje se reapsorpcijom ureje, a reapsorpcijom se vode koja je pod nadzorom antidiuretskoga hormona dodatno povećava osmolarnost što konačno rezultira koncentriranim urinom. Prema Guytonu i Hallu (2010), preduvjeti su stvaranja koncentriranoga urina: 1) visoka prisutnost ADH i 2) visoka osmolalnost međustanične tekućine u bubrežnoj srži.

*Vasa recta* i dvostruki kapilarni krvotok pomoću reapsorpcije određenih elektrolita i održavanja hidrostatskoga tlaka uspijevaju stvoriti protustrujni mehanizam i na taj način uvjetuju stvaranje koncentriranoga urina. Sustav povratne sprege osmoreceptori – ADH i mehanizam žeđi djeluju usporedno i daju integrirani odgovor u nadzoru nad osmolarnošću i koncentracijom natrija u izvanstaničnoj tekućini.

## Odgovor bubrežnoga sustava na sportsku aktivnost i vježbanje

Pouzdana i dijagnostički točna analitička procjena stupnja hidriranosti organizma predstavlja izniman izazov znanstvenoj zajednici, zbog čega je neki autori navode u kontekstu nedostižnoga *zlatnog standarda* (Armstrong, 2007). Prilikom mjerenja i interpretacije stupnja hidriranosti organizma važno je istaknuti sklop uvjeta uslijed kojih se ostvaruje posljedična dehidracija (aktivnim ili pasivnim putem). Unatoč generalno prihvaćenoj elastičnosti veze deficita vode i koncentriranosti urina, mehanizam koncentracije urina može biti pod utjecajem drugih faktora. Primjerice, visoko intenzivno vježbanje izaziva promjene u bubrežnoj hemodinamici i pritom dovodi do povećanoga lučenja proteina u urinu (Poortmans i Vanderstraeten, 1994). Slijedom prijenosnih faza uslijed visoko intezivne aktivnosti, ostvaruju se promjene u ravnoteži hidrostatskih i koloidno osmotskih sila što rezultira umanjenim priljevom krvi u bubreg i do 40 %. Studija Gleima i sur. (2000) na visoko utreniranim sportašima ističe

sposobnost bubrega prilikom ostvarenja koncentrirnog urina kao funkciju intenzivnoga tjelesnog vježbanja, upravo zbog akutnoga umanjenja bubrežnoga protoka 30 - 40 % nakon treninga. Iscrpljujući i intenzivni treninzi mogu biti medijator povišene koncentracije metabolita u urinu te, shodno tome, utjecati na dijagnostičku točnost procjene stupnja hidriranosti organizma, ukazujući na lažno pozitivne nalaze kod sportaša (Poortsman, 1988). Stoga prevladava teorija kako visokointenzivno vježbanje dovodi do umanjene stope MGF-a i do povišene koncentracije otopljenih tvari.

Prema laboratorijskoj studiji Montaina i sur. (1997), stimulus je za upliv AVP-a prelazak anaerobnog praga (~70 % od $Vo_2$ max.) kao odgovor organizma na povišen osmolalitet seruma i redukciju volumena plazme uslijed povećanja tjelesne aktivnosti i pojačanoga znojenja. Također, autori pokazuju kako se urin nastavlja koncentrirati i sat vremena nakon vježbanja. Do sličnih nalaza dolaze i španjolski autori, točnije, studija Hamoutija i sur. (2013) na dobro utreniranim rekreativnim sportašima pokazuje mehanizam koncentracije urina putem refraktometrijske analize, koja se ostvaruje na račun reapsorpcije ureje čak 11 sati posteksperimentalnoga protokola prilikom kojega su ispitanici dosegli 3 % redukcije u tjelesnoj masi uslijed vježbanja u toplom okolišu. Autori Galloway i Mahugan (2000) demonstriraju kako vježbanje na ∼70 % od $Vo_2$ max. izaziva redukciju u tjelesnoj masi ∼1.2 - 1.5 % što dovodi do oscilacija u osmolalitetu seruma 5-10 $mOsmol•L^{-1}$, no takve relativno male promjene izazivaju velike oscilacije i osjetljivosti bubrega na AVP gdje ∼1 $mOsmol•kg^{-1}$ dovodi do porasta od ∼90 $mOsmol•kg^{-1}$ prilikom paralelnih očitanja vrijednosti (Cheuvront i Kenefick, 2014). Takav proces rezultira redistribucijom tekućine iz izvanstaničnoga prostora u radne mišiće i dovodi do redukcije tekućine u vaskularnom prostoru. Pritom neaktivni mišići gube vodu na račun kompenzacijskih mehanizama (Dijagram 1). Drugi je važan čimbenik hormonalni nadzorni sistem renin-angiotenzin-I. Kaskadni odgovor nadzornih endokrinih mehanizama na deficit ukupne vode u tijelu uslijed vježbanja i posljedičnoga isparavanja tekućine putem znojenja nastaje zbog očuvanja termoregulacije i djeluje na sljedeći način: angiotenzin-I posredovanjem ACE enzima proizvodi aniotenzin-II u plućima i stimulira proizvodnju aldosterona, koji ima važnu ulogu u očuvanju homeostaze elektrolita i vode. Koncetracija se adlosterona uslijed visoko intenzivnoga vježbanja može povisiti s početnih 80-830 na 250-3300 $pmol•L^{-1}$ (Zambranski, 1990). Temeljni fiziološki mehanizmi otkrivaju kako intenzivan trening sam po sebi može smanjiti stopu glomerularne filtracije urina, povisiti koncentraciju urina i dovesti do vazokonstrikcije na

aferentnoj arterioli i time povećati očuvanje vode na uzlaznom kraku Henelove petlje (Poortmans i Vanderstraeten, 1994). Druge studije pokazuju kako se pri niskoj razini hipohidriranosti oporavak osmolalnosti krvnoga seruma ostvaruje zbog obrambenoga mehanizma očuvanja volumena plazme u sprezi s očuvanjem vode na Henelovoj petlji i redistribucijom tekućina iz staničnoga u izvanstanični prostor. Važno je istaknuti ulogu limfnoga sustava kao zaštitnoga kompenzacijskog mehanizma prilikom preraspodjele tekućine u organizmu (Nose i sur., 1998). Aktivacija ranije navedenih mehanizama umanjuje dijagnostičku točnost osmolaliteta krvnog seruma prilikom uporabe istog u kontekstu dehidracijskoga biomarkera. Stoga, podatci upućuju na zaključak kako se procjena stupnja hidriranosti organizma ogleda kao funkcija razine deficita tekućine u tijelu (Dijagrami 2 i 3).

U studijama primijenjenim na borilačke sportove, autori su Shiffers i Maughan (1998) pokazali su kako postoje razlike u vrijednostima urinarnih pokazatelja stupnja hidriranosti. Predstavljene hipoteze utemeljene su na analizi osmolaliteta prvoga uzorka urina (i. e., 775±263 *vs*. 627±186 $mOsmol \bullet kg^{-1}$; $p<0.05$), čak i tijekom perioda stabilnosti u tjelesnoj masi, prilikom usporedbe natjecatelja u težinskim kategorijama i ostalih sportaša. Takvi nalazi govore o postojanju kompenzacijskih i adaptacijskih mehanizama na procese nagle i nekontrolirane redukcije tjelesne mase. U prilog tome ide i studija Yankanich i sur. (1998) koja prvi put u literaturi opisuje fiziološke adaptacije na opetovane cikluse nagle redukcije tjelesne mase i prijavljuje vrijednosti osmolaliteta krvnoga seruma od ~300 $mOsmol \bullet kg^{-1}$ čak i prilikom primjerene hidriranosti organizma. Novije studije Reljića i sur. (2013-2015) ističu kako razlike u hematološkom odgovoru organizma između mladih boksača Njemačke u odnosu na ostale natjecatelje iz srodnih sportova nastaju uslijed procesa nagle redukcije tjelesne mase (i.e., različit kompenzacijski odgovor na 5 % redukciju tjelesne mase uočljiv kroz povišenu koncentraciju hematokrita kod mladih boksača). Sve ranije navedeno doprinosi složenosti problematike mjerenja stupnja hidriranosti organizma, osobito prilikom analize akutnih i kroničnih promjena hidriranosti organizma.

## Čimbenici povezanosti nagloga svojevoljnog smanjenja tjelesne mase i posljedične akutne dehidracije

Amaterski boks ima najdulju tradiciju podjele natjecatelja u težinske kategorije koja datira još od 1867. godine. Službena pravila nalažu stratifikaciju natjecatelja u različite težinske kategorije s ciljem osiguranja ravnopravnosti natjecatelja (Smith, 2006). Sukladno tome, ranije navedena službena pravila smatraju se jednim od najznačajnih faktora koji su doveli do inicijacije dragovoljnoga, naglog i nekontroliranog smanjenja tjelesne mase koje je postalo uobičajena prednatjecateljska praksa boksača. Prema službenim pravilima (AIBA, Tehnički priručnik, 2013), juniori i seniori natječu se u deset različitih težinskih kategorija. Takva distribucija raspodjele težinskih kategorija predstavlja najširi spektar klasifikacije u težinske kategorije od svih olimpijskih borilačkih sportova. Nerijetko, par dana prije natjecanja, boksači nastoje doseći nižu težinsku kategoriju s namjerom ostvarenja natjecateljske prednosti pred potencijalno lakšim i slabijim protivnikom (Franchini i sur., 2012; Reljić i sur., 2015). Unatoč takvim tvrdnjama, epidemiološki podatci, koji dovode natjecateljski uspjeh i stupanj hidriranosti organizma u izravnu relaciju, ostaju dvosmisleni. Ipak, brojni zdravstveni problemi, uključujući i smrt mladih hrvača i judaša uslijed pokušaja naglog i nekontroliranog smanjenja tjelesne mase ogledaju kao posljedica agresivnoga pristupa prilikom redukcije tjelesne mase (Loenneke i sur., 2011; Franchini i sur., 2012).

Reljić i sur. (2013) ističu kalorijsku restrikciju u kombinaciji s posljedičnom akutnom dehidracijom i uporabom saune kao najučestalije metode korištene pri prednatjecateljskom reduciranju tjelesne mase kod mladih amaterskih boksača. Štoviše, ista grupa autora ističe posljedicu takve prakse, akutnu dehidraciju, kao temeljni faktor povezan s brojnim zdravstvenim problemima kod boksača adolescenata (Reljić i sur., 2013). Kod adolescenata, biološki je rast i razvoj praćen konstantnim oscilacijama u tjelesnoj masi s ciljem očuvanja željene ili natjecanja u nižoj težinskoj kategoriji. Pretjerana praksa nekontroliranoga smanjenja mase tijekom adolescencije može negativno utjecati na rast i razvoj kroz promjene u endokrinim mehanizmima kao što su oslobađanje testosterona i IGF-1 (Rommenich i Sinning, 1987). Nadalje, *case-study* engleskih autora ukazuje na poremećaj prehrane i posljedičnu pojavnost bulimije povezane s održavanjem težinske kategorije kod juniorskoga boksača Engleske (Lovet, 1991). Studija finskih autora ukazuje na veću učestalost prekomjerne tjelesne težine i pojavu pretilosti kod bivših

natjecatelja u borilačkim sportovima u odnosu na druge bivše sportaše koji se nisu natjecali u težinskim kategorijama tijekom karijere (Saari i sur., 2006). Smith (2006) prijavljuje kako su engleski boksači adolescenti sa zdravstvenoga aspekta najugroženija skupina u amaterskom boksu i izvještava o učestalim restrikcijama prilikom konzumiranja jela i pića među mladim boksačima, što naknadno rezultira visokim vrijednostima koncentracije urina i zrcali opetovane pokušaje nekontroliranog smanjenja tjelesne mase. Sudeći prema svemu ranije navedenom, nagla se i nekontrolirana redukcija tjelesne mase odvija prije svega uslijed manipulacije tjelesnim tekućinama kod mladih boksača Europe. Usprkos tome, boksači i dalje putem različitih postupaka (metoda) nastoje ubrzano smanjiti ukupnu tjelesnu masu kombinacijom pasivnih (restrikcija hrane, tekućine, sauna) i aktivnih (trening u gumenim odijelima) protokola (Franchini i sur., 2012; Reljić i sur., 2013). Štoviše, sklonost kronično niskoj tjelesnoj masi i posljedičnoj dehidraciji može biti uzrokovana neprimjerenim pristupom u prehrambenim navikama tijekom čitave natjecateljske sezone (Petterson i Berg, 2014b; Reljić i sur., 2015b). Ranije navedeni švedski autori navode kako *at libitum* konzumacija jela i pića i produljeno vrijeme oporavka od vage do natjecanja samo po sebi ne osigurava primjeren stupanj hidriranosti organizma, pokazujući nerazmjer između unosa tekućine i posljedične hipohidriranosti organizma ($R=0.13$, $p=0.30$). Predstavljene rezultate autori su nastojali opravdati teorijom Costilla (1973) koji pretpostavlja postojanje fizioloških prepreka za zadržavanje tekućine u tijelu sportaša tijekom ograničenoga vremena oporavka. Međutim, ostaje mogućnost kako su švedski autori prenaglasili ulogu prikupljenih vrijednosti $S_{TU}$ presječnom studijom (eng. *cross-section study design*) u kontekstu mjerenja ukupnoga deficita vode u tijelu i posljedične redukcije u tjelesnoj masi. Povrh svega ranije navedenoga, Pettersson i Berg (2014a) ističu kako službeno vaganje nije dovoljan zaštitni mehanizam u sprječavanju pojave posljedične akutne dehidracije organizma na službenom natjecanju kod švedskih Olimpijaca u borilačkim sportovima. Kod srodnih sportova, brazilski autori navode približno 60 % sportaša (Brito i sur., 2012), a studija na iranskim hrvačima (Kordi i sur., 2011) ističe približno podjednaku stopu natjecatelja koji u adolescenciji kreću s praksom nagloga smanjenja tjelesne mase. Usprkos svemu ranije navedenom, praksa je nekontrolirane redukcije tjelesne mase još uvijek svakodnevna u olimpijskim borilačkim sportovima (Franchini i sur., 2012), a velika debata u znanstvenim krugovima postoji u vidu metrijskih karakteristika trenutačno korištenih biomarkera pri detekciji i klasifikaciji stupnja hidriranosti organizma. Također, nagla je redukcija tjelesne mase usko povezana sa zlouporabom

diuretika u borilačkim sportovima. Ovakva je praksa zabranjena metoda, sukladno pravilniku Svjetske antidoping agencije i MOO i zaslužuje posebnu pažnju (Halabchi i sur., 2009).

## Osobitosti mjerenja i interpretacije stupnja hidriranosti organizma

Dosadašnja istraživanja procjene stupnja hidriranosti organizma u borilačkim sportovima ukazuju na univerzalan trend agresivnoga pristupa u redukciji tjelesne mase, gdje natjecatelji kratkoročno, nekoliko dana prije natjecanja dinamičnom redukcijom izvanstanične tekućine od 2-6 % dosežu nižu težinsku kategoriju (Reljić i sur., 2013-2015; Petterson i Berg, 2014b.; Smith, 2006). Takva ubrzana praksa drastičnoga smanjenja volumena izvanstanične tekućine najčešće dovodi organizam u stanje posljedične dehidracije. Kaskadna reakcija nadzornih mehanizama za očuvanje vode, izazvana takvim pristupom, navodi bubrege na proizvodnju iznimno koncentriranoga urina. Sukladno ranije navedenom, biokemijski pokazatelji stupnja hidriranosti organizma utemeljeni na procjeni koncentracije urina i volumena tjelesnih tekućina profilirali su se kao nužan dijagnostički alat korišten prilikom detekcije posljedične akutne dehidracije. Stoga su brojna istraživanja u borilačkim sportovima problemski usmjerena na mjerenja i interpretaciju stupnja hidriranosti organizma. Usprkos tome, ne postoji konsenzus u literaturi u kontekstu opće prihvaćene analitičke metode za određivanje stupnja hidriranosti. Točnije, gotovo svi neinvazivni biomarkeri stupnja hidriranosti sadrže određena metodološka ograničenja (Armstrong 2007; Mahugan i sur., 2007; Sawka i sur., 2007). Primjerice, većina do sada objavljenih studija koje za cilj postavljaju detekciju stupnja hidriranosti organizma i provjeru metrijskih karakteristika urinarnih indikatora ne prate paralelnu redukciju u tjelesnoj masi koja se ogleda kao uzrok povišene koncentracije urina (Fernandez-Elias i sur., 2014; Petterson i Berg, 2014a.; Zubac i sur., 2015a). Osim toga, kao nedostatak do sada objavljenih radova ogleda se procjena stupnja hidriranosti organizma izvedena mjerenjem isključivo u jednoj vremenskoj točki, presječnim studijama, prilikom razdoblja nestabilne tjelesne mase ispitanika, što limitira objašnjenje uzročno-posljedičnih veza zavisnih varijabli. Unatoč brojnim objavljenim radovima o procjeni stupnja hidriranosti organizma sportaša olimpijskih borilačkih sportova trenutačno ne postoji isključivo definiran pokazatelj deficita vode u tijelu koji bi predstavljao referentnu točku.

Nadalje, poteškoće su u analitičkoj procjeni stupnja hidriranosti organizma prepoznate i od drugih autora koji navode složenost u procjeni odnosa nadzornih mehanizama, biološkoga odstupanja, ali i nedostataka u trenutnim korištenim tehnikama mjerenja (Sawka i sur., 2007; Cheuvront i sur., 2010) (Dijagram 3). Važno je naglasiti potrebu standardizacije protokola mjerenja kako bi se omogućile odgovarajuće usporedbe. Najčešće je procjena potreba unosa, ali i deficita tekućine u sportaša utemeljena na kvalitativnim i kvantitativnim podatcima (Sawka i sur., 2007). Anketni upitnici mogu pružiti kvalitativne podatke, dok biokemijske procjene prikupljenih uzoraka mogu ponuditi kvantitativnu podršku za adekvatnost prijavljenih unosa. Trenutačne preporuke krovnih sportskih organizacija u SAD-u (ACSM, NATA, NCAA) prilikom interpretacije različitih dehidracijskih biomarkera kod sportaša naglašavaju nužnost osjetljivosti i preciznosti u detekciji oscilacija od >1 % u tjelesnoj masi (Armstrong, 2007; Casa i sur., 2000; Sawka i sur., 2007). Osim toga, biomarkeri hidriranosti, također, trebaju biti praktični (vrijeme, trošak i tehnička stručnost) i prije svega osjetljivi na otkrivanje malih, ali važnih promjena u stupnju hidriranosti organizma kako bi omogućili praktičnu primjenu u sportskoj praksi (Armstrong i sur., 2014). Bitno je istaknuti u kontekstu istraživanja primijenjenih na borilačke sportove, indicije kronične dehidracije mogu pojaviti uslijed ponovljenih intenzivnih treninga isti dan ili dan za danom (Hoffman i Maresh, 2011), dok se želja za unosom tekućine obično ne pojavljuje sve dok gubitak vode ne dosegne >2 % posljedične dehidriranosti (Adolph, 1947).

Generalno prihvaćena teorija u literaturi sugerira $S_{TU}$ kao brz, precizan, neinvazivan biomarker korišten prilikom procjene hidriranosti organizma (Sawka i sur., 2007) a precizna referentna točka ostaje dvosmislena (Fernandez-Elias i sur., 2014; Petterson i Berg, 2014a; Reljić i sur., 2015). Unatoč tome, nadzorni mehanizmi na čijoj se procjeni temelji dijagnostička točnost urinarnih biomarkera u istraživanjima na borilačkim sportovima nisu u potpunosti razjašnjeni. Većina istraživanja o stupnju hidriranosti putem urinarnih indikatora prijavljuje presječne analize (jedna vremenska točka; eng. *stand alone assessment*), a pritom ne uspijevaju istražiti pouzdanost utemeljenu na dan-za-dan pristupu koji predlaže Hopkins (2000). Nedosljednost u metodološkom pristupu i problematika mjerenja i interpretacije stupnja hidriranosti organizma sažete su u nedavnom preglednom članku autora Cheuvronta i sur. (2014), koji ističu kako uzorkovanje urina u jednoj vremenskoj točki može biti pod utjecajem tjelesne aktivnosti, prehrambenih navika i drugih faktora te dovesti do zabluda u procjeni stvarnoga stupnja hidriranosti organizma. Sukladno tome, istraživanje na NCAA sveučilišnim sportašima autora Sommerfileda i sur. (2016)

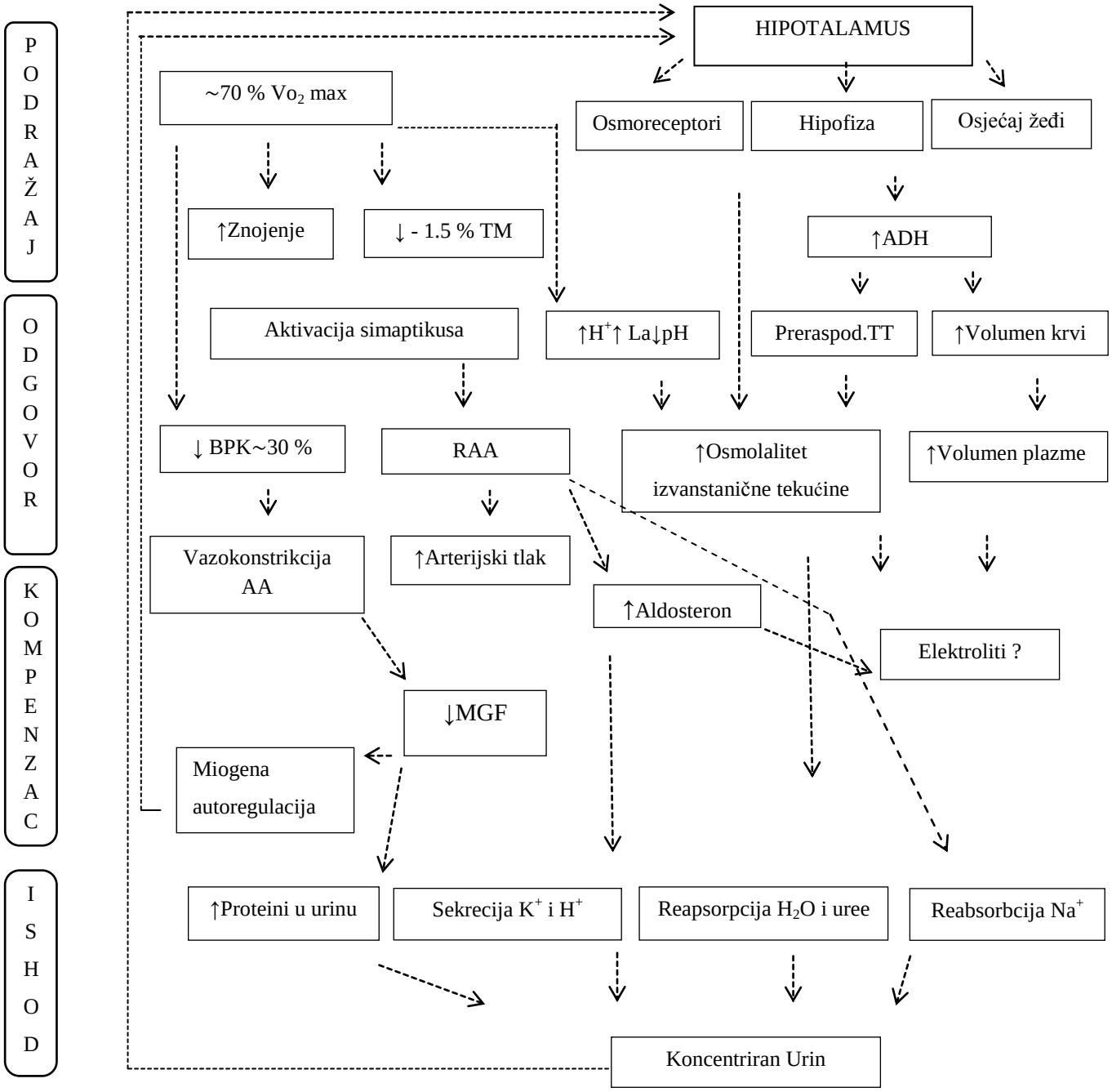
dodatno podupire ranije navedene tvrdnje Cheuvronta i sur. (2014), gdje autori studije na uzorku hrvača prilikom dvosatnoga akutnog protokola (pri kojem su ispitanici dosegli ~ 3 % dehidracije), bilježe trivijalnu povezanost i lošu osjetljivost urinarnih indikatora stupnja hidriranosti u odnosu na osmolalitet seruma. Studija Singha i sur. (2013) izvedena tijekom trodnevne utrke južnoafričkih atletičara dugoprugaša nije pronašla korelacije između hematoloških varijabli korištenih za procjenu stupnja hidriranosti organizma (osmolalitet krvi, hematokrit, hemoglobin, postotak promjene volumena plazme, koncentracije izvanstaničnoga $Na^+$) niti su postojale značajne povezanosti s urinarnim pokazateljima stupnja hidriranosti ($S_{TU}$, $U_{OSM}$). Takvi su nalazi naveli autora na zaključak kako općeprihvaćeni analitički biomarkeri stupnja hidriranosti (krvni i urinarni) pokazuju veliku varijabilnost i nisu dovoljno osjetljivi prilikom detekcije akutnoga deficita vode u tijelu tijekom stvarnoga (eng. *real-life settings*) pristupa mjerenja u toj populaciji.

