Učinak ronjenja s komprimiranim zrakom na biljege funkcije i integriteta kardiovaskularnoga sustava

Žarak, Marko

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:378480

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

MARKO ŽARAK

UČINAK RONJENJA S KOMPRIMIRANIM ZRAKOM NA BILJEGE FUNKCIJE I INTEGRITETA KARDIOVASKULARNOGA SUSTAVA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

MARKO ŽARAK

EFFECT OF SCUBA DIVING ON CARDIOVASCULAR SYSTEM FUNCTION AND INTEGRITY BIOMARKERS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2021



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

MARKO ŽARAK

UČINAK RONJENJA S KOMPRIMIRANIM ZRAKOM NA BILJEGE FUNKCIJE I INTEGRITETA KARDIOVASKULARNOGA SUSTAVA

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr. sc. Jerka Dumić, red. prof.

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

MARKO ŽARAK

EFFECT OF SCUBA DIVING ON CARDIOVASCULAR SYSTEM FUNCTION AND INTEGRITY BIOMARKERS

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Professor Jerka Dumić, Ph.D.

Zagreb, 2021

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

Ovaj je doktorski rad izrađen pod voditeljstvom prof. dr. sc. Jerke Dumić, u sklopu Sveučilišnoga poslijediplomskog doktorskog studija Farmaceutsko-biokemijske znanosti pri Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Izražavam veliku zahvalnost svojoj mentorici prof. dr. sc. Jerki Dumić na svim nesebičnim znanstvenim, stručnim i životnim savjetima, poticanju, podršci i pomoći, ali i na iskazanom povjerenju kroz sve faze stručnog i znanstvenog usavršavanja. Od profesora s najvećim autoritetom tijekom studiranja, preko mentorstva na diplomskom radu i prvih koraka u znanosti, do životnog mentorstva i bezuvjetnog prijateljstva za cijeli život.

Hvala dr. sc. Antoniji Perović i Marini Njire Bratičević na pomoći pri prikupljanju uzoraka. Antoniji posebno hvala na svim stručnim i znanstvenim savjetima te podršci i pomoći pri izradi doktorskog rada.

Veliko hvala cjelokupnom osoblju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava, a posebice kolegicama mr. sc. Marceli Živković na kontinuiranom poticanju, Brankici Šimac na razumijevanju, prijateljskim savjetima i pomoći pri izradi doktorskog rada te Marini Tomičević. Marina, od kolegice na fakultetu, preko trnja na poslu, postala si vrlo brzo iskrena prijateljica, puna podrške, razumijevanja i vjere u moj uspjeh. Činiš me boljom osobom i jačim čovjekom u svakom smislu te riječi i na tome sam ti posebno zahvalan.

Kažu da je u životu teško naći osobu koja se može nazvati pravim prijateljem. Osobu koja je uvijek spremna slušati, pomoći i stati uz tebe. Izgleda da sam ja bio te sreće. Jelena, hvala ti na apsolutno bezuvjetnoj podršci. Hvala ti što si sa mnom dijelila sve trenutke moje radosti i tuge, sve moje uspone i padove. Hvala ti na prijateljstvu, hvala ti što si uvijek tu.

Najveće i najiskrenije hvala svim mojim najbližima, a posebno mami, tati i sestri.
Ovaj uspjeh posvećujem vama.

SAŽETAK

Rekreacijsko ronjenje s komprimiranim plinskim smjesama (engl. *self-contained underwater breathing apparatus*, SCUBA) poseban je oblik tjelesne aktivnosti, koja zbog specifičnih uvjeta okoline izaziva stresni odgovor organizma. Dosadašnje su studije djelovanja SCUBA ronjenja na ljudski organizam uočile različite učinke na kardiovaskularni sustav (KVS), no molekularna pozadina tih učinaka još uvijek nije u potpunosti razjašnjena. Cilj je ovog istraživanja bio pridonijeti razumijevanju promjena kardiovaskularnog, mišićnog i imunosnog sustava izazvanih rekreacijskim SCUBA ronjenjem na molekularnoj razini praćenjem specifičnih biokemijskih biljega. U tu je svrhu jedna skupina ronilaca (N=16) izvela 1 neovisan (30 min, 30 m), a druga skupina (N=14) 5 susljednih zarona (jednom tjedno, 30 min, 20-30 m), obje nakon najmanje 5 mjeseci neronjenja, kako bi se procijenio učinak jednokratnog SCUBA ronjenja, odnosno njegov kumulativni učinak. Plazmatske koncentracije Gal-3, hs-TnI, NT-proBNP, mioglobina, hs-CRP, IL-6, VEGF i ET-1, serumske koncentracije CRP, CK, CK-MB i LD te ukupan broj leukocita određeni su prije i nakon zarona u obje studije, a u studiji s jednim zaronom i 3 i 6 sati nakon zarona. U studiji učinka jednokratnog zarona uočeni su statistički značajni porasti konc. Gal-3, hs-TnI, NT-proBNP, mioglobina i VEGF te pad konc. ET-1 odmah nakon ronjenja u odnosu na vrijednosti prije ronjenja, a konc. hs-CRP se nisu značajno mijenjale. Vršne koncentracije, uz povratak na bazalne vrijednosti 6 sati nakon ronjenja, za mioglobin i VEGF uočene su odmah nakon zarona, a za Gal-3 3 sata nakon zarona. Konc. hs-TnI i NT-proBNP kontinuirano su rasle tijekom cijelog perioda praćenja. Nakon inicijalnog pada, konc. ET-1 je počela rasti 3 sata nakon zarona, no do 6. sata nije dostigla svoju bazalnu vrijednost. U studiji sa susljednim zaronima potvrđene su sve prethodno uočene promjene koncentracija mjerene odmah nakon ronjenja, a uočeni kumulativni učinak na kardiovaskularni i mišićni sustav očitovao se kontinuiranim padom konc. Gal-3, hs-TnI, mioglobina i VEGF te porastom konc. NT-proBNP, IL-6 i ET-1 kroz promatrani period praćenja od mjesec dana. Utvrđena je i klinička značajnost promjena hs-TnI, Gal-3, NT-proBNP i mioglobina koje se događaju unutar fizioloških mehanizama prilagodbe organizma rekreacijskom SCUBA ronjenju. Zaključno, jednokratno rekreacijsko SCUBA ronjenje, nakon 5 mjeseci dugog perioda neronjenja, uzrokuje neželjene, ali reverzibilne promjene, koje uključuju blago oštećenje srčanog mišića, narušavanje integriteta membrane skeletnog mišića te snažnu aktivaciju vaskularnog endotela, dok se pri opetovanom ronjenju (jednom tjedno tijekom mjesec dana) pokreću mehanizmi prilagodbe, čime se neželjeni učinci ronjenja ublažavaju.

Ključne riječi: SCUBA ronjenje, kardiovaskularni sustav, adaptacijski mehanizmi, biomarkeri

SUMMARY

Background: Recreational SCUBA (self-contained underwater breathing apparatus) diving is a special form of physical activity, which due to specific environmental conditions, triggers a stress response of the organism. Previous studies on the effects of SCUBA diving on the human organism have revealed different effects on cardiovascular system (CVS), but molecular mechanisms that lead to these changes remain unclear. The aim of this study was to contribute to the understanding of molecular background of (pato)physiological changes in cardiovascular, muscular, and immune system, caused by recreational SCUBA (rSCUBA) diving by monitoring specific biochemical markers.

Methods: For this purpose, one group of divers (N=16) performed 1 independent dive, while another group (N=14) performed 5 dives in a series, both after 5 months long non-diving period, to evaluate the effect of single-dive and repeated-dives on CVS, respectively. In the single-dive effect study, blood samples were collected in 4 time-points: immediately before (A_0) and after (A_1) the dive, and 3 (A_2) and 6 (A_3) hours after. In cumulative effect study divers preformed 5 consecutive dives (one per week), and blood samples were collected in 6 time-points: immediately before (K_{1-1}) and after (K_{1-2}) the 1st dive, immediately before (K_{2-1}) and after (K_{2-2}) the 3rd dive, and immediately before (K_{3-1}) and after (K_{3-2}) the 5th dive. Gal-3, hs-TnI, NT-proBNP, myoglobin, hs-CRP, IL-6 VEGF, and ET-1 plasma concentrations, CRP, CK, CK-MB, and LD serum concentrations as well as total leukocyte count were determined using appropriate analytical methods. It was hypothesized that rSCUBA diving causes changes in concentration of selected parameters, due to molecular and cellular processes that a part of organism's response and adaptation to the specific environmental conditions.

Results: In the single-dive effect study, statistically significant increases in NT-proBNP, hs-TnI, VEGF, myoglobin, and Gal-3 plasma concentrations were detected immediately after the dive compared with pre-dive concentrations. A statistically significant decrease in ET-1 conc. noticed immediately after the dive, was followed by an increase 3 h after diving. It continued to rise up to 6 h after the dive, but it did not reach its initial pre-dive value. After the initial increase, hs-TnI and NT-proBNP conc. continued to rise during the whole recovery period (from A_0 to A_3). Myoglobin, VEGF, and Gal-3 conc. returned to their initial values 6 h after the dive, whereas the peak values of myoglobin and VEGF were noticed immediately after the dive, and of Gal-3 3 h after the dive. No change in hs-CRP plasma concentration was observed after the dive. Clinically significant changes (difference higher than calculated RCV) in hs-TnI and NT-proBNP conc. during the recovery period (A_2, A_3) as compared to the pre-dive period (A_0)

were observed. Although statistically significant, there was no clinically significant difference for hs-NT-proBNP and hs-TnI between A_0 and A_1. Gal-3 conc. was clinically significantly higher in its peak value (A_2) as compared to the pre-dive value (A_0). There was also clinically significant increase in hs-TnI conc. and decrease in myoglobin conc. 6 hours (A_3) after the dive as compared to the post-dive value (A_1).

In the repeated-dives effect study the first dive induced statistically significant changes in concentrations of majority biomarkers, but not in total leukocyte count, CRP, hs-CRP, CK-MB, and LD. Myoglobin, hs-TnI, NT-proBNP, VEGF, Gal-3, IL-6, and CK values significantly increased, while ET-1 conc. decreased immediately after the first dive. The third and fifth dives caused the same significant changes in all biomarkers, including the increase in total leukocyte count, CRP, hs-CRP, CK-MB, and LD values after the dive. There were also significant changes in all biomarkers' values if comparing the pre-dive 3 (K_{2-1}) and 5 (K_{3-1}) values to the pre-dive 1 (K_{1-1}) values; hs-CRP, IL-6, NT-proBNP, and ET-1 values increased significantly with each preformed dive, while myoglobin, hs-TnI, VEGF, and Gal-3 values decreased. If comparing all post-dive values (K_{1-2}, K_{2-2}, K_{3-2}), only ET-1 did not changed significantly.

Conclusions: Changes in hs-TnI, NT-proBNP, Gal-3, myoglobin, ET-1, and VEGF conc. observed in the single-dive study suggest that rSCUBA diving (30 m, 30 min) triggers adverse but reversible changes in cardiovascular function and integrity. Although majority of the processes underlying those consequences (*e.g.* cell damage and stretch, changed cell membrane permeability, ROS production) are fundamentally pathological, their scope and strength do not reach an extent that is sufficient to cause permanent damage or disruption of basic homeostatic functions of the particular tissue. However, under challenging environmental conditions, stress forces organisms to adapt to the rapidly changing surroundings. In the repeated-dives effect study, we showed that repeatedly performed rSCUBA diving (five dives, one per week) triggers activation of an adaptive response of the cardiovascular, muscular, and immune system, which was reflected in changes in the specific biomarkers. No clinically relevant impairment of any observed systems was noticed, but all measured biomarkers showed different dynamics of change with repeatedly performed rSCUBA diving. Therefore, it would be interesting to monitor dynamics of changes in these biomarkers with rSCUBA diving performed repeatedly over a longer period of time, thus providing an opportunity either to confirm the observed adaptive response or to disclose possible adverse effects.

Key words: SCUBA diving, cardiovascular system, adaptational mechanisms, biomarkers

SADRŽAJ

1 UVOD ... 1
1.1. RONJENJE UZ POMOĆ AUTONOMNOG RONILAČKOG UREĐAJA ZA DISANJE (SCUBA) ... 3
1.2. FIZIOLOŠKE PROMJENE ORGANIZMA TIJEKOM RONJENJA ... 5
1.2.1. Učinak imerzije tijekom ronjenja na funkciju srca ... 5
1.2.2. Učinak imerzije tijekom ronjenja na raspodjelu tjelesnih tekućina ... 5
1.2.3. Učinak imerzije tijekom ronjenja na promjene u protoku krvi ... 6
1.2.4. Učinak spola i dobi na odgovor organizma na imerziju tijekom ronjenja ... 6
1.2.5. Učinak imerzije tijekom ronjenja na bubreg i neuroendokrini regulatorni sustav ... 6
1.2.6. Učinak imerzije na ravnotežu plinova (kisik, ugljikov dioksid, dušik) ... 8
1.2.7. Učinak temperature vode na organizam prilikom ronjenja ... 9
1.3. PATOFIZIOLOŠKE POSLJEDICE RONJENJA ... 11
1.3.1. Imerzijom uzrokovani edem pluća ... 11
1.3.2. Dekompresijska bolest ... 11
1.4. UČINAK TJELESNE AKTIVNOSTI NA BIOMARKERE U KRVI ... 12
1.4.1. Biomarkeri srčanog oštećenja i rastezanja ... 12
1.4.2. Biomarkeri integriteta membrane miocita ... 16
1.4.3. Biomarkeri aktivnosti vaskularnog endotela ... 19
1.4.4. Biomarkeri upale ... 22
1.5. UČINAK RONJENJA NA BIOMARKERE KARDIOVASKULARNOG SUSTAVA ... 24
2 OBRAZLOŽENJE TEME ... 30
3 ISPITANICI I METODE ... 33
3.1. ISPITANICI ... 34
3.2. EKSPERIMENTALNI ZARONI ... 35
3.3. UZORKOVANJE KRVI I IZDVAJANJE PLAZME I SERUMA ... 36
3.4. VREMENSKE TOČKE UZORKOVANJA KRVI ... 36
3.5. METODE ODREĐIVANJA BIOMARKERA ... 37
3.6. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA ... 38
4 REZULTATI ... 40
4.1. OSNOVNE KARATKERISTIKE RONILACA ... 41
4.2. UČINAK SCUBA RONJENJA NA KARDIOVASKULARNE, MIŠIĆNE I IMUNOSNE BIOMARKERE ... 41
4.2.1. Studija procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja ... 41
4.2.2. Studija procjene kumulativnog učinka SCUBA ronjenja ... 43
4.3. PROCJENA UČINKA SCUBA RONJENJA NA SRČANE MIOCITE MJERENJEM BIOMARKERA SRČANOG OŠTEĆENJA I RASTEZANJA ... 45
4.3.1. Studija procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja na biomarkere srčanog oštećenja i rastezanja (hs-TnI, NT-proBNP, hs-CRP) ... 45
4.3.2. Studija procjene učinka opetovanog SCUBA ronjenja na biomarkere srčanog oštećenja i rastezanja (hs-TnI, NT-proBNP, hs-CRP i CK-MB) ... 47

4.4. UČINAK SCUBA RONJENJA NA INTEGRITET MEMBRANE MIOCITA 50
4.4.1. Studija procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja na biomarkere integriteta membrane miocita (mioglobin, galektin-3) 50
4.4.2. Studija procjene kumulativnog učinka SCUBA ronjenja na biomarkere integriteta membrane miocita (mioglobin, galektin-3, LD i CK) 51
4.5. UČINAK RONJENJA NA AKTIVNOST VASKULARNOG ENDOTELA 54
4.5.1.Studija procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja na biomarkere aktivnosti vaskularnog endotela (endotelin-1 i VEGF) 54
4.5.2. Studija procjene kumulativnog učinka SCUBA ronjenja na biomarkere aktivnosti vaskularnog endotela (endotelin-1 i VEGF) 55
4.6. UČINAK RONJENJA NA IMUNOSNI SUSTAV MJERENJEM BIOMARKERA UPALE 57
4.6.1. Studija procjene kumulativnog učinka SCUBA ronjenja ne biomarkere upale (broj leukocita, CRP i interleukin-6) 57
4.7. KLINIČKA ZNAČAJNOST PROMJENE BIOMARKERA 59
4.7.1. Studija procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja 60
4.7.2. Studija procjene kumulativnog učinka SCUBA ronjenja 61
4.8. KORELACIJSKE ANALIZE 62
5 RASPRAVA 64
5.1. STUDIJA UČINKA JEDNOKRATNOG SCUBA RONJENJA 65
5.2. STUDIJA KUMULATIVNOG UČINKA SCUBA RONJENJA 69
5.3. INTERPRETACIJA REZULTATA PREMA KLINIČKOJ ZNAČAJNOSTI 73
5.4. OGRANIČENJA STUDIJE 75
6 ZAKLJUČCI 77
7 POPIS LITERATURE 79
8 POPIS KRATICA 101
9 ŽIVOTOPIS 105
10 PRILOG 110

1 UVOD

Voda prekriva gotovo 70% površine Zemlje. Premda je život na Zemlji započeo upravo u oceanima, milijunima godina kasnije, uslijed evolucijske prilagodbe, došlo je do značajnih fizioloških promjena koje su omogućile boravak organizama na kopnu, ali koje su istovremeno većini kopnenih životinja i čovjeku uskratile dugotrajniji boravak pod vodom. Ipak, od prapovijesti su čovjekov život i djelatnosti vezani za vodu, no duži boravak i aktivnosti pod vodom predstavljaju napor za ljudski organizam, a u slučaju dugotrajnije izloženosti mogući su negativni učinci. Naime, nemogućnost održavanja homeostaze i prilagodbe uvjetima vodenog okoliša (organizma samog ili uz pomoć opreme) može dovesti do značajnih ozljeda (barotrauma srednjeg uha), pobola (edem pluća, dekompresijska bolest), pa čak i smrti.

Zbog specifičnih fizikalnih karakteristika vode (gustoća, pritisak i toplinski kapacitet) kao i okolišnih čimbenika (povišeni hidrostatski tlak, temperatura) boravak pod vodom za ljudski organizam predstavlja značajan izazov, koji se u najvećoj mjeri reflektira adaptivnim promjenama u respiratornom, kardiovaskularnom, mišićnom, koštanom i središnjem živčanom sustavu te mehanizmima regulacije tjelesne temperature. Ovisno o vrsti aktivnosti (plivanje, ronjenje) te dubini i trajanju boravka u vodenom okolišu, osim fizioloških mehanizama prilagodbe, moguć je razvoj patoloških i toksičnih stanja, kako zbog utjecaja okoliša (snižena temperatura vode) tako i zbog neophodne primjene opreme za boravak pod vodom (disanje komprimiranih plinova pod povišenim tlakom, hiperoksija, imerzija tijela).

Ronjenje predstavlja svaki boravak ljudskog organizma ispod vodene površine uz korištenje adekvatne opreme. Upravo ga se zbog uvjeta u kojima se odvija, a ne samog tjelesnog napora kojeg je potrebno uložiti, često svrstava u ekstremne sportove. Popularnosti i globalizaciji različitih oblika ronjenja prethodio je prije svega razvoj sofisticirane ronilačke opreme, standardizacija ronilačkih protokola i razumijevanje fiziologije ljudskog organizma pod vodom. Premda su dosadašnja znanstvena istraživanja prepoznala brojne pozitivne učinke redovite i umjerene tjelesne aktivnosti u održavanju zdravlja organizma, pokazano je da pojedinačni ili kontinuirani intenzivni tjelesni napori, poput ronjenja, mogu uzrokovati značajnu aktivaciju stresnog odgovora organizma koji može imati i štetne posljedice.

Ronjenje s primjenom autonomnog ronilačkog uređaja za disanje (engl. *Self-Contained Underwater Breathing Apparatus*, SCUBA), za razliku od ronjenja na dah ili plutajući površinom vode uz pomoć disalice, karakterizirano je pojačanim tjelesnim naporom zbog izloženosti tijela posebnim fizikalnim uvjetima, poput disanja komprimiranog zraka ili drugih plinskih smjesa pri povišenom tlaku. Pojačana fizička aktivnost koja je kod SCUBA ronjenja dodatno izražena zbog težine ronilačke opreme i povećanog otpora kretanju pod vodom,

zajedno s učinkom imerzije i niske temperature okoliša, izaziva stresni odgovor, prije svega respiratornog, kardiovaskularnog i lokomotornog sustava. Dosadašnje spoznaje o utjecaju ronjenja na ove i ostale organske sustave temelje se uglavnom na praćenju kliničkih znakova i simptoma, dok je razumijevanje molekularnih procesa kao i poznavanje promjena specifičnih biokemijskih parametara nedostatno, štoviše neke su osnovne informacije još uvijek nepoznate.

1.1. RONJENJE UZ POMOĆ AUTONOMNOG RONILAČKOG UREĐAJA ZA DISANJE (SCUBA)

Povijest SCUBA ronjenja usko je povezana s razvojem opreme koja se koristi prilikom njegovog izvođenja. Premda se ne može sa sigurnošću utvrditi kada je ronjenje na dubine veće od par metara prvi puta prakticirano, postoje dokazi koji upućuju da je to bilo 5000 godina prije Krista. Prva su ronjenja bila na dah, a provođena su s ciljem eksploatacije bisera i spužvi na dubinama ne većim od 30 m i ne dulje od 2 min (1). Kasnije se razvio oblik vojnog ronjenja koje je svoj vrhunac dostiglo u velikim pomorskim bitkama u razdoblju 1800. – 400. godine prije Krista. Prvi konkretan dokaz primitivnog oblika ronjenja s opremom predstavlja asirski reljef na kojem je prikazan muškarac koji pliva pod vodom udišući zrak iz velikih kožnih vreća, a koji datira iz 885. godine prije Krista, dok je prvi autentičan zapis o ronjenju s opremom pronađen u rukopisu grčkog povjesničara Herodota iz 450. godine prije Krista (2).

Prva ideja o razvoju neovisnog podvodnog ronilačkog aparata koji bi zamijenio dotadašnje ronilačko zvono dizajnirano 1535. godine (Guiglielmo de Lorena), zabilježena je 1680. godine izumom talijanskog znanstvenika Borellija. Godine 1837. Augustus Siebe konstruirao je tzv. ronilačku kacigu u koju se zrak kompresorom dopremao s površine vode. Prvu zadovoljavajuću ronilačku opremu razvio je francuski dvojac Benoit Rouquayrol i Auguste Denayrouze 1863. godine, ali uz značajan nedostatak adekvatnih visokotlačnih kompresora i cilindara, zbog čega se zrak i dalje morao dopremati cijevima s površine vode. Godine 1878. Henry Fleus razvija prvi SCUBA aparat zatvorenog tipa koji je iz izdahnutog zraka filtrirao ugljikov dioksid te ga tako činio ponovno adekvatnim za udisanje. Tom su opremom ronioci u kasnom 19. stoljeću mogli dosezati dubine od 50 m, ali uz značajan razvoj dekompresijske bolesti koju je prvi opisao francuski znanstvenik Paul Bert (1).

Prvi samostalni podvodni aparat za disanje komprimiranog plina otvorenog tipa u uvjetima povišenog hidrostatskog tlaka konstruirali su 1943. Emilie Gagnan i Jacques-Yves Cousteau. Moderni SCUBA aparat koji se koristi danas (visokotlačni regulator na cilindru plina

i crijevo koje doprema plin na ventil u ustima) dizajnirao je australski inženjer Ted Eldred početkom 50-ih godina prošlog stoljeća (1).

Komercijalno ronjenje razvija se tijekom 19. i 20. stoljeća i uključuje razvoj prvih autonomnih aparata za disanje pod vodom i standardiziran pristup razvoju ronilačkih protokola. Suvremeni se oblici ronjenja po svojoj namjeni mogu podijeliti na amatersko i profesionalno ronjenje, odnosno na sportsko ili rekreacijsko i tehničko ronjenje s obzirom na potrebnu obuku, iskustvo, uvjete zarona (dubina) i korištenu opremu za ronjenje. Profesionalno ronjenje podrazumijeva obavljanje plaćenih poslovnih ili vojnih zadataka pod vodom koji se mogu odvijati u uvjetima rekreacijskog ili tehničkog ronjenja. Međutim, najčešći oblik ronjenja predstavlja rekreacijsko ili sportsko ronjenje koje, sukladno europskoj (EN 14153-2) i međunarodnoj normi (ISO 24801-2) te Svjetskom udruženju za podvodne aktivnosti (fra. *Confédération Mondiale des Activités Subaquatiques*, CMAS; engl. *World Underwater Federation*, WUF), predstavlja ronjenje ograničeno na dubine do 40 metara uz korištenje isključivo komprimiranog zraka ili nitroxa (plinske smjese kisika i dušika, gdje udio kisika ne prelazi 40%) uz izravan, vertikalni pristup površini i postupno izranjanje bez dekompresijskog zaustavljanja (3). Prema istim smjernicama, tehničkim se ronjenjem smatra svaki oblik ronjenja koji nadilazi normalne limite rekreacijskog ili sportskog ronjenja, a podrazumijeva aktivnosti koje uključuju jednu ili više sljedećih karakteristika: ronjenje na dubini većoj od 40 metara, obavezno dekompresijsko zaustavljanje, zabranjen vertikalni pristup površini ili korištenje više različitih smjesa komprimiranih plinova tijekom jednog zarona (3, 4). Primjena smjesa plinova poput trimixa (kisik, dušik, helij) i helioxa (kisik, helij) omogućava dublje zarone i duže zadržavanje pod vodom s obzirom na to da sadrže niži postotak kisika i dušika u odnosu na zrak.

S rastućom popularnosti rekreacijskog ronjenja kao jedinstvene tjelesne aktivnosti u zadnjem desetljeću, s više od 90.000 aktivnih kvalificiranih ronilaca u Ujedinjenom Kraljevstvu i 3.500.000 u Sjedinjenim Američkim Državama (5) javlja se i potreba za boljim razumijevanjem osnovnih fizioloških mehanizama prilagodbe organizma uvjetima podvodnog okoliša.

1.2. FIZIOLOŠKE PROMJENE ORGANIZMA TIJEKOM RONJENJA

1.2.1. Učinak imerzije tijekom ronjenja na funkciju srca

Uronjenost ili imerzija ljudskog tijela u vodu, djelovanjem hidrostatskog tlaka vode i kompresijom venskih odjeljaka perifernih dijelova tijela uzrokuje premještanje krvi prema središnjem torakalnom području uzrokujući povećanje centralnog venskog tlaka (6). Intratorakalno povećanje volumena krvi povećava: 1. volumen na kraju dijastole, 2. udarni volumen i 3. srčani minutni volumen (7).

Rastezanje srčanog atrija te povećanje arterijskog pulsnog tlaka pobudit će intratorakalne baroreceptore koji detektiraju rastezanje i aktivirati srčano-endokrino-bubrežnu os (natriuretski hormon) te uzrokovati diurezu (8). Uzrok povećanju volumena plazme je i transkapilarni pomak izvanstanične tekućine u krv uslijed utjecaja hidrostatskog tlaka okoline koji smanjuje i kapacitet venskog perifernog odjeljka te dodatno uzrokuje pomak krvi prema toraksu (9). Uz to, autotransfuzija, koja se događa prvenstveno iz kapilara nogu, dodatno povećava volumen krvne plazme te smanjuje njezin koloidno-osmotski tlak (10). Pomak tekućine događa se i iz samih stanica pri čemu je uloga bubrega osigurati pojačano lučenje tekućine kako bi se smanjilo povećanje volumena plazme, a time i dodatno srčano opterećenje (11).

1.2.2. Učinak imerzije tijekom ronjenja na raspodjelu tjelesnih tekućina

Volumen plazme se na početku ronjenja povećava za 7% što je rezultat djelovanja hidrostatskog tlaka vode na organizam koji uzrokuje povećanje tlaka u tkivima iznad hidrostatskog tlaka u kapilarama uzrokujući kapilarnu reapsorpciju tekućine (8). Kako se povećava dubina ronjenja, tako linearno rastu tlakovi u tkivu, kapilarama i centralnom venskom odjeljku. S obzirom na to da se osmolarnost plazme ne mijenja, dolazi do hemodilucije i pada koloidno-osmotskog tlaka plazme. Međutim, nema promjene u volumenu intersticijske tekućine, kao ni značajnije promjene protoka tekućine kroz limfni sustav. Dokaz da se volumen plazme najviše povećava pomakom tekućine iz stanica jest povećanje plazmatske koncentracije aminokiselina i kalijevih (K^+) iona (11). Kompenzacijski mehanizam bubrežnog odgovora dovoljan je za održavanje normalne homeostaze kardiovaskularnog sustava samo ako imerzija ne traje dulje od 12 sati (12). Prosječno povećanje srčanog minutnog volumena tijekom ronjenja iznosi 32 – 62%. U tom rasponu ne dolazi do promjene srednjeg arterijskog tlaka jer se smanjuje ukupni periferni otpor krvnih žila (6, 11).

1.2.3. Učinak imerzije tijekom ronjenja na promjene u protoku krvi

Sistemska potrošnja kisika (O_2) ne mijenja se tijekom ronjenja. To znači da će, uslijed pojačanog protoka, dostava kisika nadilaziti stvarne metaboličke potrebe tkiva. U normalnim bi uvjetima došlo do autoregulacije protoka koji bi odgovarao metaboličkim potrebama tkiva (6). Međutim, u uvjetima ronjenja proces autoregulacije je modificiran jer dolazi do sustavnog povećanja protoka krvi (13). Uslijed pojačanog rada srca i pluća, dolazi do povećanja protoka krvi kroz vanjske međurebrene mišiće i srčani mišić (13). Povećava se protok krvi kroz kožu i potkožno masno tkivo. Protok kroz bubrege ostaje nepromijenjen. Međutim, protok krvi kroz crijeva, jetru, gušteraču i slezenu raste. Tijekom daljnjeg ronjenja visceralni protoci padaju na predimerzijsku razinu i povećani srčani minutni volumen se kompenzira preraspodjelom protoka na nerespiratorne skeletne mišiće (14).

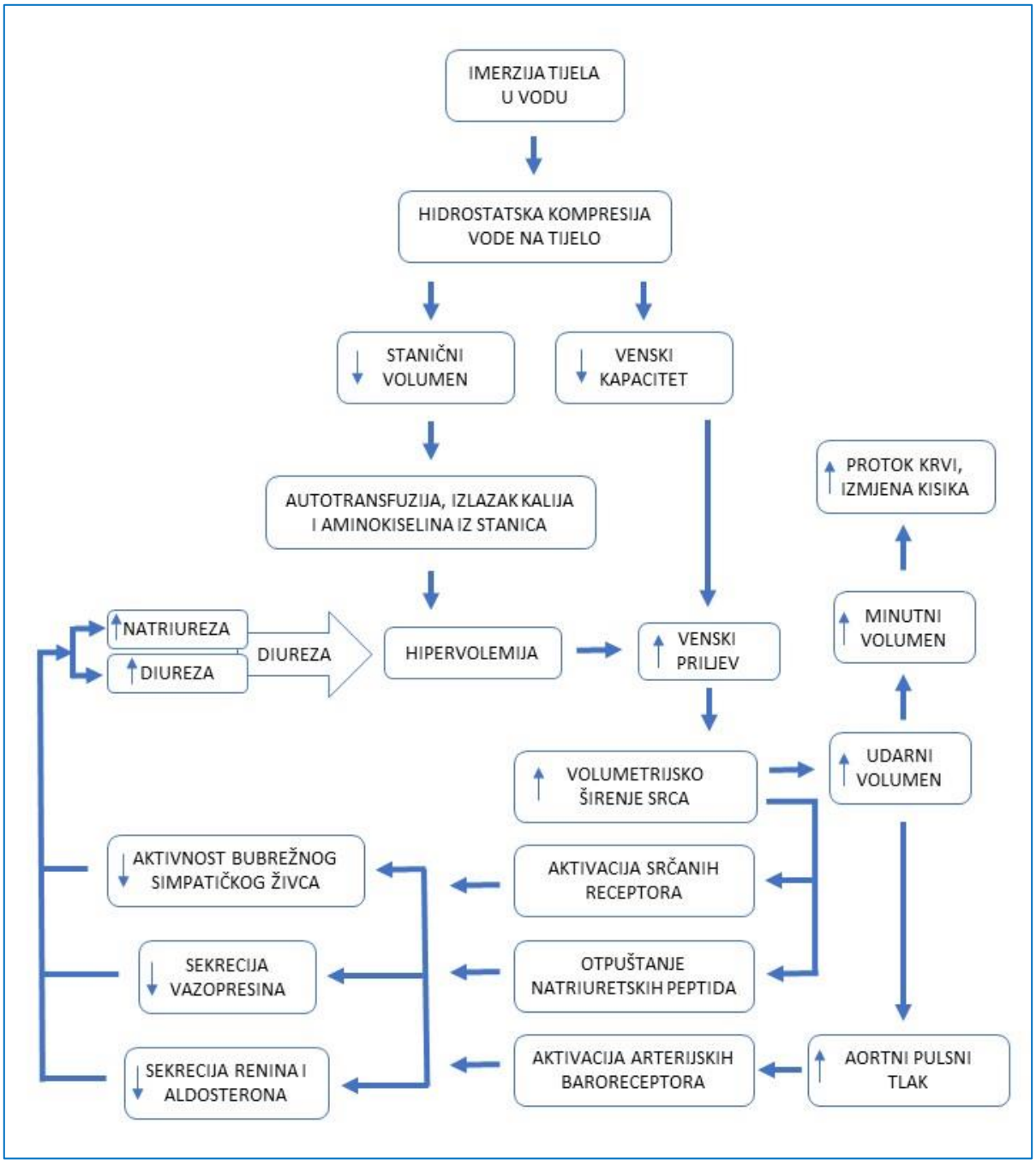
1.2.4. Učinak spola i dobi na odgovor organizma na imerziju tijekom ronjenja

Unatoč fiziološkim razlikama i razlikama u veličini tijela, ne postoji razlika u kardiovaskularnoj i bubrežnoj prilagodbi organizma imerziji s obzirom na spol, pa se opisane prilagodbe organizma jednako odnose na muškarce i žene (15). Premda utjecaj dobi na odgovor organizma na izazove ronjenja zahtjeva podrobnija i sustavnija istraživanja, dokazano je da povećanje srčanog minutnog volumena pada starenjem (16).

1.2.5. Učinak imerzije tijekom ronjenja na bubreg i neuroendokrini regulatorni sustav

Imerzija u normalno hidriranih ljudi izaziva diurezu, natriurezu, kaliurezu i povećava klirens slobodne vode (6), ali ne učinkom na glomerularnu filtraciju već promjenom tubularnih mehanizama. Povećani klirens slobodne vode odvija se uslijed pada plazmatske koncentracije vazopresina (17) čija je koncentracija u uvjetima imerzije primarno regulirana arterijskim baroreceptorima i srčanim mehanoreceptorima (12), a ne osmolarnosti plazme. Imerzija uzrokuje i pad plazmatske aktivnosti renina i aldosterona (18). Međutim, diureza i natriureza prisutni su još 40 min nakon imerzije i odvijaju se prenaglo da bi bili primarno ovisni o supresiji sekrecije aldosterona. Širenje atrija uzrokuje otpuštanje atrijskog natriuretskog peptida (ANP) koji djeluje pozitivno na diurezu, natriurezu, vazodilataciju te pomak tekućine iz vaskularnih odjeljaka. Imerzija uzrokuje naglo povišenje koncentracije ANP u plazmi (12, 19) koji djeluje više sati, kao i bubrežni odgovor koji traje 2 – 4 sata nakon imerzije (11, 20). Uz jednaki protok krvi kroz bubreg tijekom imerzije, čini se da najveći utjecaj na promjenu bubrežne funkcije te posljedično lučenje vode i natrija (18) ima inhibicija simpatičke aktivnosti (21) putem

mehaničkog rastezanja atrija i/ili aktivacije arterijskih baroreceptora. Sažetak svih učinaka imerzije na ljudski organizam prikazan je na Slici 1.



Slika 1. Sažetak cirkulacijskih, bubrežnih i neurohormonalnih odgovora organizma u imerziji. Preuzeto i prilagođeno prema Pendergast i sur. (7).

Središnja ekspanzija volumena i povišeni srčani minutni volumen posljedica su kompresije venskih odjeljaka i autotransfuzije. Porast srčanog minutnog volumena koje se događa zbog imerzije toliko je jak da nadilazi energetske i metaboličke potrebe organizma u mirovanju, ali i tijekom vježbanja. Aktivacija kardiovaskularnih mehanoreceptora i pojačano izlučivanje atrijskog natriuretskog peptida aktivira niz neurohormonalnih mehanizama koji potiču izlučivanje natrija i vode smanjujući hipervolemiju i prilagođavajući protok krvi i izmjenu kisika. Najsnažniji mehanizam djelovanja na bubrege ostvaruje simpatički živčani sustav. Ostali hormonski odgovori, poput izravne osjetljivosti bubrega na natriuretske peptide, dodatno modificiraju primarni bubrežni neurohormonalni odgovor na imerziju tijela.

1.2.6. Učinak imerzije na ravnotežu plinova (kisik, ugljikov dioksid, dušik)

Suprotno boravku na visokim nadmorskim visinama, hipoksija nije problem tijekom imerzije s opremom za disanje s obzirom na to da hidrostatski tlak ujedno povisuje i parcijalni tlak kisika (pO_2). Međutim, povišeni pO_2 uzrokuje stanje tkivne hiperoksije koja može imati toksične učinke na organizam (22), posebice na respiratorni (23) i živčani sustav (24). Adaptacijski su mehanizmi prilagodbe hiperoksiji ograničeni, s obzirom na to da se radi o umjetno izazvanom stanju (povišeni hidrostatski tlak vode, barokomore), suprotno hipoksiji za koju je organizam razvio brojne kompenzacijske mehanizme. Čini se da su periferna vazokonstrikcija i umjereni pad srčanog minutnog volumena fiziološki mehanizmi kojima se smanjuje unutarstanični pO_2 (23) čime dolazi do prilagodbe stanju hiperoksije. Na razini stanice, kemijske reakcije posredovane antioksidacijskim enzimima reduciraju količinu nastalog superoksida i vezanih produkata (reaktivnih kisikovih spojeva) (23). Međutim, važno je napomenuti da su mehanizmi prilagodbe hiperoksiji ograničeni te da toksičnost kisika predstavlja potencijalno značajan rizik boravka pod vodom (22) ili tijekom drugih hiperoksičnih stanja (23, 24).

Alveolarna ventilacija u zdravih je osoba precizno regulirana kako bi održavala arterijski parcijalni tlak ugljikovog dioksida (pCO_2) na otprilike 40 mmHg (25). Tijekom ronjenja se najčešće događa retencija CO_2 uzrokovana spontanom ili samovoljnom hipoventilacijom (radi uštede plina za disanje) ili nemogućnošću ubrzanja disanja uslijed slabih ili umornih respiratornih mišića. Ronjenjem prouzročena retencija CO_2 može primarno uzrokovati stanje ugljične narkoze (26) i konvulzije (27) ili sekundarno pojačati toksičnost kisika u središnjem živčanom sustavu uz razvoj dušične narkoze (26). Mehanizmi retencije CO_2 nisu u potpunosti razjašnjeni. Jedan od glavnih uzroka hipoventilacije tijekom ronjenja najvjerojatnije je smanjena osjetljivost respiracijskog sustava na porast koncentracije CO_2 (26) ili pak komorbiditet vezan uz aktivnost respiratornih mišića. Nedavna istraživanja pokazala su da ciljano vježbanje respiratornih mišića može prevenirati oštećenje respiratorne funkcije u više od 85% slučajeva (28), normalizirati respiracijsku osjetljivost na CO_2 (29) te pojačati izdržljivost ronilaca (30) i podvodnu tjelesnu aktivnost (28, 30) te smanjiti retenciju CO_2 (29).

Povišenje parcijalnog tlaka dušika (N_2), uz povišeni pO_2, predstavlja najveći rizik razvoja toksičnih djelovanja inertnih plinova zbog kompresije uzrokovane hidrostatskim tlakom vode. Ukoliko se tijekom dekompresije za vrijeme tehničkog ronjenja, tijekom izranjanja, inertni plinovi (poput N_2) ne eliminiraju spontano procesom plućne perfuzije, može doći do formiranja mjehurića plina u tkivima i krvi i razvoja dekompresijske bolesti (27).

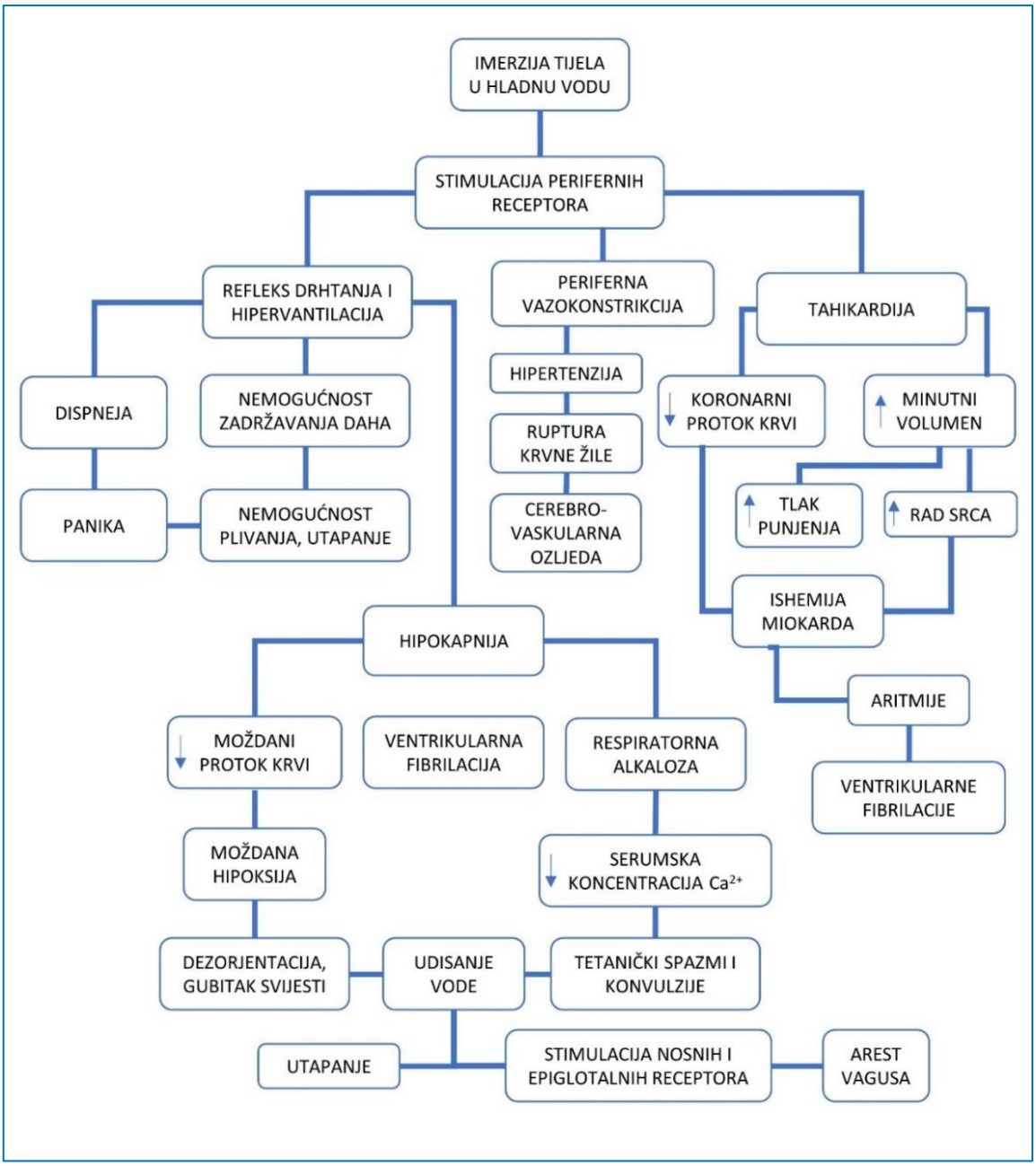
Tijekom kompresije uzrokovane hidrostatskim tlakom vode najčešće se smanjuje slobodna perfuzija plinova koja je dodatno narušena selektivnim promjenama srčanog minutnog volumena. Nastajanje mjehurića plina smanjuje se disanjem plinova pod negativnim tlakom tijekom ronjenja ili boravkom u barokomori nakon izranjanja (31). Nedavna su istraživanja pokazala da tjelovježba prije ronjenja značajno smanjuje rizik formiranja mjehurića i razvoja dekompresijske bolesti. Povoljan utjecaj ima i dušikov oksid (NO) (32) čija je neosporna uloga dokazana u smanjenju perfuzije tijekom stresa uzrokovanog hladnoćom (33), povećanju perfuzije plinova tijekom tjelovježbe (34) te eliminaciji N_2 tijekom ronjenja (35). Promjene u perifernoj cirkulaciji vezane uz promjenu temperature vode (36) i zagrijavanje tijela dokazano reduciraju formiranje mjehurića i rizik od razvoja dekompresijske bolesti (37). Na velikim dubinama, gdje se razvija visoki tlak i kompresija, N_2 ima narkotični učinak. Zbog toga je dubina na kojoj se smije udisati smjesa O_2 i N_2 ograničena na 30 do 50 metara (27). Na većim se dubinama preporučuje korištenje nenarkotičnih inertnih plinova poput helija u smjesi s kisikom kao što su trimix (sadrži dušik, kisik i helij) i heliox (sadrži kisik i helij).

1.2.7. Učinak temperature vode na organizam prilikom ronjenja

Većina vodenih površina u svijetu ima temperaturu daleko ispod termoneutralne za ljudski organizam (< 34 – 35°C). To, zbog visoke termalne vodljivosti i kapaciteta vode, može biti uzrok hipotermije. Ronjenje u hladnoj vodi izaziva pojačano premještanje krvi prema prsima uz manje izraženi porast volumena plazme te slični porast udarnog i srčanog minutnog volumena kao prilikom imerzije u termoneutralnoj vodi (36). Sve promjene uzrokovane hladnoćom događaju se uslijed pojačane aktivnosti simpatičkog živčanog sustava (38). U takvim uvjetima dolazi do porasta broja otkucaja srca (36). U hladnoj vodi, kutana vazokonstrikcija uzrokovana je padom temperature kože. Međutim, tek pad tjelesne temperature značajno aktivira simpatikus i uzrokuje daljnju vazokonstrikciju potkožnog tkiva i mišića tijekom aklimatizacije na hladnoću za vrijeme produljenog boravka u hladnoj vodi (39). Uz simpatikus, kao medijator regulacije temperature ističe se NO (40) čija se koncentracija u izdahnutom zraku smanjuje tijekom boravka u hladnoj vodi (33).

Otpor otpuštanju tjelesne topline u hladni okoliš osigurana je slojem potkožnog masnog tkiva i perifernom vazokonstrikcijom (41) koja je regulirana ili centralno ili lokalno putem NO (40). Dodatni odgovor smanjenju temperature kože i tijela je inicijacija drhtanja kako bi se generirala dodatna metabolička toplina (40). Tijekom boravka u hladnoj vodi vazokonstrikcija ne zahvaća isključivo kožu i potkožje, već i mišiće što pridonosi težem podnošenju tjelesnog napora pri hladnoći (36).

Dubina ima značajan učinak na stres uzrokovan niskom temperaturom vode s obzirom na to da je na većim dubinama kompresija uzrokovana hidrostatskim tlakom vode na tijelo veća. To dodano pojačava termalnu provodljivost vode, pa je gubitak topline veći (42). Uočeno je, također, značajno smanjenje kognitivnih sposobnosti ronilaca u hladnoj vodi (43). U adaptacijskom odgovoru organizma na stres uzrokovan hladnom vodom nisu uočene razlike između spolova (44). Studije utjecaja dobi na adaptacijski odgovor organizma u hladnoj vodi do sada još nisu provedene (7). Učinak imerzije tijela u hladnu vodu na kardiovaskularni sustav sažet je na Slici 2.



Slika 2. Kardiovaskularne promjene uzrokovanje imerzijom tijela u hladnu vodu. Preuzeto i prilagođeno prema Pendergast i sur. (7).

1.3. PATOFIZIOLOŠKE POSLJEDICE RONJENJA

1.3.1. Imerzijom uzrokovani edem pluća

Imerzijom uzrokovani edem pluća (engl. *immersion pulmonary edema*, IPE) očituje se simptomima hipoksemije: kašljem, hemoptizom, dispnejom, a javlja se češće kod mlađih, zdravih pojedinaca (45, 46) uključujući i iznimno izvježbane vojne ronioce (47). IPE se najčešće povlači spontano, a samo kod nekih pojedinaca može završiti smrću (48). Liječi se β_2 adrenergičkim agonistima i diureticima. Uzrok IPE najčešće je stres kapilara pluća uzrokovan ubrzanim protokom krvi i povišenim krvnim tlakom (46) uz dodatne čimbenike poput porasta opterećenja ventrikula, povećanja volumena krvi u plućima, hipertenzije pulmonalne arterije i hladne vode (49). Dodatni čimbenici za razvoj IPE jesu disfunkcija lijevog ventrikula (50), akutni koronarni sindrom (51), akutna reverzibilna disfunkcija miokarda (49), hipertenzija i aktivacija simpatikusa (49).

1.3.2. Dekompresijska bolest

Dekompresijska bolest (engl. *decompression illness*, DCI) predstavlja sindrom uzrokovan nakupljanjem mjehurića plina u krvnim žilama ili tkivu prilikom dekompresije, a uslijed disanja komprimiranog plina (52). Razlikujemo dva osnovna mehanizma nastanka DCI. Nedovoljan izlazak plina kroz traheobronhalno stablo uzrokuje hiperekspanziju pluća i rupturu alveola. U tom slučaju alveolarni plin preko intersticija pluća ulazi u medijastinum odakle može ući u vrat, potkožno tkivo i abdomen. Može ući u plućnu kapilarnu krv i arterijsko stablo uzrokujući arterijsku plinsku emboliju (engl. *arterial gas embolism*, AGE), rupturu pleure ili pneumotoraks. Drugi mehanizam podrazumijeva *in situ* formaciju mjehurića zbog supersaturacije tkiva inertnim plinom. *De novo* nastajanje mjehurića moguća je u tkivu oko zglobova, leđnoj moždini i drugim tkivima. Klinički se manifestira kao dekompresijski sindrom (engl. *decompression syndrome*, DCS) (52). Nastali mjehurići ostvaruju svoje učinke mehaničkom distorzijom tkiva (uzrokujući bol) i okluzijom krvne žile (embolije) ili u slučaju DCS oštećenjem endotela, ekstravazacijom plazme, hemokoncentracijom i šokom (52). Javlja se i vazoplegija, stanje endotelne hipoosjetljivosti na vazoaktivne tvari. Uočena je i aktivacija trombocita te adhezija leukocita na endotel krvnih žila (53). Najčešće manifestacije DCI uključuju bol (tipično uz zglobove), paresteziju, slabost, motorne ispade, promjenu mentalnog stanja, mučninu, vrtoglavicu i gubitak koordinacije (52, 54). Simptomi se najčešće javljaju unutar par minuta od izrona ako je u pitanju AGE, odnosno do 24 sata nakon izrona ako je u pitanju DCS (52).

1.4. UČINAK TJELESNE AKTIVNOSTI NA BIOMARKERE U KRVI

Dosadašnja znanstvena istraživanja prepoznala su brojne pozitivne učinke redovite i umjerene tjelesne aktivnosti na održavanje zdravlja organizma (55). Međutim, pojedinačni ili kontinuirani intenzivni tjelesni napori mogu uzrokovati stresni odgovor organizma s mogućim negativnim, pa i fatalnim ishodima (56). S rastućom popularnošću sportova visokog intenziteta tjelesne aktivnosti poput maratona, ultra-maratona, triatlona i dugih biciklističkih utrka (57) nameće se pitanje mogućnosti adaptacije organizma takvom stresu, posebice srčanog, krvožilnog i mišićnog sustava. Najčešća prilagodba kardiovaskularnoga sustava intenzivnom vježbanju poznata je pod nazivom „atletsko srce“ i predstavlja skup fizioloških prilagodbi vježbanju koje uključuju uvećanje srčanih komora, zadebljanje ventrikularnog dijela srčanog mišića te pojačanu parasimpatičku inervaciju srca u mirovanju (58). Navedene promjene najčešće su vezane uz normalnu funkciju lijevog ventrikula. Međutim, ukoliko dođe do znatne hipertrofije lijevog ventrikula, javljaju se promjene u njegovoj funkciji koje su najčešći uzrok iznenadne smrti mladih sportaša (56, 59). Osim na lijevi ventrikul, različiti oblici tjelesne aktivnosti mogu uzrokovati povišenje srčanog ritma (broj otkucaja u minuti), udarnog i minutnog volumena te sistoličkog krvnog tlaka (60).

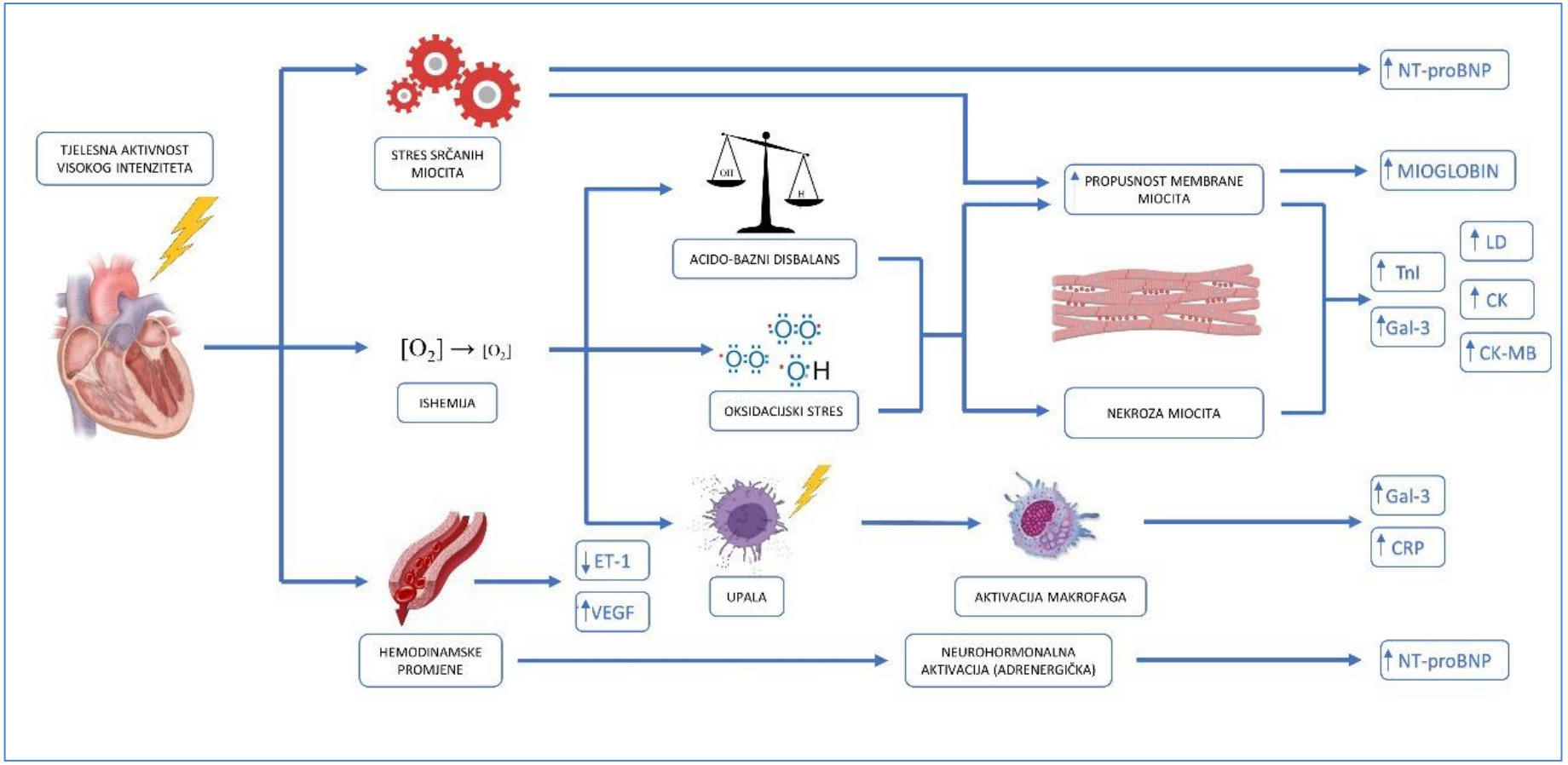
Biomarkeri su endogene supstance otpuštene u cirkulaciju tijekom tjelesne aktivnosti različitim mehanizmima (Slika 3.) nakon stresa ili oštećenja stanice, organa ili organskih sustava. Brojne intenzivne tjelesne aktivnosti, poput maratona i ultramaratona, najčešće uzrokuju promjene u koncentracijama različitih kardiovaskularnih biomarkera. To je, međutim, privremeno i ovisno o intenzitetu i trajanju aktivnosti (61).

1.4.1. Biomarkeri srčanog oštećenja i rastezanja

1.4.1.1. Srčani troponini

Troponini su proteini koji sudjeluju u regulaciji mišićne kontrakcije čineći interakcije aktina s miozinom osjetljivim na citosolnu koncentraciju kalcija (62). Troponinski kompleks čine 3 različita proteina (63): troponin C (TnC) veličine 18 kDa, troponin I (TnI) veličine 21 kDa i troponin T (TnT) veličine 37 kDa.

Prva studija u kojoj je pokazana povezanost tjelesne aktivnosti s otpuštanjem troponina u cirkulaciju provedena je još 1987. godine (64). Međutim, do nedavno nije postojao jasan konsenzus o kojem redu veličine otpuštanja je riječ s obzirom na neujednačenost studija u smislu veličine uzorka, odabira sudionika (samo profesionalni sportaši) i korištenja testova za detekciju troponina. Treba istaknuti da su prve imunokemijske tehnike za određivanje troponina



Slika 3. Potencijalni mehanizmi uključeni u otpuštanje biomarkera u cirkulaciju nakon tjelovježbe. Preuzeto i prilagođeno prema Le Goff i sur. (58).

iz srca imale visoku križnu reaktivnost s troponinima iz skeletnog mišića te da nisu bile prikladne za mjerenje niskih (nanogramskih) koncentracija. Razvojem metoda visoke osjetljivosti i proširenjem studija na veći broj ispitanika omogućen je bolji uvid u sve molekularne mehanizme koji dovode do porasta koncentracije troponina u cirkulaciji nakon tjelesne aktivnosti (65).

Brojne su studije pokušale objasniti vježbanjem uvjetovano otpuštanje troponina u cirkulaciju. Međutim, teško je izvesti općeniti zaključak o kliničkoj značajnosti tog otpuštanja. Najčešće spominjani uzroci uključuju pojačanu propusnost membrane kardiomiocita uzrokovanu mehaničkim stresom, pojačanu proizvodnju reaktivnih kisikovih spojeva ili pak promjenu u kiselinsko-bazičnoj ravnoteži (66 – 70). S obzirom na to da se troponin u cirkulaciju otpušta u dvije faze, logično je zaključiti da je za prvi porast odgovorna promjena u propusnosti membrane miocita iz kojeg se otpušta citosolni troponin. Drugi porast uzrokovan je otpuštanjem troponina vezanog uz troponinski kompleks (57). Neki autori zagovaraju teoriju da je otpuštanje troponina I (TnI) rezultat loma troponinskog kompleksa u miofibrilima te da je izravan dokaz stanične smrti, koja ne uključuje nužno nekrozu (71). Drugi pak, porast koncentracije troponina povezuju s tzv. nekrotskim otočićima koje nije moguće detektirati standardnim kliničkim tehnikama (72).

Uočeno je, nadalje, da intenzitet vježbanja korelira s koncentracijom troponina na način da aktivnosti većeg intenziteta i kraćeg trajanja uzrokuju njegovo najintenzivnije otpuštanje (73). Dodatno, primijećeno je da je otpuštanje troponina manje kod maratonaca koji dulje treniraju, što sugerira prilagodbu srčanog mišića intenzivnoj tjelesnoj aktivnosti s postupnim smanjivanjem ozljede (74). U općoj populaciji koncentracija troponina iznad 99. percentile uz porast ili pad nakon retestiranja indicira dijagnozu akutnog infarkta miokarda (75). Isti scenarij nerijetko se događa i u studijama utjecaja intenzivnih oblika tjelesne aktivnosti na koncentraciju troponina (74, 76).

1.4.1.2. Natriuretski peptidi

Prvi izolirani natriuretski peptid bio je atrijski (engl. *atrial natriuretic peptide,* ANP) kao hormon odgovoran za natriurezu i diurezu koji izlučuje tkivo srčanog atrija (77). B-tip ili moždani tip natriuretskog peptida (engl. *B-type or brain natriuretic peptide,* BNP), kao i C-tip (engl. *C-type natriuretic peptide,* CNP) izolirani su iz tkiva mozga svinje (78). Kasnije su studije pokazale da se sinteza BNP-a u ljudi odvija u kardiomiocitima (79), dok je CNP eksprimiran u središnjem živčanom sustavu i perifernim tkivima (80). ANP i BNP imaju važnu ulogu u regulaciji krvnog tlaka i homeostaze tjelesnih tekućina tako što smanjuju vaskularni

tonus, pojačavaju ekskreciju vode i elektrolita bubrezima i djeluju antifibrozno i antihipertrofično na srce, upravo antagonistički djelovanju renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (RAAS) (81).

Povišene koncentracije ANP-a i BNP-a u cirkulaciji znak su jakog povećanja opterećenja ventrikula tlakom koje je posljedica elongacije miocita uslijed povišenog krvnog tlaka, većeg priljeva krvi, neurohormonske aktivacije, disfunkcije srca, zatajenja srca, akutnog koronarnog sindroma, kardiomiopatije ili drugih sličnih sindroma (83). S obzirom na to da su izravan biljeg disfunkcije srca, određivanje koncentracije BNP-a i njegovog prohormonskog N-terminalnog fragmenta (NT-proBNP) nužno je za dijagnozu, stupnjevanje i praćenja odgovora na terapiju kardiovaskularnih bolesti (83). Plazmatska koncentracija natriuretskih peptida izravno korelira s ozbiljnošću ventrikularne disfunkcije, a njihova se snažna negativna prediktivna vrijednost koristi za isključivanje akutnog ili kroničnog zatajenja srca (82, 84).