Očigledno, nedostaje koherentna slika metodološki primjerenoga pristupa prilikom procjene stupnja hidriranosti organizma u navedenoj populaciji. Proturječni dokazi u literaturi, kao i neslaganje autora o metodološkom pristupu i analitici prikupljenih podataka pri mjerenju i interpretaciji stupnja hidriranosti, predstavljaju istraživački izazov, ali zahtijevaju provedbu daljnjih studija. Jasno se ogleda potreba uspostave odgovarajućih protokola prilikom procjene stupnja hidriranosti kako bi se omogućile neposredne povratne informacije za sportaše i trenere. Točnije, zaključci laboratorijskih studija o pouzdanosti na jednoj populaciji (poput Hamoutija i sur., 2013) neprimjereno se interpretiraju kao temelj terenskih studija o valjanosti na drugoj populaciji, poput metodološkoga pristupa u studiji Fernandez-Elias i sur. (2014). Znanstvena literatura primijenjena na borilačke sportove obiluje dvosmislenim nalazima, ponajprije u vidu metodoloških ograničenja prilikom analize dijagnostičke točnosti. Time je pokazan jasan nedostatak višedimenzionalnoga pristupa u procjeni zavisnih varijabli (ponajprije koncentracije $S_{TU}$ i $U_{OSM}$). Uz sve ranije navedene probleme metodoloških postavki nedostaje primijenjenih istraživanja u borilačkim sportovima o utjecaju povišene mišićne mase na urinarne pokazatelje hidriranosti sukladno prijedlogu Hamoutia i sur. (2010). Suplementacijske dijete proteinskoga sadržaja mogu izazvati povišenu koncentraciju metaboličkih otpadnih tvari u uzorku urina, neovisno o stupnju hidriranosti organizma (Martin i sur., 2006). Unatoč brojnim studijama koje prijavljuju procjenu stupnja hidriranosti na dan natjecanja, takva su istraživanja tijekom pripremnoga razdoblja rijetka. Iznenađuje činjenica kako se samo par istraživanja fokusira na

postotak promjene u tjelesnoj masi tijekom razdoblja nagle i nekontrolirane redukcije tjelesne mase u sprezi s analizom preostalih biomarkera iz krvi ili urina (Kutlu i Guler, 2006). Štoviše, nedostaje studija o borilačkim sportovima koje ukazuju na laboratorijsku analizu sadržaja proteina u urinu i posljedičnoj pojavnosti lažno pozitivnih/negativnih nalaza $S_{TU}$. Mnogi su autori previdjeli činjenicu kako se urinarni indikatori hidriranosti manifestiraju ponajprije kao inertan indikator balansa tjelesnih tekućina i mogu se smatrati osjetljivim ponajprije na akutne, a zatim na kronične (dan-za-dan) promjene u procjeni i interpretaciji hidriranosti organizma. Dualizam je nadzornih mehanizma združenih sustava (regulacija balansa tjelesnih tekućina i osmolaliteta izvanstanične tekućine) možda naveo određeni dio autora na ishitrene zaključke o dijagnostičkoj točnosti urinarnih indikatora pri dijagnostici stupnja hidriranosti organizma (Armstrong, 2007; Armstrong i sur., 2014). Nedavna studija Gonçalvesa i sur. (2015) potvrđuje dijagnostičku točnost BIA-e u procjeni ukupne vode u tijelu kod vrhunskih judaša, tijekom razdoblja stabilnosti tjelesne mase. Međutim, prisutne su nedosljednosti u literaturi, koje se prije svega odnose na uporabu BIA-e u mjerenjima u jednoj vremenskoj točki, najčešće na dan natjecanja (Fernandez-Elias i sur., 2014; Zubac i sur., 2015). Proturječni dokazi u literaturi, kao i u postojećoj raspravi o primjerenosti i dosljednosti biomarkera korištenih u praćenju stupnja hidriranosti organizma i dalje prisutni. Određena su neslaganja među autorima i dalje aktualna, prije svega u vidu mjerenja i interpretacija funkcije nadzornih mehanizama i dijagnostičke točnosti trenutačno korištenih biomarkera stupnja hidriranosti. Generalna preporuka neinvazivne procjene stupnja hidriranosti organizma sportaša gravitira k simultanom pristupu i „procjenom“ oba nadzorna neuroendokrina mehanizma, sukladno sugestijama Armstronga (2007). Stoga je cilj metodološkoga pristupa ovoga rada premostiti nedostatke prethodnih studija.

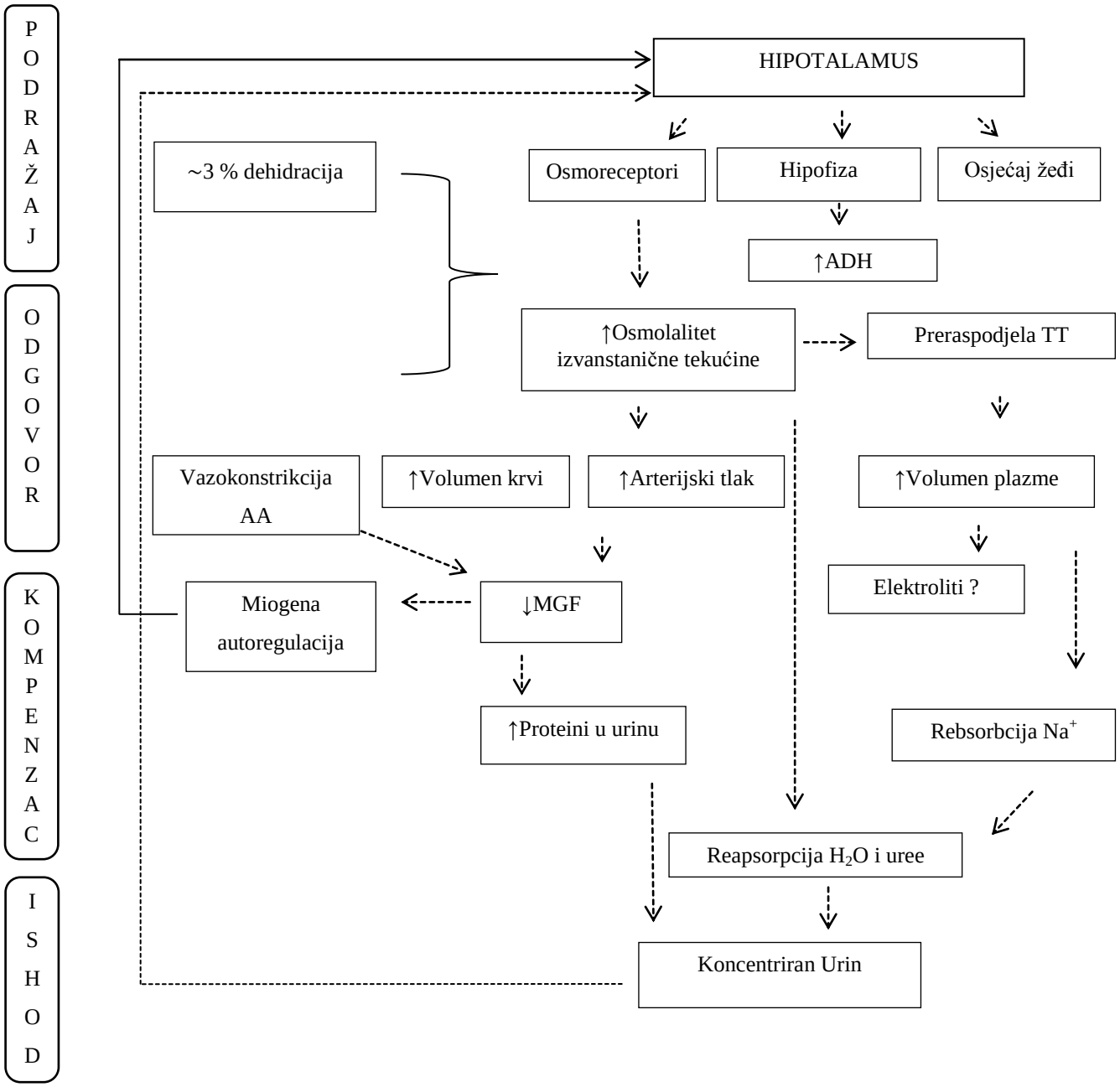
# Dehidracijski dijagrami

**Dijagram 1.** Preduvjeti stvaranja koncentriranoga urina uslijed visoko intenzivnoga vježbanja



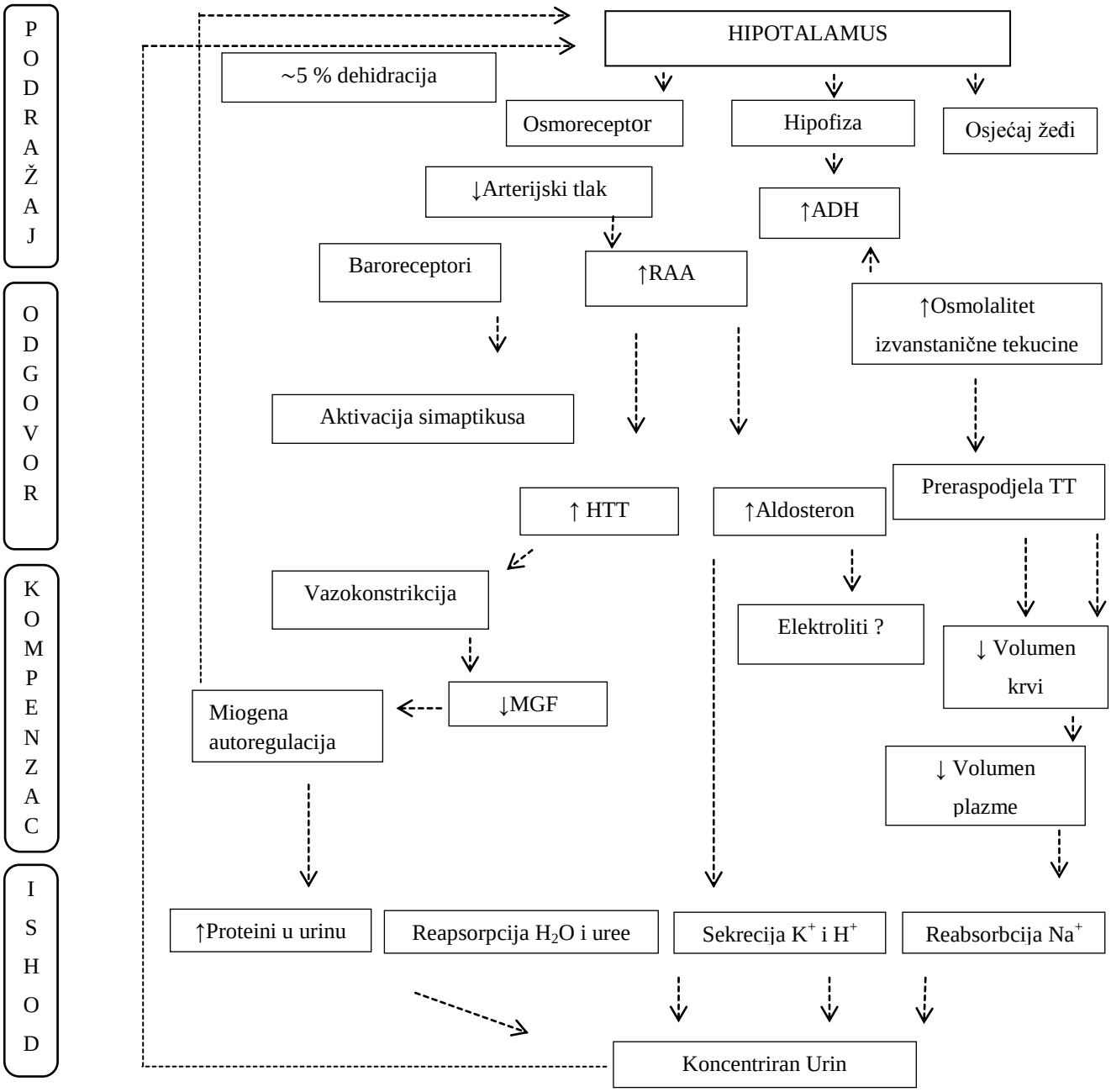

Legenda: Vo2 max - maksimalna potrošnja kiska; ADH - anti-diuretski hormon; BPK - bubrežni protok krvi; MGF - minutna glomerularna filtracija; RAA - renin-anginotenzin-adlosteron sustav; TM - tjelesna masa; TT - tjelesne tekućine; La - laktati

**Dijagram 2.** Preduvjeti stvaranja koncentriranoga urina uslijed minimalnoga deficita vode u tijelu




Legenda: ADH - anti-diuretski hormon; AA - aferentna arteriola; MGF - minutna glomerularna filtracija; TT - tjelesne tekućine

**Dijagram 3.** Preduvjeti stvaranja koncentriranoga urina uslijed visoke razine deficita vode u tijelu




Legenda: HTT - hidrostatski transkapilarni tlak; ADH - anti-diuretski hormon; RAA - renin-anginotenzi-aldosteron sustav; MGF - minutna glomerularna filtracija; TT – tjelesne tekućine

## Pregled dosadašnjih istraživanja u okviru predložene problematike

S ciljem sprječavanja ponavljanja ishoda tragične smrti trojice mladih hrvača uslijed drastičnoga pokušaja nekontrolirane redukcije tjelesne mase 1997. godine, NCAA komisija Sveučilišnoga hrvanja uvela je 1998. godine nova pravila certificiranja u težinske kategorije koja reguliraju rizična i po zdravlje opasna ponašanja (Loenneke i sur., 2011). Propisi nalažu utvrđivanje stupnja hidriranosti organizma na dan natjecanja putem terenske procjene koncentracije urina ($S_{TU}$). Iako već više od desetljeća pravila NCAA hrvanja nalažu procjenu hidriranosti organizma na vaganju, službena pravila krovne organizacije olimpijskih borilačkih sportova takvo što za sada zanemaruju. Preventivni mehanizam (sredstvo) sprječavanja nekontrolirane redukcije tjelesne mase, analiza koncentracije urina ($S_{TU}$), ogleda se kao pouzdan pokazatelj u procjeni stupnja hidriranosti organizma i niske razine ukupnog deficita vode u tijelu kod sportaša u strogo kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Istraživanje Hamouti i sur. (2013), dokumentira $S_{TU}$ kao superioran indeks stupnja hidriranosti organizma, sposoban detektirati deficit vode u organizmu i pritom paralelno pratiti porast osmolaliteta krvnoga seruma kada dehidracija premaši 1 % od ukupne tjelesne mase. Autori se ranije spomenute studije, prilikom razlaganja uzročnih mehanizama, oslanjaju na hipoteze Nosea i sur. (1988) koji navode umanjenje dijagnostičke točnost osmolaliteta seruma uslijed transfera tekućine iz unutarstaničnoga u izvanstanični prostor u sprezi s očuvanjem vode na Henelovoj petlji i redistribucijom tekućina iz staničnoga u izvanstanični prostor. Točnije, ovaj obrambeni mehanizam u sprezi s odgovorom limfnoga sustava na preraspodjelu tekućine umanjuje osjetljivost osmolaliteta seruma kao pokazatelja dehidriranosti. Fernandez-Elias i sur. (2014) predlažu $S_{TU}$ kao valjan neinvazivan pokazatelj pomanjkanja tekućine u tijelu kod natjecatelja u borilačkim sportovima temeljem korelacijskoga nacrta (konkurentna valjanost) na uzorku od 345 sportaša u španjolskim olimpijskim borilačkim sportovima. Ipak, ranije spomenuta studija prijavljuje samo 36 % objašnjene varijance između terenskih i laboratorijske analize koncentracije urina kod skupine ispitanika koja je u radu predstavljena kao iznimno dehidrirana (temeljem povišenih vrijednosti koncentracije urina). Sukladno ranije navedenom, ali i opće prihvaćenoj teoriji, ili svojevrsnoj znanstvenoj paradigmi kako urinarni biomarkeri vjerodostojno zrcale stupanj hidriranosti organizma, postoji i velik broj studija koje navode da $S_{TU}$ nije isključivi pokazatelj ukupnoga deficita vode u tijelu. Primjerice, Hamouti i sur. (2010) ističu

značajnu povezanost udjela mišićne mase i posljedično povišenih nalaza $S_{TU}$ prilikom usporedbe ragbijaša i atletičara. Čimbenici poput povećane mišićne mase (Baxmann i sur., 2008), klirensa metabolita u urinu (Poortsman, 1988) i visoko proteinskih dijeta (Martin i sur., 2006) mogu povisiti koncentraciju urina neovisno o stupnju hidriranosti organizma i pritom umanjiti dijagnostičku točnost $S_{TU}$ usljed karakterizacije stupnja hidriranosti organizma.

Štoviše, primijenjena istraživanja kod borilačkih sportova nerijetko prikazuju nedostatak dijagnostičke točnosti prilikom procjene stupnja hidriranosti boraca putem analize $S_{TU}$ (Buford i sur., 2006, Oppinger i sur., 2005; Sommersfield i sur., 2016). Točnije, Buford i sur. (2006) ističu kako NCAA hrvači u SAD-u imaju povišene vrijednosti $S_{TU}$ izvan natjecateljske sezone, tijekom perioda stabilne tjelesne mase. Autori Oppliger i sur. (2005) prijavljuju 37 % lažno pozitivno klasificiranih hrvača putem $S_{TU}$ analize, a noviji podatci Reljića i sur. (2015) demonstriraju kako, neovisno o održavanju volumena tjelesnih tekućina i krvne plazme, vrijednosti $S_{TU}$ blago rastu ( od 1.018±0.008 do 1.025±0.008 $g \bullet mL^{-1}$) kod kontrolne skupine ispitanika sastavljene od 14 vrhunskih boraca Njemačke. Rivera-Brown i sur. (2012) prijavljuju univerzalno visoku stopu hipohidriranosti (~90 %) kod mladih judaša putem analize $S_{TU}$, što objašnjavaju odgovorom organizma na prakticiranje juda u toplom okolišu. Studija Hamoutija i sur. (2010) na uzorku ragbijaša prva otvara mogućnost kako mehanički kontakti, odnosno udarci u tijelo tijekom natjecanja mogu utjecati na umanjen protok krvi u bubrezima i utjecati na posljedično povišene nalaze urinarnih indikatora hidriranosti, čak i tijekom održavanja stabilne tjelesne mase. U istraživanju na uzorku od 60 mladih sportaša iz različitih sportova Arnaoutis i sur. (2015) prijavljuju univerzalno visoku stopu hipohidriranosti, (~90 %), dok prilikom analize zajedničke varijance između relativnoga postotka promjene u tjelesnoj masi (% Δ) i vrijednosti očitovanja $S_{TU}$ nalaze samo 10 % zajedničke varijance ($p>0.05$). Ranije spomenuta grupa autora, Singh i sur. (2013) kod atletičara dugoprugaša nije pronašla značajne korelacije između hematoloških varijabli korištenih za procjenu stupnja hidriranosti organizma (osmolalitet, hematokrit, hemoglobin, postotak promjene volumena plazme, koncetracija izvanstaničnog $Na^+$) niti su postojale značajne povezanosti s urinarnim indikatorima stupnja hidriranosti ($S_{TU}$, $U_{OSM}$). Trivijalna korelacija prijavljena je između promjene tjelesne mase (% Δ) i osmolaliteta seruma ($R=0.35$, $p<0.01$). Temeljem tih podataka autori zaključuju kako općeprihvaćeni analitički biomarkeri stupnja hidriranosti (krvni i urin) pokazuju veliku varijabilnost i nisu dovoljno osjetljivi prilikom detekcije akutnoga deficita vode u tijelu u terenskim uvjetima.

U dosadašnjim istraživanjima na uzroku različitih ispitanika iz borilačkih sportova (Oppinger i sur., 2005; Petterson i Berg, 2014a; Zubac i sur., 2015a) stupanj je hidriranosti organizma procijenjen ponajprije presječnim studijama, najčešće prema općeprihvaćenom modelu kako povišeni urinarni indikatori analogno ukazuju na promjene u tjelesnoj masi. Nasuprot tome, brojne studije ukazuju na nedostatke pri detekciji stupnja hidriranosti u jednoj vremenskoj točki (Armstrong 2007; Chervornt i sur., 2015; Zubac i sur., 2016a). Generalne preporuke neinvazivne procjene stupnja hidriranosti ipak gravitiraju prema multidimenzionalnom pristupu procjene balansa tjelesnih tekućina i sposobnosti bubrega da koncentrira urin. Stoga, uz urinarne indikatore, BIA se također koristi pri terenskoj procjeni ukupnoga udjela vode u tijelu sportaša. Prema nekim autorima BIA predstavlja prikladnu alternativu u terenskoj procjeni stupnja hidriranosti organizma (Utter i sur., 2012), iako dosadašnja istraživanja donose oprečne zaključke o valjanosti i dijagnostičkoj točnosti varijabli korištenih za procjenu udjela vode u tijelu (Fernandez-Elias i sur., 2014; Zubac i sur., 2015). Tehničke karakteristike BIA opreme (jednofrekvencijska *vs.* multifrekvencijska) kao i raskorak u metodološkom pristupu (ležeći *vs.* stojeći položaj tijela) i dalje su predmet rasprave među autorima. Osim urinarnih pokazatelja i BIA-e, vaganje ispitanika je pouzdana, jednostavna i brza terenska neinvazivna metoda korištena u procjeni oscilacija u tjelesnoj masi sportaša (% Δ) (Baker i sur., 2009).

Dosadašnja istraživanja osiguravaju samo djelomičnu informaciju ne uzimajući u obzir brojne remeteće faktore. Neprimjereno je zanemariti prisutnost metaboličkih nusprodukata u uzorku urina, koji se prije svega ogledaju kao funkcija mišićnoga katabolizma uslijed iscrpljujućih priprema za natjecanja. Također, nedostaju istraživanja koja su se bavila procjenom metrijskih karakteristika trenutačno korištenih parametara stupnja hidriranosti, ne samo na dan natjecanja, nego i tijekom pripremnoga perioda, gdje su nalazi urina potkrijepljeni analizama stabilnosti u tjelesnoj masi. Stoga, problematika istraživanja opisana u ovoj studiji utemeljena je na ideji definiranja pouzdanosti, valjanosti i dijagnostičke točnosti dehidracijskih biomarkera, uzimajući u obzir otvorena istraživačka pitanja prisutna u literaturi, ali i metodološke propuste prethodno spomenutih studija

# POGLAVLJE II

## METODE I POSTUPCI

### Ciljevi i svrha istraživanja

Proturječni dokazi, kao i postojeća rasprava unutar znanstvene zajednice o primjenjivosti različitih pokazatelja (biomarkera) korištenih prilikom detekcije stupnja hidriranosti organizma nedvojbeno su prisutni u znanstvenoj literaturi i ukazuju na potrebu novoga istraživanja. Pretpostavka se autora ogleda u hipotezama kako prethodne studije, prilikom mjerenja i interpretacije stupnja hidriranosti, nose određena metodološka ograničenja, stoga predstavljena studija ima cilj premostiti ista sveobuhvatnijim pristupom. Nadalje, ova disertacija postavlja za ciljeve utvrditi: (i) pouzdanost, (ii) valjanost, (iii) dijagnostičku točnost utemeljenu prilikom uzastopnih mjerenja na istom uzorku ispitanika tijekom perioda stabilne tjelesne mase i prilikom očuvanja uniformnih uvjeta prilikom prikupljanja uzoraka. Trenutačno u znanstvenoj literaturi takva informacija nije potkrijepljena metodološkim pristupom (i) dan-za-dan uzorkovanja, (ii) simultanom analizom unosa makronutrijenata i vode, (iii) promjenom u tjelesnoj masi, (iv) uplivom remetećih faktora (poput visoko proteinskih dijeta i udjela mišićne mase) za koje se opravdano smatra da mogu utjecati na dijagnostičku točnost stupnja hidriranosti. Osim toga, predstavljena je stopa hipohidriranosti organizma tijekom perioda stabilne tjelesne mase, uspoređena s referentnim vrijednostima, sukladno preprukama ACSM-a.

Moguće je stoga identificirati veći broj problema u odnosu na predstavljenu problematiku:

a) pouzdanost i valjanost urinarnih pokazatelja stupnja hidriranosti organizma
b) osjetljivost i specifičnost urinarnih pokazatelja stupnja hidriranosti organizma
c) upliv remetećih faktora na dijagnostičku točnost terenske procjene stope hidriranosti putem urinarnih pokazatelja i procjene udjela vode u organizmu sportaša

## Hipoteze:

$H_1$ – Osmolalitet je urina dijagnostički točan, superioran pokazatelj stupnja hidriranosti organizma kod boksača juniora tijekom pripremnoga perioda.

$H_2$ – Urinarni indikatori, postotak promjene u udjelu vode u organizmu (% Δ) i postotak promjene u tjelesnoj masi (% Δ) pouzdani (dosljedni) su pokazatelji stupnja hidriranosti organizma kod boksača juniora tijekom pripremnoga perioda.

$H_3$ – Specifična je težina urina valjan pokazatelj stupnja hidriranosti organizma kod vrhunskih boksača juniora tijekom pripremnoga perioda.