Porast plazmatske koncentracije NT-proBNP uočen je u različitim studijama nakon intenzivnog vježbanja (85, 86). Smatra se da je njegov porast nakon tjelesne aktivnosti posljedica aktivacije neuroendokrinog sustava, a ne znak uznapredovale disfunkcije srca (79). Porast koncentracije natriuretskih peptida posljedica je prolazne produkcije/sekrecije iz samog srca, fenomenu koji se temelji na subkliničkoj nekrozi stanica miokarda (85, 87). Moguć je i porast koncentracije NT-proBNP uslijed porasta plazmatskih kateholamina, povećanog mehaničkog djelovanja na ventrikul, promjene u dinamici energije, homeostazi kalcija ili proizvodnje reaktivnih kisikovih spojeva (85, 86). Također je uočeno da iskusniji sportaši imaju najviše koncentracije natriuretskih peptida nakon tjelesne aktivnosti (87).

Korištenjem mišjeg modela uočeno je da natriuretski peptidi imaju i citoprotektivni učinak na način da limitiraju opseg infarkta povišenjem cikličkog gvanozin-monofosfata (cGMP) otvarajući adenozin-trifosfat osjetljive kalijeve kanale (K_{ATP}) na membranama mitohondrija u miocitima (88). Ista hipoteza postavljena je i u istraživanju utjecaja tjelesne aktivnosti na prividno zdrave sportaše gdje porast natriuretskih peptida nije posljedica ozljede miokarda nego zaštita miokarda i regulacija njegovog rasta (89). Unatoč svemu, slično kao i kod troponina, još nije utvrđen stvaran mehanizam otpuštanja natriuretskih peptida, no čini se, ipak, da se radi o fiziološkom, a ne patofiziološkom fenomenu.

1.4.2. Biomarkeri integriteta membrane miocita

1.4.2.1. Mioglobin

Mioglobin je monomerni protein, izgrađen od 153 aminokiseline, niske molekularne mase (18 kDa) (90). Tri su izoforme mioglobina normalno prisutne u ljudskom mišiću. Osim u pohrani i prijenosu kisika (91), mioglobin sudjeluje u mikrovaskularnoj i tkivnoj regulaciji lučenja dušikovog oksida (NO) što dovodi do otpuštanja iona željeza iz molekule hema u mioglobinu. To pak promovira peroksidaciju membrana mitohondrija (92). Već blagi porast koncentracije mioglobina u cirkulaciji narušava funkciju bubrega i ravnotežu elektrolita u zdravih pojedinaca (93). Stanje značajnog oštećenja skeletnih mišića s razvojem nekroze naziva se rabdomioliza. Ona je karakterizirana višestruko povišenom koncentracijom mioglobina i katalitičkom aktivnošću kreatin-kinaze (CK) u serumu i mokraći te visokim rizikom razvoja akutnog bubrežnog zatajenja (94).

Nakon intenzivne tjelesne aktivnosti, mioglobin se u cirkulaciju otpušta kao rezultat razgradnje samog proteina u mišićima (95). Njegova plazmatska koncentracija nakon vježbanja raste unutar 30 min (96), a povišenom može ostati tijekom sljedećih 5 dana, najvjerojatnije zbog laganog upalnog procesa u samom mišiću (97). Aktivnost CK i koncentracija mioglobina koreliraju s upalom koja se očituje neutrofilnim odgovorom kao dijelom odgovora mišićnog tkiva na stres (98). Stoga se mioglobin može smatrati korisnim biomarkerom za praćenje učinkovitosti rada i prilagodbe mišićnog tkiva vježbanju (99).

1.4.2.2. Galektin-3 (Gal-3)

Galektin-3 (Gal-3) je protein iz obitelji galektina, molekulske mase 29-32 kDa, kodiran genom *LGALS3* na kromosomu 14. Galektini su lektini koji specifično prepoznaju i vežu β-galaktozidne ostatke putem evolucijski konzervirane domene (engl. *carbohydrate recognition domain*, CRD) veličine 130 aminokiselinskih ostataka (100). Gal-3 je ubikvitarno eksprimiran u brojnim tkivima u ljudskom organizmu; od imunosnih stanica (makrofagi, monociti, neutrofili, eozinofili, bazofili, Langerhansove stanice, dendritične stanice, mastociti) i senzornih neurona, do različitih vrsta epitelnih i endotelnih stanica (101). Tkiva s najvećom ekspresijom su pluća, gušterača, želudac, crijeva, jajnici, maternica i nadbubrežne žlijezde. Određeni stimulansi mogu potaknuti povećanu ekspresiju i u drugim stanicama ili tkivima poput limfocita, srca i jetre (102).

Gal-3 je uključen u velik broj fizioloških i patofizioloških mehanizama, uključujući imunosne i upalne reakcije. Pretpostavlja se da u patofiziologiji srca Gal-3 sudjeluje u

"mehanizmu preživljavanja miokarda" nakon ishemije, a potvrđeno je da je on vrlo važan čimbenik u srčanom remodeliranju nakon infarkta miokarda (103). U općoj su populaciji visoke koncentracije Gal-3 indikator loše prognoze i mortaliteta (100, 104). Smatra se da su u kardiovaskularnoj (pato)fiziologiji, glavni izvor Gal-3 srčani makrofagi koji se aktiviraju tijekom upalnih procesa (100, 104). Kao biomarker, komplementaran je NT-proBNP jer daje informaciju o uzvodnoj (engl. *upstream*) progresiji kardiomiopatije (kao indikator fibroze i remodeliranja srca), dok je NT-proBNP nizvodni (engl. *downstream*) indikator povišenog krvnog tlaka i rastezanja srčanog mišića (rezultat fibroze i remodeliranja). Određivanje konc. Gal-3 u smislu prognoze kardioloških bolesti odobrilo je 2013. godine Američko udruženje za srce (engl. *American Heart Association*, AHA) i Američki kolegij za kardiologiju (engl. *American College of Cardiology*, ACC) (105). Uz navedeno, visoka koncentracija Gal-3 upućuje na povećani rizik smrtnosti i rehospitalizacije za pacijente sa zatajenjem srca (104, 105).

Neke su studije pokazale da dugotrajno sudjelovanje u fizičkim aktivnostima visokog intenziteta uzrokuje fibrozu srčanog mišića koja može biti uzrok srčanih aritmija (106). Stoga se Gal-3, između ostalog, smatra zanimljivim srčanim biomarkerom za kardiovaskularno praćenje sportaša (107). Nekoliko je studija provedeno s ciljem istraživanja povezanosti Gal-3 i sporta, pa je tako uočen značajan porast koncentracije Gal-3 nakon trčanja na 30 km (106), maratona (108) i ultramaratona (91). Porast koncentracije Gal-3 niti u jednoj od navedenih studija nije korelirao sa srčanim troponinima niti NT-proBNP. Nadalje, porast koncentracije Gal-3 veći je kod sportaša nego u općoj populaciji što se pripisuje nedovoljnom vremenu odmora nakon ponavljanih treninga (58). Porast koncentracije Gal-3 obrnuto je proporcionalan intenzitetu treninga, suprotno standardnim biomarkerima upale interleukinu-6 (IL-6) i leukocitima što se pripisuje prilagodbi skeletnih mišića koji smanjuju upalni odgovor (106). Međutim, i dalje ostaje nerazjašnjeno je li za porast koncentracije Gal-3 nakon tjelesne aktivnosti u ljudi odgovoran skeletni mišić (84, 106) ili ona reflektira strukturne srčane anomalije uzrokovane intenzivnim vježbanjem (84). Istraživanje Hättascha i suradnika (106) provedeno na animalnom modelu, dalo je barem donekle odgovor na ovo pitanje jer je pokazalo da ekspresija mRNA Gal-3 značajnije raste u skeletnom nego u srčanom mišiću (98% naprema 20%) kod uvježbanih miševa u odnosu na sedentarne životinje. Time je ovo istraživanje potvrdilo skeletni mišić kao glavni izvor otpuštanja Gal-3 tijekom i nakon vježbanja. Nadalje, povišene koncentracije Gal-3 vrlo se brzo vraćaju na početne vrijednosti nakon završetka aktivnosti, sugerirajući da lučenje ne bi trebalo biti dovoljno da uzrokuje remodeliranje srca i

posljedično fibrozu (58). Istraživanja koja bi potvrdila negativan kardiovaskularni učinak Gal-3 kao posljedicu dugotrajnog bavljenja tjelesnom aktivnošću još nisu provedena.

1.4.2.3. Kreatin-kinaza (CK) i CK-MB izoenzim

Kreatin-kinaza (CK) je dimerni globularni protein sastavljen od dvije podjedinice molekularne mase 43-45 kDa. Katalizira reverzibilnu izmjenu visoko-energijskih fosfatnih veza između fosfokreatina i adenozin-difosfata (ADP) koji nastaju tijekom kontrakcije mišića te tako održava omjer koncentracija adenozin-trifosfata (ATP) i ADP-a u miocitima u ravnoteži. Postoji najmanje 5 izoformi enzima CK: 3 citoplazmatske (CK-MM, CK-MB i CK-BB) i 2 mitohondrijske (nesarkomerna i sarkomerna) (109). Citoplazmatski izoenzimi različito su tkivno rasprostranjeni i marker su različitih tkivnih ozljeda. Izoenzim CK-MM je pronađen u nekoliko domena mišićnih vlakana gdje je potrošnja ATP-a jako visoka te se smatra biomarkerom bolesti skeletnih mišića (110), dok je izoenzim CK-MB vezan uz nekrozu i oštećenje srčanog mišića (111), a izoenzim CK-BB može se naći u cirkulaciji nakon nekih cerebralnih oštećenja (112).

Različiti čimbenici utječu na stupanj aktivnosti enzima CK tijekom i nakon tjelesne aktivnosti. Najviše serumske vrijednosti pronađene su nakon dugotrajnih intenzivnih vježbanja poput ultramaratona (113) i triatlona (114). Svakodnevni trening rezultira trajnim povišenjem serumske katalitičke koncentracije CK (115) čije su bazalne vrijednosti više kod sportaša u odnosu na opću populaciju (116). Međutim, kod profesionalnih sportaša bazalne su vrijednosti ipak, kao i porasti nakon vježbanja, značajno niže u odnosu na rekreativce (117, 118). Vršna katalitička aktivnost, koja može biti i dvostruko veća u odnosu na bazalnu, očekuje se uglavnom unutar 8 sati nakon napornog treninga (119).

1.4.2.4. Laktat-dehidrogenaza (LD)

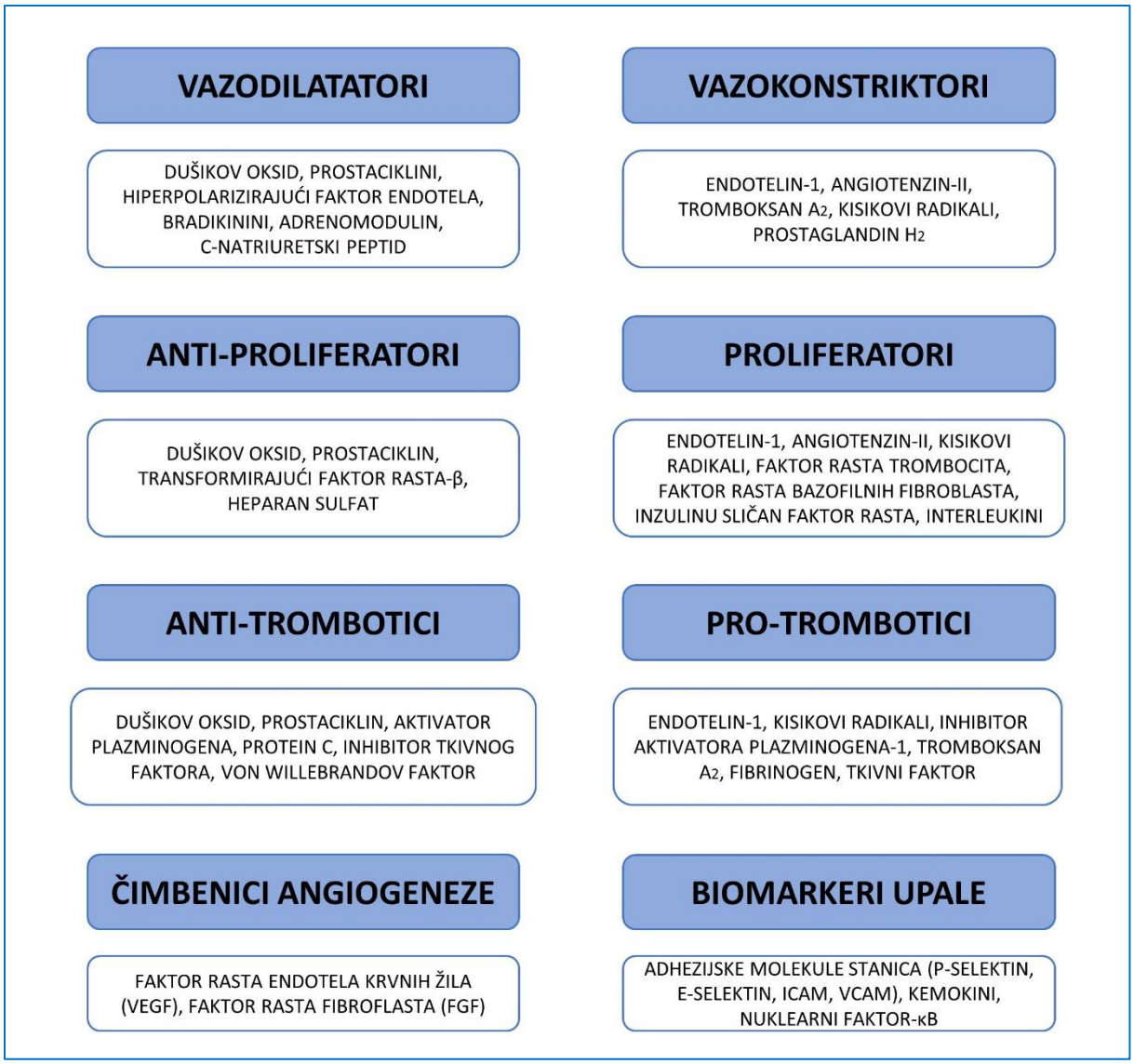
Laktat-dehidrogenaza (LD) enzim je koji reverzibilno katalizira reakciju pretvorbe piruvata u laktat uz istovremenu konverziju reduciranog nikotinamid-adenin-dinukleotida (NADH) u oksidirani NAD^+. U organizmu je normalno prisutno 5 izoenzima (LD1 – LD5) sastavljenih od M (mišićni, engl. *muscle)* i H (srčani, engl. *heart*) polipeptida, tako da je izoenzim LD5 građen od 4 M monomera, izoenzim LD4 od 3 M i 1 H monomera, izoenzim LD3 od 2 M i 2 H monomera, izoenzim LD2 od 1 M i 3 H monomera, a izoenzim LD1 od 4 H monomera (120). Serumska katalitička koncentracija LD-a je nespecifični biomarker oštećenja stanica (121).

Vježbanje značajno povisuje katalitičku koncentraciju LD u serumu (122), a stupanj aktivnosti ovisi o intenzitetu i trajanju tjelesne aktivnosti (123). Primjerice, nakon maratona, aktivnost LD može se i udvostručiti te ostati povišena tijekom naredna 2 tjedna (124). Porast katalitičke koncentracije nakon tjelesne aktivnosti uglavnom se odnosi na ukupni LD, s obzirom na to da nije utvrđena promjena omjera LD1/LD2 (125). Porast vrijednosti izoenzima LD1 nakon vježbanja ne isključuje otpuštanje iz srčanog mišića (126). Otpuštanje enzima LD iz mišićnih stanica vezano je uz promjene propusnosti samih stanica ili njihovog stvarnog mehaničkog oštećenja (127).

1.4.3. Biomarkeri aktivnosti vaskularnog endotela

Vaskularni endotel čine stanice koje oblažu unutarnje površine krvnih žila. Premda se inicijalno smatrao inertnim, statičkim slojem krvožilnog sustava, danas je poznato da je to tkivo s velikim brojem bitnih autokrinih i parakrinih funkcija koje proizvodi mnoštvo vazoaktivnih (konstrikcijskih i dilatacijskih) čimbenika (Slika 4.) koji djeluju na glatke mišićne stanice krvnih žila (128). Endotel je u stanju prepoznati hemodinamičke sile i odgovoriti otpuštanjem vazoaktivnih spojeva koji će održati normalnu vaskularnu homeostazu. Pojam „endotelna funkcija“ predstavlja mnoštvo fizioloških promjena poput regulacije adherencije leukocita, aktivacije trombocita, mitogeneze i aktivacije koagulacijske kaskade. Oštećenje endotela vodi endotelnoj disfunkciji čije posljedice mogu biti tromboza, oksidacija, koagulacija, vaskularna upala, ateroskleroza (129) i kardiovaskularne bolesti (130). Rizik razvoja kardiovaskularnih bolesti ovisit će o promjenama u sastavu vazoaktivnih tvari od kojih se najviše ističu prostaglandini i endotelin-1 (ET-1). Navedene promjene aktivirat će veliki broj prooksidacijskih procesa koji reduciraju bioraspoloživost dušikovog oksida (NO) (131).

Tijekom tjelovježbe endotel je konstantno izložen hemodinamičkim silama koje variraju u magnitudi i usmjerenju te su ovisne o anatomskim karakteristikama krvne žile. Djelovanje navedenih sila smatra se važnim aktivatorom endotela što za posljedicu ima remodeliranje, ali i formiranje novih krvnih žila (neovaskularizaciju) (132) primarno pod utjecajem faktora rasta endotela krvnih žila (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) (133).



Slika 4. Autokrine i parakrine tvari koje se otpuštaju iz endotela. Izrađeno prema tekstu iz Haram i sur. (128).

1.4.3.1. Endotelin-1 (ET-1)

Endotelin-1 (ET-1), peptid građen od 21 aminokiseline, pleiotropna je molekula najpoznatija po svojoj vazokonstrikcijskoj aktivnosti (134). Uz endoteline ET-2 i ET-3 čini porodicu koju karakteriziraju 2 disulfidna mosta i 6 konzerviranih aminokiselinskih ostataka na C kraju molekule. Ljudski ET-1 sintetizira se kao pre-pro-polipeptid, a ključnu ulogu u kidanju i aktivaciji molekule ima endotelin-konvertirajući enzim (ECE-1) (135). Osim u endotelu, eksprimiran je u leukocitima, stanicama glatkih mišića krvnih žila, srčanim miocitima i astrocitima (136). Poticaj za lučenje ET-1, osim mehaničke stimulacije endotela, mogu biti i različiti hormoni i proupalni citokini (137). Proizvodnja ET-1 inhibirana je dušikovim oksidom, prostaciklinima i atrijskim natriuretskim peptidom (ANP) (138). ET-1 proizvode i izlučuju u najvećem opsegu stanice vaskularnog endotela. Uz potentni vazokonstrikcijski, ima i

proliferacijski učinak na stanice glatkih mišića krvnih žila (139), stimulira kontrakciju miokarda i rast srčanih miocita, regulira otpuštanje drugih vazoaktivnih tvari (140) te može kontrolirati upalni odgovor promovirajući adheziju i migraciju neutrofila te stimulirajući produkciju proupalnih citokina (141).

Redovita tjelesna aktivnost značajno smanjuje plazmatsku koncentraciju ET-1 u općoj populaciji (142). Tijekom tjelesne aktivnosti dolazi do interakcije signalnih puteva ET-1 s NO (143) tako da je smanjenje koncentracije ET-1 uvjetovano pojačanom produkcijom NO (144). Međutim, kontinuirana tjelovježba uzrokovat će porast bazalnih vrijednosti ET-1 kako bi se aktiviralo njegovo proliferacijsko djelovanje na glatke mišiće krvnih žila (143, 145). Nadalje, s obzirom na to da tjelovježba povisuje krvni tlak te je moguće da se krvna žila na nekim mjestima stanji, porast ET-1 predstavlja adaptaciju organizma kako bi se proliferacijom zaštitio endotel od naglih promjena krvnog tlaka i stanjivanja krvnih žila (146). Uzimajući u obzir sve navedeno, promjene u koncentraciji ET-1 tijekom i nakon tjelovježbe smatraju se fiziološkom adaptacijom organizma (146).

1.4.3.2. Faktor rasta endotela krvnih žila (VEGF)

Faktor rasta endotela krvnih žila (VEGF ili VEGF-A), poznat i pod imenom faktor propusnosti krvnih žila (engl. *vascular permeability factor*, VPF), snažan je medijator angiogeneze i vaskulogeneze u fetalnom i odraslom razdoblju (147). Tijekom embriogeneze VEGF regulira proliferaciju, migraciju i preživljenje endotelnih stanica (147) određujući tako gustoću i debljinu krvne žile. Po rođenju, VEGF sudjeluje u održavanju integriteta endotelnih stanica kao potentni mitogen za mikro- i makrovaskularne endotelne stanice. Član je porodice trombocitnih faktora rasta (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF) koja je karakterizirana prisutnošću 8 konzerviranih cisteinskih ostataka koji tvore cistinski čvor i formiraju antiparalelni disulfidno vezani dimer molekule VEGF-a (148).

Angiogeneza, koja čini sastavni dio multifaktorske adaptacije endotela tjelovježbi, u najvećoj je mjeri posredovana aktivnošću VEGF-a i faktora rasta fibroblasta (engl. *fibroblast growth factor*, FGF) (133). VEGF izravno utječe na promjene sastava izvanstaničnog matriksa i proliferaciju endotelnih stanica (148). Tijekom tjelovježbe, neovaskularizacija je najpotrebnija i najizraženija u skeletnom mišiću gdje VEGF ostvaruje svoj agiogenezni učinak (149). To omogućuje mišićnom tkivu da ostvari bolji i brži prijenos kisika između mikrocirkulacije i mitohondrija samog mišića (150). Međutim, adaptacija organizma tjelovježbi vodit će redukciji ekspresije gena za VEGF (mRNA) (148, 151) te smanjenju njegove bazalne koncentracije.

Zaključno, uloga VEGF u adaptaciji organizma na pojačanu tjelesnu aktivnost bitna je u inicijalnoj fazi kada se događa značajna angiogeneza (148).

1.4.4. Biomarkeri upale

Upala je karakterizirana kaskadom staničnih i molekularnih događaja kao odgovor na čimbenike koji narušavaju integritet i homeostazu organizma, kakvim se može smatrati i intenzivna tjelesna aktivnost (152). Upala je ključan dio obrane organizma, održavanja tkivne homeostaze te eliminacije štetnih čimbenika ili oštećenog tkiva (153). Zanimljivo je, međutim, da redovita umjerena tjelesna aktivnost može dugoročno djelovati protuupalno (151, 154). Posljedično, učinci tjelovježbom uzrokovane upale mogu se podijeliti na akutne (za vrijeme i odmah nakon početka bavljenja tjelesnom aktivnošću) i dugoročne (nakon nekog vremena bavljenja tjelesnom aktivnošću ili prestanka bavljenja istom) (155). Neovisno o poticaju, u upali će se aktivirati brojne kompleksne kaskade što se može očitovati promjenom broja perifernih krvnih stanica, aktivnosti granulocita, aktivnosti prirodnih stanica ubojica (engl. *natural killer cells*, NK), proliferaciji limfocita i plazmatskim koncentracijama citokina. Ipak, kakav će biti intenzitet upalnog odgovora ovisi o tipu, intenzitetu i trajanju tjelovježbe, ali i o dobi i kliničkom stanju sudionika (152).

Citokini su topljivi proteini ili glikoproteini koji se proizvode i izlučuju tijekom upale. Sudjeluju u komunikaciji između imunosnih stanica te imunosnih stanica s drugim, neimunosnim stanicama i u regulaciji različitih bioloških procesa (156). Njihova je proizvodnja regulirana vrlo brzo nakon stimulacije, a lučenje može biti prolazno ili produljeno (157). U slučaju tjelesne aktivnosti, proupalni citokini poput faktora nekroze tumora alfa (engl. *tumour necrosis factor*, TNF-α), IL-1β i IL-6 otpuštaju se neposredno nakon tjelesne aktivnosti, da bi kasnije započelo izlučivanje protuupalnih ili regulatornih citokina (IL-4, IL-10, IL-1RA, IL-13) koji stišavaju upalni odgovor (153). Osim citokinima, akutna upalna reakcija praćena je porastom ukupnog broja leukocita na periferiji i povišenjem koncentracije specifičnih proteina akutne faze (158), poput C-reaktivnog proteina (CRP) koji predstavlja biomarker sustavne upale i povezan je s rizikom oboljenja, morbiditetom i mortalitetom od kardiovaskularnih bolesti (157).

1.4.4.1. C-reaktivni protein (CRP)

CRP sintetizira i izlučuje jetra. Mnoštvo je stimulansa koji će uzrokovati porast njegove koncentracije u cirkulaciji: infekcija, trauma, operacija, kronična upalna stanja, umjerena i intenzivna tjelesna aktivnost (159). Studije utjecaja vježbanja na koncentraciju CRP-a započele

su još 1990-tih godina od kada je provedeno više od 15 prospektivnih kliničkih studija. One su utvrdile da koncentracija CRP-a korelira s kratkotrajnim i dugotrajnim smanjenjem mortaliteta te s kardiovaskularnim bolestima, uključujući akutnu i kroničnu ishemijsku bolest srca (160).

Porast koncentracije CRP-a u niskom koncentracijskom rasponu, mjereno metodama s pojačanom osjetljivošću ili visoke osjetljivosti (engl. *high-sensitivity*, hs-CRP), pokazao se kao jak neovisan faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti u budućnosti. Smjernice Američkog udruženja za srce (AHA) i CDC-a (engl. *Center for Disease Control*) svrstavaju pacijente u 3 skupine prema koncentraciji hs-CRP-a: niskog (hs-CRP < 1 mg/L), srednjeg (hs-CRP = 1-3 mg/L) i visokog (hs-CRP > 3 mg/L) rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti u sljedećih 10 godina (161).

Učinak tjelovježbe na sintezu, izlučivanje i dinamiku promjene koncentracije CRP-a i dalje je predmet brojnih rasprava. U pravilu, radi se o porastu koncentracije odmah nakon (162) ili 1 dan nakon (163) tjelesne aktivnosti. Međutim, kako je utvrđen i pad koncentracije CRP-a nakon tjelovježbe (158), nije moguće u potpunosti donijeti zaključak o kakvom je učinku zaista riječ. Između ostalog, pretpostavlja se da je porast koncentracije CRP-a nužan za supresiju sinteze proupalnih citokina u tkivnim makrofagima i indukciju sinteze protuupalnih citokina (163).

1.4.4.2. Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 (IL-6) je pleiotropni citokin koji ima različite imunosne i metaboličke učinke (164). Smatra se proupalnim citokinom koji regulira akutni upalni odgovor. Receptori preko kojih ostvaruje svoje učinke prisutni su na adipocitima, skeletnim miocitima i hepatocitima. Uključen je u patogenezu akutnog koronarnog sindroma putem nekoliko mehanizama: stimulacija produkcije fibrinogena i CRP-a i drugih proteina akutne faze u jetri, stimulacija makrofaga na proizvodnju tkivnog faktora i matriks-metaloproteinaza (MMP), agregacija trombocita, stimulacija proizvodnje adhezijskih molekula, TNF-α i proliferacija vaskularnih stanica glatkih mišića (165).

Intenzivna tjelesna aktivnost praćena je porastom njegove koncentracije i do 100 puta što se smatra povoljnim protuupalnim učinkom tjelesne aktivnosti na organizam (166). Trenutni porast koncentracije nakon tjelovježbe posredovan je transkripcijskom aktivacijom u skeletnim mišićnim vlaknima (167, 168) i masnom tkivu (169, 170). Tijekom tjelesne aktivnosti IL-6 ostvaruje svoje metaboličke učinke ovisne o dostupnosti glikogena u mišiću (167, 168, 171). Redukcija intramuskularnog glikogena pojačava transkripciju IL-6 mRNA u skeletnim

mišićima putem aktivacije AMPK (172) i p38 MAPK (167). IL-6 djeluje i kao signal za otpuštanje glukoze iz jetre kako bi se tijekom tjelovježbe održavala njezina normalna homeostaza (173). Uz to, IL-6 pojačava lipolizu i oksidaciju masnih kiselina u adipocitima (169, 170) kako bi se omogućila dostupnost slobodnih masnih kiselina za proizvodnju energije kada su zalihe glikogena u mišiću niske. Osim mišićnog i masnog tkiva, IL-6 se tijekom tjelovježbe može izlučiti i iz infiltriranih limfocita, neutrofila, monocita i drugih imunosnih stanica te stimulirati produkciju protuupalnih citokina i medijatora poput kortizola, IL-1RA, IL-10 i CRP-a (163). Faktori koji utječu na izvor i količinu izlučenog IL-6 tijekom tjelovježbe uključuju frekvenciju, trajanje i intenzitet tjelesne aktivnosti te status uvježbanosti i količinu mišićne mase (174). Visoke koncentracije IL-6 mišićnog porijekla u pravilu se očekuju tijekom i odmah nakon tjelesne aktivnosti aludirajući na oštećenje samog mišića, dok se IL-6 izlučen iz infiltriranih imunosnih stanica očekuje u kasnijoj fazi tijekom oporavka i regeneracije oštećenog tkiva (174).

1.4.4.3. Ukupan broj leukocita

Leukociti (bijele krvne stanice) dio su imunosnog sustava organizma koje proizvodi koštana srž. Nakon nastanka izlaze u krvotok te se prenose u različita limfoidna tkiva i organe gdje se nastavlja njihovo sazrijevanje. Fundamentalni značaj leukocita je brzi i snažan obrambeni odgovor prema mogućem infektivnom agensu (159).

Tjelesna aktivnost uzrokuje prolaznu leukocitozu (povišeni broj leukocita) koja ovisi o intenzitetu vježbanja, odnosno, jače je izražena kod tjelesne aktivnosti visokog intenziteta i neuvježbanih pojedinaca (152). Povišeni broj leukocita prati se 30 min do 3 sata nakon tjelovježbe, a potom se vraća na bazalne vrijednosti, najčešće unutar 24 sata nakon prestanka tjelesne aktivnosti (175). Porast ukupnog broja leukocita posljedica je rasta broja neutrofila i makrofaga uz pad broja limfocita (176). Općenito, nedostaju studije koje bi detaljnije objasnile promjene u broju leukocita u odnosu na tjelesne aktivnosti različitih intenziteta i trajanja.

1.5. UČINAK RONJENJA NA BIOMARKERE KARDIOVASKULARNOG SUSTAVA

Razumijevanje fiziologije ronjenja zahtjeva razumijevanje fiziologije sporta te prilagodbe kardiovaskularnog sustava uvjetima u kojima se ronjenje kao tjelesna aktivnost odvija. Koliko je to važno, svjedoči niz istraživanja provedenih na profesionalnim i dobro uvježbanim, iskusnim roniocima u kojima je naglasak stavljen na mjerenje kliničkih parametara poput dijastoličkog krvnog tlaka (177, 178), udarnog volumena lijeve klijetke (179), brzine otkucaja srca (180), ejekcijske frakcije lijevog ventrikula (177, 178, 179), krutosti arterija (179,

180), stupnja stvaranja plinskih mjehurića (177 – 180) ili promjenama u ultrazvuku (UZV) (177 – 179) i elektrokardiogramu (EKG) (180) srca prije i nakon ronjenja.

Pregledom literature, uočena je značajna neujednačenost studija utjecaja imerzije tijela na promjene u kardiovaskularnom sustavu, pa se tako studije najčešće bitno razlikuju u: broju sudionika (koji je u pravilu vrlo malen), izvježbanosti ronilaca (najčešće se radi o profesionalnim i vojnim roniocima te instruktorima ronjenja), vrsti zarona (najčešće statička ili dinamička apneja i tehničko SCUBA ronjenje), opetovanosti i razmacima između susljednih zarona (najčešće 3 – 6 dana sa svakodnevnim zaronima, rjeđe jednokratno), provođenju dekompresije, korištenom plinu za disanje (komprimirani zrak, nitrox, trimix), dubini (radi se ili o relativno plitkom rekreacijskom ili značajno dubokom tehničkom ronjenju) i trajanju, dinamici mjerenja kliničkih i laboratorijskih parametara (u pravilu se studije baziraju na mjerenju parametara prije i odmah nakon ronjenja) te metodama za određivanje laboratorijskih parametara koje su najčešće imunokemijske i različitih generacija osjetljivosti što dodatno otežava, odnosno onemogućava usporedbu rezultata.

Zbog svega navedenog, gotovo je nemoguće uspoređivati rezultate studija učinka ronjenja na laboratorijske biomarkere međusobno, prije svega zbog njihovog iznimno ograničenog broja, pa se studije na roniocima najčešće uspoređuju sa studijama tjelesnih aktivnosti visokih i vrlo visokih intenziteta. No, ni ta usporedba nije u potpunosti moguća, jer se ronjenje ipak odvija u uvjetima okoliša koji se ne mogu usporediti s boravkom na kopnu ili u uvjetima s jednakom izloženošću tlaku, ali bez provođenja imerzije. Izvrstan je primjer nesuglasnosti između rezultata studija provedena na roniocima u uvjetima stvarnog ronjenja i nakon boravka u hiperbaričnoj komori, pri čemu nije uočen porast koncentracije NT-proBNP nakon boravka u barokomori, dok je nakon zarona na 10 m dubine uočen pad koncentracije (181).

Prema literaturi, BNP i njegov N-terminalni fragment prohormona, kao biomarkeri srčanog oštećenja i rastezanja, najčešće su mjereni parametri kojima se prate (pato)fiziološke promjene kardiovaskularnog sustava uzrokovane ronjenjem. Uočeni su porasti natriuretskih peptida kod profesionalnih ronilaca odmah nakon SCUBA ronjenja primjenom različitih plinova za disanje, na različitim dubinama i različitim vremenom trajanja (177, 181 – 184) koji se prate do 5 sati nakon ronjenja (181, 182). Međutim, u studijama sa susljednim zaronima u trajanju 4 – 6 dana s razmacima od 24 sata između svakog zarona, nije uočena promjena NT-proBNP, kada su uspoređene sve vrijednosti prije i sve vrijednosti poslije ronjenja (177, 183) što upućuje da nema prilagodbe organizma niti kumulativnog učinka, bilo zbog nedovoljnog

razmaka između zarona bilo zbog utreniranosti sudionika. Statička apneja (185), kao i razvoj DCS i IPE (186) dovest će također do porasta koncentracije NT-proBNP. Međutim, čini se da kod dobro uvježbanih i iskusnih vojnih ronilaca porast BNP nakon jednog zarona nije moguće uočiti (187).

Utvrđeno je da ronjenje uzrokuje također otpuštanje srčanih troponina I i T, ali samo u slučaju razvoja IPE (186, 188). DCS (186) i statička apneja (189, 190) nisu uzrokovale promjene u koncentracijama cTn odmah nakon ronjenja, iako je jedna studija uočila značajan porast visoko-osjetljivog TnI (hs-TnI) 4 sata nakon statičke apneje (185). Jedina do sada provedena studija učinka SCUBA ronjenja na koncentraciju TnI kod dobro uvježbanih i iskusnih vojnih ronilaca nije uočila značajan porast odmah nakon ronjenja (187), kao ni značajan porast koncentracije mioglobina.

Općenito, što se tiče mjerenja biomarkera integriteta membrane miocita, mioglobin i Gal-3 do sada nisu bili predmetom istraživanja, u smislu učinka imerzije na promjenu njihovih koncentracija. Porast mioglobina uočen je u prikazu slučaja gdje je nakon apneje došlo do razvoja nesvjesnog stanja kada je mioglobin porastao 40 i 150 min nakon razvoja simptoma (189), ali nije došlo do porasta TnI niti CK-MB. Statička apneja uzrokovat će porast katalitičke koncentracije CK 4 sata nakon eksperimenta uz pad vrijednosti sljedeće jutro, ali bez povratka na bazalnu vrijednost. Isto istraživanje nije uočilo promjenu katalitičke koncentracije LD (191). Međutim, studija provedena na profesionalnim SCUBA roniocima u uvjetima tehničkog ronjenja (192) utvrdila je značajan porast katalitičke koncentracije LD i CK odmah nakon ronjenja, uz kontinuirani rast do 3 sata nakon ronjenja. Uvjeti rekreacijskog SCUBA ronjenja uzrokovat će značajan porast katalitičke koncentracije CK odmah nakon ronjenja (193), kao i razvoj IPE (188).

Promjena aktivnosti vaskularnog endotela u ovisnosti o ronjenju praćenjem promjene specifičnih biomarkera za sada je najslabije istražena od svih promatranih segmenata adaptacije kardiovaskularnog sustava. Studija učinka rekreacijskog SCUBA ronjenja nije uočila promjenu koncentracije ET-1 nakon ronjenja, kao niti prilagodbu nakon 4 susljedna ronjenja s razmacima od 24 sata između svakog (193). Jedina studija koja je uočila porast VEGF i pad ET-1 odmah nakon ronjenja te vraćanje ET-1 na bazalne vrijednosti, ali ne i VEGF 3 sata nakon ronjenja, provedena je na profesionalnim roniocima i u uvjetima tehničkog ronjenja (192). U istoj je studiji uočen i porast ukupnog broja leukocita 3 sata nakon ronjenja.

Istraživanja utjecaja ronjenja na biomarkere upale te početnu aktivaciju, ali i adaptaciju imunosnog sustava najviše su pratila upravo ukupan broj leukocita te koncentraciju IL-6 i CRP. Uočeno je da je nakon 5 susljednih apneja ukupan broj leukocita značajno porastao nakon 5. apneje i ostao je povišen do 40 min poslije (194). Pokazano je da je tehničko SCUBA ronjenje, koje su u studiji izveli profesionalni ronioci, uzrokovalo porast broja leukocita tek 3 sata nakon ronjenja (195, 192). To je potvrđeno i u studiji na amaterskim roniocima, koji su proveli rekreacijsko ronjenje, u kojoj je porast praćen od 3. do 6. sata nakon ronjenja (196). Međutim, kada su rekreacijsko SCUBA ronjenje izveli certificirani instruktori ronjenja, porast broja leukocita nije uočen (188), kao niti značajna promjena njihovog broja nakon 4 susljedna zarona s 24 sata razmaka između svakog (197). Vojni trening od 44 dana nije uzrokovao značajan porast IL-6 nakon završetka obuke (198), kao niti boravak u suhim uvjetima hiperbarične komore (199). Međutim, tehničko SCUBA ronjenje uzrokovalo je porast koncentracije IL-6 odmah nakon ronjenja kod iskusnih instruktora ronjenja (200), ali i porast mRNA IL-6 izolirane iz neutrofila kod profesionalnih ronioca koji je praćeni do 3. sata nakon ronjenja (201). Porast CRP-a zabilježen je samo u prikazu slučaja iskusnog ronioca nakon razvoja simptoma IPE (202), dok je pad njegove koncentracije zabilježen kod natjecatelja ronjenja na dah nakon statičke apneje (190).

Pregledom literature utvrđeno je da studije u kojima su mjerene koncentracije Gal-3, hs-TnI, hs-CRP, VEGF i mioglobina u više vremenskih točaka nakon jednokratnog i/ili kontinuiranog rekreacijskog ronjenja s komprimiranim zrakom nisu provedene. Detaljan pregled literature prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Pregled literature učinka ronjenja i drugih oblika podvodnih aktivnosti na biomarkere kardiovaskularnog, mišićnog i imunosnog sustava.

AUTOR (GODINA) (referenca)	BROJ RONILACA	TIP RONILACA	VRSTA ZARONA	OPETOVANOST	PROVEDENA DEKOMPRESIJA	KORIŠTENI PLIN	DUBINA (m)	TRAJANJE (min)	BROJ I VREMENA UZORKOVANJA KRVI	REZULTATI MJERENJA
Ersson (2002) (198)	11	profesionalni vojni ronioci	SCUBA	44 dana za redom (1-4/dne)	DA i NE (ovisno o dubini)	KZ, nitrox	3-57	3-48	2 (prije početka i nakon završetka trenažnog procesa)	nema promjene **IL-6** nakon završetka trenažnog procesa u odnosu na vrijednost prije
Sureda (2004) (191)	7	profesionalni ronioci	apneja	60 imerzija u danu	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	3 (prije, 4 h nakon, sljedeće jutro)	↑ **CK** 4h nakon apneje uz pad sljedeće jutro, ali bez povratka na bazalne vrijednosti nema promjene **LD i leukocita** između mjerenja
Baković (2005) (194)	42	18 profesionalnih ronilaca na dah 24 bez iskustva (6 splenektomiranih)	apneja	5 susljednih s razmakom od 2 min	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	8 (prije provođenja apneja, nakon 1., 3. i 5. apneje te 10, 20, 40 i 60 min nakon)	↑ **leukocita** nakon 5. apneje s kontinuiranim porastom do 40 min nakon protokola u obje skupine nema porasta leukocita u skupini splenektomiranih
Gempp (2005) (182)	10	utrenirani vojni ronioci	SCUBA	jednokratno	NE	nije navedeno	10	60	5 (prije zarona, nakon 30, 60, 300 min i nakon 24 h)	↑ **NT-proBNP** nakon 60 i 300 min u odnosu na vrijednost prije zarona
Anderson (2009) (189)	1 pacijent	volonter	apneja odmah ispod površine	nije primjenjivo	n.p.	n.p.	n.p.	10 s	3 (kontrolno, 40 i 150 min nakon)	nema promjene u koncentracijama **troponina T** i **CK-MB,** ↑ koncentracija **Mb** 40 i 150 min nakon u odnosu na vrijednost prije
Grassi (2009) (181)	9	8 profesionalnih 1 iskusni ronilac	SCUBA	jednokratno	DA (5min na 3m)	KZ	10	55	3 (prije zarona, odmah nakon i 5 h nakon)	↑ **NT-proBNP** odmah nakon i 5h nakon u odnosu na vrijednost prije zarona
Sureda (2009) (195)	7	profesionalni ronioci	tehničko SCUBA	jednokratno	DA (5min na 3m)	KZ	40	25	3 (prije, odmah nakon i 3 h nakon izrona)	↑ **leukocita** 3h nakon u odnosu na vrijednosti prije i odmah nakon ronjenja
Madden (2010) (199)	5	volonteri	boravak u hiperbaričnoj komori	jednokratno	DA (simulacija 5min na 6 i 3m dubine)	100% kisik	simulacija 18m dubine	60	2 (prije i odmah nakon izlaska iz hiperbarične komore)	nema promjene **IL-6** nakon boravka u hiperbaričnoj komori
Marinović (2010) (177)	7	iskusni ronioci (Hrvatska jedinica za traganje i spašavanje na moru)	tehničko SCUBA	svaki dan kroz 6 dana za redom	DA	NITROX TRIMIX (svaki dan druga mješavina i drugi sastav)	55-80	65-75	6 (prije i nakon zarona organiziranih 1., 3. i 6. dan)	↑ **NT-proBNP** odmah nakon zarona mjereno 1. i 6. dana u odnosu na vrijednosti mjerene prije zarona istog dana, nema promjene **NT-proBNP** odmah nakon zarona mjereno 3. dan u odnosu na vrijednost mjerenu prije zarona istog dana, nema promjene **NT-proBNP** između 1., 3., i 6. dana u vrijednostima prije i nakon zarona.
Ljubković (2010) (183)	7	certificirani ronioci (Hrvatska jedinica za traganje i spašavanje na moru)	SCUBA	svaki dan kroz 3 dana za redom	DA	TRIMIX (korišten do dna i do 21. metra izrona) NITROX (korišten nakon 21. metra izrona)	63-65	59-83	4 (prije i nakon zarona organiziranih 1. i 3. dan)	↑ **NT-proBNP** odmah nakon zarona mjereno 3. dan u odnosu na vrijednost mjerenu prije zarona istog dana Nema promjene NT-proBNP odmah nakon zarona mjereno 1. dan u odnosu na vrijednost mjerenu prije zarona istog dana, nema promjene NT-proBNP između 1. i 3. dana u vrijednostima prije i nakon zarona
Passino (2011) (184)	12	iskusni ronioci	SCUBA	jednokratno	NE	nije navedeno	15	30	2 (prije i nakon zarona)	↑ **NT-proBNP** odmah nakon u odnosu na vrijednost prije zarona
Sureda (2012) (192)	9	profesionalni ronioci	SCUBA	jednokratno	DA (3min na 6m dubine i 6min na 3m dubine)	KZ	50	35	3 (prije zarona, odmah nakon i 3 h nakon)	↓ **ET-1** odmah nakon u odnosu na vrijednost prije zarona, a 3h nakon se ne vraća na početnu vrijednost, ↑ **VEGF** odmah nakon u odnosu na vrijednost prije zarona, 3h nakon ↓ u odnosu na prethodnu vrijednost ali se ne vraća na početnu, ↑ **Leukocita** 3h nakon izrona u odnosu na vrijednost prije zarona i odmah nakon izrona, ↑ **LD** i **CK** odmah nakon i 3h nakon izrona (kontinuirani rast) u odnosu na vrijednost prije zarona

AUTOR (GODINA) (referenca)	BROJ RONILACA	TIP RONILACA	VRSTA ZARONA	OPETOVANOST	PROVEDENA DEKOMPRESIJA	KORIŠTENI PLIN	DUBINA (m)	TRAJANJE (min)	BROJ I VREMENA UZORKOVANJA KRVI	REZULTATI MJERENJA
Thom (2012) (197)	16	certificirani ronioci	SCUBA	svaki dan kroz 4 dana za redom (dodatno je održan kontrolni zaron 7 mjeseci nakon)	NE	KZ	18	49	6 (prije i nakon zarona organiziranih 1. i 4. dan i prije i nakon kontrolnog zarona)	nema promjene **leukocita** niti nakon jednog provedenog zarona u odnosu na vrijednosti prije zarona, nema promjene **leukocita** ako se gledaju samo sve vrijednosti prije i sve vrijednosti nakon provedenih zarona
Bilopavlović (2013) (193)	16	zdravi ronioci	SCUBA	svaki dan kroz 4 dana za redom (dodatno je održan kontrolni zaron 7 mjeseci nakon)	NE	KZ	18	49	6 (prije i nakon zarona organiziranih 1. i 4. dan i prije i nakon kontrolnog zarona)	nema promjene **ET-1** nakon zarona mjereno 1. i 4. dan u odnosu na vrijednosti mjerene prije zarona istog dana nema promjene **ET-1** između 1. i 4. dana u vrijednostima prije zarona, ↑ **CK** odmah nakon izrona u odnosu na vrijednost prije ronjenja (u kontrolnom zaronu)
Sureda (2014) (201)	9	profesionalni ronioci	tehničko SCUBA	jednokratno	DA (3min na 6m dubine i 6min na 3m dubine)	KZ	50	35	3 (prije zarona, odmah nakon i 3h nakon)	↑ **mRNA IL-6** (izolirana iz neutrofila) odmah nakon u odnosu na vrijednost prije i 3h nakon u odnosu na vrijednost prije i odmah poslije ronjenja
Kjeld (2015) (203)	17	natjecateljski ronioci na dah	apneja, zaron na dah	jednokratno	n.p.	nije primjenjivo	0,8	306±50 s	2 (prije i nakon apneje)	nema promjene **hs-TnT** nakon apneje, ↓ **CRP** nakon apneje
Louge (2016) (186)	31 pacijent	19 IPE 12 DCS	SCUBA	nije navedeno	nije navedeno	KZ	3-59	15-90	po prijemu u hitnu službu	↑↑↑↑ **NT-proBNP** kod IPE, ↑ **NT-proBNP** kod DCS ↑ **hs-TnI** kod IPE, nema promjene **hs-TnI** kod DCS
Perović (2017) (196)	17	amaterski ronioci	SCUBA	jednokratno	NE	KZ	30	30	4 (prije, odmah nakon, 3 i 6 h nakon ronjenja)	↑ **leukocita** 3 i 6h nakon izrona u odnosu na vrijednost prije ronjenja
Bosco (2018) (200)	6	instruktori ronjenja	SCUBA	jednokratno	DA (3min na 5m)	EAN (*enriched air nitrox*)	15	20	2 (prije i nakon ronjenja)	↑ **IL-6** nakon ronjenja
Eichhorn (2018) (185)	17	iskusni (elitni) ronioci na dah	apneja, zaron na dah	jednokratno	n.p.	n.p.	n.p.	297±52 s	4 (prije, odmah nakon, 30min i 4 h nakon apneje)	↑ **NT-proBNP** odmah nakon uz stabilan porast sve do 4h nakon u odnosu na vrijednost prije ↑ **hs-TnI** 4h nakon u odnosu na vrijednost prije
Marlinge (2018) (188)	12 pacijenata	IPE	nije navedeno	nije navedeno	nije navedeno	nije navedeno	5-40	11-24	po prijemu u hitnu službu i 6 h nakon prijema	↑ **hs-TnT** i **CK** 6 h nakon prijema, nema promjene **TnI** 6h nakon prijema, ↓ **BNP** 6h nakon prijema
Morishima (2018) (202)	1 pacijent IPE	iskusni instruktori SCUBA ronjenja	SCUBA	jednokratno	DA (3min na 5m)	nije navedeno	18,7	56	po prijemu u hitnu službu	nema porasta **NT-proBNP** ↑ **CRP** po prijemu
Marlinge (2019) (187)	12	iskusni vojni ronioci	SCUBA	jednokratno	NE	komprimirani zrak	5-40	11-24	2 (prije i nakon zarona)	nema promjene **TnI**, **BNP** i **Mb** nakon u odnosu na vrijednosti prije zarona

IPE – imerzijom uzrokovani plućni edem; DCS – dekompresijska bolest; n.p. – nije primjenjivo; KZ – komprimirani zrak, ↑ - statistički značajan porast, ↓ - statistički značajan pad.

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Rekreacijsko ronjenje s komprimiranim plinskim smjesama, odnosno SCUBA ronjenje, poseban je oblik tjelesne aktivnosti, koja zbog specifičnih uvjeta okoline u kojoj se odvija izaziva stresni odgovor organizma. Premda su dosadašnja znanstvena istraživanja prepoznala brojne pozitivne učinke redovite i umjerene tjelesne aktivnosti za održavanje zdravlja organizma, smatra se da pojedinačni ili kontinuirani intenzivni tjelesni napori, kakvo je i ronjenje samo po sebi, mogu imati negativne učinke, prije svega na kardiovaskularni sustav. Koliko je taj utjecaj velik i značajan, najbolje govore studije provedene na profesionalnim ili dobro uvježbanim roniocima u uvjetima tehničkog ronjenja koje se uglavnom temelje na praćenju promjene raznih kliničkih parametara, dok su studije koje prate dinamiku promjena specifičnih biomarkera nakon rekreacijskog ronjenja vrlo rijetke.

Svrha je ovog rada pridonijeti razumijevanju molekularnih i staničnih mehanizama adaptacijskog odgovora kardiovaskularnog, mišićnog i imunosnog sustava pri rekreacijskom SCUBA ronjenju te ispitati kliničku značajnost promjene odabranih biljega s ciljem njihove preciznije kliničke primjene u slučajevima ronilačkih nesreća.

Osnovna je hipoteza da jednokratno SCUBA ronjenje kod rekreativnih ronioca izaziva promjene plazmatskih koncentracija odabranih biljega uslijed narušavanja integriteta KVS, dok se kod ponavljanog ronjenja uslijed opetovanog izlaganja fiziološkom stresu pokreću molekularni i stanični mehanizmi prilagodbe koji ublažavaju narušavanje integriteta KVS, a time i promjene koncentracija odabranih biljega.

Cilj je rada bio ispitati učinke jednokratnog i opetovanog rekreacijskog SCUBA ronjenja na kardiovaskularni sustav praćenjem koncentracija biljega srčanog oštećenja i rastezanja (hs-TnI, NT-proBNP), integriteta membrane miocita (Gal-3, mioglobin, CK, CK-MB, LD), upale (CRP, hs-CRP, IL-6, broj leukocita) te prilagodbe vaskularnog endotela (ET-1, VEGF).

Kako bi se ostvario zadani cilj provedene su dvije neovisne studije koje su uključivale sljedeće postupke:

U studiji jednokratnog učinka SCUBA ronjenja:

- organiziran je jednokratni eksperimentalni zaron na dubinu do 30 metara u trajanju od 30 minuta u kojem su sudjelovali ronioci koji nisu prethodno ronili barem 5 mjeseci
- uzorci krvi prikupljeni su u 4 vremenske točke: neposredno prije i nakon eksperimentalnog zarona te 3 i 6 sati nakon ronjenja te su u plazmi izmjerene koncentracije biomarkera srčanog oštećenja i rastezanja (hs-TnI, NT-proBNP), integriteta membrane miocita (Gal-3, mioglobin), upale (hs-CRP) te prilagodbe vaskularnog endotela (ET-1, VEGF)

- ispitana je klinička značajnost promjene biomarkera kroz vremenski period od 6 sati nakon ronjenja
- ispitana je povezanost Gal-3 s biljezima srčanog oštećenja i rastezanja (hs-TnI, NT-proBNP) te integriteta membrane miocita (mioglobin)

U studiji kumulativnog učinka SCUBA ronjenja:

- organizirano je 5 susljednih eksperimentalnih zarona, s tjedan dana razmaka između svakog zarona, na dubine 20 – 25 metara (1. zaron) te 30 metara (ostali zaroni) u trajanju od 30 minuta u kojem su sudjelovali ronioci koji nisu ronili barem 5 mjeseci prije početka studije
- uzorci krvi prikupljeni su u 6 vremenskih točaka: neposredno prije i nakon 1., 3. i 5. zarona te je određen ukupan broj leukocita i koncentracije biomarkera srčanog oštećenja i rastezanja (hs-TnI, NT-proBNP), integriteta membrane miocita (Gal-3, mioglobin, CK, CK-MB, LD), upale (CRP, hs-CRP, IL-6) te aktivacije vaskularnog endotela (ET-1, VEGF)
- ispitana je klinička značajnost promjene biomarkera nakon svakog zarona tijekom kojeg su prikupljeni uzorci

3 ISPITANICI I METODE

3.1. ISPITANICI

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 30 rekreativnih ronilaca muškoga spola; 16 ispitanika u studiju procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja te 14 ispitanika u studiju procjene kumulativnoga učinka SCUBA ronjenja. Svi su ispitanici prije provedbe eksperimentalnog dijela bili upoznati sa svrhom i tijekom istraživanja, odnosno objašnjen im je plan eksperimentalnih zarona te važnost pridržavanja svih potrebnih zahtjeva tijekom ronjenja. Istraživanje je provedeno u skladu s Helsinškom deklaracijom, a ispitanici su pisanim pristankom pristali na dobrovoljno sudjelovanje u provedenim studijama. Provedbu istraživanja odobrilo je Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Klasa: 643-02/19-01/02; Ur. broj: 251-62-03-19-12 od 14. ožujka 2019. te Klasa: 643-02/19-01/02; Ur. broj: 251-62-03-19-35 od 17. svibnja 2019.).

Ispitanici su odabrani prema jasno određenim kriterijima uključenja: neprakticiranje ronjenja tijekom zimskog razdoblja u minimalnom vremenskom periodu od 5 mjeseci, važeća medicinska potvrda za ronjenje, indeks tjelesne mase između 20 i 30 kg/m^2, neuzimanje bilo kakvih lijekova 7 dana prije istraživanja te suzdržavanje od vježbanja 48 sati prije svakog zarona. Uz postojanje povijesti bilo kakve kronične bolesti ili značajnijeg pobola unutar 3 mjeseca prije početka istraživanja, kriteriji isključenja bili su profesionalno bavljenje sportom, pušenje te klinički značajno odstupanje u nalazima laboratorijskih pretraga. Važan kriterij isključenja iz studije bio je i razvoj blagih li teških znakova dekompresijske bolesti, nakon provedenih zarona, što nije bio slučaj niti u jednog ispitanika.

Zdravstveni status ispitanika uključenih u studiju procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja procijenjen je sistematskim pregledom koji je proveden od strane liječnika, specijalista baromedicine i pomorske medicine, a obuhvaćao je uzimanje detaljne anamneze, antropometrijska mjerenja, mjerenje krvnog tlaka te laboratorijsku obradu. Procjena zdravstvenog statusa ispitanika u studiji kumulativnog učinka provedena je uvidom u medicinsku dokumentaciju i anamnestičke podatke te provedbom antropometrijskih mjerenja i laboratorijske obrade.

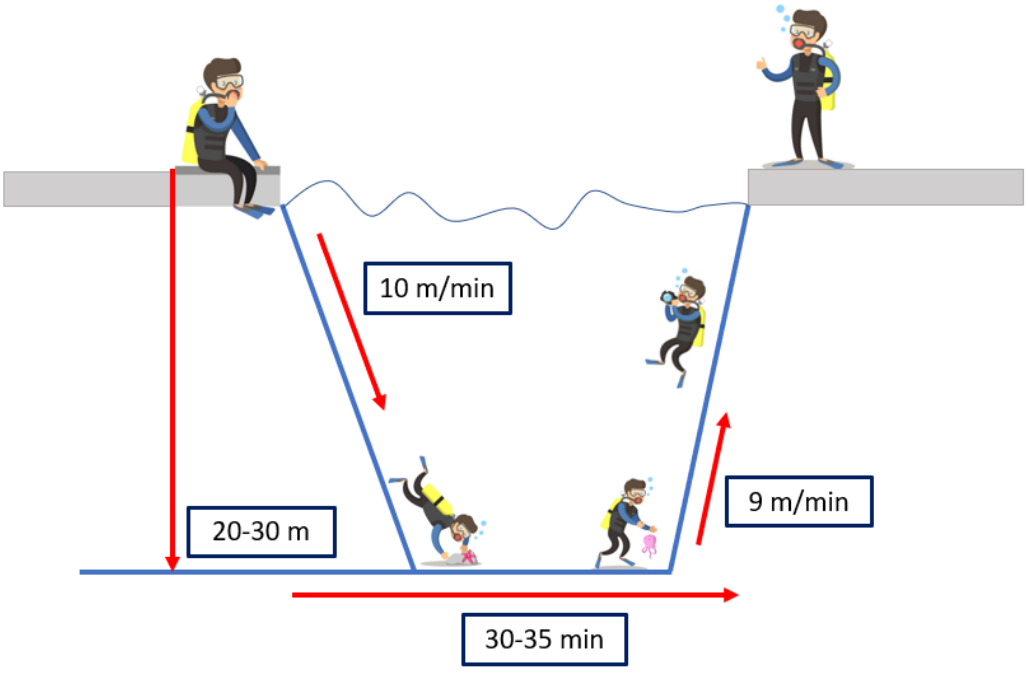
Kada su u obzir uzeti svi kriteriji uključenja i isključenja, pridržavanje dizajna zarona te laboratorijski parametri i sukladnost uzoraka, od početnog broja od 34 ispitanika konačan broj ispitanika sveden je na 30, jer su 4 ispitanika isključena iz druge studije; jedan zbog značajne hipotireoze, jedan zbog izrazite lipemije uzoraka prije i nakon prvog zarona te dva uslijed nepridržavanja zadanog profila zarona.

3.2. EKSPERIMENTALNI ZARONI

Eksperimentalni zaroni obiju studija provedeni su na obali Jadranskog mora pokraj Dubrovnika; studija učinka jednokratnog SCUBA ronjenja u travnju 2016. godine, a studija kumulativnog učinka SCUBA ronjenja tijekom ožujka i travnja 2019. godine.

Profili zarona usklađeni su s ronilačkim algoritmima koji se koriste u rekreacijskom ronjenju (3); ronioci su se pridržavali preporučene brzine zarona i izrona (203) te nisu provodili dekompresijsko zaustavljanje (Slika 5.), ronili su isključivo u skupini, a za disanje su koristili komprimirani zrak. Svi su ronioci bili opremljeni mokrim ronilačkim odijelima te ronilačkim računalima s kojih su preuzeti profili zarona s ciljem analize dubine i trajanja zarona, kao i temperature mora. Temperature zraka u objema studijama kretale su se između 16 i 20 °C, dok je temperatura mora na površini bila između 15 i 17 °C, a na dubini od 30 metara između 13 i 15 °C.

U studiji procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja, ronioci su jednokratno zaronili do 30 metara dubine u trajanju od 30 do 35 minuta, dok su u studiji procjene kumulativnog učinka SCUBA ronjenja to učinili uzastopno 5 puta s minimalnim razmakom od tjedan dana između svakog zarona: prvi zaron bio je na dubinu od 20 metara u trajanju od 30 do 35 minuta, a svaki sljedeći na dubinu od 25 do 30 metara u trajanju od 30 do 35 minuta (Slika 5.).



Slika 5. Shematski prikaz profila zarona.
Maksimalna dubina zarona kretala se između 20 i 30 metara u trajanju 30 do 35 minuta. Maksimalna brzina zarona nije prelazila 10 metara u minuti, kao niti brzina izrona 9 metara u minuti. Ronioci nisu provodili dekompresijsko zaustavljanje.

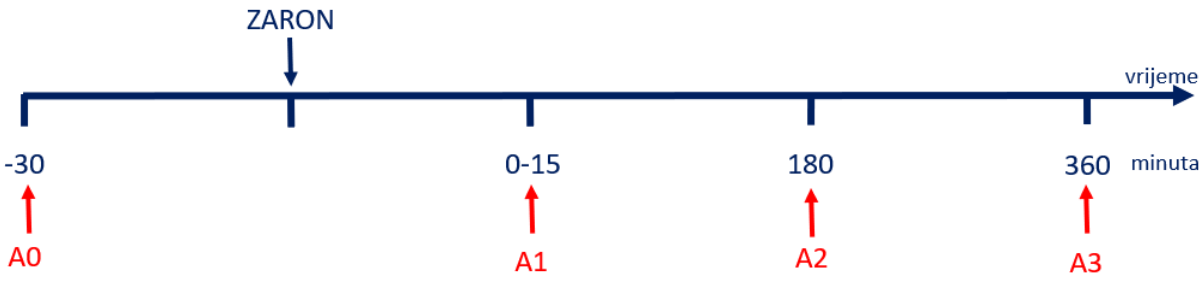
3.3. UZORKOVANJE KRVI I IZDVAJANJE PLAZME I SERUMA

U svim vremenskim točkama venska je krv uzorkovana izravno zatvorenim sustavom u vakuum epruvete s K_2EDTA kao antikoagulansom (za dobivanje plazme) te epruvete s aktivatorom zgrušavanja i gel separatorom (za dobivanje seruma) (Vacuette, Greiner Bio-One GmbH). Uzorkovanje je provelo stručno laboratorijsko osoblje, prema važećim nacionalnim i međunarodnim preporukama za uzorkovanje venske krvi (204).