$H_4$ – Postotak promjene udjela vode u organizmu boksača (% Δ) i ukupna promjena (% Δ) u tjelesnoj masi neovisni su indikatori stupnja hidriranosti s obzirom na urinarne pokazatelje kod vrhunskih boksača juniora u pripremnom periodu.

$H_5$ – Moguće je utvrditi stopu hipohidriranosti organizma vrhunskih boksača juniora tijekom pripremnoga perioda.

$H_6$ – Specifična je težina urina značajno povezana s udjelom ukupnih proteina u urinu.

$H_7$ – Udio mišićne mase značajno je povezan s nalazom specifične težine urina isključivo kod težih boksača juniora tijekom pripremnoga perioda.

## Uzorak ispitanika

Uzorak se ispitanika sastojao od 23 vrhunska boksača juniorskoga uzrasta (dobi 17.3±1.9 godina, tjelesne visine 1.75±0.8 m, tjelesne mase 66.8±11.8 kg, 8.3±2.3 % udjela masti u tijelu, 7.1±0.9 iskustva u boksu), isključivo nacionalnih prvaka Rusije, Srbije i Bosne i Hercegovine (>25 borbi) i minimuma od 14 trenažnih sati tjedno tijekom prethodne natjecateljske sezone. Zbog osobitosti i specifičnosti prilagodbe organizma vrhunskih boksača juniora na cikluse nagloga i nekontroliranog smanjenja tjelesne mase s ciljem očuvanja homogenosti varijance, pristupilo se strogom kriteriju pri izboru ispitanika. Točnije, nedavan niz studija autora Reljića i sur. (2013-2015) pokazale su određene osobitosti i specifičnosti u fiziološkoj prilagodbi organizma uslijed opetovanih procesa nagle i nekontrolirane redukcije tjelesne mase kod boksača

juniora u odnosu na ostale srodne borilačke sportove. Anamnestički su podatci prikupljeni tijekom razgovora s odgovornim medicinskim osobljem svih reprezentacija prije uzorkovanja potvrdili kako ispitanici nisu u prethodnih šest mjeseci imali obljenja bubrega ili urinarnoga trakta. Ovo je istraživanje odobreno od Etičke komisije Kineziološkoga fakulteta Sveučilišta u Splitu (Redni broj 2181-205-02-05-15-008) u skladu s Helsinškom deklaracijom. Pravni su skrbnici i medicinsko osoblje potpisali pristanak za sudjelovanje u studiji prije inicijalnoga mjerenja, a maloljetni su boksači usuglasili pristanak za sudjelovanje u studiji.

## Uzorak varijabli

### Antropometrijske karakteristike

Tjelesna je masa utvrđena vagom Tanita BC-418 (Tanita Corp., Tokyo, Japan), sukladno preporukama Charltona i Andrewsa (2015), ispitanici su pristupili bosonogi u suhom donjem rublju, a tjelesna je visina utvrđena antropometrom po Martinu. Postotak tjelesne mase izražen kao udio masti (%) izračunat je sukladno preporukama (Lohman i sur., 1981) putem kožnih nabora i korištenjem Holtain kalipera (Crymych, Velika Britanija). Navedena je metodologija prethodno korištena u istraživanju na boksačima juniorima (Reljić i sur., 2013). Udio mišićne mase u tijelu (Tablica 1) boksača izračunat je iz antropometrijskih varijabli (dijametri šake, koljena, suma kožnih nabora, tjelesna masa, tjelesna visina) sukladno preporukama Hamouti i sur. (2010). Prema metodologiji istih autora, a sukladno našoj pilot studiji (Zubac i sur., 2015) boksači su, s obzirom na težinske kategorije, podijeljeni u dvije skupine ispitanika (lakši: raspon 52-65 kg; teži:raspon 69-91 kg tjelesne mase).

1. Udio tjelesne masti (%) = 0.1051 x (∑ šest kožnih nabora) + 2.585
2. Udio masti = [tjelesna masa x udio masne mase (%)] / 100
3. Rezidualna masa = tjelesna masa x 0.241
4. Koštana masa = 3.02 x (visina$^2$ x dijametar šake x dijametar koljena x 400) 0.712
5. Mišićna masa = Tjelesna masa – (koštana masa + udio masti + rezidualna masa)

Uzorkovanje urina

Temeljem smjernica za procjenu stupnja hidriranosti organizma postavljenih od ACSM (Sawka i sur., 2007) od svih ispitanika prikupljen je uzorak prvoga jutarnjeg urina u sterilan plastični spremnik. Specifična je težina urina ($S_{TU}$) analizirana AtagoPal-10s refraktometrom (Tokyo, Japan) (otklon mjerne skale 0.001). Refraktometar je kalibriran destiliranom vodom prije uporabe. Unutar 30 minuta nakon uzorkovanja urina, refraktometar je dostavljen u biomedicinski laboratorij Human Lab Subotica na daljnju obradu, sukladno preporukama laboratorijskih standarda za prijenos uzorka. Osmolalitet je uzorka urina analiziran putem standardne laboratorijske metodologije (-80, sniženje točke smrzavanja) putem osmometra (Advanced Instruments, Automated Osmometer Norwood, MA, USA). Ukupni su proteini u urinu analizirani turbidimetrijskom metodom korištenjem reagensa *benzenthonium chloride* na 404nm (Cobas U-411 automated analyzer, Roche Diagnostics, Indianapolis, SAD), sukladno protokolima (Iwata, 1971; Dihazi i Müller, 2007). Uzorci su urina prikupljeni u ranim jutarnjim satima (6:15-6:45 sati), prije treninga i konzumacije jela i pića. Ispitanici su pomno odabrani zbog mogućnosti upliva prehrambenih navika i kulturoloških razlika između različitih nacija Europe na vrijednosti osmolaliteta urina (Armstrong, 2007). U predstavljenoj studiji, *ishod testa* označava primjerena hidriranost $U_{OSM} \leq 1050$ mOsmol•kg$^{-1}$ i $S_{TU} \leq 1030$ g•mL$^{-1}$, a *ishod testa* dehidrirano je stanje organizma, definirano vrijednostima $U_{OSM} > 1050$ mOsmol•kg$^{-1}$ i $S_{TU} > 1030$ g•mL$^{-1}$, sukladno postavkama prethodnih istraživanja (Sawka i sur., 2007; Fernandez-Elias i sur., 2014), ali i rezultatima naših pilot studija (Zubac i sur., 2015a; Zubac i sur., 2016a). Temperatura zraka i relativna vlažnost kretale su se u rasponu 15–18°C i 45–50%, za sva mjerenja.

Bioelektrična impedanca:

Za procjenu ukupnoga udjela vode u tijelu ($U_{TV}$ % ) korištene su osmokontaktne elektrode segmentne jednofrekvencijske BIA-e (Tanita BC-418, Tanita Corp., Tokyo, Japan), koja je u prethodnim istraživanjima pokazala najmanji udio pogreške prilikom procjene u odnosu na ostale BIA uređaje (Demura i sur., 2004). Sličan je metodološki pristup (uspravan položaj tijela) prethodno predložen kao primjerena metoda prilikom procjene stupnja hidriranosti u borilačkim

sportovima (Utter i sur., 2012; Fernandez-Elias i sur., 2014). Protokol mjerenja identičan je prethodno opisanom mjerenju tjelesne mase.

## Protokol istraživanja

### Preliminarna mjerenja

Istraživanje je provedeno tijekom Međunarodnoga pripremnog boksačkog kampa, ponovljenim mjerenjem u tri vremenske točke (tijekom tri uzastopna dana). Inicijalno, s ciljem determinacije stabilnost tjelesne mase, svi su ispitanici vagani tri dana prije glavnoga dijela studije (dan-za-dan ponovljivost koji je prethodio analizi koncentracije urina). Osim toga, prethodno prikupljanju uzoraka urina, ispitanicima i trenerima predstavljeno je nekoliko smjernica u svezi s regulacijom tjelesne mase prije i tijekom izvedbe studije. U prvom tjednu kampa svi su sudionici provodili uniforman režim prehrane, treninga i spavanja prema istom, zajedničkom planu i programu. Također, ispitanici su zamoljeni da apstiniraju od konzumacije kofeinskih i alkoholnih pripravka i suplementacijskih dijeta visokoga proteinskog sadržaja. Niti jedna od poznatih metoda nagle redukcije tjelesne mase, poput saune, prehrambene restrikcije, akutne dehidracije, zlouporabe diuretika, nije bila dozvoljena. Sukladno protokolu, istraživanja tijekom kampa provodila su se uz nadzor trenera, službenih liječnika i istraživača. Boksači nisu trenirali 24 sata prije prvoga uzrokovanja i prethodno su odgovorili na demografski upitnik (dob, težinska kategorija, iskustvo, navike i praksa u redukciji tjelesne mase). Točnije, tijekom preliminarnih testiranja s ciljem uklanjanja remetećih faktora u kontekstu navika u redukciji tjelesne mase i konzumacije suplemenata prethodno je prihvaćen upitnik ispunilo 28 mladih boksača (upitnik o redukciji tjelesne mase) (Artioli i sur., 2009). Temeljem prikupljenih informacija o ranije spomenutim faktorima, homogena skupina od 23 boksača izabrana je za ovu studiju. Tri su ispitanika isključena zbog konzumacije suplemenata, a dva zbog neiskustva u nagloj i nekontroliranoj redukciji tjelesne mase (superteška kategorija). Pouzdanost je upitnika potvrđena putem test-retest korelacijskoga nacrta (za ordinalne varijable poput dobi ispitanika), a za ordinalne i nominalne varijable pouzdanost je provjerena analizom usporedbe jednakih

odgovora (eng. *equal item theory*). Prethodno ovoj studiji, pouzdanost upitnika, u razmaku od 10 dana, provjerena je na uzorku od 20 boksača iz Splita i Mostara. Svi su ispitanici ispunili upitnike na materinjem jeziku.

Unos markonutrijenata i vode

Unos je markonutrijenata tijekom studije bio pod sustavnim nadzorom profesionalnoga nutricionista. Svi su sportaši dobili smjernice kako primjereno dokumentirati bilo koje dodatno konzumirane namirnice s posebnom pažnjom pri kvantificiranju volumena prilikom dokumentiranja nutrijenata. Volumen vode iz namirnica, obroka i ukupan unos makronutrijenata izračunat je korištenjem otvorenoga softvera za kliničku prehranu *OPEN* preuzet iz nutricionističkih baza Republike Slovenije u suradnji s *Nutricionist d.o.o.* Split, Republika Hrvatska. Vrijednosti su nutrijenata izražene u gramima prilikom analize. Sastav hrane apliciran putem OPEN sustava, sukladno Europskim standardima za hranu CEN/TC 387 i u skladu s istraživanjem (Pakkala i sur., 2010).

## Metode obrade podataka

Pri statističkoj obradi podataka korišten je statistički paket Statistica v. 13.0. (SoftStat, SAD). Deskriptivna statistika distribucije varijabli korištena je prilikom izračuna aritmetičke sredine ± standardne devijacije, a normalitet je distribucije varijabli testiran Shapiro-Wilks testom za male uzroke, dodatno grafički provjerenim Q-Q grafom. Dvosmjernom je analizom varijance (ANOVA) provjereno postojanje inicijalnih razlika između različitih varijabli (nacija x vrijeme) prilikom analize $U_{OSM}$. Također, dvosmjernom su ANOVOM provjerene razlike između dviju grupa boksača u svim zavisnim varijablama. Razina značajnosti prihvaćena kod dvosmjerne ANOVA-e korigirana je Bonnferoni korekcijom ($\alpha/3=0.0167$), snaga testa (beta pogreška) postavljena je na 0.80 sukladno preporukama Vincenta (2005).

Interklasnim koeficijentom korelacije i standardnom pogreškom mjerenja (ICC, SEM), koeficijentom varijacije (CV %), univarijatnom analizom varijance za ponovljena mjerenja (uz Bonfferoni post hoc test), provjerena je pouzdanost zavisnih varijabli korištenih za neinvazivnu procjenu stupnja hidriranosti organizma. Slaganje individualnih vrijednosti višekratnih pokazatelja stupnja hidriranosti prikazano je Bland-Altman grafikonima na kojima su vrijednosti prethodno standardizirane na Z-vrijednost radi primjerene usporedbe različitih urinarnih indikatora i ukupnoga udjela vode u tijelu. Konvergentna valjanost utvrđena je Personovim koeficijentom korelacije između (i) urinarnih indikatora stupnja hidriranosti, (ii) ukupnih proteina u urinu, (iii) urinarnih indikatora i ukupne vode u tijelu. Hi-kvadrat testom za zavisne uzorke analizirane su povezanosti između dvije dijagnostičke metode (laboratorijska i terenska) u otkrivanju hipohidriranosti organizma putem urinarnih indikatora, a ROC krivulja poslužila je kao determinanta dijagnostičke točnosti (specifičnost i osjetljivost) prilikom detekcije stupnja hidriranosti organizma. Nezavisnim t-testom utvrđene su inicijalne razlike u mišićnoj masi dviju skupina boksača, sukladno pilot studiji (Zubac i sur., 2015a). Personovom linearnom i Spermanovim rangom korelacije, analiziran je utjecaj ukupnoga sadržaja proteina u uzorcima urina, ali i utjecaj udjela mišićne mase na urinarne indikatore stupnja hidriranosti organizma.

Veličina je učinka/promjene (eng. *effect size*) prihvaćena kao srednja ili velika sukladno podatcima iz naše pilot studije. Mauchley testom analizrano je postojanje sfernosti kod ponovljenih mjerenja dvosmjerne ANOVA-e. Snaga veze određena je sukladno preporukama

Vincenta (2005). Prilikom klasifikacije veličine učinka (ES) korišteni su Cohenov d i $\eta^2$ (eng. *partial eta-squared*), sukladno ranije uspostavljenim kriterijima (Cohen, 1988).

# POGLAVLJE III

## REZULTATI

Sve su zavisne varijable, osim ukupnih proteina u urinu ($U_P$), zadovoljile su uvjete normalnosti distribucije, testirane Shapiro-Wilks testom za male uzorke, stoga je prilikom analize ponovljivosti u varijabli $U_P$ korištena neparametrijska inačica ANOVE, Freidman ANOVA-test.
S obzirom na činjenicu kako medicinski dijagnostički model (kontigencijska 2x2 tablica) intergira *Yatsovu korekciju*, prilikom univarijatne analize frekvencija urinarnih pokazatelja, korišten je ukupan broj prikupljenih uzoraka urina tijekom glavnog dijela studije (tri dana), a pri korelacijskim nacrtima i ROC krivulji korištene su prosječne vrijednosti prikupljenih podataka.

### Rezultati preliminarnih mjerenja

Nisu utvrđene preliminarne razlike između tri nacije u vrijednostima osmolaliteta urina ($F=0.71$; $p=0.61$, $\eta^2=0.13$). Analiza preliminarne stabilnosti u tjelesnoj masi prikazala je odličnu ponovljivost prikupljenih vrijednosti: ICC=0.99; CV %=0.001; $F=0.24$, $p=0.62$. Koeficijenti su varijabilnosti zavisnih varijabli ($S_{TU}$, $T_M$, $U_{VT}$) (eng. *intra-assay*) pokazali visoku pouzdanost mjerenja, CV %<1. Koeficijenti pouzdanosti upitnika potvrdili su primjerenu pouzdanost testiranja; Spearmanov rang korelacije iznosio je 0.99 (stopa reducirane tjelesne mase), a postotak jednako odgovorenih čestica na upitniku iznosio je od 90 % (natjecateljsko iskustvo) do 100 % (trenutačna težinska kategorija). Dosljednost se prilikom analize test-retest pouzdanost kretala u intervalu 95-100 %, što ukazuje na primjerenu pouzdanost upitnika. Od svih sportaša uključenih u studiju, tijekom prethodne natjecateljske sezone 53 % imalo je iskustvo u nagloj i nekontroliranoj redukciji tjelesne mase (i. e. >3 % redukcija tjelesne mase unutar tri dana, sukladno preporukama Koral i Doreseville, 2009). 62 % boksača iniciralo je praksu nagle i nekontrolirane redukcije tjelesne mase tijekom adolescencije (16-17 godina), a 38 % krenulo je s praksom sustavnoga prednatjecateljskog umanjenja $T_M$ i mnogo ranije (13-14 godina). Tijekom prednatjecateljske faze, 65 % ispitanika limitira unos nutrijenata u kombinaciji s metodama pojačanoga znojenja dva do tri dana pred natjecanje putem kombiniranja saune i treninga u

plastičnom odijelu (85 %). Najrasprostranjenije prijavljena stopa redukcije tjelesne mase iznosila je 2-5 %, dosegnuta neposredno pred natjecanje.

Antropometrijske karakteristike

U Tablici 1, razlike između lakih i teških boksača utvrđene su u varijablama tjelesna masa, tjelesna visina, udio mišićne mase, suma kožnih nabora i udio tjelesne masti na razini ($p<0.001$).

Unos makronutrijenata i vode

Nisu utvrđene razlike u ukupnom unosu markonutrijenata i vode tijekom provedenoga istraživanja (Tablica 3).

Pouzdanost

Rezultati prikazani u Tablici 2 ističu niske vrijednosti koeficijenata pouzdanosti (ICC) očitanih vrijednosti urinarnih pokazatelja stupnja hidriranosti (terenski i laboratorijski) kod obje grupe. Vrijednosti ICC koeficijenta za lake i teške boksače u varijabli $S_{TU}$ iznose (ICC=0.52–0.54, pojedinačno), a za $U_{OSM}$ (ICC=0.38–0.58, pojedinačno). Interval pouzdanosti ICC koeficijenta u varijabli $S_{TU}$ iznosi (±95 % IP 0.20–0.78, za lake) i (±95 % IP 0.21–0.83, za teške. Pri varijabli $U_{OSM,}$ interval pouzdanosti za lake iznosi (±95 % 0.05–0.72), a za teške (±95 % IP 0.23–0.81). Nasuprot tome, izvrsnu su ponovljivost (pouzdanost) pokazale varijable $T_M$ i $U_{TV}$ kod obje grupe u rasponu (ICC=0.93–0.99). Zbog velike varijabilnosti urinarnih parametara pristupilo se dvosmjernoj ANOVA-i (grupa x vrijeme) pri oba urinarna biomarkera. Kod varijable $S_{TU}$ utvrđen je značajan efekt vremena; ($F=12.32$; $p<0.001$; $\beta=0.98$; $\eta^2=0.35$), a nisu utvrđene razlike između grupa ($F=1.01$, $p=0.27$; $\eta^2=0.04$) ni interakcijski efekti ($F=2.71$, $p=0.33$; $\eta^2=0.14$). S obzirom na značajne razlike između tri vremenske točke mjerenja pristupilo se Bonnferoni *post hoc* testovima (Graf 1). Kod lakih boksača *post-hoc* test nije pokazao značajne razlike ($F=3.02$; $p=0.09$, $\eta^2=0.23$), a za teške boksače u varijabli $S_{TU}$ *post hoc* test ukazuje na

značajne razlike, i porast u vrijednostima od 0.5±0.4 % između prvoga i trećeg mjerenja (F=8.90, $\eta^2$=0.49; β=0.94; p<0.001), dok nisu utvrđene razlike između prvoga i drugog i drugoga i trećeg mjerenja (p=0.11; p=0.18, pojedinačno). Kod varijable $U_{OSM}$ također je utvrđen značajan učinak vremena; (F=13.32; p<0.001; β=0.99; $\eta^2$=0.39), a nisu promotrene razlike između grupa (F=0.08, p=0.93; η2=0.001) ni interakcijski efekti (F=1.19, p=0.29; $\eta^2$=0.05). S obzirom na značajne razlike između tri vremenske točke pristupilo se Bonnferoni *post hoc* testovima (Graf 2). Post hoc test pokazao je značajne razlike kod obje skupine boksača. Kod lakih su boksača opažene razlike na razini (F=5.17; p=0.01, β=0.79, $\eta^2$=0.32), između prvoga i trećeg mjerenja i porast od 11.2±12.8 %, razlike između prvoga i drugog i drugoga i trećeg mjerenja nisu utvrđene (p=0.15; p=0.36, pojedinačno). Za teške boksače u varijabli $U_{OSM}$ post hoc testom utvrđene su značajne razlike između prvoga i trećeg mjerenja te porast od 19.9±22.7 % (F=10.22; p=0.001, β=0.98, $\eta^2$=0.48), a nije bilo značajnih razlika između prvoga i drugog i drugoga i trećeg mjerenja (p=0.20; p=0.27, pojedinačno). Neparametrijska analiza Freidman ANOVA-e pokazala je značajne razlike između prve i treće točke mjerenja u varijabli ukupni proteini u urinu kod teških boksača (F=3.31, p<0.001), te porast u koncentraciji od 29.5±51.8 %. Pretpostavke (preduvjeti) sfernost (Mauchley test) i homogenost (Levinov test) pri dvosmjernoj ANOVA-i nisu narušene ($\chi^2$ =2.3; $\chi^2$ =3.5; pojedinačno; p>0.05).

Valjanost

Graf 5 prikazuje konkurentnu valjanost, analiziranu korelacijskim nacrtom, a Graf 4 i Graf 5 prikazuju visoku pozitivnu povezanost između $S_{TU}$ i $U_{OSM}$ (r=0.87; p<0.001, 95 % IP= 0.72–0.93). Trivijalna korelacija utvrđena između oba urinarna indikatora i ukupnoga udjela vode u tijelu (r=0.06, p=0.45, ±95 % IP=-0.35–0.47, r=-0.13, p=0.53; ±95 % IP=-0.51–0.29, pojedinačno). Na Grafu 6 putem Bland-Altman grafikona prikazano je individualno slaganje zavisnih varijabli korištenih prilikom procjene stupnja hidriranosti organizma. Vrijednosti su standardizirane na Z-vrijednosti da bi omogućile primjerene usporedbe. Rezultati demonstriraju izniman varijablilitet između vrijednosti urinarnih biomarkera stupnja hidriranosti i ukupne vode u tijelu; [$S_{TU}$ i $U_{TV}$ sustavna pogreška (eng. *bias*) =0.0002, ±Sd=1.37; ±95 % IP=-2.7–2.7]; [$U_{OSM}$ i $U_{TV}$ sustavna pogreška (eng. *bias*)=0.0004; ±Sd=1.51; ±95 % IP=-2.95–2.95], a slaganje između

vrijednosti urinarnih indikatora pokazuje trend uniformnosti i niske varijabilnosti [$S_{TU}$ i $U_{OSM}$ sustavna pogreška (eng. *bias*) =0.0002; ±Sd=0.47; ±95% IP=-0.97–0.97].

Dijagnostička točnost

Tablica 4, Medicinski dijagnostički model pokazuje odsutnost razlika (Hi-kvadrat test $\chi^2$) u pojavnostima prikazanih frekvencija urinarnih biomakera (laboratorijskih i terenskih na razini $p>0.05$ za oba testa). Graf 3 prikazuje linearnu povezanost utvrđenu Pearsonovom linearnom korelacijom između udjela mišićne mase i $S_{TU}$ (r=0.14, p=0.51; IP 95 %=-0.52–0.28); linearnu povezanost ukupnih proteina i $S_{TU}$ utvrđenu Spearmanovim rangom korelacije (r=0.27, p=0.22; IP 95 %=-0.16–0.61). Graf 4 prikazuje linearnu povezanost, analiziranu Spearmanovim rangom korelacije, između varijabli $U_{OSM}$ i ukupnih proteina u urinu (r=0.11; p=0.59; IP 95 %=-0.31–0.51). Graf 7 ilustrira dijagnostički model ROC krivulje urinarnih indikatora stupnja hidriranosti. Područje ispod krivulje ($A_{UC}$) ukazuje na sličan ishod prilikom analize vrijednosti oba urinarna biomarkera (0.93, $p<0.001$) s visokom osjetljivošću i specifičnošću (93.5 % i 87.5 %). Povrh toga model ROC krivulje klasificira 64.2 % ispitanika kao stvarno pozitivne (dehidrirani), a 34.8 % njih bilo je klasificirano kao stvarno negativni.

Stopa hipohidriranosti

Na Grafu 8 prikazane su prosječne vrijednosti stope hipohidriranosti u varijablama $S_{TU}$=1.028±0.003 g•mL$^{-1}$, i $U_{OSM}$=1036±158 mOsmol•kg$^{-1}$ .