Svi su uzorci dopremljeni u odgovarajućim hlađenim spremnicima u Odjel za laboratorijsku dijagnostiku Opće bolnice Dubrovnik unutar 30 minuta od uzorkovanja. Plazma i serum dobiveni nakon centrifugiranja 10 minuta pri 2200 *g* (3500 okretaja u minuti), odmah su odvojeni i pohranjeni na -80 °C do provođenja analiza.

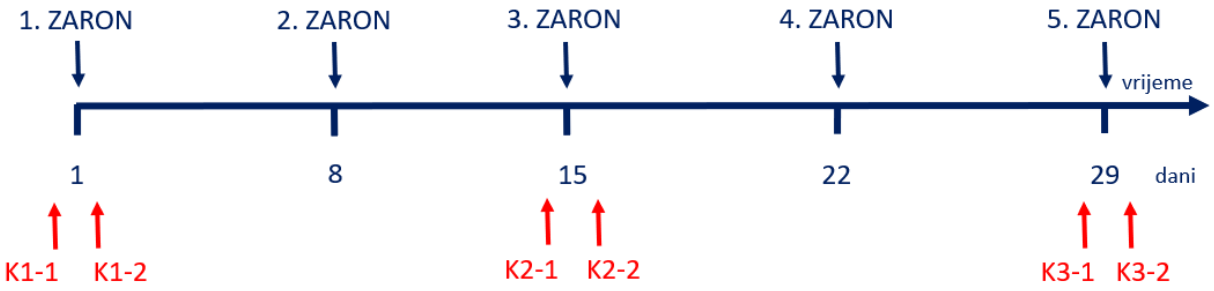
3.4. VREMENSKE TOČKE UZORKOVANJA KRVI

Studija procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja obuhvaćala je četiri vremenske točke uzorkovanja krvi: neposredno prije izvođenja zarona (A_0) između 9:15 h i 9:45 h; neposredno nakon ronjenja (A_1) između 10:45 h i 11:15 h; 3 sata nakon ronjenja (A_2) između 13:45 h i 14:15 h; te 6 sati nakon ronjenja (A_3) između 16:45 h i 17:15 h (Slika 6.).



Slika 6. Vremenske točke uzorkovanja u studiji procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja.

Studija procjene kumulativnog učinka SCUBA ronjenja obuhvaćala je šest vremenskih točaka uzorkovanja krvi: neposredno prije (K_{1-1}) i nakon (K_{1-2}) prvog zarona, neposredno prije (K_{2-1}) i nakon (K_{2-2}) zarona organiziranog 2 tjedna nakon prvog zarona te neposredno prije (K_{3-1}) i nakon (K_{3-2}) zarona organiziranog mjesec dana nakon prvog zarona (Slika 7.). Sva uzorkovanja provedena su 15 minuta neposredno prije početka zarona i 15 minuta neposredno nakon izrona u prijepodnevnim satima.



Slika 7. Vremenske točke uzorkovanja u studiji procjene kumulativnog učinka SCUBA ronjenja.

3.5. METODE ODREĐIVANJA BIOMARKERA

Svi testovi korišteni u ovom istraživanju, osim testova za određivanje koncentracije galektina-3 (Gal-3), ET-1 i VEGF, koriste se u rutinskom radu medicinsko-biokemijskog laboratorija i ispunjavaju kriterije kvalitete svih segmenata laboratorijskih procesa prema HRN EN ISO 15189 međunarodnoj normi za akreditaciju medicinsko-biokemijskih laboratorija. Točnost rezultata određivanja za rutinske metode provjerena je analizom komercijalnih kontrolnih materijala neposredno prije početka analitičkog segmenta, dok je točnosti i reproducibilnost određivanja Gal-3, ET-1 i VEGF utvrđena mjerenjem svih uzoraka i kalibracijskih točaka u duplikatu.

Svi biomarkeri određeni su standardiziranim metodama prikladnih analitičkih karakteristika, s komercijalno pribavljenim reagensima na certificiranim analizatorima, kako je navedeno u Tablici 2.

Tablica 2. Analitičke platforme i metode za određivanje biomarkera.

PARAMETAR	UZORAK	METODA	ANALIZATOR	PROIZVOĐAČ REAGENSA
hs-TnI	plazma	CLIA	UniCel DxI 600	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
IL-6				
mioglobin				
hs-CRP		IT	AU 680	
CRP	serum			
CK				
CK-MB		SF		
LD				
broj leukocita	puna krv	FC	Cell Dyn Ruby	Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, USA
NT-proBNP	plazma	CMIA	Architect i1000$_{SR}$	
Gal-3		ELISA	BEP 2000 Advance	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
VEGF				
endotelin-1				

hs-TnI – visoko-osjetljivi (engl. *high-sensitivity*) troponin I, IL-6 – interleukin-6, hs-CRP – visoko-osjetljivi C-reaktivni protein, CK – kreatin-kinaza, CK-MB – kreatin-kinaza, MB izoenzim, LD – laktat-dehidrogenaza, NT-proBNP – N-terminalni fragment prohormona moždanog natriuretskog peptida (engl. *brain natriuretic peptide*), Gal-3 – galektin-3, VEGF – faktor rasta endotela krvnih žila (engl. v*ascular endothelial growth factor*), CLIA – kemiluminiscentna imunoanaliza (engl. *chemiluminescence immunoassay*), IT – imunoturbidimetrija, SF – spektrofotometrija, CMIA – kemiluminiscentna imunoanaliza bazirana na mikročesticama (engl. *chemiluminescent microparticle immunoassay*). FC – protočna citometrija (engl. *flow citometry*), ELISA – enzimski imunotest na čvrstoj fazi (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*).

3.6. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Pri odabiru statističkih testova u obzir je uzeta normalnost raspodjele dobivenih rezultata (testirana Shapiro-Wilk testom) te broj ispitanika uključenih u ovo istraživanje. Za testiranje razlika između zavisnih brojčanih varijabli korišteni su neparametrijski testovi Wilcoxon signed-rank test za dvije, odnosno Friedman ANOVA za više od dvije zavisne varijable. Ako je Friedmanovim testom utvrđeno postojanje razlike između testiranih varijabli, proveden je *post-hoc* test prema Conoveru (205) kako bi se utvrdilo koja se točno varijabla statistički značajno razlikuje od druge varijable. Za usporedbu rezultata osnovnih karakteristika ronilaca (dob, visina, težina, indeks tjelesne mase (ITM)) između dviju studija korišten je Mann-Whitney statistički test. Za prepoznavanje stršećih (netipičnih) vrijednosti (engl. *outlier values*) korišten je model po Tukey-u. Svi rezultati izraženi su kao medijan i interkvartilni raspon, osim dobi ispitanika koja je izražena kao medijan i raspon. Statistička analiza dobivenih rezultata provedena je u računalnom programu MedCalc verzije 14.8.1 (MedCalc, Mariakerke, Belgium). Statistički značajnom razlikom proglašena je svaka testirana razlika s dobivenom P-vrijednosti $\leq 0,05$.

Prikladnost veličine uzorka procijenjena je analizom statističke snage testa preko veličine učinaka (promjena koje želimo uočiti) koje su preuzete iz prethodnih istraživanja za dostupne parametre (Gal-3, hs-TnI, NT-proBNP, ET-1, IL-6, LD, CK (106, 206 – 208)). S obzirom na to da se zaključivalo uz pogrešku prvog reda od 5% ($P<0,05$) i da je odabrana snaga istraživanja od najmanje 90% ($\beta=0,10$), pomoću MedCalc programa dobiven je minimalni broj uzoraka potreban da se željena razlika uoči. Procijenjeni minimalni broj uzoraka potreban da se uoče promjene svih parametara u skladu je s brojem ispitanika uključenih u oba pokusa ove studije.

Za utvrđivanje povezanosti pojedinih parametara, posebice Gal-3 i hs-TnI, NT-proBNP i mioglobina, a s ciljem razlučivanja o njegovom mjestu otpuštanja (srce ili skeletni mišić), korišten je Spearmanov koeficijent korelacije (rho, ρ). Statistički značajna povezanost (uz $P<0,05$) tumačena je sukladno Coltonovu kriteriju (za r 0 do 0,25 ili 0 do -0,25 kao nepostojanje povezanosti; za r 0,26 do 0,50 ili -0,26 do -0,50 kao slaba povezanost; za r 0,51 do 0,75 ili -0,51 do -0,75 kao umjerena do dobra povezanost; za r 0,76 do 1 ili -0,76 do -1 kao vrlo dobra do izvrsna povezanost).

Kako bi se uz statističku utvrdila i klinička značajnost promjene koncentracija rutinski mjerenih parametara, za svaki je parametar izračunana referentna vrijednost promjene (engl.

reference change value, RCV) vrijednost (1) i indeks individualnosti (engl. *individuality index*, II) (2) (209, 210) prema formulama:

(1) $$RCV = \sqrt{2} \times Z \times \sqrt{CV_A^2 + CV_I^2}$$

(2) $$II = \frac{CV_I}{CV_G}$$

gdje su CV_G interindividualna, CV_I intraindividualna biološka varijabilnost (BV), CV_A analitička nepreciznost metode, a odabrana Z-vrijednost 1,96, za 95% dvosmjernu statističku značajnost promjene. Trenutno najrelevantnija baza biološke varijabilnosti Europske federacije za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (EFLM) nema podataka o CV_G i CV_I za odabrane parametre pa su podaci za TnI, CRP, hs-CRP, NT-proBNP, mioglobin, CK, CK-MB i LD preuzeti iz baze podataka Minchinela i suradnika (211), dok su za Gal-3 i interleukin-6 korišteni dostupni literaturni podaci (212, 213). CV_A je izračunan iz rezultata unutarnje kontrole kvalitete rada Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava za razdoblje 1.1. – 31.12.2018. za sve parametre osim za Gal-3 za koji je CV_A preuzet iz proizvođačevih podataka o inicijalnoj verifikaciji testa i interleukin-6 za koji je CV_A preuzet iz vlastitih laboratorijskih podataka o inicijalnoj verifikaciji testa.

Kako bi se procijenila klinička značajnost promjene rezultata za svakog ispitanika izračunan je postotak razlike u odnosu na vrijednosti prije ronjenja prema formuli (3):

(3) $$\%\, razlike = \left(\frac{A_n - A_0}{A_0}\right) \times 100$$

gdje je A_n vrijednost neposredno nakon ronjenja, 3 i 6 sati nakon ronjenja, a A_0 vrijednost prije ronjenja. Srednja vrijednost postotaka razlike (% razlike) svih ispitanika veća od RCV za pojedini parametar smatrana je kliničkim značajnom promjenom.

4 REZULTATI

4.1. OSNOVNE KARAKTERISTIKE RONILACA

Sistematskim pregledom, ispunjavanjem anketnog listića te antropološkim mjerenjima utvrđene su osnovne karakteristike ispitanika obiju studija provedenog istraživanja (Tablica 3.). Nije utvrđena statistički značajna razlika u dobi (P=0,493), težini (P=0,289), visini (P=0,389) i ITM (P=0,479) između ispitanika pojedine studije.

Tablica 3. Antropometrijski parametri ispitanika obiju studija.

	STUDIJA JEDNOKRATNOG UČINKA (N=16)	**STUDIJA KUMULATIVNOG UČINKA (N=14)**	**P** (Mann-Whitney)
DOB (godine)*	42 (30-47)	42 (19-54)	0,493
TEŽINA (kg)†	90 (85-92)	84,5 (75-93)	0,289
VISINA (cm)†	180 (180-185,5)	180 (175-186)	0,389
ITM (kg/m^2)†	27,7 (24,8-28,4)	26,4 (23,5-28,9)	0,479

ITM – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*), * izraženo kao medijan i raspon, † izraženo kao medijan i interkvartilni raspon (engl. *interquartile range, IQR*)

4.2. UČINAK SCUBA RONJENJA NA KARDIOVASKULARNE, MIŠIĆNE I IMUNOSNE BIOMARKERE

4.2.1. Studija procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja

U studiji procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja s komprimiranim zrakom mjerene su plazmatske koncentracije Gal-3, NT-proBNP, hs-TnI, mioglobina, hs-CRP, VEGF i endotelina-1 čiji su medijani i interkvartilni rasponi u svim točkama mjerenja (A_0 – A_3) izraženi u Tablici 4.

Uočeni su statistički značajni porasti koncentracija Gal-3, hs-TnI, NT-proBNP, mioglobina i VEGF te pad koncentracija ET-1 odmah nakon ronjenja u odnosu na vrijednosti prije ronjenja, a koncentracije hs-CRP se nisu značajno mijenjale. Vršne koncentracije, uz povratak na bazalne vrijednosti 6 sati nakon ronjenja, za mioglobin i VEGF uočene su odmah nakon zarona, a za Gal-3 3 sata nakon zarona. Koncentracije hs-TnI i NT-proBNP kontinuirano su rasle tijekom cijelog perioda praćenja. Nakon inicijalnog pada, koncentracija ET-1 je počela rasti 3 sata nakon zarona, no do 6. sata nije dostigla svoju bazalnu vrijednost.

Tablica 4. Rezultati odabranih biomarkera u studiji učinka jednokratnog SCUBA ronjenja (N=16).

PARAMETAR (mjerna jedinica)	**A 0**	**A 1**	**A 2**	**A 3**	**P** (Friedman)
NT-proBNP (pg/mL)	27,6 †‡§ (21,0-41,6)	37,5 *‡§ (28,9-52,6)	42,0 *†§ (30,2-60,0)	46,9 *†‡ (34,9-62,1)	**<0,001**
hs-troponin I (ng/L)	0,57 †‡§ (0,35-2,10)	0,87 *‡§ (0,71-2,55)	1,71 *†§ (0,99-4,36)	2,24 *†‡ (1,17-4,72)	**<0,001**
Gal-3 (ng/mL)	5,12 †‡ (3,59-6,77)	5,55 *‡§ (3,84-7,43)	5,79 *†§ (4,83-8,57)	5,29 †‡ (3,25-6,64)	**<0,001**
mioglobin (ng/mL)	64,0 †‡ (50,0-81,0)	99,5 *‡§ (83,5-126,5)	83,5 *†§ (64,0-109,5)	70,5 †‡ (52,0-87,5)	**<0,001**
hs-CRP (mg/L)	1,2 (0,4-1,5)	1,1 (0,5-1,4)	0,9 (0,5-1,5)	0,9 (0,3-1,5)	0,357
VEGF (pg/mL)	106,1 †‡§ (95,7-135,8)	178,9 *‡§ (132,1-267,5)	93,4 *†§ (74,2-121,9)	122,5 *†‡ (113,0-141,3)	**<0,001**
endotelin-1 (ng/mL)	6,4 †‡§ (3,1-8,3)	2,9 *‡§ (2,8-3,3)	3,4 *† (3,0-4,0)	3,9 *† (3,0-5,2)	**<0,001**

Rezultati su izraženi kao medijani i interkvartilni rasponi. NT-proBNP – N-terminalni fragment prohormona moždanog natriuretskog peptida (engl. *brain natriuretic peptide*), Gal-3 – galektin-3, hs – visoko-osjetljivi (engl. *high-sensitivity*), VEGF – faktor rasta endotela krvnih žila (engl. v*ascular endothelial growth factor*). A_0 – neposredno prije ronjenja, A_1 – neposredno nakon ronjenja, A_2 – 3 sata nakon ronjenja, A_3 – 6 sati nakon ronjenja. Statistički značajno (P<0,05) *post-hoc* testom po Conoveru u odnosu na A_0 (*), A_1 (†), A_2 (‡), A_3 (§).

Nakon identifikacije i izdvajanja stršećih vrijednosti iz statističke analize rezultata u studiji procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja na plazmatske koncentracije Gal-3, NT-proBNP, hs-TnI, mioglobina, hs-CRP, VEGF i endotelina-1 dobiveni su rezultati čiji su medijani i interkvartilni rasponi svih točaka mjerenja (A_0 – A_3) prikazani u Tablici 5.

Tablica 5. Rezultati odabranih biomarkera u studiji učinka jednokratnog SCUBA ronjenja nakon izdvajanja stršećih vrijednosti (N=14-16).

PARAMETAR (mjerna jedinica)	**A 0**	**A 1**	**A 2**	**A 3**	Stršeća vrijednost	**P** (Friedman)
NT-proBNP (pg/mL)	23,2 †‡§ (20,1-37,7)	31,7 *‡§ (27,4-48,1)	35,8 *†§ (29,6-57,6)	39,6 *†‡ (33,7-60,1)	R8, R12	**<0,001**
hs-troponin I (ng/L)	0,53 †‡§ (0,33-1,28)	0,85 *‡§ (0,70-1,92)	1,37 *†§ (0,98-3,17)	2,13 *†‡ (1,15-3,41)	R12	**<0,001**
Gal-3 (ng/mL)	5,12 †‡ (3,59-6,77)	5,55 *‡§ (3,84-7,43)	5,79 *†§ (4,83-8,57)	5,29 †‡ (3,25-6,64)	nema	**<0,001**
mioglobin (ng/mL)	64,0 †‡ (50,0-81,0)	99,5 *‡§ (83,5-126,5)	83,5 *†§ (64,0-109,5)	70,5 †‡ (52,0-87,5)	nema	**<0,001**
hs-CRP (mg/L)	1,2 (0,4-1,5)	1,1 (0,5-1,4)	0,9 (0,5-1,5)	0,9 (0,3-1,5)	nema	0,357
VEGF (pg/mL)	103,6 †‡§ (93,6-108,1)	143,7 *‡§ (121,9-257,2)	87,4 *†§ (72,5-103,3)	120,3 *†‡ (110,8-129,9)	R7, R8	**<0,001**
endotelin-1 (ng/mL)	4,6 †‡§ (3,1-7,7)	2,9 *‡§ (2,7-3,1)	3,3 *†§ (3,0-3,6)	3,6 *†‡ (3,0-4,5)	R7, R8	**<0,001**

Rezultati su izraženi kao medijani i interkvartilni rasponi. NT-proBNP – N-terminalni fragment prohormona moždanog natriuretskog peptida (engl. *brain natriuretic peptide*), Gal-3 – galektin-3, hs – visoko-osjetljivi (engl. *high-sensitivity*), VEGF – faktor rasta endotela krvnih žila (engl. v*ascular endothelial growth factor*). Stršeća vrijednost (engl. *outlier value*), R*X* – oznaka ronioca čiji su rezultati sadržavali stršeću vrijednost. A_0 – neposredno prije ronjenja, A_1 – neposredno nakon ronjenja, A_2 – 3 sata nakon ronjenja, A_3 – 6 sati nakon ronjenja. Statistički značajno (P<0,05) *post-hoc* testom po Conoveru u odnosu na A_0 (*), A_1 (†), A_2 (‡), A_3 (§).

Analizom rezultata bez stršećih vrijednosti uočava se dodatno statistički značajan porast koncentracije endotelina-1 između mjerenja 3 sata (A_2) i 6 sati (A_3) nakon izrona (P<0,05).

4.2.2. Studija procjene kumulativnog učinka SCUBA ronjenja

U studiji procjene učinka opetovanog SCUBA ronjenja s komprimiranim zrakom mjerene su plazmatske koncentracije Gal-3, NT-proBNP, hs-TnI, mioglobina, hs-CRP, IL-6, VEGF i endotelina-1, serumske koncentracije CRP, CK, CK-MB, LD te ukupan broj leukocita čiji su medijani i interkvartilni rasponi u svim točkama mjerenja prikazani u Tablici 6.

U ovoj studiji potvrđene su sve prethodno uočene promjene koncentracija mjerene odmah nakon ronjenja, a uočeni kumulativni učinak na kardiovaskularni i mišićni sustav očitovao se kontinuiranim padom koncentracija Gal-3, hs-TnI, mioglobina i VEGF te porastom koncentracija NT-proBNP, IL-6 i ET-1 kroz promatrani period praćenja od mjesec dana.

Tablica 6. Rezultati biomarkera studije kumulativnog učinka SCUBA ronjenja (N=14).

PARAMETAR (mjerna jedinica)	**K** $_{1-1}$	**K** $_{1-2}$	**K** $_{2-1}$	**K** $_{2-2}$	**K** $_{3-1}$	**K** $_{3-2}$	**P** (Friedman)	
							$K_{1-1/2-1/3-1}$	$K_{1-2/2-2/3-2}$
broj leukocita ($x10^9$/L)	7,31 (5,75-8,68)	6,81 (5,94-9,48)	6,92 (5,87-8,41)	6,93 (5,98-10,9)	6,82 (6,47-8,19)	7,21 (6,47-9,69)	0,801	0,765
P (Wilcoxon)	0,194		**0,042**		0,761			
CRP (mg/L)	1,29 (0,69-2,35)	1,33 (0,79-2,21)	1,29 (0,72-3,80)	1,35 (0,80-3,69)	2,55 (0,56-4,20)	2,53 (0,61-4,90)	0,623	0,936
P (Wilcoxon)	0,173		**0,011**		0,296			
interleukin-6 (pg/mL)	0,81 (0,46-1,15)	1,07 §¶ (0,81-1,66)	0,95 (0,58-2,13)	1,37 † (0,83-2,39)	1,08 (0,53-1,23)	1,74 † (1,14-3,15)	0,266	**0,006**
P (Wilcoxon)	**<0,001**		**<0,001**		**<0,001**			
CK-MB (U/L)	7,0 (6,0-8,0)	8,5 (7,0-9,0)	6,5 (5,0-8,0)	8,0 ¶ (7,0-10,0)	7,0 (6,0-8,0)	7,0 § (6,0-9,0)	0,449	**0,034**
P (Wilcoxon)	0,365		**<0,001**		0,625			
hs-troponin I (ng/L)	2,70 ǁ (2,08-4,20)	4,32 §¶ (3,33-6,01)	2,49 ǁ (1,85-3,32)	3,14 †¶ (2,70-5,61)	1,84 *‡ (1,74-2,48)	2,61 †§ (2,19-3,29)	**0,003**	**<0,001**
P (Wilcoxon)	**<0,001**		**<0,001**		**<0,001**			
NT-proBNP (pg/mL)	27,8 ‡ǁ (19,9-47,9)	31,6 §¶ (22,4-56,9)	30,3 *ǁ (24,9-54,2)	39,5 †¶ (30,6-60,1)	44,7 *‡ (26,1-80,3)	53,2 †§ (35,8-99,9)	**<0,001**	**<0,001**
P (Wilcoxon)	**<0,001**		**<0,001**		**<0,001**			
hs-CRP (mg/L)	0,30 ‡ǁ (0,10-1,65)	0,60 §¶ (0,20-1,65)	1,00 *ǁ (0,48-1,83)	1,10 †¶ (0,68-1,90)	1,80 *‡ (1,30-3,35)	1,90 †§ (1,40-3,68)	**<0,001**	**<0,001**
P (Wilcoxon)	0,074		**0,019**		**0,004**			
CK (U/L)	129 (100-171)	154 (121-206)	142 (113-169)	164 (138-183)	129 (110-167)	162 (127-194)	0,368	0,409
P (Wilcoxon)	**<0,001**		**<0,001**		**<0,001**			
LD (U/L)	146 (127-163)	152 § (131-170)	154 (138-175)	173 †¶ (145-193)	147 (131-155)	161 § (149-167)	0,107	**0,001**
P (Wilcoxon)	0,626		**<0,001**		**<0,001**			
mioglobin (ng/mL)	76 ǁ (71-88)	101 §¶ (92-114)	69 ǁ (65-79)	87 †¶ (82-99)	65 *‡ (60-73)	83 †§ (71-89)	**<0,001**	**<0,001**
P (Wilcoxon)	**<0,001**		**<0,001**		**<0,001**			
Gal-3 (ng/mL)	4,08 ǁ (2,62-4,66)	5,30 §¶ (3,10-6,96)	3,98 ǁ (2,42-4,60)	4,52 †¶ (2,88-5,15)	3,22 *‡ (2,15-4,34)	4,12 †§ (2,81-4,84)	**<0,001**	**<0,001**
P (Wilcoxon)	**<0,001**		**<0,001**		**<0,001**			
VEGF (pg/mL)	38,2 ‡ǁ (31,1-61,9)	60,7 §¶ (50,5-93,9)	31,7 *ǁ (24,1-54,3)	48,8 †¶ (32,3-61,9)	26,9 *‡ (22,9-32,3)	33,5 †§ (25,3-56,9)	**<0,001**	**<0,001**
P (Wilcoxon)	**<0,001**		**<0,001**		**<0,001**			
endotelin-1 (pg/mL)	6,58 ‡ǁ (6,42-6,80)	4,38 (4,19-4,70)	6,65 *ǁ (6,56-6,95)	4,49 (4,28-4,85)	6,83 *‡ (6,70-7,52)	4,58 (4,15-4,70)	**<0,001**	0,426
P (Wilcoxon)	**<0,001**		**<0,001**		**<0,001**			

Rezultati su izraženi kao medijani i interkvartilni rasponi. CRP – C-reaktivni protein, CK-MB – kreatin-kinaza, MB izoenzim, hs – visoko-osjetljivi (engl. *high-sensitivity*), NT-proBNP – N-terminalni fragment prohormona moždanog natriuretskog peptida (engl. *brain natriuretic peptide*), CK – kreatin-kinaza, LD – laktat-dehidrogenaza, Gal-3 – galektin-3, VEGF – faktor rasta endotela krvnih žila (engl. v*ascular endothelial growth factor*). K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona. Statistički značajno (P<0,05) *post-hoc* testom po Conoveru u odnosu na K_{1-1} (*), K_{1-2} (†), K_{2-1} (‡), K_{2-2} (§), K_{3-1} (ǁ), K_{3-2} (¶).

Nakon utvrđivanja i izdvajanja stršećih vrijednosti iz statističke analize rezultata u studiji procjene učinka opetovanog SCUBA ronjenja na plazmatske koncentracije Gal-3, NT-proBNP, hs-TnI, mioglobina, hs-CRP, IL-6, VEGF i endotelina-1, serumske koncentracije CRP, CK, CK-MB, LD te ukupan broj leukocita dobiveni su rezultati čiji su medijani i interkvartilni rasponi kroz sve točke mjerenja prikazani u Tablici 7.

Tablica 7. Rezultati biomarkera studije kumulativnog učinka SCUBA ronjenja nakon odbacivanja stršećih vrijednosti (N=11-13).

PARAMETAR (mjerna jedinica)	**K 1-1**	**K 1-2**	**K 2-1**	**K 2-2**	**K 3-1**	**K 3-2**	Stršeća vrijednost	**P** (Friedman)	
								$K_{1-1/2-1/3-1}$	$K_{1-2/2-2/3-2}$
broj leukocita ($x10^9$/L)	6,46 (5,74-8,19)	6,38 (5,92-8,34)	6,56 (5,72-7,63)	6,55 (5,83-8,44)	6,80 (5,97-7,53)	6,95 (6,23-8,24)	R10. R12	0,368	0,926
P (Wilcoxon)	0,519		0,151		0,301				
CRP (mg/L)	1,16 (0,56-1,87)	1,18 (0,66-1,94)	1,07 (0,61-1,60)	1,12 (0,68-1,76)	2,02 (0,56-3,79)	2,07 (0,57-3,84)	R2, R12	0,578	0,926
P (Wilcoxon)	0,339		**0,043**		0,677				
interleukin-6 (pg/mL)	0,59	0,99 §¶	0,84	1,22 †	0,97	1,47 †	R10, R12	0,562	**0,038**
	(0,39-1,09	(0,70-1,34)	(0,54-1,16)	(0,83-1,83)	(0,47-1,21)	(0,91-2,19)			
P (Wilcoxon)	**0,001**		**0,001**		**0,001**				
CK-MB (U/L)	7,0 (6,0-7,8)	7,0 (6,3-9,0)	6,0 (5,3-7,0)	8,0 ¶ (7,0-9,8)	7,0 (6,0-7,0)	7,0 § (5,3-7,8)	R1, R4, R5	0,489	**0,050**
P (Wilcoxon)	0,461		**0,002**		0,688				
hs-troponin I (ng/L)	2,89 ǀ (1,93-4,55)	4,09 §¶ (3,22-5,77)	2,38 (1,67-3,24)	2,84 †¶ (2,66-4,75)	1,99 * (1,78-2,39)	2,58 †§ (2,11-2,94)	R6, R7	**0,013**	**<0,001**
P (Wilcoxon)	**<0,001**		**0,001**		**<0,001**				
NT-proBNP (pg/mL)	27,1 ‡ǀ (18,5-33,4)	31,0 §¶ (20,9-42,1)	28,8 *ǀ (24,7-39,7)	35,4 †¶ (30,1-50,7)	32,1 *‡ (25,9-51,8)	41,8 †§ (33,4-60,9)	R5, R8, R12	**<0,001**	**<0,001**
P (Wilcoxon)	**<0,001**		**<0,001**		**<0,001**				
hs-CRP (mg/L)	0,25 ‡ǀ (0,10-1,45)	0,60 §¶ (0,20-1,40)	1,00 *ǀ (0,45-1,65)	0,95 †¶ (0,65-1,65)	1,60 *‡ (1,35-2,90)	1,70 †§ (1,40-3,10)	R2, R12	**<0,001**	**<0,001**
P (Wilcoxon)	0,078		0,078		**0,008**				
CK (U/L)	123 (99-151)	144 (118-171)	128 (112-160)	154 (136-171)	125 (100-163)	152 (117-187)	R1, R4, R12	0,757	0,715
P (Wilcoxon)	**0,001**		**0,001**		**0,001**				
LD (U/L)	154 (141-184)	168 § (142-173)	156 (140-175)	174 †¶ (156-194)	147 (135-156)	161 § (152-169)	R12	0,203	**0,001**
P (Wilcoxon)	0,636		**0,001**		**0,001**				
mioglobin (ng/mL)	74 ‡ǀ (70-83)	100 §¶ (90-109)	70 *ǀ (68-76)	92 †¶ (85-101)	65 *‡ (60-73)	86 †§ (71-90)	R4, R12	**<0,001**	**<0,001**
P (Wilcoxon)	**<0,001**		**<0,001**		**<0,001**				
Gal-3 (ng/mL)	3,72 ‡ǀ (2,43-4,47)	4,79 §¶ (2,99-6,15)	3,58 *ǀ (2,27-4,33)	4,37 †¶ (2,87-5,06)	2,75 *‡ (1,89-3,66)	3,89 †§ (2,75-4,56)	R1, R5	**<0,001**	**<0,001**
P (Wilcoxon)	**<0,001**		**<0,001**		**<0,001**				
VEGF (pg/mL)	37,0 ǀ (28,2-46,6)	56,2 §¶ (44,4-84,5)	31,1 ǀ (23,5-35,2)	39,4 †¶ (32,3-58,1)	24,7 *‡ (22,9-30,5)	30,5 †§ (25,3-52,4)	R1, R12	**<0,001**	**<0,001**
P (Wilcoxon)	**0,001**		**0,001**		**0,001**				
endotelin-1 (pg/mL)	6,56 ‡ǀ (6,39-6,76)	4,33 (4,19-4,59)	6,65 *ǀ (6,54-6,95)	4,42 (4,26-4,74)	6,80 *‡ (6,48-7,48)	4,56 (4,14-4,70)	R1	**<0,001**	0,589
P (Wilcoxon)	**0,001**		**0,001**		**0,001**				

Rezultati su izraženi kao medijani i interkvartilni rasponi. CRP – C-reaktivni protein, CK-MB – kreatin-kinaza, MB izoenzim, hs – visoko-osjetljivi (engl. *high-sensitivity*), NT-proBNP – N-terminalni fragment prohormona moždanog natriuretskog peptida (engl. *brain natriuretic peptide*), CK – kreatin-kinaza, LD – laktat-dehidrogenaza, VEGF – faktor rasta endotela krvnih žila (engl. v*ascular endothelial growth factor*). Stršeća vrijednost (engl. *outlier value*), R*X*–oznaka ronioca sa stršećom vrijednošću. K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona. Statistički značajno (P<0,05) *post-hoc* testom po Conoveru u odnosu na K 1-1 (*), K 1-2 (†), K 2-1 (‡), K 2-2 (§), K 3-1 (ǀ), K 3-2 (¶).

Provođenjem statističke analize rezultata bez stršećih vrijednosti uočava se izostanak statističke značajnosti promjene rezultata ukupnog broja leukocita i visoko-osjetljivog CRP između mjerenja neposredno prije (K_{2-1}) i neposredno nakon 3. zarona (K_{2-2}). U odnosu na analizu rezultata sa stršećim vrijednostima, koncentracije mioglobina i Gal-3 statistički značajno padaju ($P<0,05$) već prije 3. zarona (K_{2-1}) u odnosu na vrijednost prije 1. zarona (K_{1-1}), ali u istom promatranom razdoblju izostaje statistički značajan pad koncentracije VEGF.

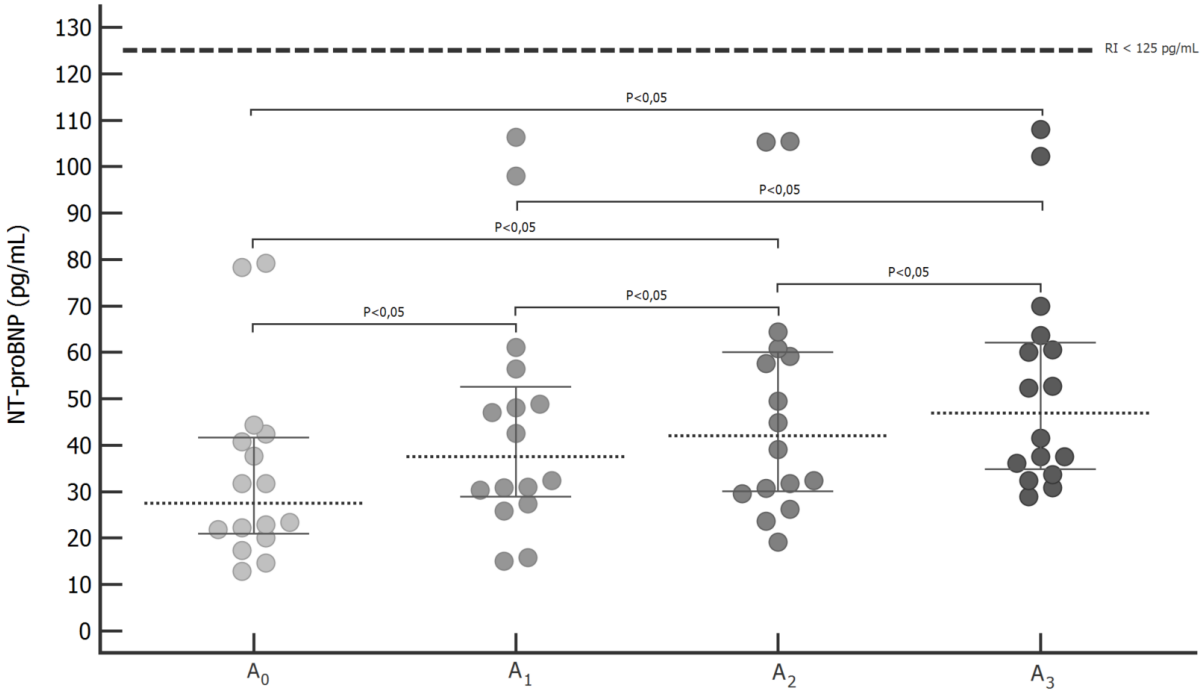
S obzirom na to da su analizom rezultata bez stršećih vrijednosti dobiveni gotovo identični rezultati uz istaknute iznimke koje dodatno potvrđuju već uočene razlike, rezultati u nastavku i rasprava temelje se rezultatima analize svih sudionika kako bi se zadržala prikladna snaga studije.

4.3. PROCJENA UČINKA SCUBA RONJENJA NA SRČANE MIOCITE MJERENJEM BIOMARKERA SRČANOG OŠTEĆENJA I RASTEZANJA

4.3.1. Studija procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja na biomarkere srčanog oštećenja i rastezanja (hs-TnI, NT-proBNP, hs-CRP)

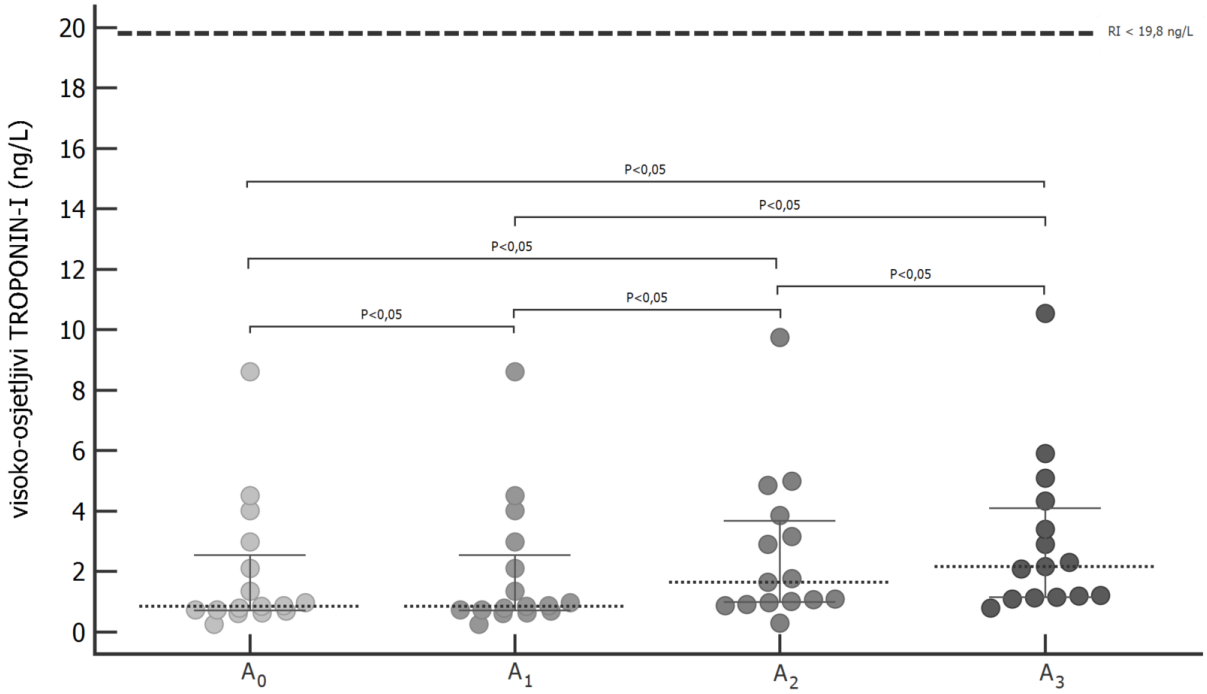
Kako bi se procijenio učinak jednokratnog SCUBA ronjenja na biomarkere srčanog oštećenja i rastezanja u prikupljenim uzorcima izmjerene su koncentracije hs-TnI, hs-CRP i CK-MB neposredno prije i nakon ronjenja te 3 i 6 sati nakon zarona.

Uočen je statistički značajan porast plazmatskih koncentracija NT-proBNP ($P<0,05$) i hs-TnI ($P<0,05$) odmah nakon zarona (A_1) u usporedbi s koncentracijama prije zarona (A_0). Koncentracije NT-proBNP i hs-TnI nastavile su rasti u cijelom periodu oporavka (3 sata (A_2) (obje $P<0,05$) i 6 sati nakon (A_3) (obje $P<0,05$)). Statistički značajna razlika obiju koncentracija uočena je između mjerenja A1 i A3 (obje $P<0,05$). Stabilan rast koncentracija NT-proBNP i hs-TnI od A_0 do A_3 (sve $P<0,05$) vidljiv je na Slici 8. i Slici 9. Mjerenje hs-CRP-a nije pokazalo statistički značajne promjene koncentracija ($P=0,357$) između svih mjerenja (A_0 do A_3) što je vidljivo na Slici 10.



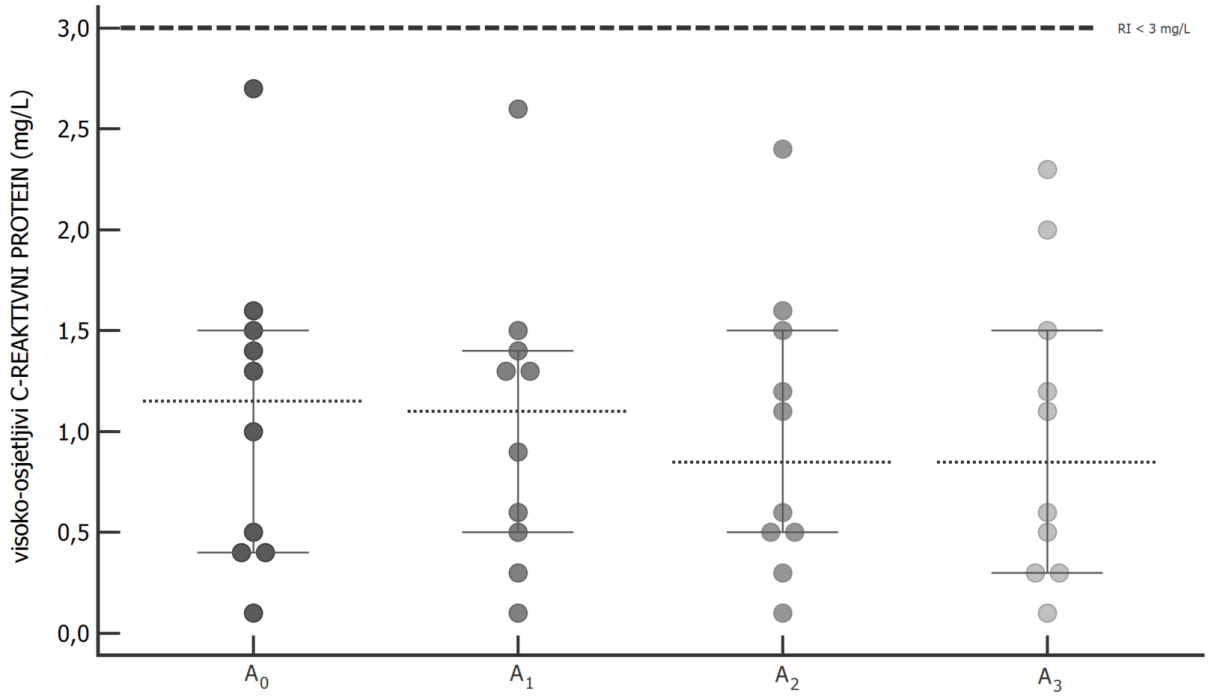
Slika 8. Učinak jednokratnog SCUBA ronjenja na koncentraciju NT-proBNP.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. P (Friedman ANOVA, *post-hoc* po Conoveru). NT-proBNP – N-terminalni fragment prohormona moždanog natriuretskog peptida (engl. *brain natriuretic peptide*), A_0 – neposredno prije ronjenja, A_1 – neposredno nakon ronjenja, A_2 – 3 sata nakon ronjenja, A_3 – 6 sati nakon ronjenja.



Slika 9. Učinak jednokratnog SCUBA ronjenja na koncentraciju hs-TnI.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. P (Friedman ANOVA, *post-hoc* po Conoveru). A_0 – neposredno prije ronjenja, A_1 – neposredno nakon ronjenja, A_2 – 3 sata nakon ronjenja, A_3 – 6 sati nakon ronjenja.



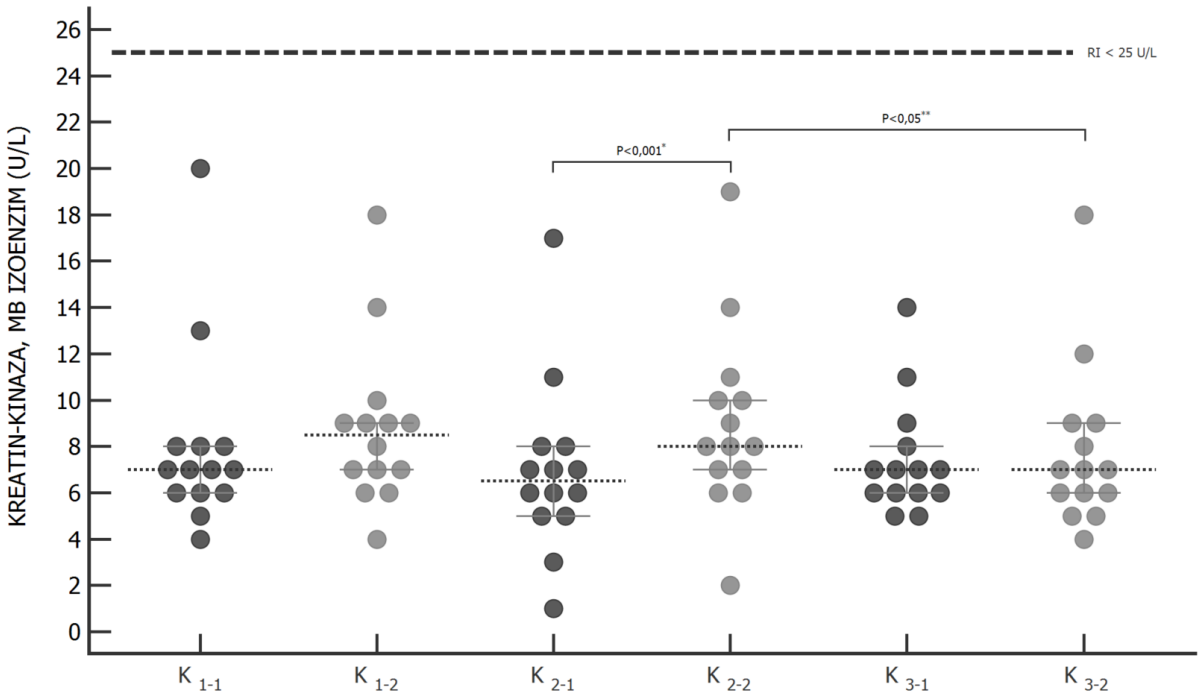
Slika 10. Učinak jednokratnog SCUBA ronjenja na koncentraciju hs-CRP.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. P (Friedman ANOVA) = 0,357. A_0 – neposredno prije ronjenja, A_1 – neposredno nakon ronjenja, A_2 – 3 sata nakon ronjenja, A_3 – 6 sati nakon ronjenja.

4.3.2. Studija procjene učinka opetovanog SCUBA ronjenja na biomarkere srčanog oštećenja i rastezanja (hs-TnI, NT-proBNP, hs-CRP i CK-MB)

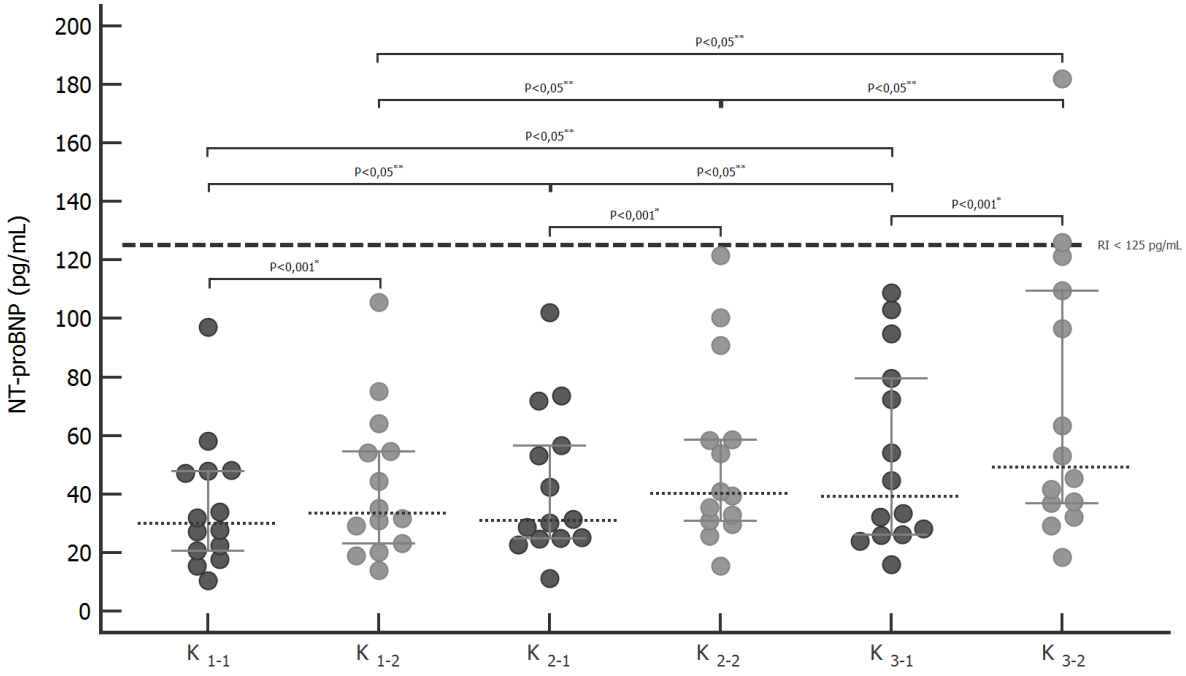
Kako bi se dobio uvid u posljedice opetovanog SCUBA ronjenja na biomarkere srčanog oštećenja i rastezanja, osim mjerenja hs-TnI, NT-proBNP i hs-CRP neposredno prije i nakon 1., 3. i 5. zarona, izmjerena je i katalitička koncentracija izoenzima CK-MB.

Utvrđeno je da se katalitička koncentracija CK-MB nije statistički značajno mijenjala nakon 1. ($K_{1\text{-}2}$) (P=0,365) i 5. ($K_{3\text{-}2}$) (P=0,625) zarona u usporedbi s pripadajućim vrijednostima prije navedenih zarona ($K_{1\text{-}1}$, $K_{3\text{-}1}$). Međutim, vidljiv je statistički značajan porast (P<0,001) nakon 3. zarona ($K_{2\text{-}2}$) u odnosu na vrijednost prije zarona ($K_{2\text{-}1}$). Usporedba svih vrijednosti prije i nakon zarona otkrila je statistički značajan porast (P<0,05) CK-MB nakon 5. zarona ($K_{3\text{-}2}$) u odnosu na vrijednost nakon 3. zarona ($K_{2\text{-}2}$) (Slika 11.). Koncentracije NT-proBNP i hs-TnI statistički su značajno rasle (sve P<0,001) nakon svakog zarona u usporedbi s vrijednostima prije zarona (Slika 12., Slika 13.). Nadalje, uočen je statistički značajan porast hs-CRP nakon 3. (P=0,019) i 5. (P=0,004) zarona u odnosu na pripadajuće vrijednosti prije zarona (Slika 14.). Kad su uspoređene samo vrijednosti prije i samo vrijednosti nakon svih zarona uočen je statistički značajan pad koncentracija hs-TnI te statistički značajni porasti koncentracija NT-proBNP i hs-CRP između svih točaka mjerenja (sve P<0,05).



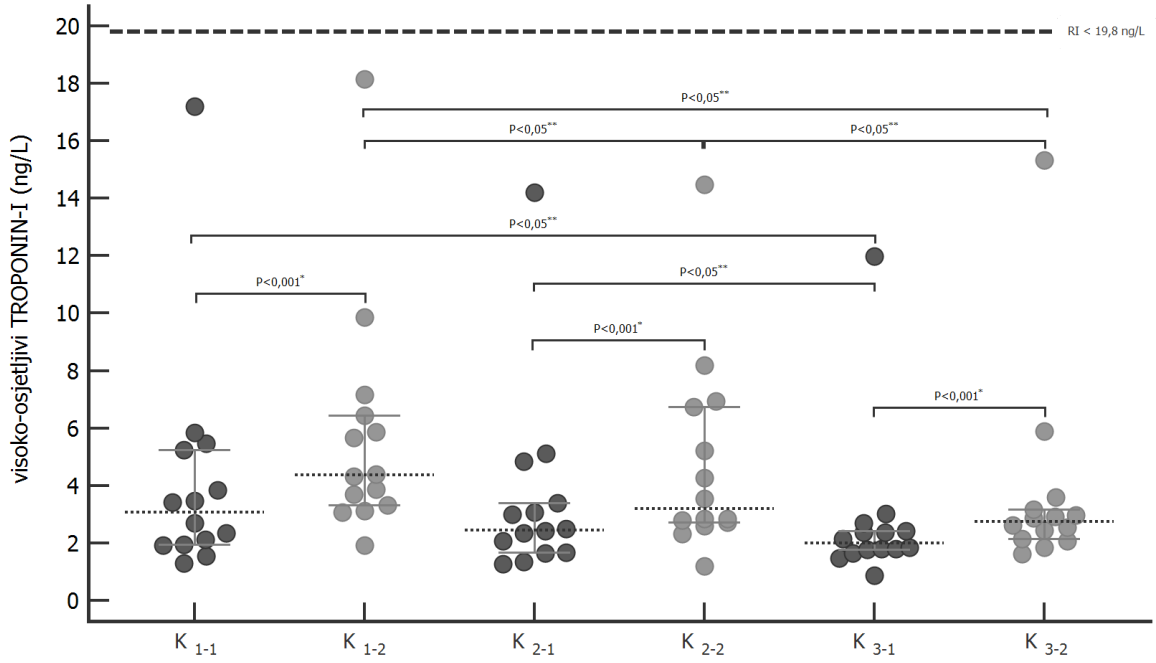
Slika 11. Kumulativni učinak ronjenja na katalitičku aktivnost CK-MB.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. *statistički značajno (Wilcoxon), **statistički značajno (Friedman ANOVA, *post-hoc* prema Conoveru), CK-MB – kreatin-kinaza, MB izoenzim (engl. *creatine-kinase, myocardial band*), K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.



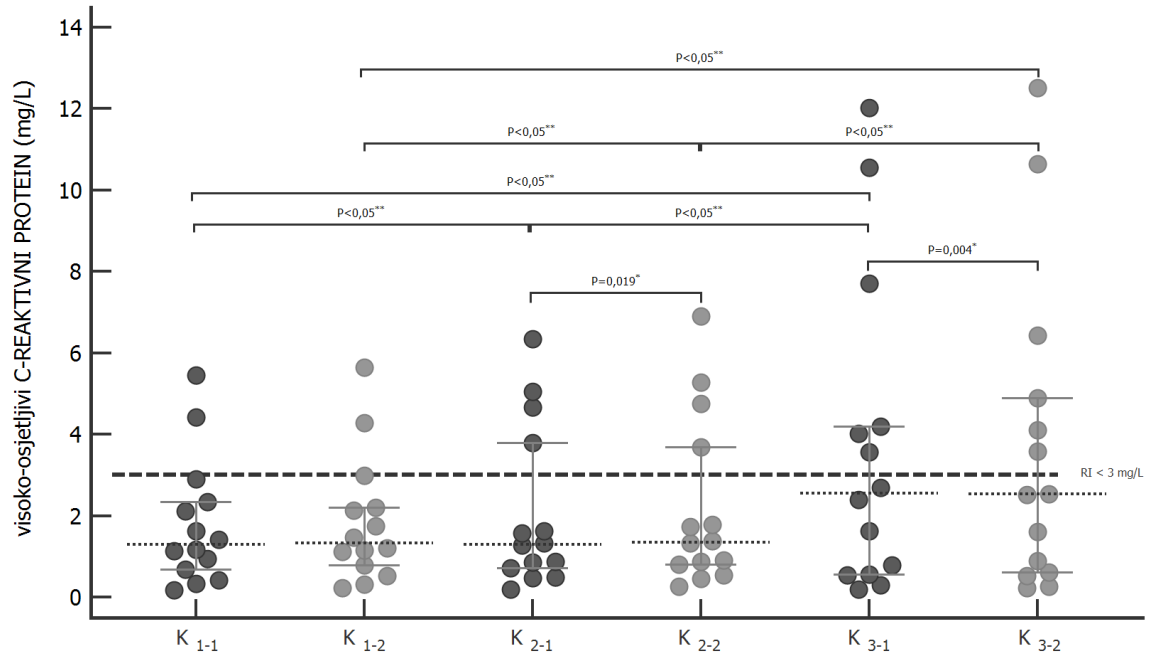
Slika 12. Kumulativni učinak ronjenja na koncentraciju NT-proBNP.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. *statistički značajno (Wilcoxon), **statistički značajno (Friedman ANOVA, *post-hoc* prema Conoveru), NT-proBNP – N-terminalni fragment prohormona moždanog natriuretskog peptida (engl. *brain natriuretic peptide*), K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.



Slika 13. Kumulativni učinak ronjenja na koncentraciju hs-TnI.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. *statistički značajno (Wilcoxon), **statistički značajno (Friedman ANOVA, *post-hoc* prema Conoveru), hs-TnI – visoko-osjetljivi troponin I, K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.



Slika 14. Kumulativni učinak ronjenja na koncentraciju hs-CRP.

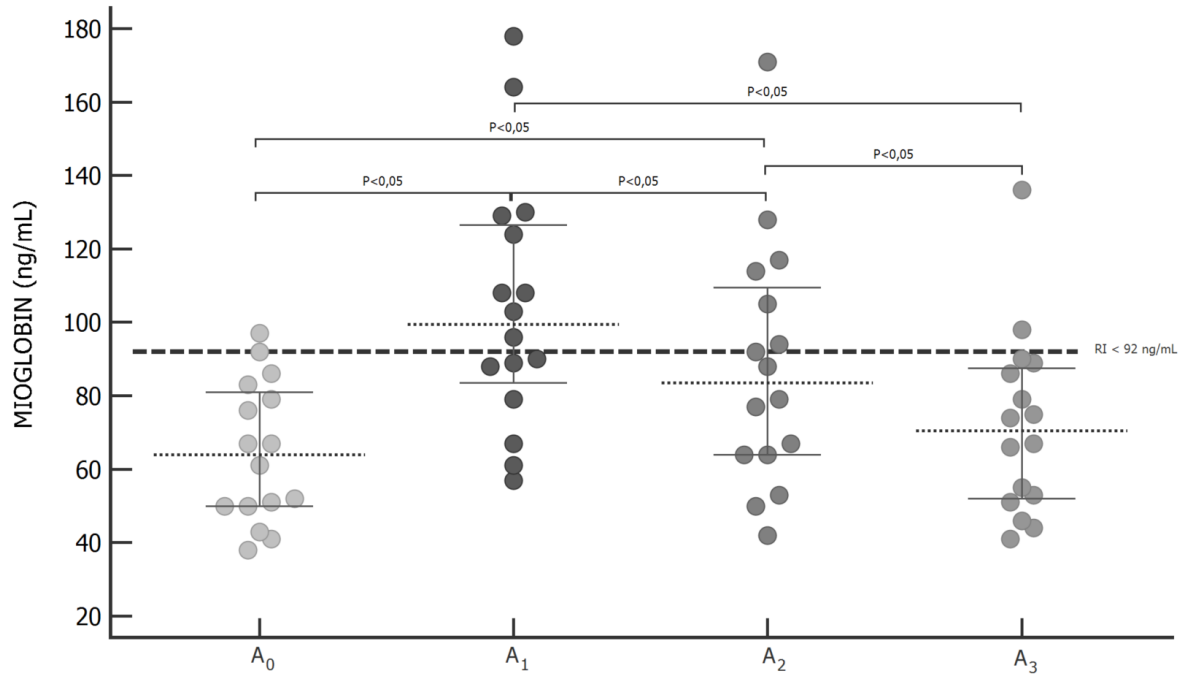
Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. *statistički značajno (Wilcoxon), **statistički značajno (Friedman ANOVA, *post-hoc* prema Conoveru), hs-CRP – visoko-osjetljivi CRP, K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.

4.4. UČINAK SCUBA RONJENJA NA INTEGRITET MEMBRANE MIOCITA

4.4.1. Studija procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja na biomarkere integriteta membrane miocita (mioglobin, galektin-3)

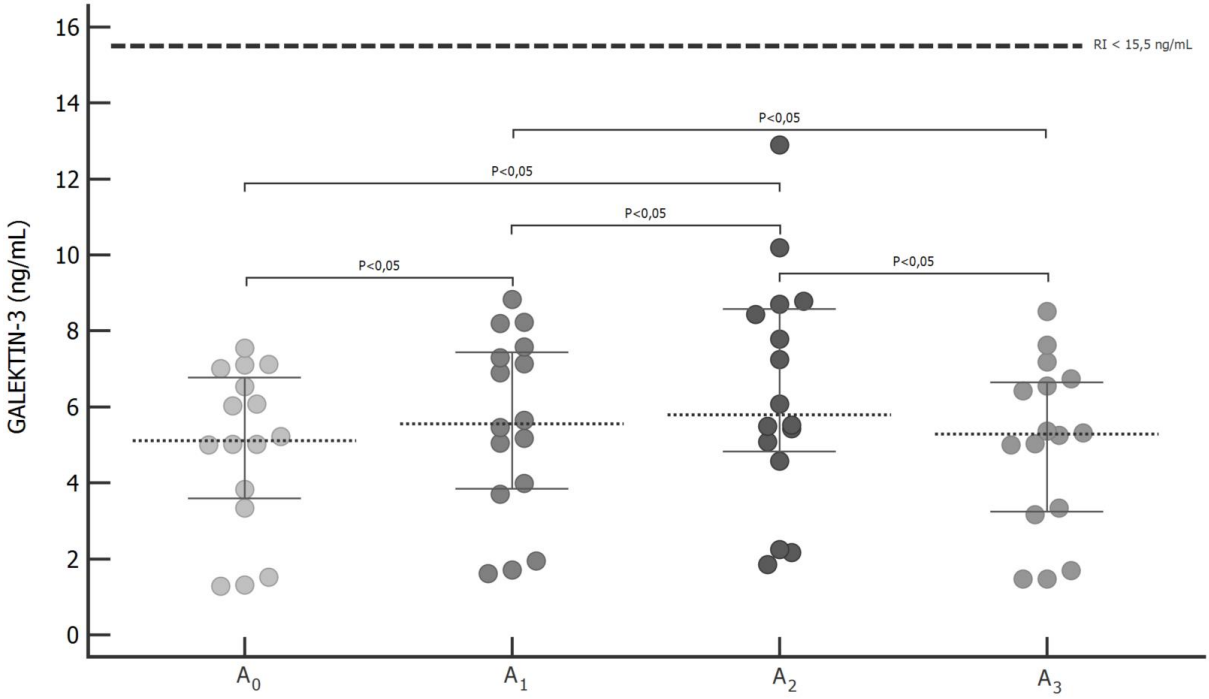
U cilju ispitivanja učinka jednokratnog SCUBA zarona na integritet membrane miocita izmjerene su plazmatske koncentracije mioglobina i Gal-3 neposredno prije, neposredno nakon zarona te 3 i 6 sati nakon zarona.