# TABLICE I GRAFOVI

Tablica 1. Antropometrijske karakteristike ispitanika

| Parametri | Laki | Teški |
|---|---|---|
| Dob (godine) | 17.2±0.4 | 17.5±0.7 |
| Tjelesna masa (kg) | 57.4±4.6* | 76.9±7.7 |
| Tjelesna visina (m) | 1.69±0.07* | 1.79±0.08 |
| Udio mišićne mase (kg) | 37.8±3.0* | 49.5±4.5 |
| Suma kožnih nabora (mm) | 38.3±4.3* | 56.1±12.8 |
| Udio tjelesne masti (%) | 7.1±0.9* | 9.3±1.8 |
| Iskustvo (godine) | 7.1±1.2 | 7.0±1.1 |

Legenda: Podatci su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna devijacija; laki - boksači manje tjelesne mase; teški - boksači veće tjelesne mase; * različito od teški na razini ($p<0.05$);

Tablica 2. Analiza pouzdanosti neinvazivnih biomarkera stupnja hidriranosti

| | Parametri | Mjerenje 1 | Mjerenje 2 | Mjerenje 3 | F-test | ICC | SEM | CV% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Laki | $S_{TU}$ | 1.027±0.004 | 1.029±0.003 | 1.029±0.002 | 3.02 | 0.52 | 0.001 | 0.008 |
| | $U_{OSM}$ | 987±127 | 1038±68 | 1085±80 | 5.16* | 0.38 | 57.5 | 0.03 |
| | $U_P$ | 0.11±0.07 | 0.12±0.06 | 0.12±0.05 | $0.31^{\neq}$ | -- | -- | 0.09 |
| | $T_M$ | 57.4±4.6 | 57.5±4.8 | 57.5 ±4.8 | 0.22 | 0.99 | 1.1 | 0.002 |
| | $U_{TV}$ | 63.7±2.1 | 63.7±1.7 | 63.5±1.6 | 0.24 | 0.93 | 0.6 | 0.004 |
| Teški | $S_{TU}$ | 1.025±0.005 | 1.027±0.004 | 1.030±0.002 | 8.90* | 0.54 | 0.001 | 0.001 |
| | $U_{OSM}$ | 952±179 | 1031±164 | 1033±127 | 10.20* | 0.58 | 82.3 | 0.04 |
| | $U_P$ | 0.09±0.04 | 0.09±0.03 | 0.11±0.03 | $3.31^{\neq}$ | -- | -- | 0.08 |
| | $T_M$ | 76.9±7.6 | 76.9±7.5 | 76.8±7.7 | 0.30 | 0.99 | 1.03 | 0.001 |
| | $U_{TV}$ | 61.4±2.2 | 61.5±2.2 | 61.5±2.1 | 0.23 | 0.95 | 0.51 | 0.003 |

Legenda: Podatci su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna devijacija; $S_{TU}$ - Specifična težina urina; $U_{OSM}$ - osmolalitet urina; $T_M$ - tjelesna masa; $U_P$ - ukupni protein u urinu; $U_{TV}$ - udio vode u tijelu; F-test - analiza varijance; ≠ Freidman neparametrijska analiza varijance; ICC - intraklasni koeficijent korelacije; SEM - standardna pogreška mjerenja; CV% - koeficijent varijacije; * različito na razini ($p<0.001$) (eng. *significant time effect*, za Bonfferroni post hoc testove Grafovi 1 i 2); Laki - boksači manje tjelesne mase; Teški - boksači veće tjelesne mase.

Tablica 3. Unos makronutrijenata i vode

| Parametri | Inicijalno 24-h | Finalno24-h | Es(d) |
|---|---|---|---|
| Energija ($kcal \cdot kg^{-1}$) | 35.4±4.5 | 34.8±4.7 | - |
| Ugljikohidrati ($g \cdot kg^{-1}$) | 2.9±0.5 | 2.9±0.3 | - |
| Proteini ($g \cdot kg^{-1}$) | 2.0±0.3 | 2.1±0.2 | - |
| Masti ($g \cdot kg^{-1}$) | 1.9±0.4 | 1.8±0.2* | 0.3 |
| Ukupna voda (L) | 2.9±0.3 | 3.0±0.6 | - |

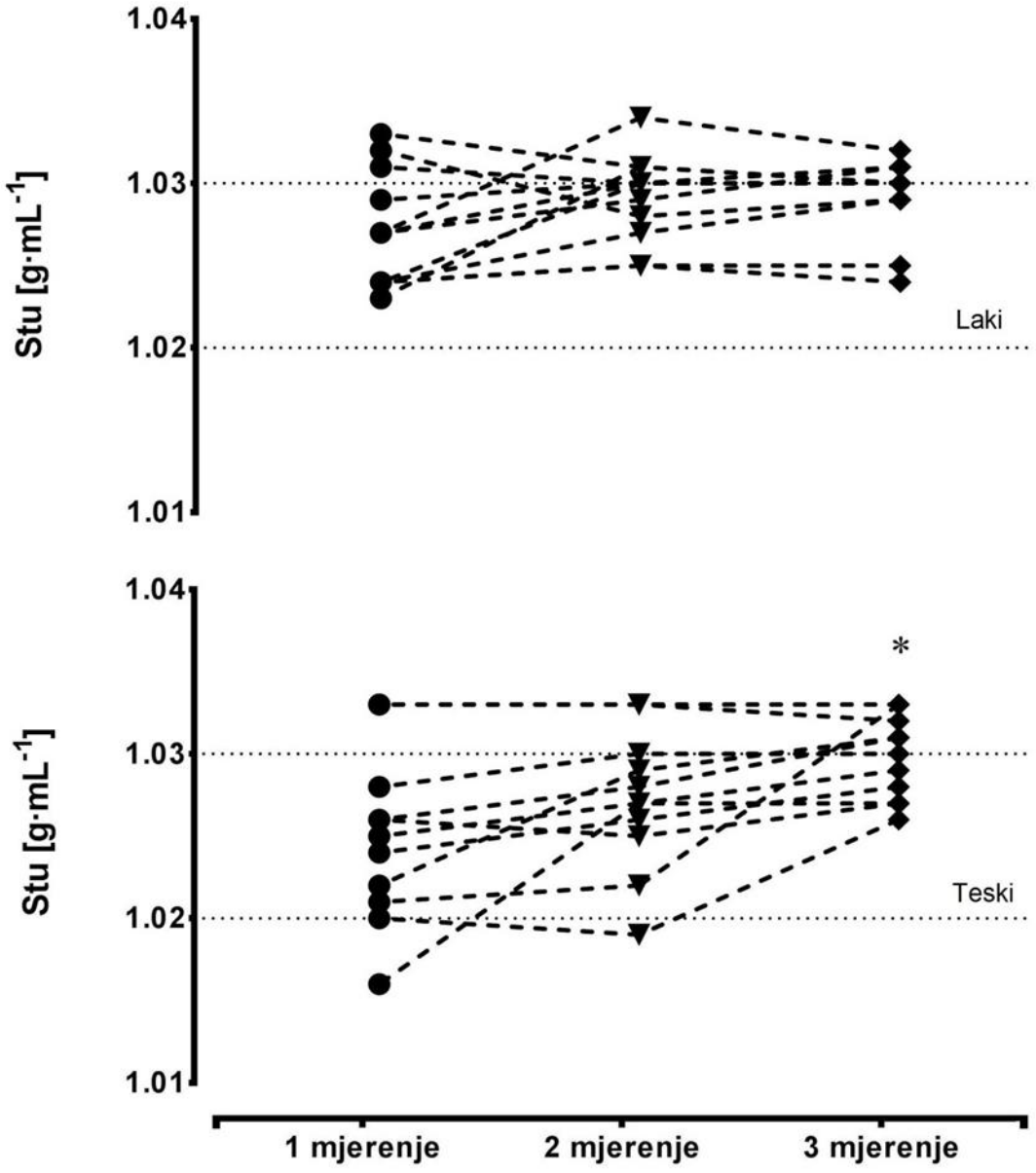
Legenda: Podatci su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Nutricionistički podatci prikupljeni su 24 sata prije uzorkovanja urina; ES - veličinu učinka (eng. *effect size*); *različito od inicijalnoga na razini ($p<0.05$).

Tablica 4. Medicinski dijagnostički model

| | Dehidrirani | Hidrirani | total |
|---|---|---|---|
| $T+S_{TU}$ | 31(44.9%) | 5(7.2%) | 36 |
| $T–S_{TU}$ | 2(2.9%) | 31(44.9%) | 33 |
| Total | 33 | 36 | 69 |

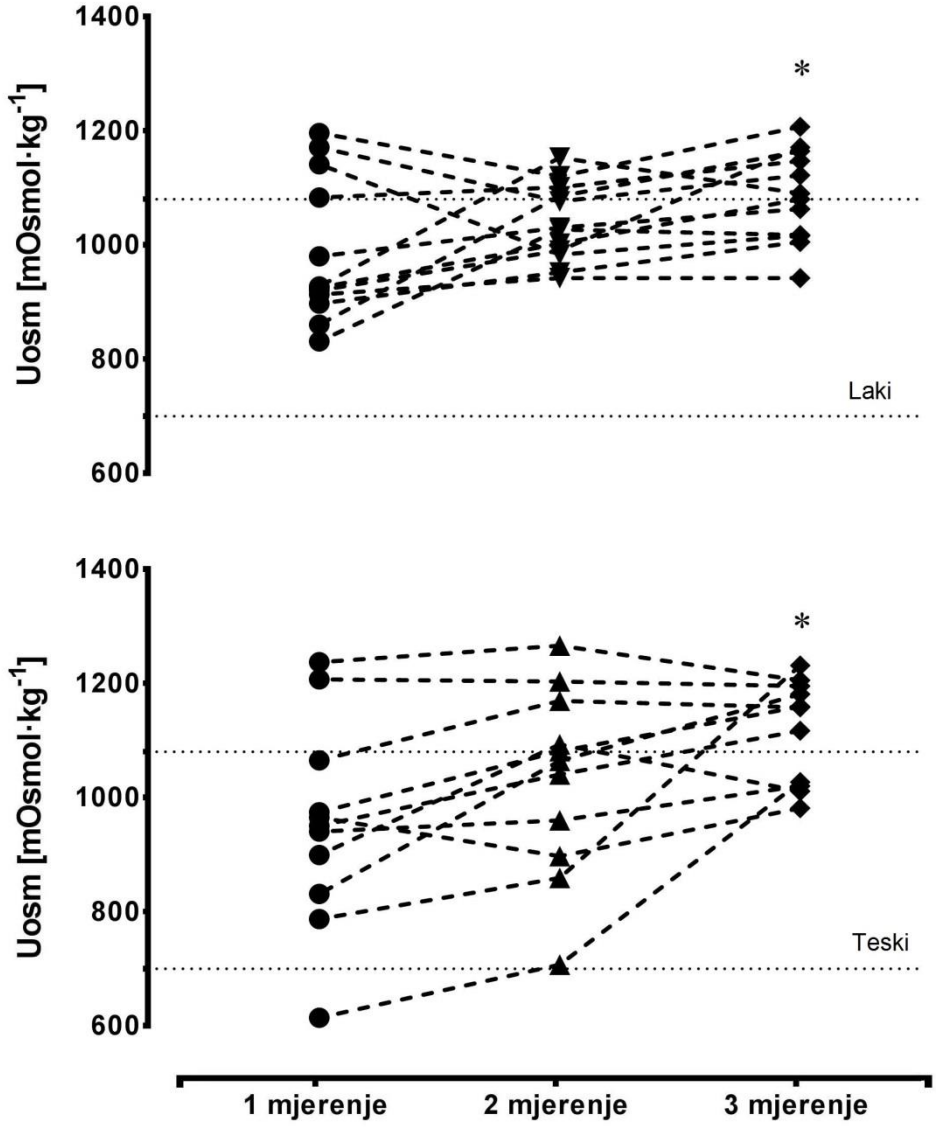
Legenda: Kontigencijska tablica (2x2); Hi kvadrat test ($\chi 2$); $S_{TU}$ - Specifična težina urina; T+ predstavlja ishod testa ($S_{TU}$>1.020 $g \bullet mL^{-1}$; T- Predstavlja ishod testa ≤1.020 $g \bullet mL^{-1}$); Nema značajanih razlika u pojavnostima prikazanih frekvencnija ($p>0.05$)

Graf 1. Bonfferroni Post hoc za parametar $S_{TU}$



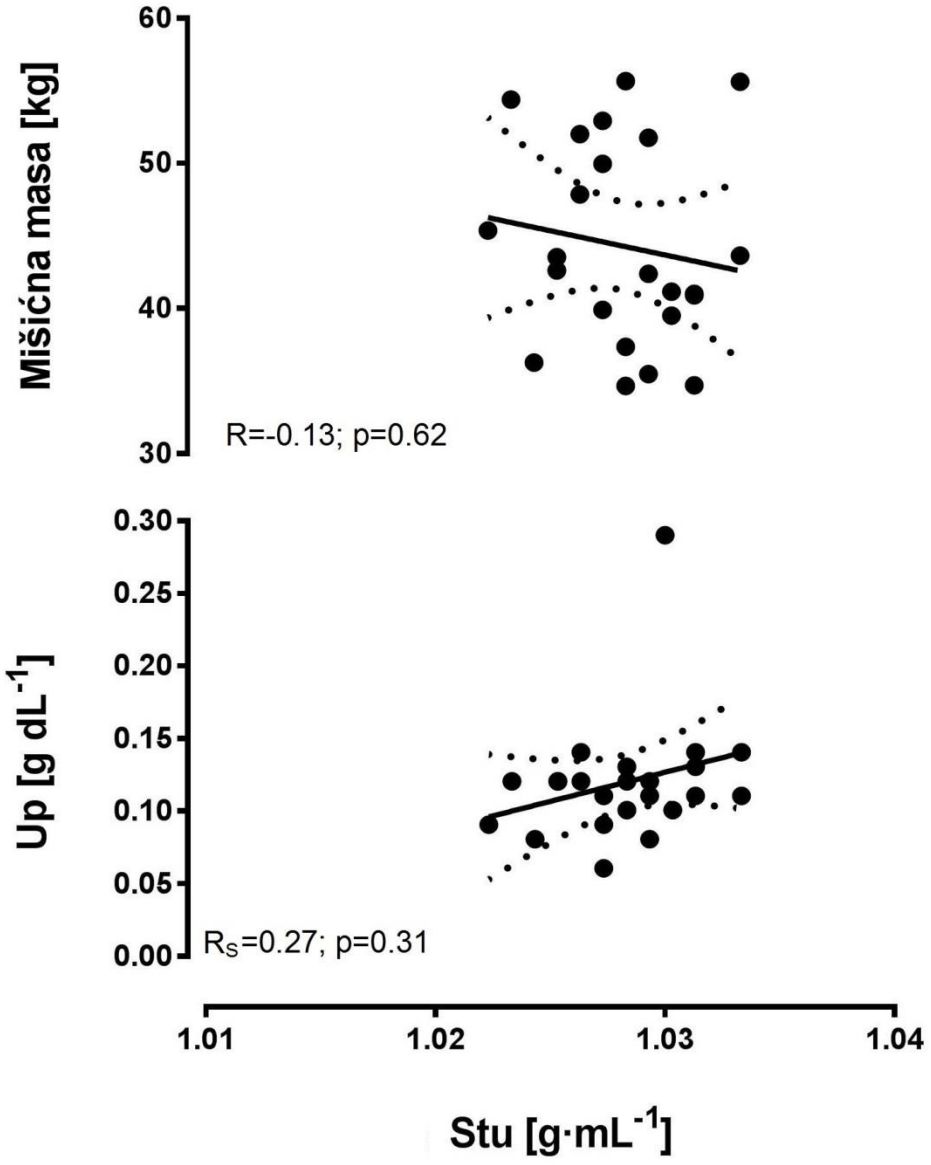

Legenda: $S_{TU}$ – Specifična težina urina (g•mL$^{-1}$); značajna razlika izmjerenih vrijednosti u trećoj točki mjerenja u odnosu na prvu kod teške skupine ispitanika na razini (*p<0.001). Isprekidana linija označava referentne vrijednosti stupnja hipohidriranosti organizma.

Graf 2. Bonfferroni Post hoc za parametar $U_{OSM}$



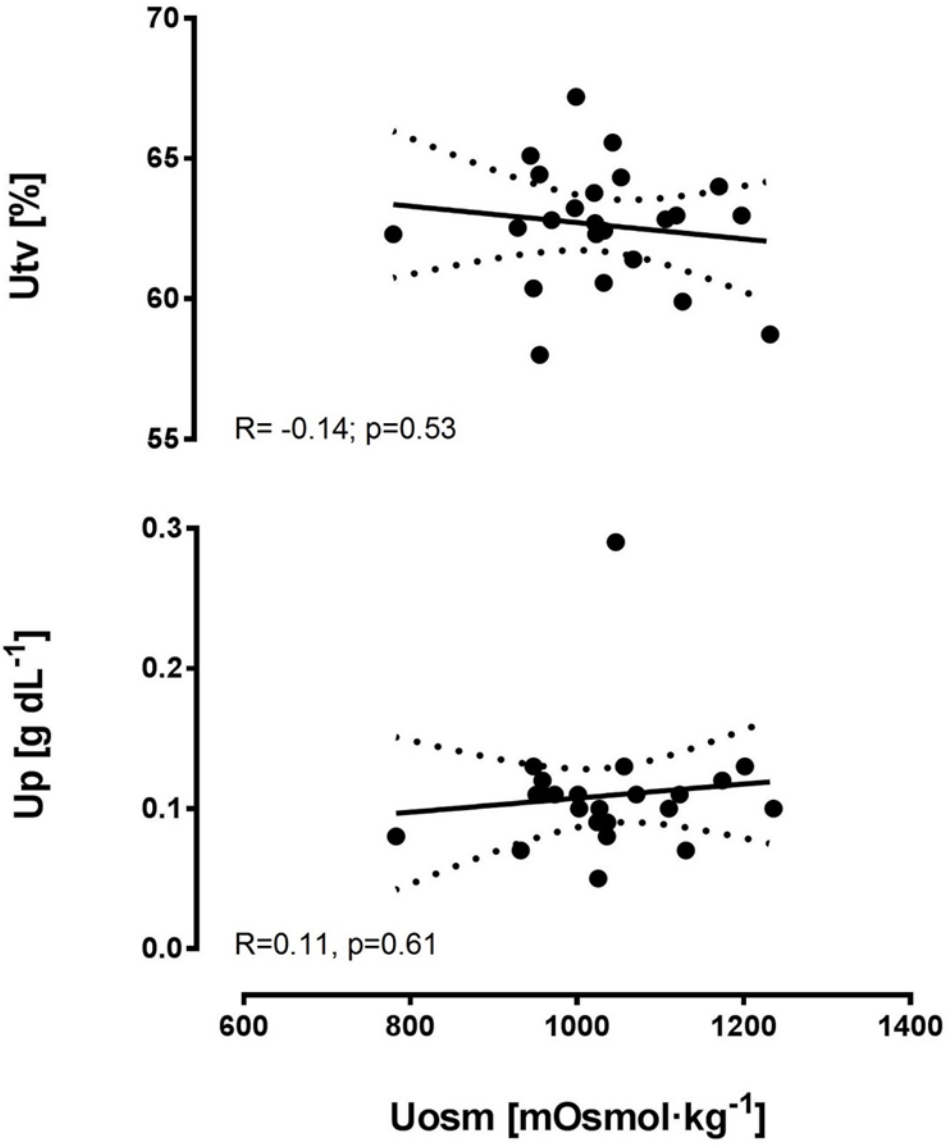

Legenda: $U_{OSM}$ – Osmolalitet urina (mOsmol•kg$^{-1}$); značajna razlika izmjerenih vrijednosti u trećoj točki mjerenja u odnosu na prvu kod obje skupine ispitanika na razini (*p<0.001). Isprekidana linija označava referentne vrijednosti stupnja hipohidriranosti organizma.

Graf 3. Linearna povezanost $S_{TU}$, ukupnih proteina u urinu i udjela mišićne mase



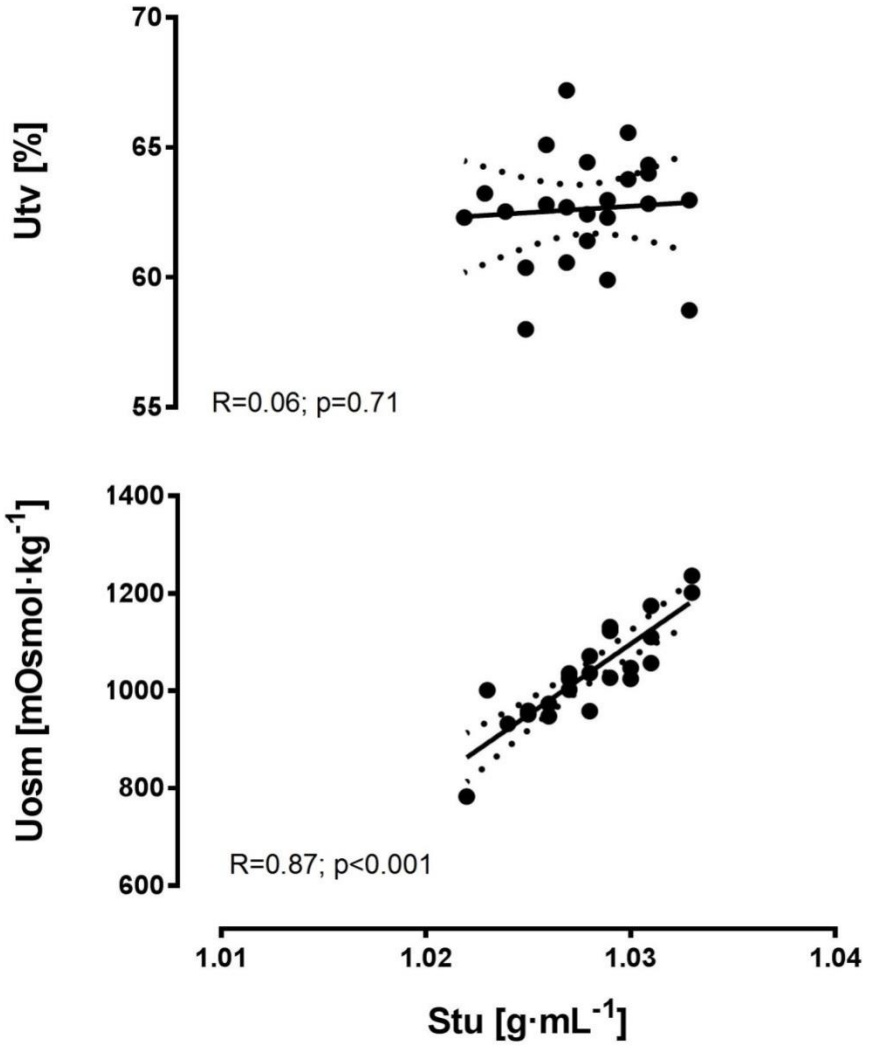

Legenda: $S_{TU}$ – Specifična težina urina (g•mL$^{-1}$); $U_P$ (g•dL$^{-1}$) – ukupni proteini u urinu; Mišićna masa (kg) – udio mišićne mase u tijelu; R - Pearsonova linearna korelacija; Rs - Spremanov rang korelacije; isprekidana linija predstavlja interval pouzdanosti korelacijskog nacrta IP ±95%.

Graf 4. Linearna povezanost $U_{OSM}$, ukupnih proteina u urinu i udjela vode u tijelu



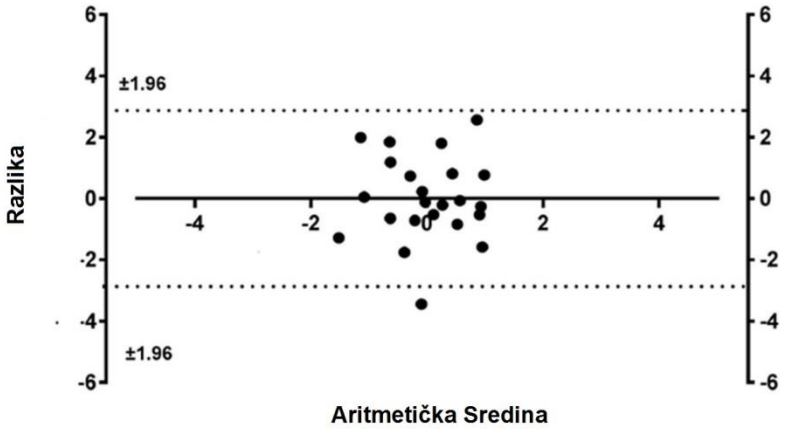

Legenda: $U_{OSM}$ – Osmolaitet urina (mOsmol•kg$^{-1}$); $U_{TV}$% – ukupan udio vode u tijelu; $U_P$ (g•dL$^{-1}$) – ukupni proteini u urinu; R - Pearsonova linearna korelacija; Rs - Spremanov rang korelacije, isprekidana linija predstavlja interval pouzdanosti korelacijskog nacrta IP ±95 %.

Graf 5. Linearna povezanost višekratnih indikatora stupnja hidriranosti organizma

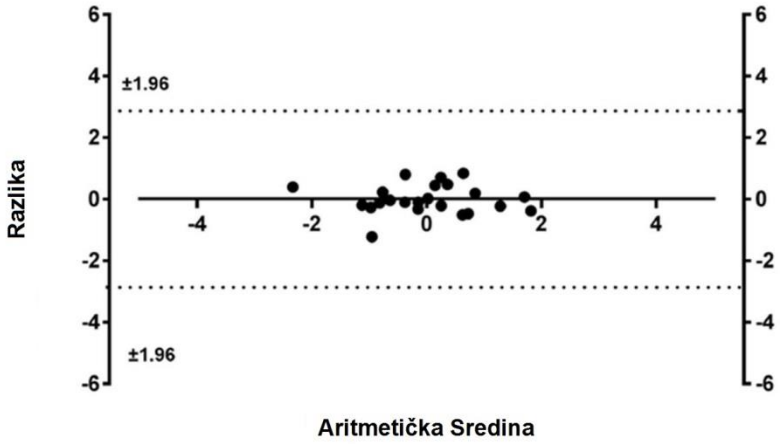



Legenda: $S_{TU}$ – specifična težina urina (g•mL$^{-1}$); $U_{OSM}$ – osmolaitet urina (mOsmol•kg-$^{1}$); $U_P$ (g•dL-$^{1}$) ukupni proteini u urinu; statistički značajna povezanost $S_{TU}$ i $U_{OSM}$ na razini (*p<0.001), R - Pearsonova linearna korelacija; isprekidana linija predstavlja interval pouzdanosti korelacijskog nacrta IP ±95 %.