Uočen je statistički značajan porast ($P<0,05$) koncentracije mioglobina odmah nakon zarona (A_1) u odnosu na mjerenje prije zarona (A_0). Nakon prvobitnog rasta, zamijećen je statistički značajan pad (obje $P<0,05$) koncentracija u mjerenjima 3 i 6 sati nakon zarona (A_2, A_3) ako se vrijednosti uspoređuju s vrijednošću odmah nakon zarona (A_1). Specifična dinamika porasta i pada na bazalne vrijednosti vidljiva je na Slici 15. Statistički značajan porast ($P<0,05$) koncentracije Gal-3 zabilježen je odmah nakon zarona (A_1) u odnosu na vrijednost prije ronjenja (A_0). Taj porast ($P<0,05$) nastavljen je sve do 3 sata nakon zarona (A_2), kada Gal-3 postiže svoju vršnu koncentraciju. Šest sati nakon zarona (A_3) Gal-3 statistički značajno pada ($P<0,05$) u odnosu na prethodnu točku mjerenja (A_2) i vraća se na svoju početnu vrijednost prije zarona (A_0) (Slika 16.).



Slika 15. Učinak jednokratnog SCUBA ronjenja na koncentraciju mioglobina.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. P (Friedman ANOVA, *post-hoc* po Conoveru). A_0 – neposredno prije ronjenja, A_1 – neposredno nakon ronjenja, A_2 – 3 sata nakon ronjenja, A_3 – 6 sati nakon ronjenja.



Slika 16. Učinak jednokratnog SCUBA ronjenja na koncentraciju galektina-3.

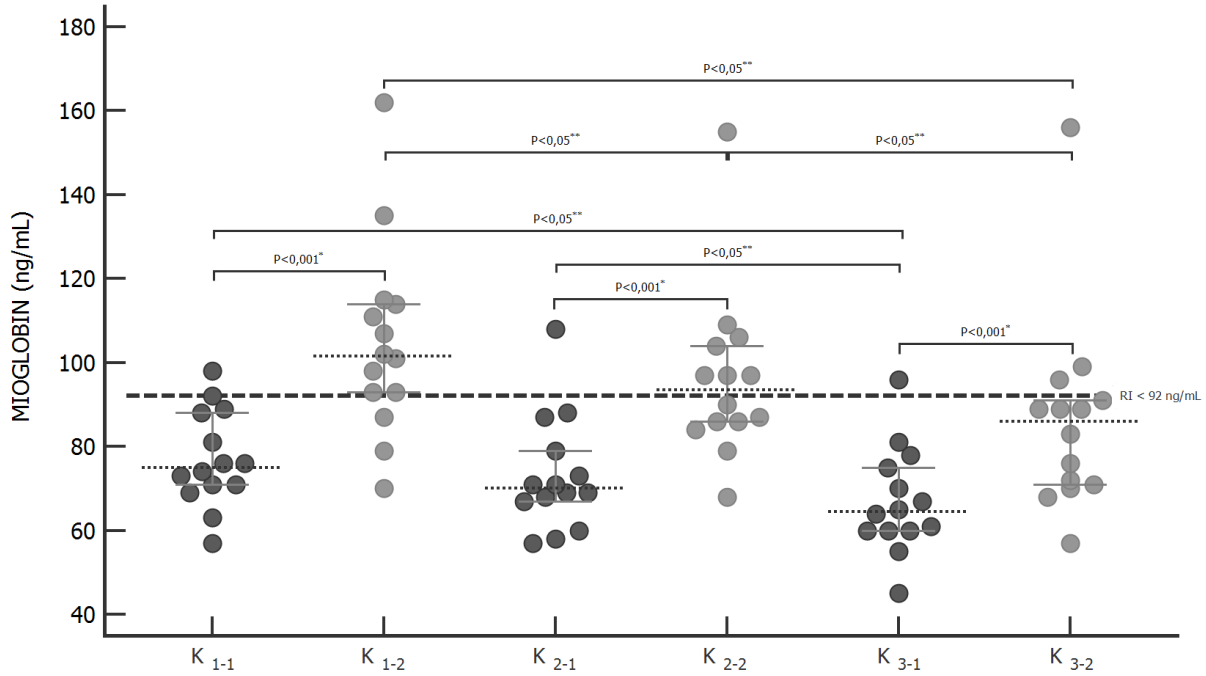
Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. P (Friedman ANOVA, *post-hoc* po Conoveru). A_0 – neposredno prije ronjenja, A_1 – neposredno nakon ronjenja, A_2 – 3 sata nakon ronjenja, A_3 – 6 sati nakon ronjenja.

4.4.2. Studija procjene kumulativnog učinka SCUBA ronjenja na biomarkere integriteta membrane miocita (mioglobin, galektin-3, LD i CK)

U studiji procjene učinka kumulativnog učinka SCUBA ronjenja na integritet membrane miocita uz mioglobin i Gal-3 izmjerene su i katalitičke koncentracije LD i CK u serumu ispitanika prije i nakon 1., 3. i 5. zarona.

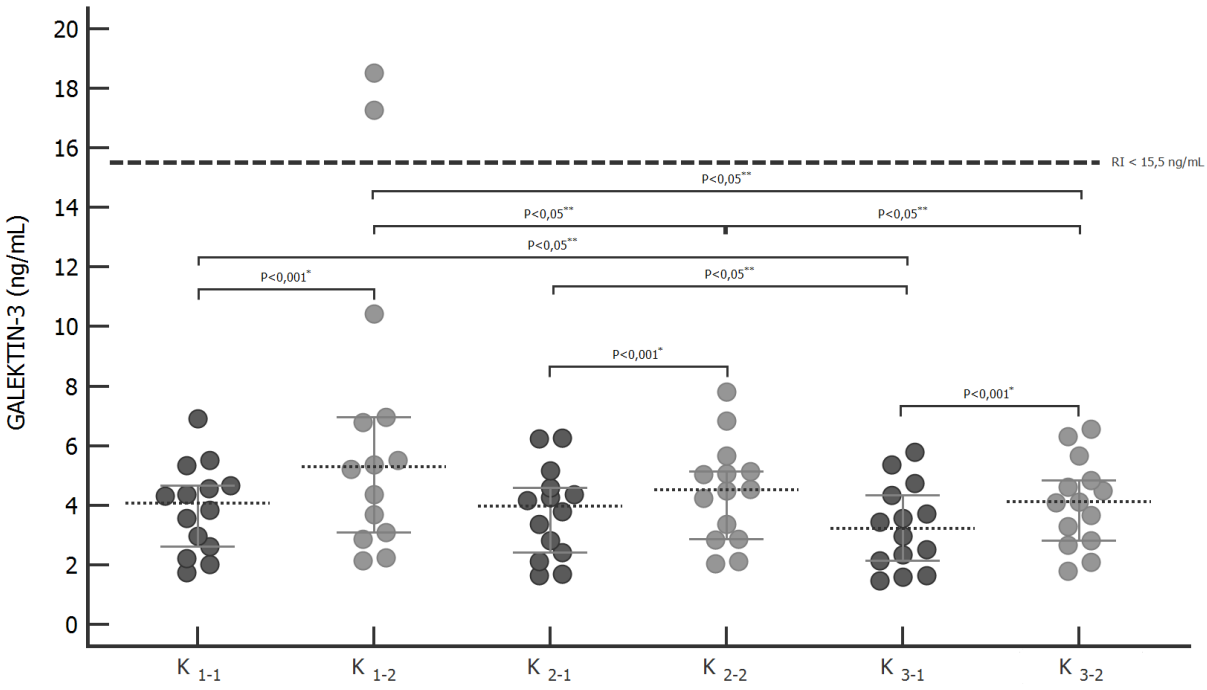
Uočeni su statistički značajni porasti koncentracija mioglobina i Gal-3 nakon svakog izvedenog zarona (sve P<0,001). Međutim, usporedbom svih vrijednosti prije i svih vrijednosti nakon zarona uočen je značajan pad vrijednosti (sve P<0,05) oba mjerena parametra, uz izostanak statističke značajnosti između koncentracija mjerenih prije 3. ($K_{2\text{-}1}$) u odnosu na 1. zaron ($K_{1\text{-}1}$) (Slika 17., Slika 18.). Katalitička koncentracija CK rasla je statistički značajno nakon svakog zarona (sve P<0,001). Međutim, ako se usporede sve vrijednosti prije (P=0,368) i sve vrijednosti nakon zarona (P=0,409), katalitičke koncentracije CK međusobno se statistički značajno ne razlikuju (Slika 19). Katalitička koncentracija LD značajno je rasla (obje P<0,001) nakon 3. ($K_{2\text{-}2}$) i 5. zarona ($K_{3\text{-}2}$) u odnosu na vrijednosti prije zarona ($K_{2\text{-}1}$, $K_{3\text{-}1}$). Kada se usporede sve vrijednosti nakon zarona vidi se statistički značajan porast vrijednosti (P<0,05) nakon 3. ($K_{2\text{-}2}$) u odnosu na vrijednost nakon 1. zarona ($K_{1\text{-}2}$), dok je vrijednost nakon 5. zarona

(K_{3-2}) statistički značajno niža ($P<0,05$) u odnosu na vrijednost nakon 3. zarona (K_{2-2}) (Slika 20.).



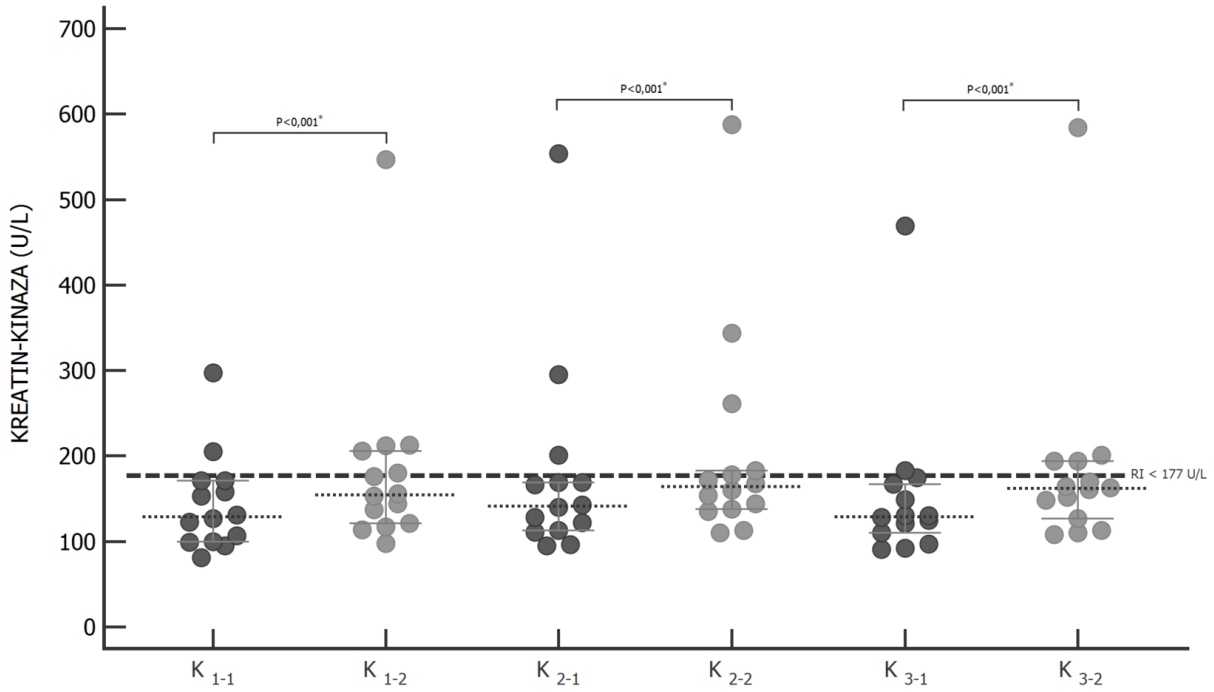
Slika 17. Kumulativni učinak SCUBA ronjenja na koncentraciju mioglobina.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. *statistički značajno (Wilcoxon), **statistički značajno (Friedman ANOVA, *post-hoc* prema Conoveru), K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.



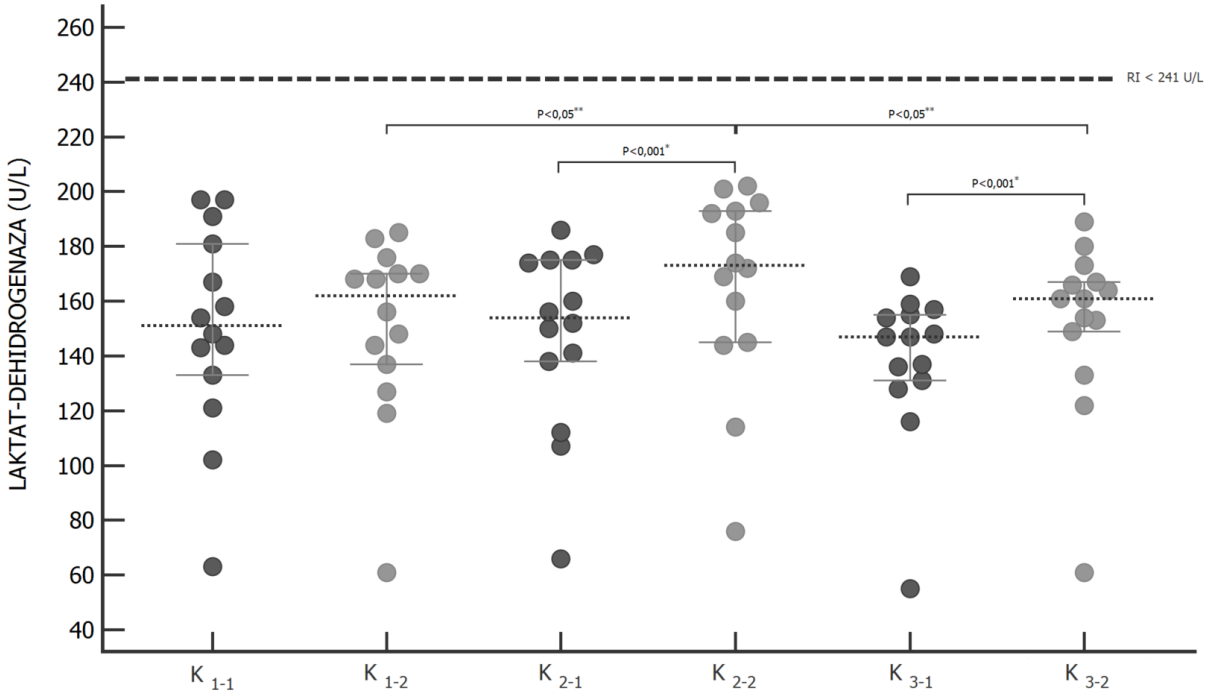
Slika 18. Kumulativni učinak SCUBA ronjenja na koncentraciju galektina-3.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. *statistički značajno (Wilcoxon), **statistički značajno (Friedman ANOVA, *post-hoc* prema Conoveru), K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.



Slika 19. Kumulativni SCUBA učinak ronjenja na katalitičku koncentraciju CK.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. *statistički značajno (Wilcoxon), CK – kreatin-kinaza, K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.



Slika 20. Kumulativni učinak SCUBA ronjenja na katalitičku koncentraciju LD.

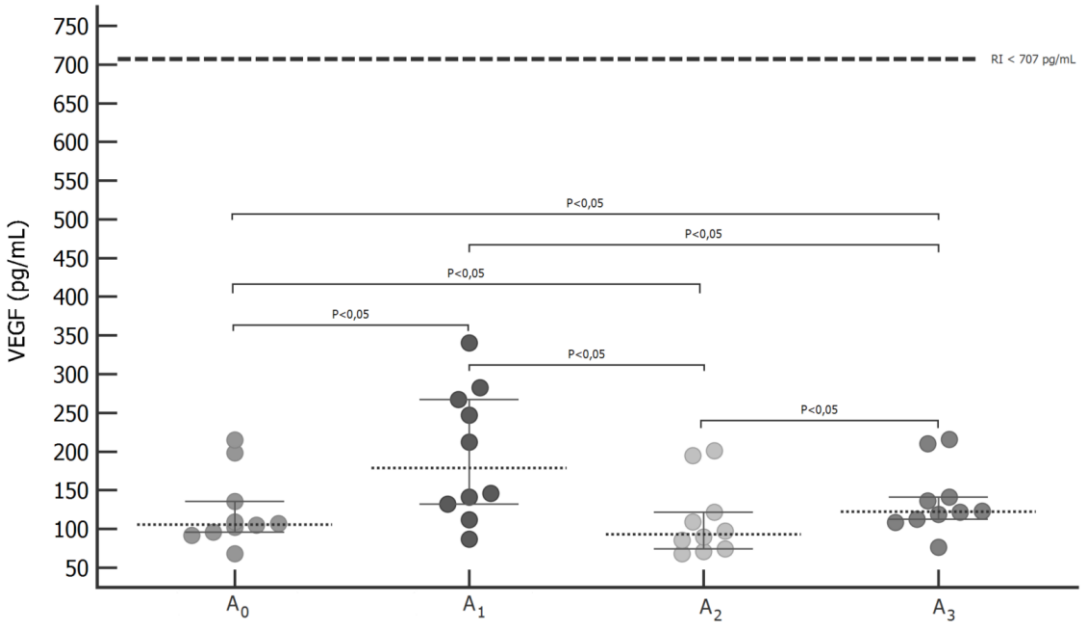
Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. *statistički značajno (Wilcoxon), **statistički značajno (Friedman ANOVA, *post-hoc* prema Conoveru), LD – laktat-dehidrogenaza, K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.

4.5. UČINAK RONJENJA NA AKTIVNOST VASKULARNOG ENDOTELA

U cilju ispitivanja učinka kako jednokratnog ronjenja tako i pet opetovanih zarona na aktivnost vaskularnog endotela u plazmi ispitanika određene su koncentracije endotelina i VEGF u plazmi ispitanika.

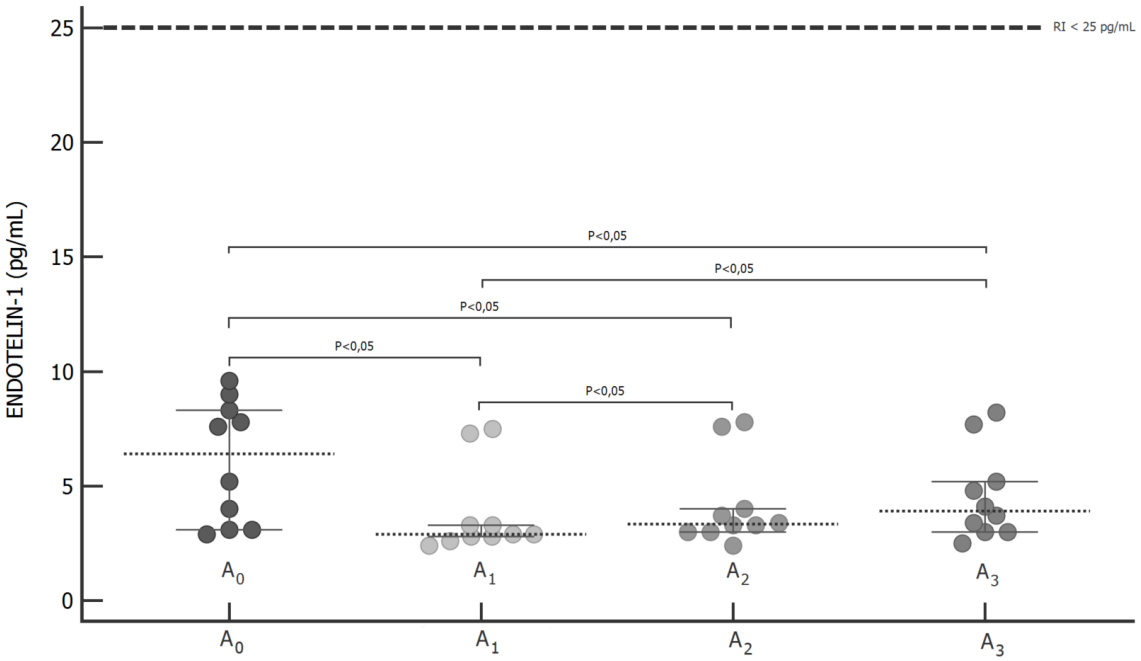
4.5.1. Studija procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja na biomarkere aktivnosti vaskularnog endotela (endotelin-1 i VEGF)

Ako se usporedi vrijednost odmah nakon zarona (A_1) s vrijednošću prije ronjenja (A_0), vidljiv je statistički značajan porast ($P<0,05$) koncentracija VEGF. Međutim, može se uočiti statistički značajan pad koncentracije ($P<0,05$) ako se usporede vrijednosti mjerene 3 sata nakon ronjenja (A_2) i prethodna vrijednost odmah nakon zarona (A_1). Nadalje, koncentracija VEGF statistički značajno raste ($P<0,05$) u točki mjerenoj 6 sati nakon zarona (A_3) u odnosu na prethodno mjerenje (A_2), ali ne vraća se na bazalnu vrijednost (A_0) ($P<0,05$) što je jasno vidljivo na Slici 21. Uočen je i statistički značajan pad koncentracija ($P<0,05$) endotelina-1 odmah nakon zarona (A_1) ako se ta vrijednosti usporede s vrijednostima prije ronjenja (A_0). Porast u odnosu na mjerenje odmah nakon zarona (A_1) uočen u točki mjerenja 3 sata od zarona (A_2) također je statistički značajan ($P<0,05$). Međutim, za razliku od VEGF, 6 sati nakon zarona (A_3) nije postignuta početna koncentracija mjerenja prije zarona (A_0) (Slika 22.).



Slika 21. Učinak jednokratnog SCUBA ronjenja na koncentraciju VEGF.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. P (Friedman ANOVA, *post-hoc* po Conoveru). VEGF – faktor rasta endotela krvnih žila (engl. *vascular endothelial growth factor*), A_0 – neposredno prije ronjenja, A_1 – neposredno nakon ronjenja, A_2 – 3 sata nakon ronjenja, A_3 – 6 sati nakon ronjenja.

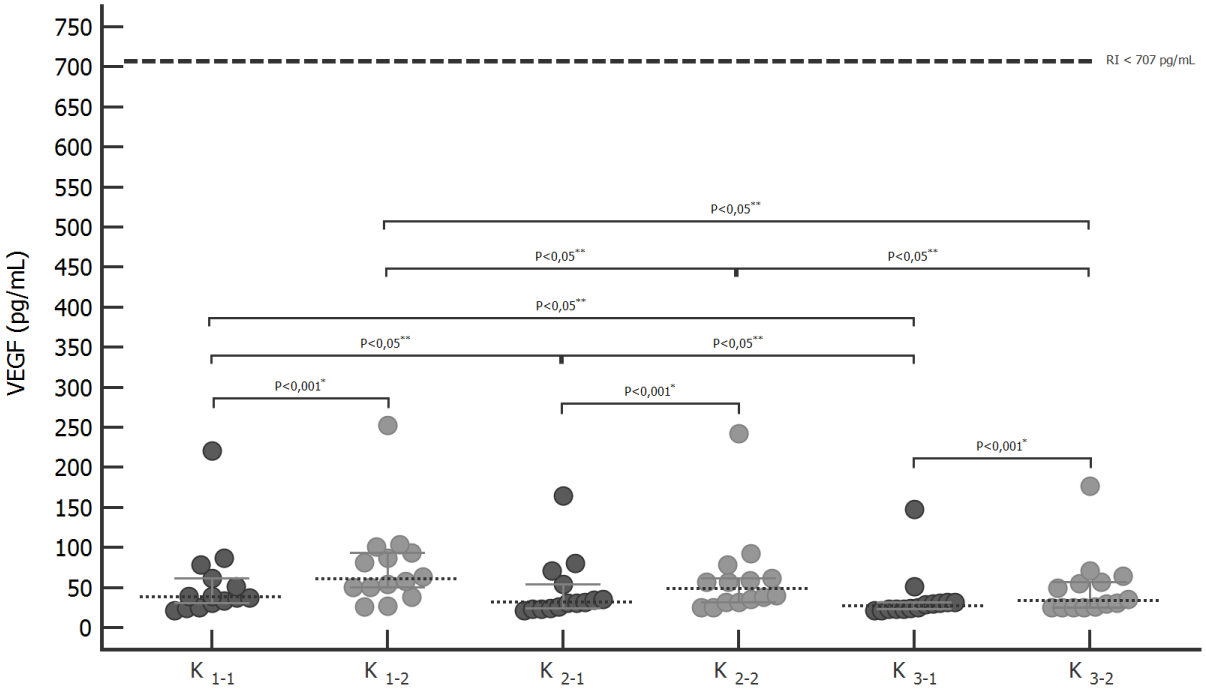


Slika 22. Učinak jednokratnog SCUBA ronjenja na koncentraciju endotelina-1.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. P (Friedman ANOVA, *post-hoc* po Conoveru). A_0 – neposredno prije ronjenja, A_1 – neposredno nakon ronjenja, A_2 – 3 sata nakon ronjenja, A_3 – 6 sati nakon ronjenja.

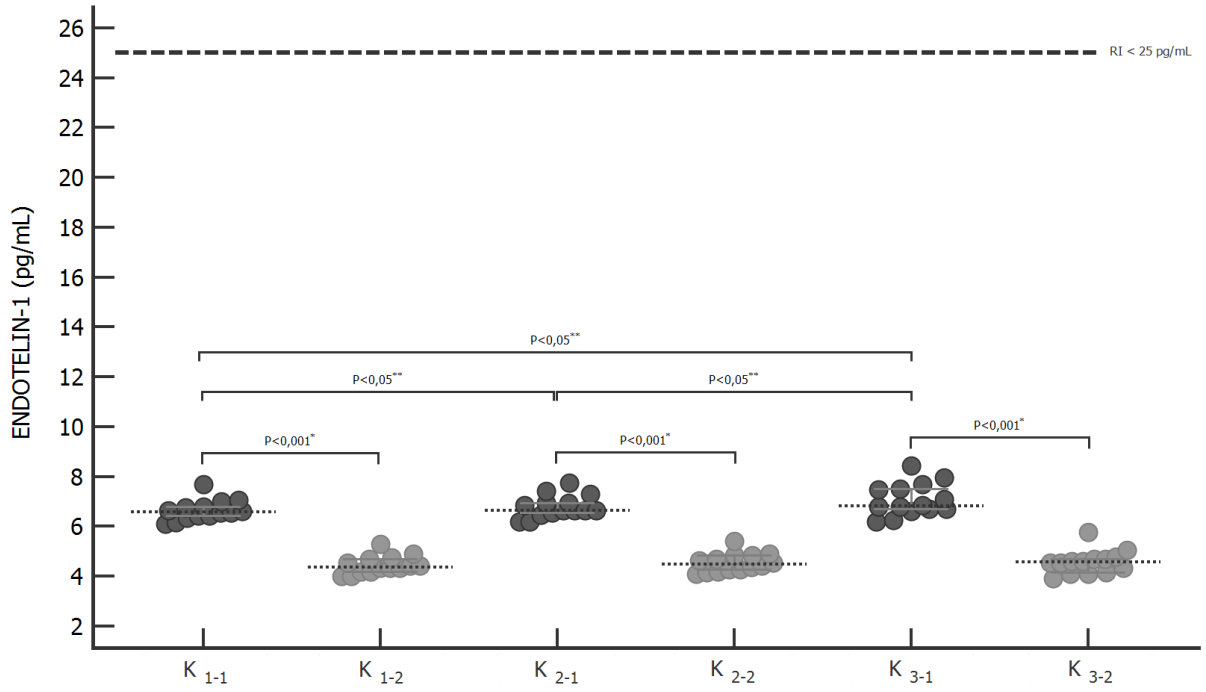
4.5.2. Studija procjene kumulativnog učinka SCUBA ronjenja na biomarkere aktivnosti vaskularnog endotela (endotelin-1 i VEGF)

Uočen je statistički značajan porast (sve P<0,001) koncentracije VEGF te pad (sve P<0,001) koncentracije endotelina-1 nakon svakog izvedenog zarona. Usporedbom isključivo vrijednosti prije i isključivo vrijednosti nakon zarona, korištenjem Friedman testa uz *post-hoc* test po Conoveru, uočava se kontinuirani statistički značajan pad (sve P<0,05) svih koncentracija VEGF (Slika 23.). Koncentracije endotelina-1 rasle su statistički značajno (sve P<0,05) prije svakog izvedenog zarona, dok su vrijednosti nakon zarona ostale nepromijenjene (P=0,426) (Slika 24.).



Slika 23. Kumulativni učinak SCUBA ronjenja na koncentraciju VEGF.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. *statistički značajno (Wilcoxon), **statistički značajno (Friedman ANOVA, *post-hoc* prema Conoveru), VEGF – faktor rasta endotela krvnih žila (engl. *vascular endothelial growth factor*), K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.