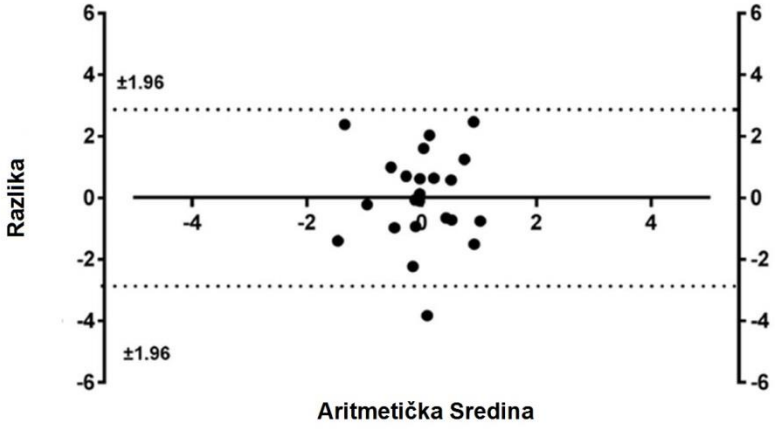
Graf 6. Bland-Altman grafikon (eng. *plot*)




B)

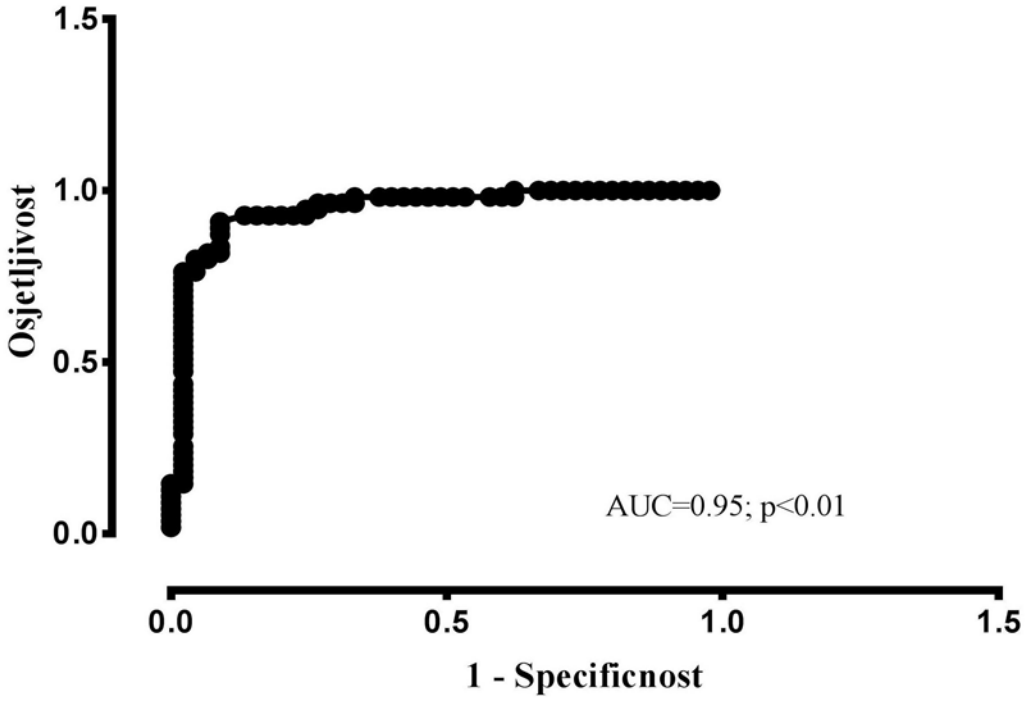



C)



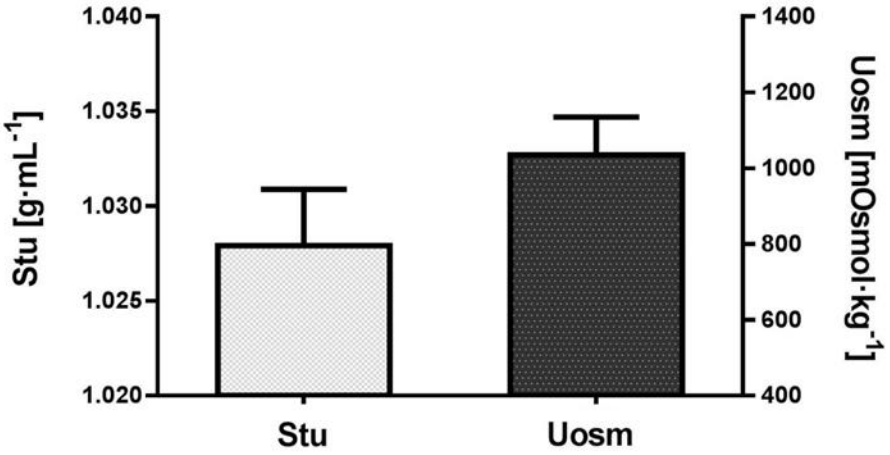
Legenda: $S_{TU}$ – Specifična težina urina (g•mL$^{-1}$); $U_{OSM}$ – osmolalitet urina (mOsmol•kg$^{-1}$); $U_{TV}$% –ukupan udio vode u tijelu; isprekidana linija predstavlja interval pouzdanosti ±95%; x – os predstavlja aritmetičku sredinu vrijednosti prikazanih parametara, y – os predstavlja razliku između vrijednosti prikazanih parametara. Slika A) individualno slaganje parametara $S_{TU}$ i $U_{TV}$; B) individualno slaganje parametara $S_{TU}$ i $U_{OSM}$; C) individualno slaganje parametara $S_{TU}$ i $U_{TV.}$

## Graf 7. ROC krivulja




Legenda: $A_{UC}$ – područje ispod krivulje; x – os prikazuje Specifičnost (pokazatelj moći klasifikacije testa pri detekciji stupnja hipohidriranosti organizma; y – os prikazuje Osjetljivost (pokazatelj moći klasifikacije testa u odsustvu stanja hipohidriranosti organizma); za varijable $U_{OSM}$ i $S_{TU.}$

Graf 8. Stopa hipohidriranosti




Legenda: Podatci su predstavljeni kao aritmetička sredina ± standardna devijacija; $S_{TU}$ – specifična težina urina ($g \bullet mL^{-1}$); $U_{OSM}$ – osmolalitet urina ($mOsmol \bullet kg^{-1}$).

# POGLAVLJE IV

## RASPRAVA

Temeljni je cilj ovoga istraživanja bio ispitati metrijske karakteristike višekratnih neinvazivnih pokazatelja stupnja hidriranosti organizma kod vrhunskih boksača juniorskoga uzrasta u stvarnim uvjetima pripremnoga kampa (eng. *real-life settings approach*). Temeljne spoznaje ogledaju se u promotrenoj velikoj varijabilnosti i nedosljednosti urinarnih pokazatelja stupnja hidriranosti organizma (laboratorijskih i terenskih) unatoč stabilnoj tjelesnoj masi i primjerenom unosu markonutrijenata i vode. Nalazi konkurentne valjanosti i medicinskih dijagnostičkih modela pokazuju uniformno slaganje i visoku povezanost urinarnih indikatora, ali i značajnu razliku u odnosu na udio vode u tijelu. Promotrena je univerzalno visoka stopa hipohidriranosti organizma kod svih ispitanika što dovodi u pitanje valjanost interpretacije do sada postavljenih kriterija i referentih vrijednosti prilikom procjene stupnja hidriranosti organizma i cjelokupne paradigme *zlatnoga standarda* prilikom dijagnostike stupnja hidriranosti organizma. Ovo istraživanje nije potvrdilo hipotezu o utjecaju povišene mišićne mase na dijagnostičku točnost specifične težine urina prilikom detekcije hipohidriranosti, dok metrijske karakteristike analize ukupnih proteina u urinu dan-za-dan pristupom ostaju dvosmislene.

## Pouzdanost

Urinarni pokazatelji stupnja hidriranosti ($S_{TU}$ i $U_{OSM}$) profilirali su se kao nezamjenjiv dijagnostički alat pri terenskoj i laboratorijskoj detekciji stupnja hidriranosti organizma (Zubac i sur., 2016a). Kao primarni razlog takve prakse navodi se elastičnost veze povišene koncentracije otopljenih čestica u uzorku urina kao odgovor bubrežnoga sustava na pomankanje udjela vode u tijelu. Prema našim trenutačnim spoznajama predstavljena studija je prva koja si je postavila za cilj analizirati metrijske karakteristike neinvazivnih pokazatelja stupnja hidriranosti dan-za-dan pristupom na uzorku vrhunskih mladih boksača. Unatoč stabilnosti u (i) tjelesnoj masi, (ii) udjelu vode u tijelu (ICC raspon, 0.93–0.99, CV%<1 %, Tablica 2) i (iii) primjerenom unosu markonutrijenata i vode (Tablica 3), ali i pomnom repliciranju trenažnih opterećenja (~3.5-h

sport-specifičnog treninga u dva navrata tijekom dana), oba urinarna indikatora pokazala su veliku varijabilnost, nedosljednost i trend porasta. Vrijednosti ICC koeficijenata kod oba urinarna pokazatelja zabilježena su u rasponu (ICC=0.38–0.58), što potvrđuje nedosljednost, štoviše dogovoreni prag prilikom analize pouzdanosti u kineziologiji i sportskoj medicini iznosi 0.80> (Hopkins 2000, Vincent 2005). *Post hoc* analize utvrdile su uniforman slijed porasta u vrijednostima osmolaliteta urina kod obje skupine ispitanika između prvoga i trećeg mjerenja za 11.2±12.8 % ($p<0.001$) kod lakih, i za 19.9±22.7 % ($p<0.001$) kod teških boksača. Prilikom očitovanja specifične težine urina zabilježen je trend, ali ne i značajan porast u vrijednostima kod lakih, a nasuprot tome, kod teških boksača, vrijednosti bilježe porast od 0.5±4 % ($p<0.001$), prateći smjer porasta u vrijednostima osmolaliteta urina. Ipak, opažene razlike u postotku promjene između dva urinarna dehidracijska biomarkera mogu biti pod utjecajem razlika u rasponu vrijednosti na mjernim ljestvicama laboratorijskih i terenskih pretraga koncentriranosti urina. Točnije, (i) veličine promjene za efekt vremena uniformne su kod oba urinarna dehidracijska markera ($\eta^2=0.5$; $\eta^2=0.4$), (ii) visoka je pozitivna korelacija između ranije spomenutih dodatno potvrđena grafičkim Bland-Altman prikazom (detaljnije objašnjenje pogledati u poglavlju Valjanost). U znanstvenoj literaturi općeprihvaćena je činjenica kako značajan porast u očitovanjima koncentriranosti urina zrcali posljedicu ukupnoga deficita vode u tijelu. Ostaje upitno/dvojbeno u kojoj mjeri $U_{OSM}$ predstavlja terenski *zlatni standard* prilikom interpretacije stupnja hidriranosti, postavljen od Fernandez-Eliasa i sur. u studiji iz 2014. godine. Dodatno opravdanje ranije spomenutnom dokumentirano je u studiji Chevronta i sur. (2010) koja je pokazala kako osmolalitet urina doseže najviše koeficijente intraindividualne varijabilnosti (0.49), ali i najveći koeficijent heterogenosti (28.3) u odnosu na sve ostale dehidracijske biološke markere.Usprkos premašenim referentnim vrijednostima hipohidriranosti i trendu porasta urninarnih parametara, mladi boksači uključeni u ovu studiju mogu se smatrati primjereno hidriranim, ponajprije zbog iznimno visokih koeficijenata pouzdanosti u varijablama tjelesne mase i ukupnoga udjela vode u tijelu (Tablica 2), sukladno tvrdnjama Bakera i sur. (2009). Dodatno uporište takvim tvrdnjama predstavlja i stabilan unos makronutrijenata i vode tijekom čitavoga protokola (Tablica 3), sukladan nalazima Reljića i sur. (2015b) kod kontrolne skupine mladih boksača Njemačke u periodu stabilne tjelesne mase, koji navodi konzumaciju od 31±8 $kcal \cdot kg^{-1}$ i 1.8 L vode tokom razdolja stabilnosti u tjelesnoj masi. Stoga, može se zaključiti kako

su drugi faktori primarno odgovorni za iznimnu varijabilnost urinarnih pokazatelja i angažman kompenzacijskoga odgovora bubrežnoga sustava.

Prilikom usporedbe rezultata ove studije sa sličnim istraživanjima bitno je istaknuti da je većina do sada objavljenih studija koristila presječni istraživački nacrt (Fernandez-Elias i sur., 2014; Stuempfe i sur., 2004; Sommerfield i sur., 2016), što dodatno otežava interpretaciju uzročnih mehanizama. Analiza pouzdanosti u ovoj studiji nije korespondentna nalazima studije Hamouti i sur. (2010) koji su prijavili vrijednosti (ICC=0.76 i 0.80 za parametar $S_{TU}$ na uzorku od 22 ragbijaša i atletičara dugoprugaša). U toj studiji autori, prilikom analize pouzdanosti za ponovljena mjerenja, nisu integrirali analizu varijance koja, za razliku od ICC i CV % koeficijenata, prepoznaje sustavnu pogrešku u variranju podataka i može ukazati na postojanje razlika između različitih točki mjerenja (Hopkins, 2000). Takvi bi podatci bili od iznimne važnosti prilikom daljnje interpretacije jer prijavljene vrijednosti ICC koeficijenta gravitiraju donjoj granici pouzdanosti ili je prelaze. Ipak, nužno je razložiti i fiziološke mehanizme kao uzročnike variranja podataka, što doprinosi pojašnjenju razlika između prikupljenih podataka kod dviju studija. Prvo su Hamouti i sur. (2010) prijavili uobičajen trenažni režim kod svojih ispitanika, a boksači su, nasuprot tome, u ovoj studiji bili pod utjecajem dva visoko intenzivna treninga na dan (i. e., sport-specifični boksački treninzi u trajanju od tri sata dnevno u prosjeku). Vjerojatno, uslijed kompenzacijskoga odgovora, vrijednosti koncentracije urina eksponencijalno su porasle. Jedan od mogućih uzročnih mehanizama redistribucije tekućine iz krvne plazme u izvanstanični prostor nastaje u sprezi s povišenim hormonalnim odgovorom uslijed visoko intezivnoga treninga. Drugo, prilikom uzorkovanja urina u šestodnevnoj studiji, Hamouti i sur. (2010) u završnom mjerenju prikupili su 24-h volumen urina, što predstavlja klinički *zlatni standard*. Temeljni je preduvjet takvoga uzorkovanja urina promjena hemodinamičkoga položaja ispitanika, što dovodi do redistribucije tekućina u tijelu i sniženja vrijednosti $S_{TU}$. Takve su hipoteze ranije potvrđene u studijama na sportašima adolescentima (Aranoutas i sur., 2015) i iskusnim triatloncima (Poortsman i sur., 2015). Stoga se raskorak u metodološkom pristupu prilikom uzorkovanju urina ogleda kao bitan preduvjet utvrđenih razlika između prikupljenih podataka. Nemogućnost uzorkovanja 24-h volumena urina nije isključivi nedostatak ove studije, ponajviše zato što u stvarnim natjecateljskim uvjetima uzorkovanja $S_{TU}$ sportaši nisu izloženi vertikalnom položaju tijela, što može dovesti do lažno pozitivnih nalaza. Treće, metabolički zahtjevi olimpijskog boksa oslanjaju se na glikolitičke energetske mehanizme za pokrivanje

energetskih potreba boksača tokom treninga i natjecanja (Chaabène i sur., 2015). Uzimajući u obzir kako je mišićni glikogen temeljni izvor energije tijekom visokog intenzivnog vježbanja (>70 % $VO_2$ max.) ishod ranije navedenog trenažnog opterećenja (~3.5-h boks treninga na dan) rezultira akutnim oscilacijama koncentracije glikogena u skeletnim mišićima. Biopsijski nalaz Ørtenblada i sur. (2011) pokazao je smanjenje u koncentraciji glikogena pohranjenog u triceps brachii mišiću od 31 ± 4 % nakon 1-h *cross-country* skijaškog natjecanja. Stoga, ostaje otvorena mogućnost kako visoko-intenzivan trening može narušiti resintezu mišićnog glikogena tokom noći, ponajprije zbog općeprihvaćene činjenice kako je skladištenje molekula glikogena u mišiću ovisna o balansu i volumenu izvanstanične tekućine (Hall & Guyton, 2010). Takav mehanizma dodatnoga utjecaja intenzivne tjelesne aktivnosti, poput boks treninga, koji dovodi do oscilacije u koncentraciji glikogena, može pridonijeti proizvodnji koncentriranoga urina.

Prikazani podatci u ovoj studiji ne podupiru tvrdnje prethodnih studija koje ukazuju na $S_{TU}$ kao *zlatni standard* terenske procjene stupnja hidiriranosti organizma (Fernandez-Elias i sur., 2014; Petterson i Berg, 2014a). Kao temeljni uzrok raskoraka u rezultatima prijavljenim između studija predstavlja se nedosljednost pristupa ranijih istraživanja koja su iznosila (i) zaključke o metrijskim karakteristikama na terenu, temeljem studija izvedenih u laboratoriju, (ii) koja su zaključke s opće populacije prenosila na specifičnu (sportaše). Kao neizravnu potvrdu ranije spomenutih postulata, studija Hamouti i sur. (2013) istražila je povezanosti $S_{TU}$ i osmolaliteta krvnoga seruma kod dobro utreniranih sportaša tijekom protokola u toplom okruženju koji je rezultirao ~3 % dehidracijom. Autori su ustanovili paralelan porast u vrijednostima $S_{TU}$ s porastom osmolaliteta seruma, kada deficit tjelesne mase premaši 1 % dehidracije i pritom ukazali na $S_{TU}$ superiorni biomarker prilikom detekcije niskih stupnjeva hipohidriranosti u odnosu na osmolalitet seruma. Takve su hipoteze objasnili činjenicom kako obrambeni mehanizmi očuvanja volumena krvne plazme značajno snižavaju osjetljivost osmolaliteta seruma kao *zlatnoga standarda* prilikom detekcije niskih razina hidriranosti organizma. Autori svoje zaključke temelje na nalazima studije Nose i sur. (1988), koja predlaže kako uslijed redistribucije tjelesnih tekućina iz krvne plazme u gastrointestinalni odjeljak putem povećanja hidrostatskoga tlaka dovodi do aktivacije ADH, koji izaziva slijed kompenzacijskih odgovora s ciljem povećanja udjela vode u plazmi. S obzirom na to da osmolalitet seruma može biti pod utjecajem preraspodjele tekućina iz izvanstaničnoga u unutarstanični prostor u sprezi s očuvanjem vode na

uzlaznom kraku Henelove petlje, dijagnostička točnost niskih stupnjeva hipohidriranosti biva narušena.

Povrh toga, studija Singha i sur. (2013) na atletičarima dugoprugašima nije pronašla značajne relacije između hematoloških parametara (osmolalitet seruma, udio hematokrita, hemoglobina, postotak promjene volumena plazme, koncentracije izvanstaničnog $Na^+$) i urinarnih parametara ($S_{TU}$, $U_{OSM}$) korištenih prilikom procjene stupnja hidriranosti organizma. Štoviše, trivijalna je korelacija prijavljena između promjene tjelesne mase (% Δ) i osmolaliteta seruma ($r=0.35$, $p<0.01$). Takvi su nalazi naveli autore na zaključak da općeprihvaćeni analitički biomarkeri stupnja hidriranosti (krvni i urin) pokazuju veliku varijabilnost i nisu dovoljno osjetljivi pri detekciji akutnoga deficita vode u tijelu prilikom mjerenja u stvarnim uvjetima natjecanja. Slične nalaze prijavljuju Arnaoutis i sur. (2015), što dodatno produbljuje problematiku mjerenja i interpretacije ukupnoga deficita vode u tijelu imajući u vidu i rezultate predstavljene studije. Problematika je mjerenja i interpretacije dodatno sažeta u nedavno objavljenom preglednom članku Chevounta i sur. (2015), gdje autori navode kako urinarni indikatori iz malih uzoraka nisu vjerodostojna zamjena 24-h uzorkovanju volumenu urina i nemaju praktičnu valjanost kao pokazatelj stvarnoga deficita vode u tijelu. Zapravo, mogu navesti na krive zaključke zbog upliva remetećih faktora kao što su prehrambene navike, tjelesna aktivnost i drugi faktori. Uzimajući sve navedeno u obzir, uzorkovanje urina tijekom stvarnih, pripremnih ili natjecateljskih uvjeta u odnosu na laboratorijske ostaje otvorena, kontraverzna metodološka problematika.

Utjecaj tjelesnoga vježbanja i sustavnoga treninga na akutni odgovor endokrinoga sustava

U preglednome su članku, autori Hoffman i Maresh (2011) impliciraju nastanak kronične dehidracija kao odgovor organizma na uzastopne treninge prilikom dan-za-dan režima rada, dok se osjećaj žeđi javlja tek pri akutnom pomanjkanju tekućine u tijelu (2 %>) što dovodi tijelo sportaša u stanje blage hipohidranosti (Adolph, 1947). Dodatno uporište takvim tvrdnjama predstavlja nedavno objavljena studija Pettersona i Berga (2014a) koji su dokumentirali kako švedski olimpijci u borilačkim sportovima imaju kronično nizak unos markonutrijenata i vode u natjecateljskom periodu. Stoga, gustoća trenažanih operatera u kombinaciji s neadekvatnim unosom vode predstavlja jedan od faktora koji mogu doprinijeti razvoju visokoga stupnja

hipohidrianosti organizma. Brojni su autori (Gleim, 2000; Mahugan i sur., 2007; Hamouti i sur., 2013) indirektno pokazali relaciju intenzivnoga tjelesnog vježbanja i kompenzacijskoga odgovora bubrežnoga sustava koji pritom koncentrira urin neovisno o stupnju hidriranosti. Takav ishod može dovesti do lažno pozitivnih nalaza prilikom detekcije stupnja hidriranosti organizma poput rezultata u predstavljenoj studiji (Tablice 2 i 4, Graf 1 i 2). Nadalje, predstavljeni se nalazi uklapaju u okvir paradigme koja ističe kako vrijednosti dehidracijskih biomakera mogu pokazati trend porasta zbog akutnoga odgovora bubrežnoga sustava na intenzivno vježbanje (Gleim i sur., 2000; Hamouti i sur., 2013; Maughan i Galloway, 2000, Mountain i sur., 1997).

Ranije spomenuta studija Hamoutija i sur. (2013) neizravno je potvrdila ovu hipotezu demonstrirajući mehanizam porasta u vrijednostima $S_{TU}$ kao funkciju akutnoga odgovora bubrežnoga sustava na vježbanje zbog činjenice da se urea nastavila koncentrirati paralelno sa $S_{TU}$ vrijednostima (do 520 mmol•$L^{-1}$) čak jedanaest sati nakon vježbanja, čime je demonstriran mehanizam dodatnoga utjecaja intenzivne tjelesne aktivnosti na ishod proizvodnje koncentriranoga urina, čak i kada su tjelesne tekućine nadomještene. Štoviše, autori ističu porast u vrijednostima $S_{TU}$ kao funkciju rane aktivacije bubrežnoga sustava temeljem vazokonstrikcije aferentne arteriole što inklinira očuvanje vode i reapsorpciju natrija. Predstavljeni fiziološki mehanizmi ogledaju se kao jako uporište nalazima ove studije u kontekstu porasta koncentriranosti urina usprkos stabilnoj tjelesnoj masi. Zapravo, navedene su tvrdnje Hamoutija sukladne sintezi informacija predstavljenih u preglednom članku Mahugana i sur. (2007), koji navode da je povećanje osmolalieta izvanstanične tekućine djelomično pod utjecajem intenzivnoga vježbanja.

Doista, visoko intenzivno vježbanje izaziva upliv metaboličkih procesa anaerobne glikolize koja može rezultirati povišenjem osmolaliteta aktivnih mišića, ponajprije zbog nakupljanja metaboličkih nusprodukata uslijed prelaska laktatnoga praga (Maughan i sur., 2007). Prema Maughanu i Gallowayu (2000), vježbanje na ~70 % od $Vo_2max$ izaziva redukciju u tjelesnoj masi ~1.2 - 1.5 %, što dovodi do visoke analitičke varijablinosti u vrijednostima osmolaliteta seruma 5-10 mOsmol•$L^{-1}$. Takve su promjene u osmolalitetu seruma puferirane i dovode do većih oscilacija u osmolalitetu urina putem rane aktivacije bubrega, koji su iznimno osjetljivi na prisutnost AVP-a, gdje pri povećanju u osmolalitetu krvnoga seruma ~5-10 mOsmol•$kg^{-1}$ može dovesti do povećanja osmolaliteta urina do ~90 mOsmol•$kg^{-1}$ (Cheuvront i Kenefick, 2014). Stoga je djelomično objašnjenje linearnoga porasta u osmolalitetu urina kod ispitanika ove studije

moguće predstaviti činjenicom da su tijekom provedbe istraživanja sportaši bili angažirani u dva visoko intenzivna treninga, ~1.5 sat svaki dan, što je izazvalo akutne oscilacije u tjelesnoj masi i uzrokovalo slijed ranije objašnjenih mehanizama. U prilog predstavljenim pojašnjenjima ide studija Gleima (2000) koja je pokazala na uzorku dobro utreniranih sportaša kako protok krvi u bubreg tijekom treninga biva reduciran ~30–40 % te dovodi do akutne supresije sposobnosti bubrežnoga sustava da koncentrira urin. Nasuprot tome, uzorci su urina u ovoj studiji prikupljeni deset sati nakon prethodnoga treninga, pa ostaje mogućnost da je zamjenski mehanizam bubrežne funkcije (i. e. autoregulacija MGF) potaknuo očuvanje vode u tijelu u sprezi s djelovanjem antidiuretskoga hormona te koncentrirao urin blizu fizioloških granica (u prosjeku za obje skupine, pri trećem mjerenju 1236±91 $mOsmol \cdot kg^{-1}$), neovisno o stvarnom stupnju hidriranosti organizma. Autori Poortmans i Vanderstraeten (1994) dokumentirali su kako visoko intenzivan trening potiče supresiju stope MGF-a putem razlike u transkapilarnom hidrostatskom tlaku, što rezultira povećanjem prisutnosti metabolita (albunima, kreatinina, ureje) u urinu i utječe na metrijske karakteristike urinarnih indikatora putem povišene koncentracije otopljenih čestica neovisno u stupnju hidriranosti organizma. Ove su tvrdnje neizravno potvrđene laboratorijskom studijom Montaina i sur. (1997) gdje autori navode izravnu vezu odgovora endokrinoga sustava (putem povišene koncentracije aldosterona i AVP-a) na visoko intenzivno vježbanje u toplom okruženju. U novoj studiji Poortmansa i sur. (2015) dokumentirano je kako raznovrsnost u tipu tjelesne aktivnosti može utjecati na propusnosti glomerularne membrane i eliminaciju nusprodukata tijekom natjecanja u triatlonu. Nedvojbeno, daljnja istraživanja trebaju imati u vidu kako akutne promjene u položaju tijela (i posljedičnoj hemodinamici tekućina) mogu izazvati značajne promjene u funkciji bubrega, što predstavlja preduvjet opaženih razlika između rezultata različitih studija (primjerice studija Hamoutia i sur., 2010; Poortsman i sur., 2015). Zaključke studije Poortmansa i sur. (2015) treba razmatrati s oprezom zbog maloga broja ispitanika (n=7) i nedostatka kontrolne skupine ispitanika.

Akutne i kronične promjene stupnja hidriranosti organizma

U dobro kontroliranim laboratorijskim uvjetima, $S_{TU}$ se ogleda kao primjeren dijagnostički alat pri detekciji hipohidriranosti kod sportaša. Ranije spomenuta studija Hamoutija i sur. (2013) istražila je vezu između $S_{TU}$ i osmolaliteta urina kod dobro utreniranih sportaša koji

su, vježbajući u toplom okruženju, dosegli redukciju tjelesne mase od ~3 %. U zaključku, Hamouti i sur. (2013) iznose tvrdnju da su vrijednosti $S_{TU}$ superioran pokazatelj stupnja hidriranosti organizma u odnosu na krvni serum, prilikom detekcije niskih razina deficita vode u tijelu (1–3 %), ponajprije zbog aktivacije obrambenih mehanizama i kompenzacijskoga odgovora nadzornoga endokrinog sustava na pomanjkanje vode i volumen krvne plazme. Korištenjem sličnoga metodološkog pristupa na uzorku NCAA hrvača studija Bartoka i sur. (2004) potvrdila je referentne vrijednosti $S_{TU}$ postavljene od NCAA komisije (1.020 g•mL$^{-1}$), pritom pokazavši visoke koeficijente osjetljivosti 96 %, specifičnosti 87 % i 91 % za svaku različitu tehniku procjene stupnja hidriranosti putem krvi i urina. Druga studija Popowskoga i sur. (2001) opisala je $S_{TU}$ kao primjeren dijagnostički alat za detekciju ukupnoga deficita u tijelu sportaša, iako nasuprot tvrdnjama Hamoutija i sur. (2013), nalaz Popowskoga i sur. (2001) ističe kako je sposobnost bubrežnoga sustava da proizvede koncentriran urin inertan proces i ne odgovara dovoljno brzo i precizno kao porast osmolaliteta seruma prilikom procjene ukupnoga deficita vode u tijelu. Prema Poortmansu i Vanderstraetenu (1994), promjene u osmolalnosti krvnoga seruma stimuliraju odgovor endokrine regulacije i reapsorpcije vode i elektrolita u sabirnim kanalićima bubrega, stoga ne odgovaraju na deficit vode jednakom brzinom kao krv prilikom akutnih oscilacija ukupnoga udjela vode u tijelu. Istraživanje Uttera i sur. (2012) izvedeno na 56 NCAA hrvača, predlaže $S_{TU}$ kao primjeren pokazatelj akutnih promjena u stupnju hidriranosti organizma pri detekciji ukupnoga deficit u tjelesnoj tekućini uslijed dvosatnoga agresivnog protokola redukcije tjelesne mase kod natjecatelja u NCAA hrvanju. Slični su rezultati prikupljeni u nedavno završenoj studiji u laboratoriju za primijenjenu kineziologiju Sveučilista Primorska gdje su dobro utrenirani boksači prilikom randomiziranoga *cross-over* nacrta bili izloženi dvosatnom protokolu pasivnoga zagrijavanja uslijed kojega vrijednosti $S_{TU}$ značajno rastu za 0.4 % ($p<0.001$) paralelno s deficitom tjelesne mase od 1 %, a pritom nisu promotrene promjene u hematološkom odgovoru, ni u koncentraciji elektrolita (Zubac i sur., 2016b). Stoga autori zaključuju kako (i) različitost u metodološkom pristupu predstavlja temelj problematike mjerenja i interpretacije stupnja hidriranosti organizma kod sportaša, točnije prilikom detekcije nižih vrijednosti ukupnoga deficita vode u tijelu $S_{TU}$ se smatra primjerenim dijagnostičkim alatom sukladno nalazima studija Nosea i sur. (1988) i Hamoutia i sur. (2013).

Nasuprot tome, brojne studije u kojima su uzorci urina ili krvi prikupljeni u stvarnim uvjetima (eng. *real-life settings*) (Arnaoutis i sur., 2015; Oppinger i sur., 2005; Reljić i sur., 2015; Rivera-

Brown i sur., 2012; Singh i sur., 2013; Sommersfiled i sur., 2016, Zubac i sur., 2015b) pokazali su veliku varijablinost, nisku osjetljivost i nedosljednost prilikom procjene deficita vode u tijelu. Točnije, Arnaoutis i sur. (2015) kategoriziraju ~90 % sportaša adolescenata iz različitih sportova kao hipohidirane unatoč trivijalnim vrijednostima zajedničke varijance između povišenih vrijednosti $S_{TU}$ i postotka promjene u tjelesnoj masi ($R^2$=0.1). Slične je nalaze iznijela nedavna longitudinalna studija (eng. *follow-up*) na vrhunskim kickboksačima Hrvatske (Zubac i sur., 2015b). Oppinger i sur. (2005) prijavljuju 37 % lažno pozitivnih nalaza $S_{TU}$ na uzorku sveučilišnih hrvača, a studija Reljića i sur. (2015) ukazuje na trend porasta u vrijednosti $S_{TU}$ (dosegnute vrijednosti od 1.025 g•mL$^{-1}$) kod kontrolne skupine vrhunskih njemačkih boraca unatoč očuvanju volumena tjelesnih tekućina, volumena plazme i $T_M$ tijekom jednomjesečnoga eksperimentalnog protokola. Rivera-Brown i sur. (2012) prijavljuju univerzalno visoku stopu hipohidriranosti od 89 % temeljem nalaza $S_{TU}$ koji premašuju ACSM smjernice (i. e. $S_{TU}$>1.020 g•mL$^{-1}$). Osim velike varijabilnosti u vrijednostima urinarnih dehidracijskih markera, Singh i sur. (2013) navode nisku povezanost između hematoloških i urinarnih parametara kod procjene stupnja hidriranosti, ali i trivijalnu korelaciju između promjene tjelesne mase (% Δ) i osmolaliteta seruma (R=0.35, p<0.01), stoga je izgledno kako općeprihvaćeni analitički dehidracijski biomarkeri (krvni i urin) nisu primjereni pokazatelji akutnoga deficita vode u tijelu kod presječnih terenskih studija. Takvi su nalazi sukladni rezultatima predstavljene studije (Tablice 2 i 4, Graf 1 i 2). Stoga, povišene vrijednosti urinarnih pokazatelja stupnja hidriranosti mogu ukazati na spregu drugih fizioloških stanja (poput povećanoga mišićnog katabolizma), neovisno o stvarnom stupnju hidriranosti organizma. Slične su tvrdnje dodatno sažete u radu Cheuvronta i sur. (2014) koji otvoreno kritiziraju uporabu terenskih i laboratorijskih nalaza urina iz malih uzoraka s ciljem interpretacije stvarnoga deficita vode u tijelu, ponajviše zbog upliva remetećih faktora poput treninga, vježbanja ili načina prehrane. Izgledno je da različitost mehanizama putem kojih se ostvaruje koncentracija urina doprinosi produbljenju problematike mjerenja i interpretacije stupnja hidriranosti (Dijagram 1-3).

Sukladno ranije navedenom, švedski su autori nedavnom studijom ukazali na neprimjerene prehrambene navike s ciljem očuvanja natjecateljske tjelesne mase kod nacionalnih olimpijaca u različitim borilačkim sportovima. Također, prijavili su visoku stopu hipohidriranosti (89 %), unatoč *ad libitum* unosu vode i produženom vremenu oporavka između vage i natjecanja, što je navelo autore na zaključak da službeno vaganje nije primjeren preventivni mehanizam. Ovakva

interpretacija stupnja hidriranosti organizma, utemeljena na nalazu $S_{TU,}$ mjerenom u jednoj vremenskoj točki, nalazi uporište u teoriji Costilla (1973) o fiziološkim barijerama prilikom zadržavanja vode u tijelu u sprezi s kratkim vremenom oporavka, što vjerojatno sprječava primjerenu rehidraciju tijela, koja je usko povezana s očitovanjima koncentriranoga urina putem $S_{TU}$, neovisno o vremenu uzorkovanja. No, ranije navedeno istraživanje u velikoj mjeri prenaglasilo je ulogu povišenih očitovanja $S_{TU}$ u kontekstu mjerenja stvarnih oscilacija i deficita vode. Stoga, samostalna procjena, izvedena u jednoj vremenskoj točki, uporabom presječnih studija navodi autora ove studije na zaključak kako analiza $S_{TU}$ nije primjeren alat za detekciju kroničnoga deficita vode, nasuprot tvrdnjama Pettersona i Berga. Prema dostupnim znanstvenim dokazima, interpretacija nalaza $S_{TU}$ primjerenije karakterizira akutni (Utter i sur., 2012; Hamouti i sur., 2013; Zubac i sur., 2016b), prije nego kronični deficit vode u laboratorijskim uvjetima. Bitno je istaknuti kako u kontekstu borilačkih ili drugih kontaktnih sportova ostaje otvorena mogućnost da povišene vrijednosti urinarnih indikatora mogu djelomično zrcaliti posljedice mehaničkog kontakt prilikom treninga i natjecanja. Ova je teorija prvi put u literaturi predstavljena od Hamoutija i sur. (2010). Autori su pretpostavili kako razlike između ragbijaša i atletičara dugoprugaša u varijabli $S_{TU}$ opstaju kao posljedica mehaničkoga kontakta što ima za posljedicu snižene MGF u sprezi s povećanom koncentracijom metabolita u urinu. Nedvojbeno, većina dosadašnjih studija previdjela je ovakav ishod, stoga generalni utjecaj udaraca u tijelo u kontekstu lažno pozitivnih nalaza stupnja hidriranosti organizma ostaje neistražen.

Velika varijabilnost i uniforman trend porasta urinarnih indikatora usprkos stabilnosti u tjelesnoj masi i primjerenom unosu markonutrijenata i vode dodatno produbljuje znanstvenu raspravu o praktičnoj primjenjivosti urinarnih pokazatelja ukupnoga deficita vode u tijelu. U sportskoj znanosti, kineziologiji i sportskoj medicini analiza se pouzdanosti smatra temeljem rasprave o valjanosti, stoga ostaje otvoreno pitanje u kojoj mjeri $U_{OSM}$ predstavlja valjan dijagnostički *zlatni standard* prilikom detekcije hipohidriranosti organizma, u tom kontekstu ranije predstavljen Fernandez-Elias i sur. (2014). Nedvojbeno, blizu fiziološke vrijednosti koncentracije urina navode na zaključak da bubrežni sustav radi iznimne napore s ciljem očuvanja homeostaze, ali definiranje uzročnih mehanizama nije u potpunosti razjašnjeno i ostaje predmet rasprave u znanstvenoj literaturi.

# Valjanost

Rezultati predstavljene studije ističu kako konkurentna valjanost (korelacijska analiza) ni individualno slaganje prilikom usporedbe višekratnih pokazatelja stupnja hidriranosti (Bland-Altman, Graf 6) nisu potvrdili osmolalitet urina kao *zlatni standard*, prethodno naveden u literaturi (Fernandez-Elias i sur., 2014), prilikom mjerenja ukupnoga deficita vode u tijelu. Ipak, neovisno o uniformno visokoj dan-za-dan varijabilnosti, visoka je pozitivna korelacija između prosječnih vrijednosti urinarnih (terenskih i laboratorijskih) pokazatelja stupnja hidiriranosti organizma opažena (Graf 6), te dodatno potvrđena nalazom ROC krivulje (Graf 7). Nasuprot tome, niski koeficijenti korelacije i visoka varijabilnost i heterogenost prosječnih vrijednosti prikazanih na Grafu Bland-Altman opaženi su prilikom usporedbe ukupnoga udjela vode u tijelu i uzoraka urina. Uz sve ranije navedeno, bitno je naglasiti kako su prilikom prikupljanja podataka strogo praćeni ranije postavljeni protokoli (Fernandez-Elias i sur., 2014) koji su također iznosili zaključke o valjanosti temeljem analize povezanosti višekratnih pokazatelja stupnja hidriranosti.

## Konkurentna valjanost

Fernandez-Elias i sur. (2014) prethodno su predložili $U_{OSM}$ kao isključivi *zlatni standard*, validan dehidracijski biomarker u borilačkim sportovima prilikom usporedbe s ostalim neinvazivnim pokazateljima stupnja hidriranosti (uključujći i BIA-u). Povrh ranije navedenog, temeljem visoke pozitivne korelacije između $S_{TU}$ i $U_{OSM}$ ($r=0.89$, $p<0.01$) na uzorku 345 španjolskih natjecatelja u olimpijskim borilačkim sportovima, autori predlažu $S_{TU}$ kao valjan terenski biomarker, sposoban diskriminirati različite stupnjeve hidriranosti organizma. Ipak, važno je dodati kako u ranije navedenom članku linearna povezanost između urinarnih pokazatelja (laboratoriji i teren) kod najdehidriranije skupine ispitanika nije bila usko korelirana ($r=0.61$), kao kod umjereno ili blago dehidriranih ispitanika. Nasuprot tome, kod ispitanika u ovoj studiji opažen je znatno viši koeficijent korelacije ($r=0.87$, $p<0.001$) unatoč uniformno premašenim referentnim vrijednostima koncentriranosti urina postavljenima od ACSM-a. Navedena je hipoteza dodatno potvrđena visokim intervalom pouzdanosti korelacijskoga nacrta (±95 % IP; 0.72–0.93). Stoga, raskorak između prikazanih podataka ove studije u odnosu na studiju španjolskih autora ogleda se u vjerojatnom utjecaju/prisutnosti metabolita u urinu,

nastalih uslijed sprege visokointenzivnih treninga i nagle redukcije tjelesne mase tijekom pripremnoga prednatjecateljskog perioda. Ipak, studija španjolskih autora nije mjerila koncentraciju ukupnih proteina u urinu, stoga ove tvrdnje traže daljnju znanstvenu verifikaciju. Nasuprot ranije navedenom, Oppinger i sur. (2005) otvoreno kritiziraju terensku procjenu stupnja hidiriranosti organizma putem $S_{TU}$, zbog 37 % lažno pozitivnih nalaza u grupi od 51 hrvača testiranoga prije redovitoga treninga. Ipak, studija Oppinger nije uzela u obzir prethodni utjecaj unosa suplemenata od ispitanika što je potvrđeno kao važan metodološki preduvjet stvarne procjene stupnja hidriranosti organizma (Fernandez-Elias i sur., 2014). Stoga, ranije naveden zaključak Fernandez-Eliasa i sur. (2014) definira metodološki pristup korišten u studiji Oppingera kao neprimjeren, ali i generalan uzrok visoke stope lažno pozitivnih nalaza $S_{TU}$ u toj studiji. Neosporno, sve ranije spomenute studije utemeljile su svoje zaključke na podatcima prikupljenim u presječnim istraživačkim nacrtima, najčešće na dan natjecanja kada je tjelesna masa najmanje stabilna i dvojbeno je iznijeti primjerene zaključke glede parcijalnih utjecaja prethodnoga trenažnog procesa i sprege stvarnoga deficita vode na učestalost lažno pozitivnih nalaza $S_{TU}$. Ostaje otvorena mogućnost kako se i laboratorijski nalaz visoke koncentracije urina ($U_{OSM}$) može ostvariti putem drugih mehanizama, neovisno o isključivom deficitu vode. Upitno je u kojoj mjeri uzorkovanje urina u jednoj vremenskoj točki (terenski i laboratorijski nalazi), primjerice kod presječnih studija, vjerodostojno predstavlja stvarni deficit vode u tijelu prilikom prikupljanja bioloških uzoraka u terenskim uvjetima ili prilikom simulacije uzoraka.

Nasuprot visokoj povezanosti urinarnih biomarkera, njihova relacija s ukupnim udjelom vode u tijelu sportaša ovoj studiji pokazala se kao niska i trivijalna (Graf 4 i Graf 5). U prilog ranije navedenom ide i odnos Z-vrijednosti oba urinarna indikatora i udjela vode u tijelu, grafički predstavljen kao iznimno varijabilan i heterogen (±Sd standardne pogreške 1.37 i 1.51, pojedinačno). Ovaj je nalaz sukladan ranijim istraživanjima (Fernandez-Elias i sur., 2014; Zubac i sur., 2015a), ali različit od nalaza studije (Reljića i sur., 2013-2015; Uttera i sur., 2012). Interpretacija raskoraka u prikupljenim podatcima između studija ogleda se prije svega u prizmi različitosti u metodološkom pristupu i uporabi različitih uređaja prilikom procjene udjela vode u tijelu. Primjerice, Utter i sur. (2012), tijekom protokola akutne dehidracije i rehidracije u periodu od dva sata, mjerenjem u četiri vremenske točke neosporno pokazuju kako prilikom 3 % redukcije $T_M$, multifrekvencijska BIA paralelno prati trend povišenja vrijednosti osmolaliteta krvi, urina i specifične težine urina, a (Fernandez-Elias i sur., 2014; Zubac i sur., 2015)

presječnim mjerenjma utvđuju raskorak u relaciji BIA mjerenja prilikom usporedbe s vrijednostima uzorka urina. Štoviše, ove presječne studije koriste jednofrekvencijski BIA uređaj koji Cheuvront i Kenefick (2014) u preglednom članku definiraju kao metodološki limitiran zbog nemogućnosti mjerenja volumena unutarstanične tekućine, što je vjerojatni razlog nedosljednosti u rezultatima primijenjenih studija. Prethodno navedena longitudinalna studija na vrhunskim kickboksačima Hrvatske utvrdila je samo 10 % zajedničke varijance između promjene u tjelesnoj masi i udjelu vode procijenjene jednofrekvencijskom BIA-om (Zubac i sur., 2015b). Nasuprot tome, korištenjem BIA-e s pripadajućim softverskim rješenjem pokazuje vektorski odmak prilikom redukcije tjelesne mase kod mjerenja u tri vremenske točke (Reljić i sur., 2013) i neosporno prati trend deficita u volumenu tjelesnih tekućina paralelno s redukcijom u volumenu krvne plazme i tjelesne mase kod eksperimentalne skupine mladih boksača Njemačke. Bitno je istaknuti kako različitost u hemodinamičkom položaju ispitanika uslijed procjene udjela vode (ležeći položaj tijela, Reljić i sur., 2013; Zubac i sur., 2015a; nasuprot stojećem položaju Ferndandez-Elias i sur., 2014; Utter i sur., 2012) dodatno otežava usporedbu rezultata različitih studija.

Osim razlika nastalih uslijed različitih karakteristika korištenih uređaja i tjelesne posture, nužno je razmotriti i fiziološke osnove utvrđenih razlika. Točnije, bilo kakav pokušaj uspostavljanja relacija između različitih neinvazivnih pokazatelja stupnja hidriranosti ostaje u okviru integriranoga odgovora združenih regulacijskih mehanizama prvotno predloženih u literaturi (Hall i Guyton, 2010; Armstrong, 2007). Drugim riječima, regulacija je osmolaliteta izvanstanične tekućine u određenoj mjeri neovisna o regulaciji ukupnoga udjela vode (i.e., različit regulacijski neuroendokrini mehanizam). Neizbježno, dijagnostički točni i univerzalno prihvaćeni neinvazivni dehidracijski markeri koji odražavaju izravan deficit vode u tijelu ostaju nedostižni *zlatni standard* sukladno postulatu Armstronga (2007). Nedvojbeno, ukupan udio vode u tijelu procijenjen jednofrekvencijskom BIA-om predstavlja nepotpunu sliku prilikom pokušaja karakteriziranja ukupnoga udjela tjelesnih tekućina. Raskorak u analizi slaganja višekratnih neinvazivnih pokazatelja stupnja hidriranosti prikazan na Bland-Altman grafu dodatno opravdava teoriju Armstronga (2007) i negira uvriježenu teoriju kako osmolalitet urina predstavlja *zlatni standard* detekcije deficita vode u tijelu. Stoga je, unatoč temeljnoj uniformnosti združenoga mehanizma prilikom regulacije balansa tjelesnih tekućina, ishod mjerenja donekle neovisan, što

je sukladno nalazima ove i prethodnih studija. Dakle, generalna preporuka mjerenja stupnja hidriranosti ipak gravitira k integriranoj procjeni oba mehanizma simultano.

## Dijagnostička točnost

Iako analiza pouzdanosti urinarnih indikatora ističe visoku dan-za-dan varijabilnost, (ali i izvrsnu pouzdanost prilikom analize stabilnosti tjelesne mase i procjene udjela vode u tijelu), ROC krivulja prikazuje gotovo identičan ishod vrijednosti za oba urinarna indikatora ($A_{UC}$=0.95, $p<0.01$; Graf 7). Nalazi ove studije nedvojbeno podupiru nedavne tvrdnje Fernandez-Elias i sur. (2014) koji proglašavaju $S_{TU}$ kao dijagnostički točan pokazatelj stupnja hididranosti prilikom usporedbe s osmolalitetom urina uz određena ograničenja prilikom interpretacije prikupljenih podataka. Točnije, ranije navedena studija španjolskih autora nije utvrdila pouzdanost urinarnih parametara na istom uzorku ispitanika iz koje je izvela zaključke o valjanosti. Iako terenski i laboratorijski nalazi urina, prema svim statističkim postupcima prikazanim u ovoj studiji ukazuju na gotovo identičan ishod, neosporno je kako se njihove interpretacije ne uklapaju u kontekst ukupnoga deficita vode u tijelu. Predstavljeni podatci nisu sukladni podatcima objavljenim u studijama Arnaoutas i sur. (2015) i Sommersfield i sur. (2016) koji su kritizirali procjenu stupnja hidriranosti putem $S_{TU}$ zbog univerzalno visoke stope lažno pozitivnih nalaza. Točnije, obje su studije koristile osmolalitet seruma kao kriterij referentne točke, a predstavljena je studija slijedila protokole ustanovljene u studiji (Fernandez-Elias i sur., 2014) postavljanjem vrijednosti osmolaliteta urina kao referentne točke predstavljenih ishoda. Podatci prethodnih studija (ranije razjašnjeni u poglavlju Pouzdanost) pokazali su kako osmolalitet seruma pri detekciji hipohidriranosti organizma može biti pod utjecajem redistribucije tekućine iz izvanstaničnoga prostora u sprezi s očuvanjem vode na uzlaznom kraku Henelove petlje. Ovaj obrambeni mehanizam, s ciljem očuvanja volumena plazme snižava osjetljivost osmolaliteta seruma prilikom detekcije niskih razina hipohidriranosti (~2–3 %) i predstavlja $S_{TU}$ kao primjereniji pokazatelj stupnja hidriranosti (Hamouti i sur., 2013). Stoga, prikazane razlike, nastale uslijed djelovanja nadzornih mehanizama, preduvjet su razlika u prikazanim statističko-analitičkim metodama predstavljenim u studiji (visoka osjetljivost i specifičnost od 93 % i 87 %) u odnosu na studije Oppingera i sur. (2005), ali i Sommersfiled i sur. (2016) koji prijavljuju nisku specifičnost

testa $S_{TU}$ u odnosu na osmolalitet seruma (u rasponu 10 % - 40 %). Kao što je i ranije spomenuto, studija Oppingera i sur. (2005) nije isključila ispitanike koji su konzumirali dodatke prehrani na svakodnevnoj osnovi, što se i ogleda kao propust u metodološkim postavkama mjerenja i interpretacije stupnja hidriranosti organizma (Fernandez-Elias i sur., 2014; Sawka i sur., 2007). Primjerice, Fernandez-Elias i sur. (2014) isključili su 12 ispitanika iz daljnjega protokola testiranja jer su prijavili uporabu prehrambenih suplemenata koji zasigurno mogu utjecati na dijagnostičku točnost uzorka urina (Martin i sur., 2006). Takav je pristup protivan trenutačnim standardima i smjernicama testiranja stupnja hidriranosti organizma (ACSM; Sawka i sur., 2007). Kao bitna metodološka postavka ranije navedenih studija ogleda se činjenica kako su prethodne studije u određenoj mjeri previdjele utjecaj visokointezivnih treninga i upliva anaerobnoga metabolizma na izvedene zaključke i generalizirale temeljem prikupljenih parametara u kontekstu relavantnosti uloge aktivnosti/sposobnosti bubrega da koncentrira urin uslijed navodnoga deficita vode. Sukladno trenutačnim smjernicama za detekciju hipohidriranosti organizma kod sportaša, analiza ROC krivulje klasificirala je 64.2 % mladih boksača kao iznimno hipohidrirane ($S_{TU}$ vrijednosti >1.030 $g \bullet mL^{-1}$) tijekom razdoblja stabilnosti u tjelesnoj masi. Unatoč gotovo identičnom ishodu terenskih i laboratorijskih analiza prilikom procjene stupnja hidriranosti organizma, interpretacija povišenih vrijednosti koncentracije urina može navesti na krive zaključke i ostaje kontraverzna problematika sportske zajednice.

Remeteći faktori preciznosti u procjeni stupnja hidriranosti organizma

Prema našim trenutačnim spoznajama, ovo je bila prva studija koje je analizirala (i) sadržaj ukupnih proteina u malim uzorcima urina, (ii) utjecaj ukupnih proteina u urinu na dijagnostičku točnost $S_{TU}$ i $U_{OSM}$ na uzorku vrhunskih natjecatelja u nekom od olimpijskih borilačkih sportova. Takva analiza može predstavljati ključan čimbenik prilikom karakteriziranja analitičke pouzdanosti i točnosti urinarnih pokazatelja hidriranosti organizma. Freidman ANOVA-test pokazuje porast od ~30 % između prvoga i trećeg mjerenja ($p<0.01$) u koncentraciji $U_P$, kod teških boksača što govori o niskoj dan-za-dan pouzdanosti proteina u urinu iz maloga uzorka. Predstavljeni nalaz je sukladan trendu promjena kod osmolaliteta i specifične težine urina. Nasuprot tome, ova studija bilježi relativno nizak broj lažno pozitivnih nalaza, od svega 7

%, a jednak je broj frekvencija stvarno pozitivnih i stvarno negativnih ishoda potvrđen hi-kvadrat testom (Tablica 4). Hamouti i sur. (2010) također su prijavili nizak broj lažno pozitivnih nalaza u svojoj studiji (8 %), ali i utvrdili visoku pozitivnu korelaciju između $S_{TU}$ i koncentracije metabolita u urinu ($R=0.92$, $p<0.001$) na uzorku trkača i ragbijaša. Suprotno ranije spomenutoj visokoj pozitivnoj korelaciji, naša studija nije utvrdila značajnu povezanost ukupnih proteina u urinu i $U_{OSM}$ ili $S_{TU}$ (Grafovi 5 i 6). Kao glavnu determinantu razlika moguće je navesti činjenicu kako je studija Hamoutija prikupila 24-h volumen urina, a predstavljena studija analizirala je ukupne proteine u urinu iz maloga uzorka, sukladno preporukama Dihaz i Mullera (2007), ali i slijedeći protokole druge studije Hamoutija i sur. (2013). Stoga je veoma izgledno kako unutarnja valjanost (eng. *intra-assay*) analize urinarnih metabolita iz maloga uzorka nema dovoljnu snagu i osjetljivost kao 24-h protokoli prikupljanja podataka, osobito kod iznimno hipohidriranih ispitanika, poput ispitanika ove studije. Poortmans i Vanderstraeten (1994) dokumentirali su kako visoko intenzivan trening omogućava smanjenje MGF-a dovodeći do povišene koncentracije urinarnih metabolita, pritom otežavajući detekciju stvarnoga stupnja hidriranosti organizma, neovisno o deficitu vode u tijelu. Povrh svega navedenoga, studija Hamoutija i sur. (2010) otvara mogućnost upliva visoko inteznivnoga treninga u prednatjecateljskom režimu rada na povećanje metabolita u urinu kao posljedice povišenoga mišićnog katabolizma, sukladno i ranijim nalazima (Poortmans J., 1988). Zaključno, temeljem predstavljenih podataka potrebno je dodatno istražiti unutarnju valjanost analize proteina iz malih uzoraka urina i pritom osigurati valjanost i unutarnju kontrolu eksperimenta u stvarnim uvjetima treninga i natjecanja.

Utjecaj mišićne mase na dijagnostičku točnost dehidracijskih biomarkera urina

Sugestijom Hamoutija i suradnika (2010), boksači su u ovom istraživanju bili podijeljeni u dvije različite grupe, temeljem razlika u antropometrijskim karakteristikama (laki i teški) kako bi se ispitao utjecaj povišene mišićne mase na vrijednosti očitovanja $S_{TU}$. Suprotno nalasku i postavkama Hamoutija, ova studija nije utvrdila relacije između ranije navedenih varijabli (Grafovi 3 i 4), usprkos značajnim razlikama u antropometrijskim karakteristikama (Tablica 1). Boksači u ovoj studiji nisu pokušavali povećati mišićnu masu prethodno izvedbi ove studije, a studija Hamoutija nije prijavila metodologiju treninga kod njihovih ispitanika. Ipak, naša je pilot

studija procjene stupnja hidriranosti putem $S_{TU}$ kod vrhunskih mladih boksača Europe pokazala raznolikost između tri različite težinske kategorije u stupnju koncentriranosti urinarnih parametara putem analize $S_{TU}$ (i. e., lakši su boksači imali značajno višu koncentraciju urina prilikom usporedbe s težima) tijekom priprema za Svjetsko juniorsko prvenstvo, što indirektno podupire nalaze ove studije. Stoga, relacija povećane mišićne mase i povišenih vrijednosti $S_{TU}$ treba dodatnu verifikaciju, korištenjem boljih dijagnostičkih alata poput DEX-e, prilikom procjene stvarnih udjela mišićne mase kod različitih sportaša.

## Stopa hipohidriranosti organizma

Univerzalno visoka stopa hipohidriranosti zabilježena je u ovoj studiji unatoč stabilnoj tjelesnoj masi tijekom preliminarnoga, ali i glavnoga djela studije (ICC=0.99; CV<1 %) i primjerenom unosu makronutrijenata i vode (Tablica 3). Točnije, Reljić i sur. prijavili su, na uzorku vrhunskih mladih boksača Njemačke (kontrolna skupina), unos makronutrijenata ukupne energetske vrijednosti od 31±8 kcal•kg$^{-1}$ prije natjecanja, a ova je studija promotrila slične vrijednosti od 35±4 kcal•kg$^{-1}$. Međutim, unos je vode u ovoj studiji bio značajno veći (~3.0 L) nego kod njemačkih boksača (1.8 L). Takvi podatci dodatno potvrđuju stabilnost u tjelesnoj masi ispitanika u predstavljenoj studiji, ali i demonstriraju kronično nizak unos makronutrijenata (Tablica 3), čak i tijekom perioda stabilne tjelesne mase. Prema podatcima anamnestičkoga upitnika, ispitanici nisu sudjelovali u protokolima redukcije tjelesne mase najmanje tri tjedna pred izvedbu ove studije, no prosječne su vrijednosti kod urinarnih pokazatelja premašile postavljene referentne vrijednosti ACMS-a ($S_{TU}$=1.028±0.003 g•mL$^{-1}$, $U_{OSM}$=1036±158 mOsmol•kg$^{-1}$). Prema svemu navedenom, čini se kako univerzalno visoka stopa hipohidriranosti opažena u ovoj studiji ne potječe isključivo iz ukupnoga deficita vode u tijelu. Unatoč veličini i trendu promjena urinarnih pokazatelja, visokoj varijablinosti i heterogenosti rezultata, prikupljeni podatci nalažu klasificiranje ispitanika u predstavljenoj studiji kao primjereno hidrirani, što je sukladno preporukama Bakera i sur. (2009), ali i Reljića i sur. (2015b). Takva je klasifikacija u suprotnosti s postavljenim ACSM-ovim smjernicama za detekciju hipohidiranosti organizma kod sportaša (Sawka, i sur. 2007). Smjernice ACSM-a nalažu svakom ispitaniku da dostavi mali

uzorak prvoga jutarnjeg urina gdje je zabilježena vrijednosti $S_{TU}$>1.020 g•mL$^{-1}$ definirana kao pomak prema hipohidriranosti organizma (Sawka i sur., 2007). Također, sukladno službenim pravilima NCAA hrvanja, svi sportaši prilikom ulaska na strunjaču moraju imati $S_{TU}$ vrijednosti od <1.020 g•mL$^{-1}$ kako bi ostvarili pravo nastupa na borilištu (Loenneke i sur., 2011). Slične su, prethodno objavljene studije, tipično koristile presječni dizajn studije prilikom određivanja stope hipohidriranosti organizma, najčešće putem analize $S_{TU}$ (Fernandez-Elias i sur., 2014; Opplinger i sur., 2005; Petterson i Berg, 2014a; Zubac i sur., 2015a). Ovi su radovi utemeljili zaključke primarno na podatcima izvedenim iz jedne vremenske točke mjerenja gdje veličina promjene ili relacija očitovanja $S_{TU}$ i promjene u tjelesnoj masi nije utvrđena, a mehanizmi su, putem kojih se ostvarila koncentracija urina, ostali nerazjašnjeni. Vrijednosti prikupljenih uzoraka urina u ovoj studiji pokazuju značajno više vrijednosti prilikom usporedbe s podatcima mladih turskih Tae-Kwon-Do sportaša gdje očitovanja dosežu $U_{OSM}$=989±171 mOsmol•kg$^{-1}$; $S_{TU}$=1.017 g•mL$^{-1}$ (Kutlu i Guler, 2006) tijekom pripremne faze. Studija Buforda i sur. (2006) navodi da sveučilišni hrvači imaju vrijednosti $S_{TU}$>1.020 g•mL$^{-1}$čak i izvan natjecateljske sezone, a nedavna studija Reljića i sur. (2015) govori o trendu porasta vrijednosti ($S_{TU}$ vrijednosti rastu od ~1.018 do 1.025 g•mL$^{-1}$) kod kontrolne grupe njemačkih olimpijaca u borilačkim sportovima unatoč očuvanju volumena plazme, ukupnoga volumena tjelesnih tekućina i tjelesne mase. Autori Shirreffs i Maughan (1998) prijavili su kako boksači i hrvači imaju značajno viša očitovanja vrijednosti $U_{OSM}$ (i. e. 775±263 *vs.* 627±186 mOsmol•kg$^{-1}$, $p<0.05$) prilikom usporedbe s drugim sportašima. Takvi podatci mogu biti indikator rane prekretnice (eng. *early milestone*) fizioloških adaptacija i upliva adaptacijskih mehanizama na spregu intenzivnoga treninga (posljedični angažman bubrega) kronično neprimjerenoga unosa vode i učestale prakse nagle i nekontrolirane redukcije tjelesne mase. Yankanich i sur. (1998) prvi su predložili takav scenarij fizioloških procesa kao kompenzacijski odgovor na spregu ranije navedenih procesa dokumentiranjem prosječnih vrijednosti osmolaliteta seurma~300 mOsmol•kg$^{-1}$ čak prilikom primjerene hidriranosti organizma.

Podatci prikupljeni o stopi hipohidriranosti u ovoj studiji (Graf 8) istovjetni su podatcima Rivera-Brown i sur. (2012) koja prijavljuje ~90 % judaša adolescenata u hipohidriranom stanju (definiranih putem $S_{TU}$), tijekom stabilne tjelesne mase iako su pripreme tih sportaša protekle u visoko stresnom i vrućem okruženju. Slično tim nalazima, Arnaoutis i sur. (2015) također karakteriziraju ~90 % sportaša adolescenata iz različitih sportova kao hipohidrirane (temeljem

$S_{TU}$ procjene) unatoč dostupnosti vode tijekom eksperimentalnoga protokola, ali i trivijalnoj relaciji između povišenih $S_{TU}$ vrijednosti i promjene u tjelesnoj masi ($R^2$=0.1). Boksači u ovoj studiji mogu biti univerzalno klasificirani kao *iznimno hipohidrirani* temeljem nalaza urina, što je ipak u suprotnosti s nalazom stabilne tjelesne mase i ukupnoga unosa markonutrijenata i vode. Ipak, svi ranije dokumentirani podatci sukladni su stopi hipohidriranosti prijavljenoj od Pettersona i Berga (2014b). Točnije, ranije spomenuti švedski autori, temeljem povišenih vrijednosti $S_{TU}$ također su prijavili visoku stopu hipohidriranosti (89 %), unatoč *ad libitum* unosu vode i produženom vremenu oporavka između vage i natjecanja. Sprega okolnosti navela je autore na zaključak da službeno vaganje nije dovoljno dobar preventivni mehanizam za sprječavanje hipohidriranosti organizma. Ipak, interpretacija stupnja hidriranosti, utemeljena na nalazu $S_{TU}$ mjerenom u jednoj vremenskoj točki vjerojatno je prenaglasila ulogu povišenih očitovanja vrijednosti koncentracije urina u kontekstu mjerenja stvarnih oscilacija i deficita vode u tijelu, zanemarivši pritom utjecaj remetećih faktora koji utječu na takav presječni dizajn studije. Uniformno, sve prethodne studije prilikom klasifikacije hipohidriranosti, služile su se kriterijima ASCM-a prilikom karakteriziranja blage hipohidriranosti, a kod ispitanika u ovoj studiji zabilježeno je da svi uniformno premašuju ranije postavljenu referentnu točku. Preciznije, čak ~ 65 % boksača premašuje vrijednost $S_{TU}$ od >1.030 $g \bullet mL^{-1}$ koja slovi za mjeru iznimne hipohidriranosti i deficita vode u organizmu (Armstrong, 2007; Fernandez-Elias i sur., 2014; Hamouti i sur., 2013; Sawka i sur., 2007). Izgledno je kako presječni istraživački nacrti univerzalno korišteni u prethodnim studijama nisu imali primjeren metodološki pristup prilikom detekcije ukupnoga deficita vode u tijelu, sukladno preporukama (Cheuvront i Kenefick, 2014), a uzročni mehanizmi uniformno visokoga angažmana bubrega s ciljem očuvanja homeostaze ostaju predmet rasprave znanstvenih krugova.

Praktična razmatranja, perspektive i primjenjivost

Prilikom uzorkovanja urina ova je studija slijedila ranije postavljene smjernice (Armstrong i sur., 2007; Hamouti i sur., 2013; Fernandez-Elias i sur., 2014; Sawka i sur., 2007) prilikom procjene hidriranosti organizma u stvarnim uvjetima, na visoko utreniranim sportašima. Iako je studija Hamoutija i sur. (2010) koristila pristup kliničke metodologije, ujedno *zlatni*

*standard* prilikom analize sastava urina (i. e. 24-h volumen), ovo je istraživanje bilo ograničeno na prikupljanje malih uzoraka urina. Svakako, autori su svjesni da akutne promjene u tjelesnom držanju uvjetuju značajne promjene u funkciji bubrega, što je jedan od bitnih preduvjeta opaženih razlika između studija. Bitno je istaknuti kako isti pristup prilikom uzorkovanja urina koriste i brojne druge laboratorijske studije koje imaju za cilj utvrditi stupanj hidriranosti organizma. S praktičnoga aspekta, ali i pravila sveučilišnoga hrvanja u SAD-u, prikupljanje se uzorka odvija u uspravnom položaju tijela, pa rezultati ove studije imaju praktični značaj. U ovom kontekstu bitno je istaknuti podjelu olimpijskih boksača na 10 različitih težinskih kategorija, što može biti jedan od bitnih čimbenika održavanja relativno niske tjelesne mase i rezultirati kronično neprimjerenim prehrambenim navikama kod sportaša adolescenata (Petterson i Berg, 2014b; Reljić i sur., 2015b). Za dodatnu potporu spomenutom, raspon ili razlika u tjelesnoj masi u amaterskom boksu između različitih težinskih kategorija relativno je uzak (AIBA Tehnička pravila, AIBA, 2013.), što je vjerojatno dodatno prouzročilo visoku stopu kronično niske tjelesne mase prijavljene u drugim studijama na uzorku mladih boksača Njemačke (Reljić i sur., 2015) i Engleske (Lovet, 1991; Smith, 2006). Autori Petterson i Berg (2014a) spekuliraju kako osim judaša, boksači pri Olimpijskim natjecanjima spadaju u zdravstveno najugroženiju i najrizičniju skupinu sportaša, ponajprije zbog jako kratkoga vremenskog odmaka između službenoga vaganja i natjecanja i paralelno visokih vrijednosti koncentracije urina. U tom okviru, nadležna bi tijela trebala razmotriti implementaciju sustavnoga praćenja tjelesnoga sastava stupnja hidriranosti organizma, te ih integrirati u redovite medicinske preglede. Također, sustavno obrazovanje trenera, roditelja i sportaša može dovesti do suzbijanja pojave nekontrolirane redukcije tjelesne mase, ponajviše zbog općepoznatih zdravstvenih komplikacija nastalih uslijed hipohidriranosti organizma. Takav pristup može predstavljati obećavajući alat koji dovodi do smanjenja zdravstvenih rizika poput rezultata opaženih kod mladih hrvača u SAD-u uslijed integracije novoga pravilnika iz 1998. Ostaje otvorena mogućnostkako unos vode tijekom samih treninga zbog učestalosti i gustoće različitih vježbi nije bio sukladan preporukama ACSM-a, iako je kompenziran kroz obroke i opravak u trajanju od deset do dvanaest sati prije mjerenja, gdje su svi ispitanici konzumirali vodu *ad libitum* pa funkciju i angažman bubrega ne treba generalizirati na druge populacije.

Sažetak praktičnih aplikacija

Uporaba urinarnih biomarkera u kontekstu karakteriziranja stupnja hidriranosti organizma ostaje predmet rasprave zbog velike analitičke varijabilnosti prikupljenih podataka, usprkos stabilnoj tjelesnoj masi i unosu markonutrijenata. Daljnja istraživanja trebaju utvrditi utjecaj ukupnih proteina u urinu na lažno pozitivne nalaze $S_{TU}$. Visoka stopa hipohidriranosti organizma (i. e. putem procjene koncentracije urina) prisutna je usprkos primjerenom unosu vode i makronutrijenata. Stoga, mjerenje i interpretacija bioloških uzoraka urina u vidu ukupnoga deficita vode u tijelu mogu biti pod utjecajem drugih faktora, ali i ukazati na kronično neadekvatan unos vode tijekom treninga. Dodatna su istraživanja potrebna da bi se utvrdila analitička pouzdanost ukupnih proteina u urinu, ali i utjecaj mišićne mase na dijagnostičku točnost $S_{TU}$. Važno je istaknuti očuvanje unutarnje kontrole i valjanost eksperimenta tijekom provedbe studije, gdje su svi ispitanici imali jednak režim prehrane, spavanja i treninga i formirani su kao homogena skupina temeljem podataka anamnestičkoga upitnika i preliminarnih mjerenja uz pomno nadziran unos makronutrijenata i vode. Utjecaj toploga okruženja nije bio prisutan (i. e., treninzi su se odvijali u velikoj dvorani Hale sportova Subotica, Srbija).

# ZAKLJUČAK

Unatoč pomnoj standardizaciji trenažnih uvjeta i prehrambenih navika, stabilnoj tjelesnoj masi i *ad libitum* unosu tekućine, urinarni indikatori pokazali su uniforman trend porasta i veliku dan-za-dan varijabilnost, čak tijekom rane faze pripremnoga kampa. Čini se kako općeprihvaćeni dehidracijski biomarkeri iz urina ukazuju na druga fiziološka stanja i kompenzacijske mehanizme osim isključivog deficita vode u tijelu. Stoga, ostaje otvorena mogućnost kako se povišene vrijednosti koncentracije urina ostvaruju pod utjecajem (i) povećanoga mišićnog katabolizma, (ii) neprimjerenoga unosa vode tijekom uzastopnih treninga, (iii) sprege djelovanja kompenzacijskih mehanizama na visoko-intenzivan trening, neovisno o stvarnom stupnju hidriranosti organizma. Analiza konkurentne valjanosti nije potvrdila općeprihvaćenu hipotezu koja predstavlja osmolalitet urina u kontekstu *zlatnog standarda* procjene stupnja hidriranosti, a ukupni proteini u urinu nisu povezani s terenskim ili laboratorijskim dehidracijskim biomarkerima uz važnu napomenu kako su svi parametri urina uniformno premašili vrijednosti prethodno postavljenih referentnih točki ACMS-a. ROC krivulja neosporno pokazuje identičan ishod kod prosječnih vrijednosti terenskih i laboratorijskih urinarnih pokazatelja, što ukazuje na metodološke propuste prethodnih studija koje su izvodile zaključke o valjanosti bez provjerene pouzdanosti na istom uzorku ispitanika ili sklopu uvjeta prilikom realizacije studije.

Izgledno je kako raskorak u prikupljenim podatcima koncentracije urina između različitih studija i dosljednost prikupljenih podataka/rezultata uvelike ovise o istraživačkom nacrtu (presječna ili ponovljena mjerenja), metodološkom pristupu (laboratorijske ili terenske studije), vremenskom odmaku (akutne ili kronične promjene), ali i utjecaju promjene hemodinamičkoga položaja prilikom uzorkovanja. Ostaje upitno u kojoj mjeri parametri iz urina vjerodostojno ukazuju na pomanjkanje ukupnoga udjela vode u tijelu prilikom terenske procjene stupnja hidriranosti. Univerzalno visoka stopa hipohidriranosti dokumentirana kod ovih sportaša unatoč stabilnoj tjelesnoj masi dovodi u pitanje praktičnu valjanost trenutačno postavljenih kriterija i referentnih točki hidriranosti organizma. Sukladno teoriji integriranoga odgovora združenih regulacijskih mehanizama (Armstrong, 2007) potrebno je procijeniti osmolalitet izvanstanične tekućine i ukupan udjel vode u tijelu simultano putem različitih dijagnostičkih instrumenata. Prema preporukama Poortsmana (1988), funkciju bubrega kod visoko utreniranih sportaša ne treba generalizirati na opću populaciju, što potvrđuju i nalazi ove studije. Neosporno je kako kronična

hipohidriranost ili čak okvir adaptacijskih mehanizama na cikluse nagle i nekontrolirane redukcije tjelesne mase i dalje predstavlja izniman zdravstveni problem kod natjecatelja u borilačkim, ali i drugim sportovima, a dugoročne posljedice ostaju neistražene. Stoga, postoje ključni fiziološko-medicinski razlozi za implementiranje sustavnoga praćenja stupnja hidriranosti organizma kod mladih boksača tijekom čitave godine koji se ogledaju u problematici razvoja tjelesnih karakteristika, endokrinoga odgovora, termoregulacijskih i kardiovaskularnih rizika u svezi s deficitom vode u tijelu.

Zaključno, ova studija opovrgava generalno prihvaćenu teoriju o osmolalitetu urina u kontekstu *zlatnoga standarda* prilikom procjene ukupnoga deficita vode u tijelu sportaša, što dovodi u pitanje primjenjivost terenske analize stupnja hidriranosti putem analize $S_{PU}$. Također predstavljena studija otvoreno kritizira presječne istraživacke nacrte koji si postavljaju za cilj utvrđivanje metrijskih karakteristika stupnja hidriranosti organizma. Pretpostavke o uplivu remetećih faktora, poput povišene mišićne mase ili koncentracije ukupnih proteina u urinu na dijagnostičku točnost $S_{PU}$ dan-za-dan pristupom ostaju dvosmislene. Daljnje studije trebaju istražiti i detaljno razložiti uzročne mehanizme porasta u vrijednostima koncentracije urina i odgovora bubrežnoga sustava na trening u borilačkim sportovima, koji za sada ostaju nerasvijetljeni. Neovisno o izboru tehnike, trenutačno ne postoji u potpunosti ispravan i točan pristup problematici i interpretaciji rezultata, što je i pokazano statističko-metodološkim pristupom prikazane studije.

# SUMMARY (IN ENGLISH)

Certainly, we know that voluntary body mass loss reduction (*via* reduction in extracellular fluid) continues to be a habitual practice in Olympic combat sports. This practice carries an increased risk of adverse health-related effects, particularly for the adolescent combat athletes. Unfortunately, the data the acute assessment of hydration status remains equivocal. Currently, there is on-going debate within the combat sport community on how best to measure whole-body fluid changes (e.g, hypohydration) which regularly occur in these athletes. Importantly, the inconsistency of research findings on measurement resolution of urinary readings may preclude a conclusive position stand within current combat sports research. Therefore, the aim of the present study was to determine the measurement resolution of multiple non-invasive diagnostic tools in real-life settings on a day-to-day basis. Furthermore, this study also investigated the prevalence of hypohydration and the association between urinary indices of hydration status and other presumably confounding factors (e.g., urine protein content, increased muscle mass, food and fluid intake) in elite youth boxers during their weight-stable phase before competition. Sixty-nine urine samples were collected over three days from 23 elite European adolescent boxers (17.3±1.9 years of age, 1.75 ±0.08 m in height, 66.8±11.8 kg in body mass, 8.3±2.3 % of body mass expressed as fat, 7.1±0.9 years of boxing experience) and analysed by field and laboratory measures reflecting on hydration status. Data collection took place during a mutual international training camp, prior to a major competition. Overall macronutrient and water intake were assessed using dietary records. According to their anthropometric characteristics, boxers were stratified into two groups: light-weight boxers (Lwb) and heavy-weight boxers (Hwb). The effects on all dependent variables between experimental protocols were analysed using repeated measures ANOVA to detect any systematic biases between items For post hoc analysis Bonferroni's test was adopted for multiple comparisons of dependent variables. The results demonstrated urine specific gravity ($U_{SG}$) and urine osmolality ($U_{OSM}$) inconsistency (ICC range=0.38–0.52) for Lwb and Hwb boxers, respectively) during their weight-stable period and regardless of the *ad libitum* fluid intake (~3.0 L• day$^{-1}$). Post-hoc test demonstrated no differences between time trials (F=3.02; p=0.09, $\eta^2$=0.23), while for Hwb there was a significant difference only between trials 1 and 3 as $U_{SG}$ increased by 0.5±0.4 % (F=8.90, $\eta^2$=0.49; β=0.94; p<0.001). The $U_{OSM}$ readings showed significant time effect for both groups (F=13.32; p<0.001; β=0.99;

$\eta^2$=0.39), while there was no group (F=0.08, p=0.93) or interaction effect (F=1.19, p=0.29). In Figure 2 post-hoc test showed differences in both Lwb and Hwb boxers over the course of the study, as $U_{OSM}$ increased between trial 1 i 3 by 11.2±12.8 % (F=5.17; p=0.01, β=0.79, $\eta^2$=0.32) and 19.9±22.7 % (F=10.2; p=0.001, β=0.98, $\eta^2$=0.48, respectively). High positive correlation between urinary dehydration markers were observed (r=0.88, p<0.001); these correlations were supported by tight Bland-Altman limits of agreement (-0.92 to 0.93). The variations observed in Bland-Altman plots between both urinary indices and total body water (TBW) (i.e. the ordinate) were greater than three standard deviations. The area under curve ($A_{UC}$) demonstrated similar outcomes for both urinary indices (0.93, p<0.001) with high sensitivity (93.5%) and specificity (87.5%). Sixty-five percent of adolescent boxers were severely hypohydrated in spite of being in their weight stability period. Hypohydration was universally prevalent among all athletes on both test days with $U_{SG}$=1.028±0.003 g•mL$^{-1}$, $U_{OSM}$ =1036±158 mOsmol•kg$^{-1}$. A trivial association between mean of both urinary values and mean water content was observed (r=0.06; p=0.45; r=-013, p=0.53), whilst $T_{PC}$ was not associated with any urinary dehydration markers ($U_{SG}$, p=0.27; $U_{OSM}$, p=0.61), indicating that the inter-assay reliability of urine sampling may remain skewed, especially for samples which have increased protein content. The present outcomes find that the most prevalent urinary dehydration markers used to classify hydration status in competition exhibit large variability, and may be influenced by external factors like intense exercise, or others, resulting in increased false-positive findings, even during the weight-stable periods of real-life competition settings. It seems that the consistency of both urinary dehydration marker readings in combat athletes depends upon research design, experimental approach (e.g., laboratory conditions *vs* real-life settings) in particular. In opposite to the prevailing theory, urine osmolality should not be considered a gold standard dehydration index. In conclusion, this study implies that the physiological mechanisms underlying diagnostic accuracy of the most common non-invasive hydration markers requires further investigation to validate the measures in elite adolescent boxers. Albeit, there are several critical physiological and medical reasons for the mandatory hydration evaluation of adolescent boxers throughout their season, including body development, endocrine responses, cardiovascular risk factors.

Key words: Dehydration, combat sports, urine, measurement resolution

# REFERENCE


1. Adolph, E. F. (1947). *Physiology of Man in the Desert*. New York, USA: Interscience.

2. Armstrong, L. E. (2007). Assessing hydration status: the elusive gold standard. *Journal of the American College of Nutrition*, 26 (5) 575S-84S.

3. Arnaoutis, G., Kavouras A. S., Mourtakos, S., Sidossis, L., (2015). Fluid Balance DuringTraining in Elite Young Athletes Of Different Sports. *Journal of Strength and Condtioning Research*, 29 (12) 3447–3452.

4. Armstrong, L. E, Ganio MS, Klau, J. F., Johnson, E. C., Casa, D. J., Maresh, C. M. (2014). Novel hydration assessment techniques employing thirst and a water intake challenge in healthy men.*Applied Physiology Nutrition and Metabolism-Physiologie Appliquee Nutrition Et Metabolisme*, 39 (2), 138-44.

5. Artioli, G. G., Scagliusi, F., Kashiwagura, D., Franchini, E., Gualano, B., & Junior, A. L. (2010). Development, validity and reliability of a questionnaire designed to evaluate rapid weight loss patterns in judo players. *Scandinavian Journal of Medicine & Science-in Sports*, 20 (1) e177-e187.

6. Baker, L. B, Lang, J. A., Kenney, W. L. (2009). Change in body mass accurately and reliably predicts change in body water after endurance exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 105 (6) 959-967.

7. Bartok, C., Schoeller, D. A., Sullivan, J. C., Clark, R. R., & Landry, G. L. (2004). Hydration testing in collegiate wrestlers undergoing hypertonic dehydration. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 36 (3) 510-517.

8. Brito, C. J., Roas, A., Brito, I. S. S., Marins, J. C. B., Cordova, C., Franchini, E. Methods of Body-Mass Reduction by Combat Sport Athletes, (2012). *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 22 (2) 89-97.

9. Baxmann, A. C., Ahmed, M. S., Marques, N. C., Menon, V. B., Pereira, A. B., Kirsztajn, G. M., et al. (2008). Influence of muscle mass and physical activity on serum and urinary

creatinine and serum cystatin C. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3 (2) 348-354.

10. Buford, T. W., Rossi, S. J., Smith, D. B., O'Brien, M. S., Pickering, C. (2006). The effect of a competitive wrestling season on body weight, hydration, and muscular performance in collegiate wrestlers. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association*, 20 (3) 689-692.

11. Carlton, A., Orr, R. M. (2015). The effects of fluid loss on physical performance: A critical review. *Journal of Sport and Health Science*, (e-pub-ahead-of print).

12. Casa, D. J., Armstrong, L. E., Hillman, S. K., Montain, S. J., Reiff, R. V., Rich, B. S. E., et al. (2000). National Athletic Trainers' Association position statement: Fluid replacement for athletes. *Journal of Athletic Training*, 35 (2) 212-24.

13. Cheuvront, S. N., Ely, B. R., Kenefick, R. W., Sawka, M. N. (2010). Biological variation and diagnostic accuracy of dehydration assessment markers. *American Journal of Clinical Nutrition*, 92 (3) 565-573.

14. Cheuvront, S., Kenefick R., Zambraski E. (2015). Spot Urine Concentrations Should Not be Used for Hydration Assessment: A Methodology Review. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, (e-pub-ahead-of print).

15. Cheuvront, S. N., Kenefick, R. W. (2014). Dehydration: Physiology, Assessment, and Performance Effects. *Comprehensive Physiology*, 4 (1) 257-285.

16. Chaabène, H., Tabben, M., Mkaouer, B., Franchini, E., Negra, Y., Hammami, M. & Hachana, Y. (2015). Amateur boxing: physical and physiological attributes. *Sports Medicine*, 45 (3), 337-352.

17. Cohen, J. (1998). *Statistical Power Analysis for the Behavior Sciences*.Associates LE, editor.Hillsdale (NJ): Routledge Academic.

18. Costill, D. L., Sparks K.E. (1973). Rapid fluid replacement following thermal dehydration. *Journal of Applied Physiology*, 34 (3) 299-303.

19. Cotter, J. D., Thornton, S. N., Lee, J. K., Laursen, P. B., (2014). Are we being drowned in hydration advice? Thirsty for more? *Extreme Physiology and Medicine*, 3 (1)1-16.

20. Demura, S., Sato S., Kitabayashi T., (2004). Percentage of total body fat as estimated by three automatic bioelectrical impedance analyzers. *Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Scienc*e, 23 (3) 93-99.

21. Dihazi, H., i Müller, G. A. (2007). Urinary proteomics: a tool to discover biomarkers of kidney diseases. *Expertal Review Proteomics*, 4 (1) 39-50.

22. Fernandez-Elias, V. E., Martinez-Abellan, A., Lopez-Gullon, J., M., Moran-Navarro, R., Pallares, J. G., De la Cruz-Sanchez, E., et al. (2014). Validity of hydration non-invasive indices during the weight-cutting and official weigh-in for Olympic combat sports. *PLoS One*, 9 (4): e95336.

23. Franchini. E., Brito C. J, Artioli G. G. (2012). Weight loss in combat sports: physiological, psychological and performance effects. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 9 (1) 52-58.

24. Gonçalves, E. M., Matias, C. N., Santos, D. A., Sardinha, L. B., Silva, A. M. (2015). Assessment of total body water and its compartments in elite judo athletes: comparison of bioelectrical impedance spectroscopy with dilution techniques. *Journal of Sports Sciences*, 33 (6) 634-640.

25. Galloway, S. D., Maughan, R. J. (2000). The effects of substrate and fluid provision on thermoregulatory and metabolic responses to prolonged exercise in a hot environment. *Journal of Sports Sciences*, (18) 339 - 351.

26. Gleim, G.W. (2000). Renal Response to Training and Exercise. In Garrett W.E., Kirkendall D. T., (Eds.), *Exercise and Sport Science*: Philadelphia, PA: Lippincott Williams &Wilkins.

27. Guyton and Hall (2010). *Textbook of Medical Physiology*, Elsevier Health Sciences.

28. Hall, C. J., Lane, A. M. (2001). Effects of rapid weight loss on mood and performance among amateur boxers. *British Journal of Sports Medicine*, 35 (6) 390-395.

29. Hamouti, N., Del Coso, J., Avila, A., Mora-Rodriguez, R. (2010). Effects of athletes' muscle mass on urinary markers of hydration status. *European Journal of Applied Physiology*, (2) 213-219.

30. Hamouti, N., Del Coso, J., Mora-Rodriguez, R. (2013). Comparison between blood and urinary fluid balance indices during dehydrating exercise and the subsequent hypohydration when fluid is not restored. *European Journal of Applied Physiology*, 113 (3) 611-620.

31. Halabchi, F. R. K., Maffulli, N., Wroble, R. R.,Wallace, W. A. (Eds.). (2009). *Doping in combat sports*. R. Kordi N. M, R. R. Wroble, & W.A. Wallace (Eds.), editor. Combat sports Medicine (pp. 55–72). London; Springer-Verlag.

32. Hoffman, J. R., Maresh, C. M. (2011). Nutrition and Hydration Issues for Combat Sport Athletes. *Strength and Conditioning Journal*, 33 (6) 10-17.

33. Hopkins, W. G. (2000). Measures of reliability in sports medicine and science. *Sports Medicine*. 30 (1) 1-15.

34. Hrastinski, B. (1992). *Koncepcija savremene pripreme vrhunskih boksera*, Beograd, SFRJ.

35. International Boxing Association. (2013). *AIBA Technical Manual*. Retrived from http://www.aiba.com; 20-36.

36. Iwata, J., Nishikaze, O. (1979). New micro-turbidimetric method for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clinical Chemistry*, 25 (7) 1317-1319.

37. Kalman, D. S., Lepeley, A. A. review of hydration. (2010). *Strength and Conditioning Journa*l, 32(2) 56-63.

38. Kordi, R., Ziaee, V., Rostami, M., Wallace, W. A. (2011). Patterns of weight loss and supplement consumption of male wrestlers in Tehran. *Sports Medicine Arthroscopy Rehabilitation Therapy Technology*, 3 (1) 4-11.

39. Koral, J., Dosseville, F. (2009). Combination of gradual and rapid weight loss: Effects on physical performance and psychological state of elite judo athletes. *Journal of Sports Sciences*, 27(2) 115-120.

40. Kutlu, M., Guler, G. (2006). Assessment of hydration status by urinary analysis of elite junior taekwon-do athletes in preparing for competition. *Journal of Sports Sciences*, 24 (8) 869-873.

41. Loenneke, J. P., Wilson, J. M., Barnes, J. T., Pujol, T. J. (2011).Validity of the Current NCAA Minimum Weight Protocol: A Brief Review. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 58 (3) 245-249.

42. Lohman, T. G. (1981). Skinfolds and body density and their relation to body fatness: a review. *Human Biology*, 181-225.

43 Lovett, J. W. (1990). Bulimia nervosa in an adolescent boy boxer. *Journal of Adolescence*, 13 (1), 79-83.

44. Martin, W. F., Cerundolo, L. H., Pikosky, M. A., Gaine, P. C., Maresh, C. M., Armstrong, L. E. (2006). Effects of dietary protein intake on indexes of hydration. *Journal of the American Dietetic Association*, 106 (4) 587-599.

45. Maughan, R. J., Shirreffs, S. M., Leiper, J. B. (2007). Errors in the estimation of hydration status from changes in body mass. *Journal of Sports Sciences*, 25 (7) 797-804.

46. Montain, S. J., Laird, J. E., Latzka, W. A., Sawka, M. N. (1997). Aldosterone and vasopressin responses in the heat: hydration level and exercise intensity effects. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 29 (5) 661-668.

47. Nose, H., Mack, G. W., Shi, X., Nadel, E. R. (1998). Role of osmolality and plasma volume during rehydration in humans. *Journal of Applied Physiology*, 65 (1) 325-331.

48. Oppliger, R. A., Magnes, S. A., Popowski, L. A., Gisolfi, C. V. (2005). Accuracy of urine specific gravity and osmolality as indicators of hydration status. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 15 (3) 236-251.

49. Pakkala, H., Christensen, T., de Victoria, I. M., Presser, K., & Kadvan, A. (2010). Harmonised information exchange between decentralised food composition database systems. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, S58-S63.

50. Pallarés, J. G., Martínez-Abellán, A., López-Gullón, J. M., Morán-Navarro, R., De la Cruz-Sánchez, E. & Mora-Rodríguez, R. (2016). Muscle contraction velocity, strength and power output changes following different degrees of hypohydration in competitive Olympic combat sports. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 13 (1), 1.

51. Popowski L. A., Oppliger, R. A., Patrick, L. G., Johnson, R. F., Kim, J. A., & Gisolf, C. V. (2001). Blood and urinary measures of hydration status during progressive acute dehydration. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 33 (5) 747-753.

52. Poortmans, J. R., Vanderstraeten, J. (1994). Kidney function during exercise in healthy and diseased humans. *Sports Medicine*, 18 (6) 419-437.

53. Poortmans, J. R. (1985). Postexercise proteinuria in humans: facts and mechanisms. *JAMA*, 253 (2) 236-240.

54. Poortmans J. R., Jeannaud, F., Baudry, S., & Carpentier, A. (2015). Changes in Kidney Functions during Middle-distance Triathlon in Male Athletes. *International Journal of Sports Medicine*, 36 (12) 979-983.

55. Pettersson, S., Berg, C. M. Hydration Status in Elite Wrestlers, Judokas, Boxers, and Taekwondo Athletes on Competition Day (2014a). *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 24 (3) 267-275.

56. Pettersson, S., Berg, C. M. (2014b). Dietary Intake at Competition in Elite Olympic Combat Sports.*International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 24 (1) 98-109.

57. Rivera-Brown, A. M.., De Félix-Dávila, R. A. Hydration Status in Adolescent Judo Athletes Beforeand After Training in the Heat. (2012). *International Journal of Sports Physiology and Performance*, 7 (1) 39-48.

58. Reljić, D., Feist, J., Jost, J., Kieser, M., Friedmann-Bette, B. (2015a). Rapid body mass loss affects erythropoiesis and hemolysis but does not impair aerobic performance in combat athletes. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, (e-pub-ahead-of-print).

59. Reljić, D., Hassler, E., Jost, J., Friedmann-Bette, B. Rapid Weight Loss and the Body Fluid Balance and Hemoglobin Mass of Elite Amateur Boxers (2013). *Journal of Athletic Training*, 48 (1) 109-117.

60. Reljić, D., Jost, J., Dickau, K., Kinscherf, R., Bonaterra, G. & Friedmann-Bette, B. (2015b) Effects of pre-competitional rapid weight loss on nutrition, vitamin status and oxidative stress in elite boxers. *Journal of Sports Sciences*, 33 (5) 437-448.

61. Roemmich, J. N., Sinning, W. E. (1997). Weight loss and wrestling training: effects on growth-related hormones. *Journal of Applied Physiology*, 82 (6) 1760-1764.

62. Ørtenblad, N., Nielsen, J., Saltin, B., & et al. Role of glycogen availability in sarcoplasmic reticulum Ca2+ kinetics in human skeletal muscle. (2011) Journal of Physiology 589(3): 711-25.

63. Sawka, M. N., Burke, L. M., Eichner, E. R., Maughan, R. J., Montain, S. J., Stachenfeld, N.S. Exercise and fluid replacement. (2007). *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 39(2)377-390.

64. Saarni, S. E., Rissanen, A., Sarna, S., Koskenvuo, M, Kaprio, J. (2006). Weight cycling of athletes and subsequent weight gain in middleage. *International Journal of Obesity*, 30(11) 1639-1644.

65. Sommerfield, L. M., McAnulty, S. R., McBride, J. M., Zwetsloot, J. J., Austin, M. D., Mehlhorn, J. D. & Utter, A. C. (2015). Validity of Urine Specific Gravity when Compared to Plasma Osmolality as a Measure of Hydration Status in Male and Female NCAA Collegiate Athletes. *Journal of Strength and Conditioning Research/National Strength & Conditioning Association*, (e-pub-ahead-of-print).

66. Smith, M. S. (2006). Physiological profile of Senior and junior England international amateur boxers. *Journal of Sports Science & Medicine*, (5) 74-89.

67. Sims, S. T., Rehrer, N. J., Bell, M. L., Cotter, J. D. (2008). Endogenous and exogenous female sex hormones and renal electrolyte handling: effects of an acute sodium load on plasma volume at rest. *Journal of Applied Physiology*, 105 (1) 121-127.

68. Singh, N. R. & Peters, E. M. (2013). Markers of hydration status in a 3-day trail running event. *Clinical Journal of Sport Medicine*, 23 (5) 354-364.

69. Shirreffs, S. M., Maughan, R. J. (1998). Urine osmolality and conductivity as indices of hydration status in athletes in the heat. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 30 (11) 1598-1623.

70. Stuempfle, K. J., & Drury, D. G. (2003). Comparison of 3 methods to assess urine specific gravity in collegiate wrestlers. *Journal of Athletic Training*, 38 (4) 315-319.

71. Utter, A. C., McAnulty, S. R., Riha, B. F., Pratt, B. A., Grose, J. M. (2012). The validity of multifrequency bioelectrical impedance measures to detect changes in the hydration status-of wrestlers during acute dehydration and rehydration. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, 26 (1) 9-15.

72. Vincent. W. (2005). *3rd Statistics in Kinesiology*. Champaign, IL: Human Kinetics.

73. Yankanich, J., Kenney, W. L., Fleck, S. J. & Kraemer, W. J. (1998). Pre-competition Weight Loss and Changes in Vascular Fluid Volume in NCAA Division I College Wrestlers. *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 12(3) 138-145.

74. Zubac, D, Karninčić, H, Zaja, M. (2015a). Hydration status assessment among elite youth amateur boxers.*The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. (e-pub ahead-of-print).

75. Zubac, D., Tomić, L., Karninčić, H. (2015b). Gradual weight-loss does not prevent hypohydration during preparation period in elite kickboxer of Croatia. *Journal of Sports Science*. 3 (11) 290-298.

76. Zubac, D., Marušić, U., Karninčić, H. (2016a). Hydration status assessment techinques and their applicability in combat sports: a literature review. *Strength and Conditioning Journal*, 38 (4) 80-89.

77 Zubac, D., Morrsion, A. S., Šimunić, B. (2016). Razvoj metode za ugotavljanje akutne dehidracije in vpliv naizabrane fiziološke parameter. *Raziskovalno poročilo*. Fundacija za sport, Dunajska Cesta 51, 1000 Ljubljana, Slovenija. Broj projekta L5-5550.

78. Zambraski, E. J. (1990). Renal regulation of fluid homeostasis during exercise. *Perspectives in Exercise Science and Sports Medicine*, (3) 247-276.

**DODATAK**

Životopis

Rođen sam 18. lipnja 1986. godine u Mostaru, Bosna i Hercegovina, SFRJ. Osnovno obrazovanje te opću gimnaziju završio sam 2005. godine u Mostaru. U razdoblju do 2004-2007. godine natječem se amaterskom boksu, te pritom osvajam srebreno odličje u juniorskom uzrastu, u okviru nacionalnog prvenstva BiH. Fakultet prirodoslovno-matematičkih i odgojnih znanosti, Sveučilišta u Mostaru, Bosna i Hercegovina upisujem 2007. godine, i bespotrebno provodim pet godina u iluziji obrazovanja, gdje diplomiram 2012. godine.

U ožujku 2013. godine upisujem poslijediplomski doktorski studiji Kineziologije na Sveučilištu u Splitu. U okviru trećeg semestra doktorskog studija, akademske 2014-2015. godine boravim kao Erasmus student na Sveučilištu Primorska, Koper, Slovenija, odjel Aplikativne kineziologije, gdje kod Dr. Boštjana Šimuniča upoznajem laboratorijski rad. Tokom boravka na Aplikativnoj kineziologiji, u razdoblju 2014-2015. godine radim na studiji koja ima za cilj utvrditi konkurentnu valjanosti i primjenjivosti akutne prilagodbe skeletnog mišičja na pliometrijski trening kod sportaša putem Tenzimografijske metode (TMG). Također, u kolovozu 2015. godine priključujem se znanstvenom radu u okviru projekta *Anaerobni kapacitet u udaračkim borilačkim sportovima,* kao doktorski student-istraživač pri Institutu za Kineziološka istraživanja, Sveučilišta u Splitu [broj projekta 6524].

Stručni staž tokom akademske 2015-2016. godine obavljam u laboratoriju odijela Aplikativne kineziologije, Sveučilištu Primorska gdje pod mentorstvom Dr. Shawnda A. Morrsion i Dr. Boštjan Šimunič provodim dvije studije:

(i) *Razvoj metode za ugotavljanje akutne dehidracije in vpliv na izabrane fiziološke parametre. Raziskovalno poročilo*. Fundacija za Šport, Dunajska cesta, 51, 1000 Ljubljana, Slovenija, [broj projekta RR-14-442].

(ii) *Pouzdanost novog TMG senzora (M-val) pri detekciji elektro-mehaničke efikasnosti m. soleus,* [broj projekta L5-5550].

Na datum 25. svibnja 2016. godine izabran sam u suradničko zvanje asistenta pri Sveučilištu u Splitu, Kineziološki Fakultet, Zavod za biomedicinu i antropologiju, Split, Republika Hrvatska izborna polja (3.01. Temeljne medicinske znanosti i 5.10. Kineziologija) pri doc.dr.sc. Vladimir Ivančev. Član sam znanstvenog udruženja Mreže mladih istraživača Republike Hrvatske. Iskustvo u sportskoj praksi podrazumijeva ulogu kondicijskog trenera u olimpijskom i profesionalnom boksu u razdoblju od 2013-2016. godine. Taj stručni rad rezultirao je s dva nacionalna prvaka, ali i profesionalnim prvakom Europe po WBO verziji.

**Dosadašnji objavljeni radovi u Thompson & Reuters bazama:**

Zubac, D. & Šimunič B. 2016. Skeletal muscle contraction time and tone decreased after 8 weeks of plyometric training. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, (e-pub ahead of print). DOI:

Zubac, D., Antelj, T., Olujic, D., Ivancev, V., & Morrison, S. A. 2016. Fluid balance and hydration assessment during the weight-stable preparation phase in elite youth boxers. *Journal of Sports Sciences*, (e-pub ahead of print). DOI: 10.1080/02640414.2016.1184302

Zubac, D., Marusic, U., Karninčić, H. 2016. Hydration status assessment techniques and their applicability in combat sports: a literature review. *Strength and Conditioning Journal*, 38 (4) 80-89.

Zubac, D., Karninčić, H., & Zaja, M. 2016. Hydration status assessment among elite youth amateur boxers. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 56 (6) 731-736.