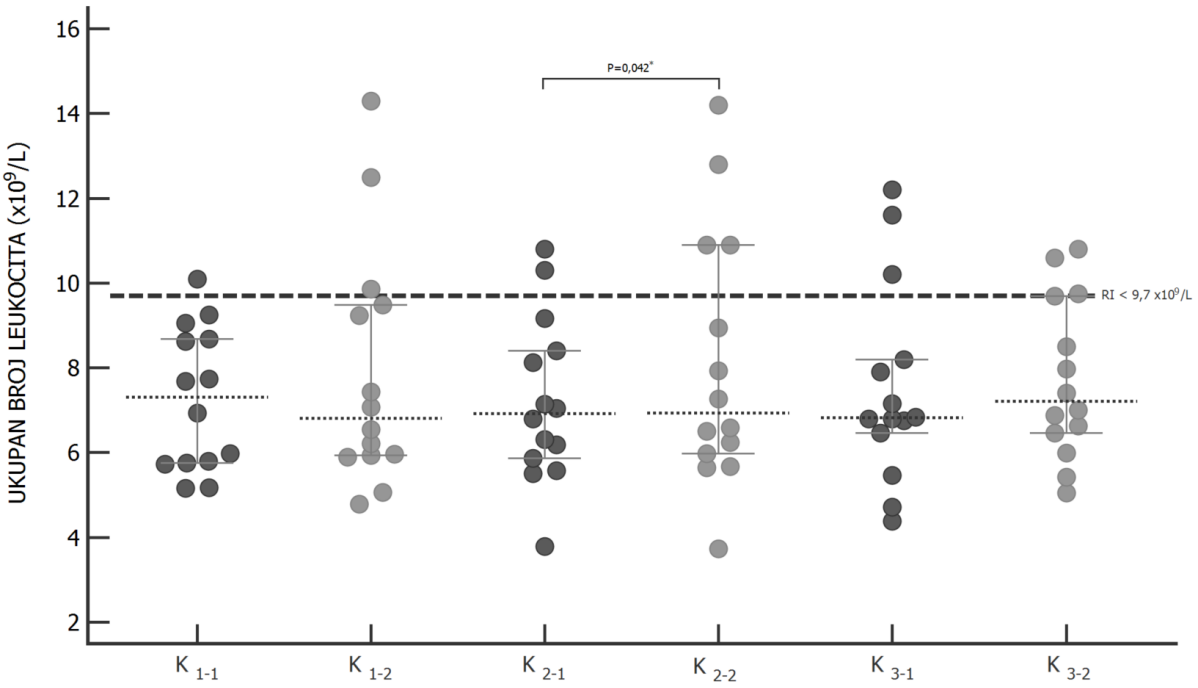
Slika 24. Kumulativni učinak SCUBA ronjenja na koncentraciju endotelina-1.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. *statistički značajno (Wilcoxon), **statistički značajno (Friedman ANOVA, *post-hoc* prema Conoveru), K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.

4.6. UČINAK RONJENJA NA IMUNOSNI SUSTAV MJERENJEM BIOMARKERA UPALE

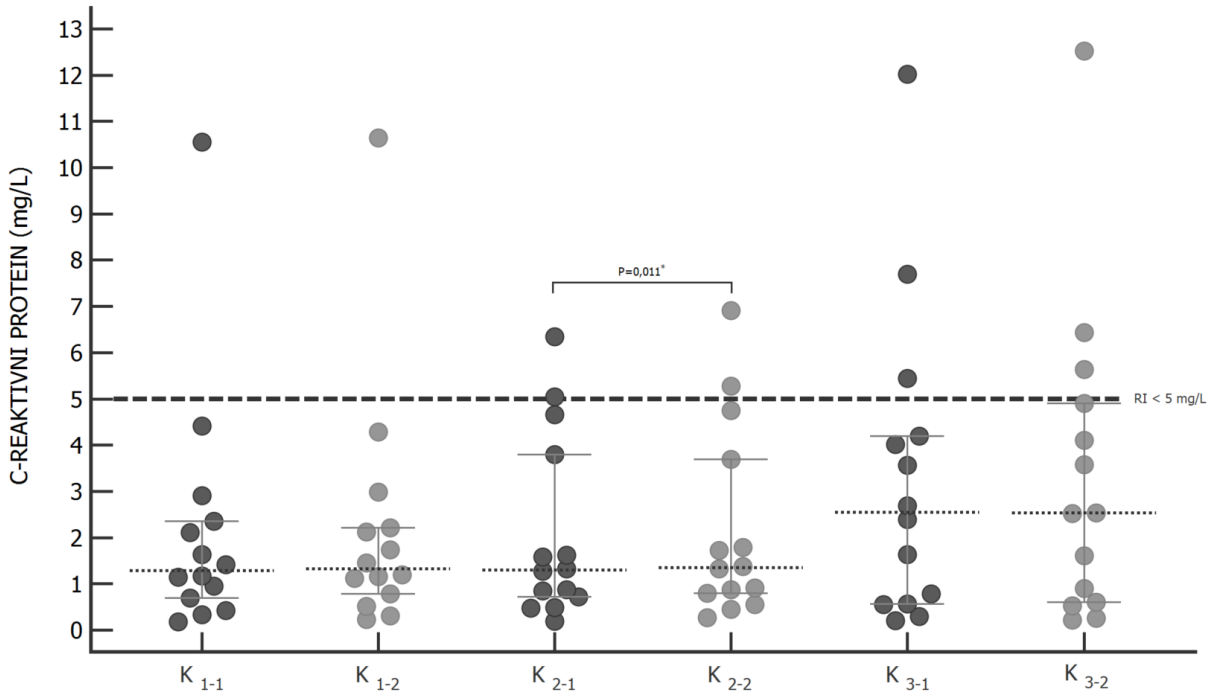
4.6.1. Studija procjene kumulativnog učinka SCUBA ronjenja ne biomarkere upale (broj leukocita, CRP i interleukin-6)

U cilju ispitivanja učinka kumulativnog učinka SCUBA ronjenja na imunosni sustav izmjereni su ukupan broj leukocita te serumske koncentracije CRP-a i IL-6 neposredno prije i nakon 1., 3. i 5. zarona. Ukupan broj leukocita i koncentracija CRP-a nisu se statistički značajno mijenjale kada se uspoređuju vrijednosti nakon 1. (K_{1-2}) ($P_{leukociti}$=0,194, P_{CRP}=0,173) i 5. (K_{3-2}) ($P_{leukociti}$=0,761, P_{CRP}=0,296) zarona sa svojim pripadajućim mjerenjima prije zarona (K_{1-1}, K_{3-1}). Međutim, uočen je statistički značajan porast nakon 3. zarona (K_{2-2} u odnosu na K_{2-1}) ($P_{leukociti}$=0,042, P_{CRP}=0,011) (Slika 25., Slika 26.). Kada se uspoređuju isključivo sve vrijednosti prije (K_{1-1}, K_{2-1}, K_{3-1}) i sve vrijednosti nakon (K_{1-2}, K_{2-2}, K_{3-2}) pojedinih zarona ne uočava se statistički značajna razlika za leukocite (P_{prije}=0,801, $P_{poslije}$=0,765) i CRP (P_{prije}=0,623, $P_{poslije}$=0,936). Međutim, uočen je statistički značajan porast interleukina-6 svaki put nakon zarona (sve P<0,001). Kada se pak uspoređuju samo vrijednosti prije i samo vrijednosti nakon zarona, uočava se statistički značajan porast IL-6 mjeren poslije 3. (K_{2-2}) i 5. (K_{3-2}) zarona u odnosu na 1. zaron (K_{1-2}) (obje P<0,05) (Slika 27.).



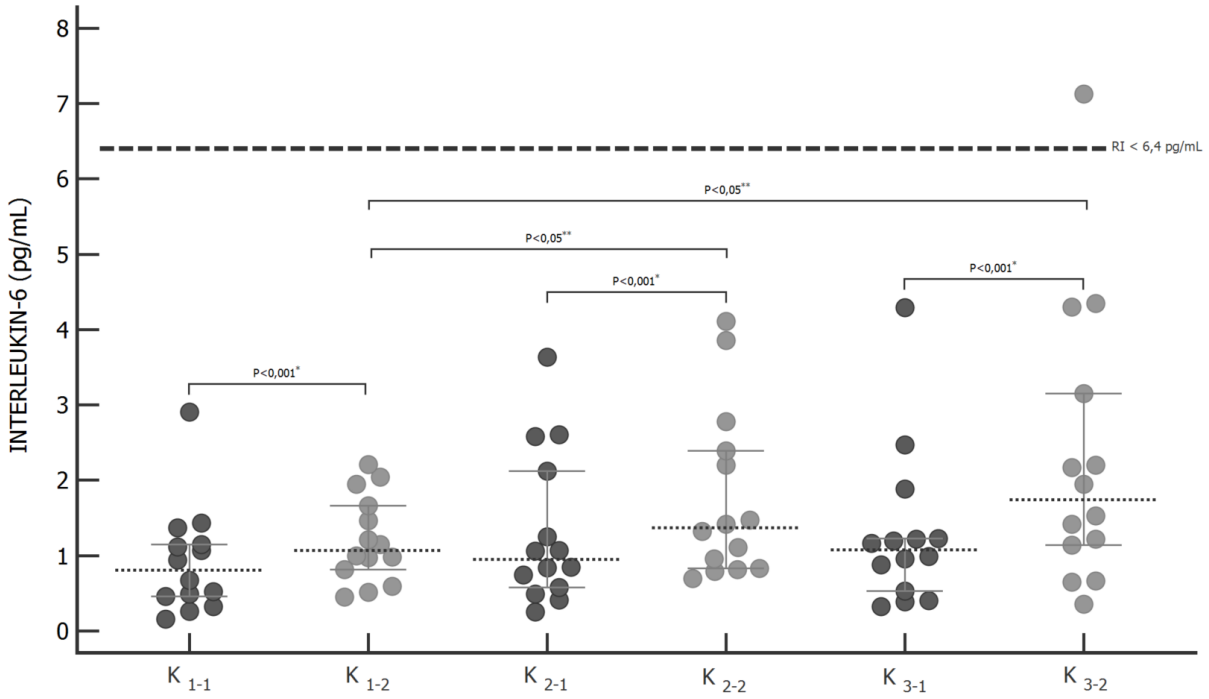
Slika 25. Kumulativni učinak SCUBA ronjenja na ukupan broj leukocita.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. *statistički značajno (Wilcoxon), K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.



Slika 26. Kumulativni učinak SCUBA ronjenja na koncentraciju CRP.

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. *statistički značajno (Wilcoxon), CRP – C-reaktivni protein, K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.



Slika 27. Kumulativni učinak SCUBA ronjenja na koncentraciju interleukina-6 (IL-6).

Rezultati su prikazani točkastim grafikonom (engl. *dot-plot*) s označenim medijanima, interkvartilnim rasponom i gornjom granicom referentnog intervala. *statistički značajno (Wilcoxon), **statistički značajno (Friedman ANOVA, *post-hoc* prema Conoveru), K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.

4.7. KLINIČKA ZNAČAJNOST PROMJENE BIOMARKERA

U Tablici 8. prikazani su svi analitički koeficijenti varijacije metoda (CV_A), intraindividualne varijacije parametara (CV_I), interindividualne varijacije parametara (CV_G) te pripadajuće izračunane vrijednosti RCV (engl. *reference change value*) i II (engl. *individuality index*) za sve rutinski određivane parametre i Gal-3.

Tablica 8. Analitički koeficijenti varijacije, biološke varijacije te izračunane RCV vrijednosti i indeks individualnosti za rutinski određivane parametre.

PARAMETAR	CV_A (%)	CV_I (%)	CV_G (%)	RCV (%)	II
NT-proBNP	3,2	10,0	16,0	± 29,1	0,6
hs-troponin I	5,4	14,1	63,8	± 41,7	0,2
Gal-3	3,5	4,5	27,9	± 15,8	0,2
mioglobin	2,2	13,9	29,6	± 39,0	0,5
hs-CRP	2,0	49,7	89,2	± 137,9	0,6
CRP	4,2	42,2	76,3	± 177,6	0,6
interleukin-6	3,8	48,5	39,4	± 134,8	1,2
broj leukocita	3,4	11,4	21,3	± 33,0	0,5
CK	3,8	22,8	40,0	± 64,1	0,6
CK-MB	4,2	19,7	24,3	± 55,8	0,8
LD	3,7	8,6	14,7	± 26,0	0,6

CV_A – analitički koeficijent varijacije preuzet iz podataka unutrašnje kontrole kvalitete rada Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava za razdoblje 1.1-31.12.2018. za sve parametre osim za Gal-3 za kojeg je CV_A preuzet iz proizvođačevih podataka o inicijalnoj verifikaciji testa i interleukin-6 za kojeg je CV_A preuzet iz vlastitih laboratorijskih podataka o inicijalnoj verifikaciji testa, CV_I – intraindividualna biološka varijacija, CV_G – interindividualna biološka varijacija preuzeti su iz baze podataka Minchinela i suradnika (211), dok su za Gal-3 i interleukin-6 korišteni dostupni literaturni podaci (212, 213), RCV – klinički značajna promjena (engl. *reference change value*), II – indeks individualnosti (engl. *individuality index*), CRP – C-reaktivni protein, CK-MB – kreatin-kinaza, MB izoenzim, hs – visoko-osjetljivi (engl. *high-sensitivity*), NT-proBNP – N-terminalni fragment prohormona moždanog natriuretskog peptida (engl. *brain natriuretic peptide*), Gal-3 – galektin-3, CK – kreatin-kinaza, LD – laktat-dehidrogenaza.

4.7.1. Studija procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja

Srednje vrijednosti postotaka razlike svih ispitanika između pojedinih rezultata u svim točkama mjerenja prikazane su u Tablici 9. Uočena je klinički značajna promjena koncentracija (relativna razlika između dva mjerenja veća od izračunanog RCV-a) hs-TnI i NT-proBNP tijekom perioda oporavka (A_2, A_3) u odnosu na vrijednost prije zarona (A_0). Ne postoji klinički značajna promjena koncentracija hs-TnI i NT-proBNP između vrijednosti odmah nakon zarona (A_1) i prije zarona (A_0). Koncentracija Gal-3 klinički je značajno porasla u svojoj vršnoj vrijednosti (A_2) u odnosu na vrijednost prije ronjenja (A_0), ali i klinički značajno pala 6 sati nakon ronjenja (A_3) u odnosu na vršnu koncentraciju (A_2). Uočen je također, klinički značajan pad mioglobina 6 sati nakon ronjenja (A_3) u odnosu na vršnu vrijednost odmah nakon ronjenja (A_1). Koncentracija hs-CRP nije se klinički značajno mijenjala.

Tablica 9. Procjena kliničkog značaja promjene rutinskih biomarkera studije učinka jednokratnog SCUBA ronjenja.

PARAMETAR	**SR *vs.* A_0**			**SR *vs.* A1**		**SR *vs.* A_2**
	A_1	**A_2**	**A_3**	**A_2**	**A_3**	**A_3**
NT-proBNP	23,8%	**31,4%***	**38,7%***	9,3%	18,6%	10,8%
hs-troponin I	33,1%	**53,4%***	**61,2%***	33,2%	**46,4%***	19,3%
Gal-3	11,5%	**22,4%***	1,3%	12,7%	-11,5%	**-29,9%***
mioglobin	35,2%	21,6%	7,6%	-22,3%	**-49,5%***	-22,4%
hs-CRP	-3,4%	-12,9%	-28,8%	-9,2%	-23,5%	-9,4%

* klinički značajna promjena (promjena veća od izračunane RCV), SR – srednja vrijednost postotaka razlike svih ispitanika, NT-proBNP – N-terminalni fragment prohormona moždanog natriuretskog peptida (engl. *brain natriuretic peptide*), hs – visoko-osjetljivi (engl. *high-sensitivity*), Gal-3 – galektin-3, CRP – C-reaktivni protein. A_0 – neposredno prije ronjenja, A_1 – neposredno nakon ronjenja, A_2 – 3 sata nakon ronjenja, A_3 – 6 sati nakon ronjenja.

4.7.2. Studija procjene kumulativnog učinka SCUBA ronjenja

Srednje vrijednosti postotaka razlike svih ispitanika između pojedinih rezultata u svim točkama mjerenja prikazane su u Tablici 10. Uočeni su klinički značajni porasti koncentracija hs-TnI i Gal-3 nakon svakog zarona (K_{1-2}, K_{2-2}, K_{3-2}) u odnosu na pripadajuće vrijednosti prije zarona (K_{1-1}, K_{2-1}, K_{3-1}). Koncentracija NT-proBNP bila je klinički značajno viša samo nakon 5. zarona (K_{3-2}) u odnosu na vrijednost prije ronjenja (K_{3-1}), dok je koncentracija mioglobina klinički značajno rasla samo nakon 1. zarona (K_{1-2}) u odnosu na vrijednost prije zarona (K_{1-1}). Ostali parametri nisu se klinički značajno mijenjali niti nakon jednog zarona.

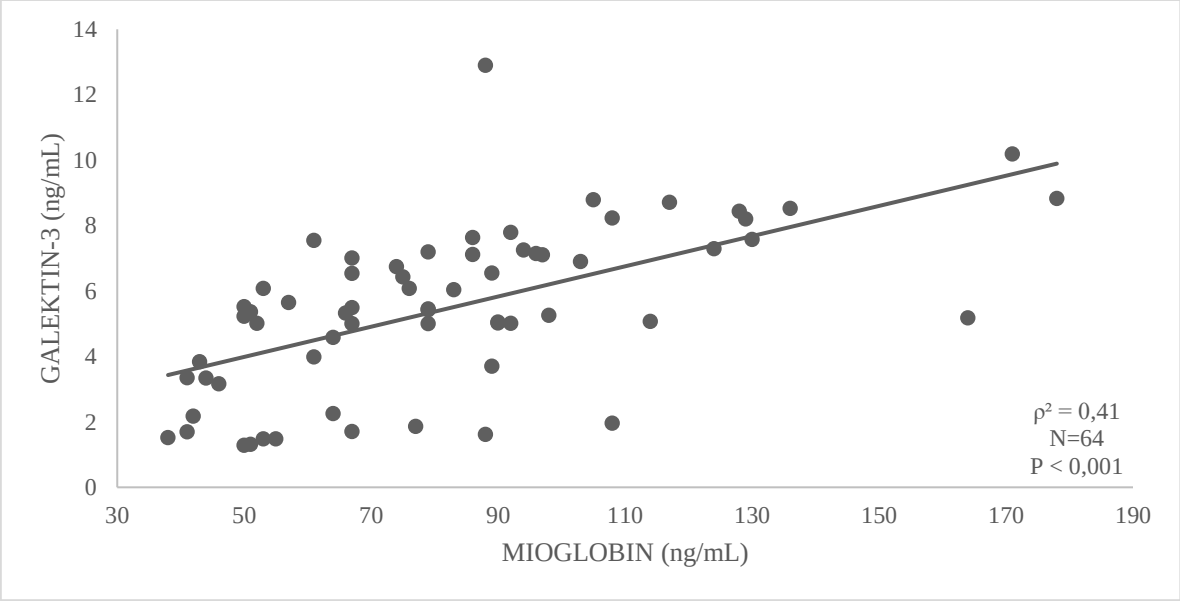
Tablica 10. Procjena kliničkog značaja promjene rutinskih biomarkera studije kumulativnog učinka.

PARAMETAR	K_{1-2} *vs.* K_{1-1}	K_{2-2} *vs.* K_{2-1}	K_{3-2} *vs.* K_{3-1}
NT-proBNP	20,3%	23,9%	**31,4%***
hs-troponin I	**58,5%***	**49,3%***	**47,9%***
Gal-3	**62,5%***	**19,3%***	**29,1%***
mioglobin	**61,3%***	31,6%	27,8%
hs-CRP	111,37%	14,8%	6,1%
CRP	6,3%	7,5%	1,9%
interleukin-6	71,8%	55,2%	83,9%
broj leukocita	6,5%	10,1%	5,4%
CK	23,4%	15,5%	19,2%
CK-MB	19,2%	39,7%	3,4%
LD	5,6%	12,8%	10,1%

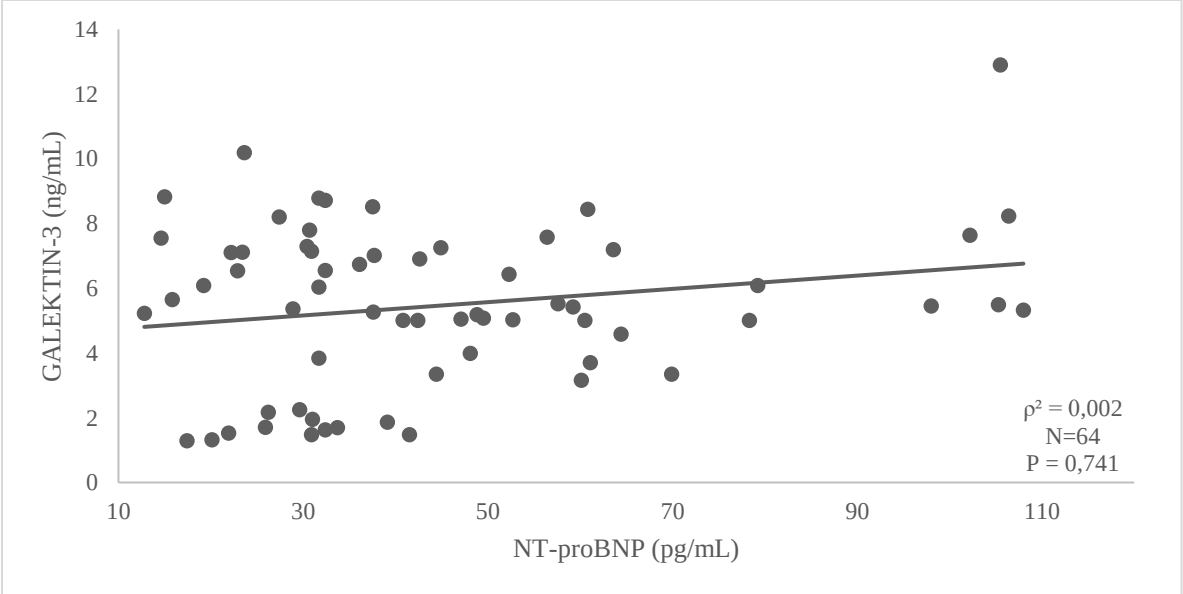
* klinički značajna promjena (promjena veća od izračunane RCV), CRP – C-reaktivni protein, CK-MB – kreatin-kinaza, MB izoenzim, hs – visoko-osjetljivi (engl. *high-sensitivity*), NT-proBNP – N-terminalni fragment prohormona moždanog natriuretskog peptida (engl. *brain natriuretic peptide*), Gal-3 – galektin-3, CK – kreatin-kinaza, LD – laktat-dehidrogenaza, , K_{1-1} – neposredno prije 1. zarona, K_{1-2} – neposredno nakon 1. zarona, K_{2-1} – neposredno prije 3. zarona, K_{2-2} – neposredno nakon 3. zarona, K_{3-1} – neposredno prije 5. zarona, K_{3-2} – neposredno nakon 5. zarona.

4.8. KORELACIJSKE ANALIZE

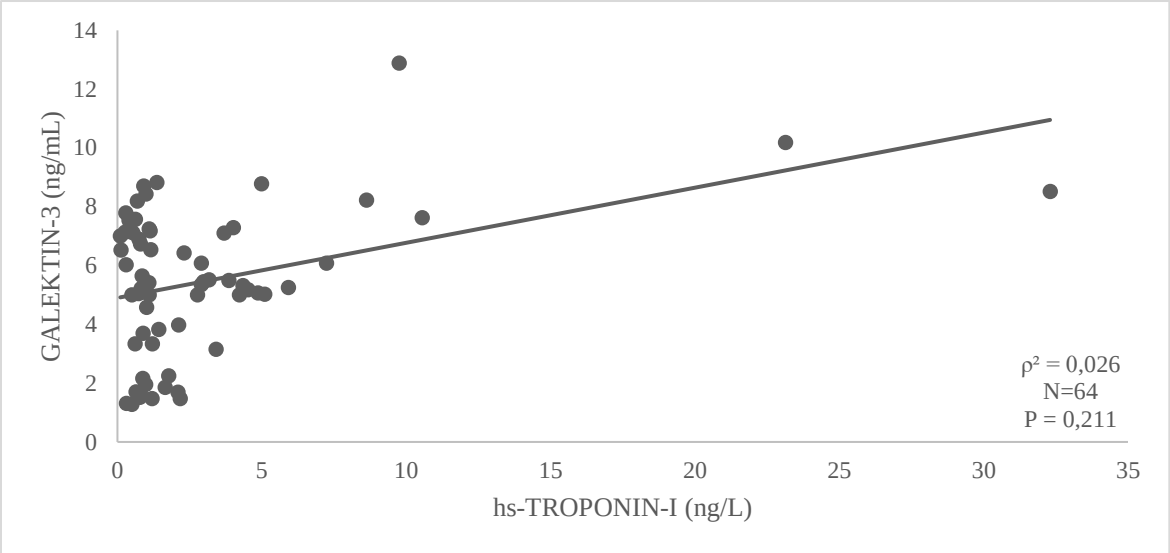
S ciljem pretpostavke mjesta predominantno izlučenog Gal-3 za vrijeme i nakon ronjenja u studiji procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja procijenjena je povezanost između Gal-3 i mioglobina, Gal-3 i hs-TnI te Gal-3 i NT-proBNP. Pronađena je umjerena do dobra pozitivna povezanost između Gal-3 i mioglobina (P<0,001, ρ=0,64, ρ^2=0,41) (Slika 28.) s 41% zajedničkih vrijednosti. S druge strane, nije uočena povezanost Gal-3 i NT-proBNP (P=0,741, ρ=0,04, ρ^2=0,002) (Slika 29.) te Gal-3 i hs-TnI (P=0,211, ρ=0,16, ρ^2=0,026) (Slika 30.).



Slika 28. Povezanost galektina-3 i mioglobina u studiji procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja.



Slika 29. Povezanost galektina-3 i NT-proBNP u studiji procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja.



Slika 30. Povezanost galektina-3 i hs-TnI u studiji procjene učinka jednokratnog SCUBA ronjenja.

5 RASPRAVA

5.1. STUDIJA UČINKA JEDNOKRATNOG SCUBA RONJENJA

Rezultati ove studije pokazali su da rekreacijsko SCUBA ronjenje s komprimiranim zrakom na dubini od 30 m u trajanju 30 min nakon zimskog perioda neronjenja od najmanje 5 mjeseci uzrokuje promjene plazmatskih koncentracija Gal-3, srčanih (NT-proBNP, hs-TnI) i vaskularnih (VEGF, ET-1) te biomarkera skeletnih mišića (mioglobin). Pri tome su u ovoj studiji po prvi puta istraživane promjene plazmatskih koncentracija Gal-3, hs-TnI, hs-CRP i mioglobina kod ovog tipa ronjenja.

Najveće promjene koncentracija Gal-3, NT-proBNP-a, hs-TnI i mioglobina uočene su odmah nakon ronjenja (A_1). Međutim, dok je za Gal-3 i mioglobin uočeno vraćanje vrijednosti na one bazalne (A_0) unutar 6 sati od zarona (A_3), koncentracije NT-proBNP i hs-TnI u istom su periodu stabilno kontinuirano rasle.

U prethodnim studijama na SCUBA roniocima, porast plazmatske koncentracije hs-TnI opisan je samo nakon reverzibilne disfunkcije miokarda uzrokovane dekompresijskom bolešću (186) i imerzijom uzrokovanog edema pluća (188). Stoga je ova studija po prvi put pokazala da se uočeni porast koncentracije hs-TnI nakon ronjenja može povezati s fenomenom prolazne i reverzibilne ishemije miokarda koja je ranije uočena u studijama različitih tjelesnih aktivnosti (214). Koncentracije hs-TnI rasla je odmah nakon ronjenja (A_1) te je svoju vršnu vrijednost postigla 6 sati nakon ronjenja (A_3). Premda nismo bili u mogućnosti pratiti kako bi se koncentracija hs-TnI ponašala nakon 6 sati, isto vrijeme postizanja vršne koncentracije uočeno je u ranijim studijama na sportašima koji su praćeni i do 24 sata nakon završetka polumaratona (215). Brojne su studije potvrdile da je epizoda intenzivne tjelesne aktivnosti praćena porastom koncentracija visoko-osjetljivog troponina I, ali i troponina T (216 – 219). Međutim, fiziologija ronjenja bitno se razlikuje od fiziologije drugih oblika tjelesne aktivnosti, ponajprije zbog ekstremnih uvjeta okoliša u kojem se odvija, a koji u slučaju ronjenja zasigurno imaju veću ulogu na (pato)fiziologiju kardiovaskularnog sustava nego sama tjelesna aktivnost. Na molekularnoj razini, otpuštanje troponina I te porast njegove koncentracije u cirkulaciji nakon tjelesne aktivnosti posljedica su međudjelovanja nekoliko različitih čimbenika poput promjene integriteta membrane srčanih miocita (214), unutarstanične homeostaze kalcija uzrokovane djelovanjem slobodnih radikala, kao i pojačanim otpuštanjem kateholamina uslijed aktivacije simpatičkog živčanog sustava (86). Gotovo je sigurno da su sva tri mehanizma djelomično uključena u porast koncentracije hs-TnI i nakon ronjenja, ali najvjerojatniji je onaj uzrokovan nastankom slobodnih radikala uslijed hiperoksije (220) i aktivacije simpatičkog živčanog sustava zbog duge izloženosti hladnoći (221).

Osim djelovanja na otpuštanje troponina, opće je poznato da je adrenergička aktivacija izravan uzrok proizvodnje i otpuštanja BNP-a, odnosno njegovog prohormonskog amino-terminalnog fragmenta (NT-proBNP) (222). Ipak, postoje i drugi faktori koji mogu utjecati na promjene koncentracije NT-proBNP. Stoga, kontinuirani porast koncentracije NT-proBNP uočen tijekom cijelog promatranog perioda nakon ronjenja (A_1 – A_3) može biti posljedica pojačanog rastezanja miokarda i aktivacije specijalnih mehaničkih receptora koje se kod ronjenja događa najvjerojatnije uslijed promjene volumena plazme, a ne kao odgovor na pojačani tjelesni napor (223). Imerzija kod ljudi uzrokuje intratorakalno povećanje volumena krvi te centralnog venskog i tlaka u desnom atriju što vodi rastezanju srčanih komora i povećanju srčanog udarnog i minutnog volumena uzrokujući hemodinamičke promjene koje mogu utjecati na izlučivanje BNP i porast koncentracije NT-proBNP (224, 225). Moguće je da je porast koncentracije NT-proBNP odraz promjena u dijastoličkom punjenju srca i prolazne disfunkcije ili ozljede miokarda. Uočeni kontinuirani porast tijekom faze oporavka nakon zarona (A_1 – A_3) najvjerojatnije se može objasniti nastavkom endokrine aktivnosti uslijed mehaničkog naprezanja koja se u zdravom miokardu može događati unatoč tome što je djelovanje imerzije, pritiska i volumnog rastezanja odavno prestalo. Rezultati su ove studije sukladni rezultatima sličnih studija, ali u kojima je ronjenje provedeno na relativno malim dubinama (10 – 15 min) tijekom 30 – 60 min, gdje je također uočen porast plazmatske koncentracije NT-proBNP odmah nakon ronjenja (181, 182, 184).

Ova je studija pokazala da rekreacijsko SCUBA ronjenje može uzrokovati porast plazmatske koncentracije Gal-3, čak i na klinički značajnoj razini. Najviša koncentracija Gal-3 uočena je 3 sata nakon ronjenja (A_2), dok se 6 sati nakon ronjenja (A_3) ona spustila i bila usporediva s vrijednošću prije ronjenja. S obzirom na ubikvitarnu prisutnost Gal-3, teško je definirati precizno što je glavni uzrok njegovog otpuštanja kao i koja se vrsta stanica može smatrati glavnim izvorom plazmatskog Gal-3.

Potencijalno glavnim izvorom izlučenog Gal-3 tijekom tjelesne aktivnosti, pa i ronjenja, mogu se smatrati skeletni mišići. Naime, u provedenoj studiji može se uočiti da su Gal-3 i mioglobin jedina dva biomarkera koja su pokazala sličnu dinamiku promjene koncentracija. Nakon inicijalnog porasta, oba parametra su nakon postizanja vršnih koncentracija (mioglobin odmah nakon – A_1, Gal-3 3 sata nakon – A_2) 6 sati nakon zarona (A_3) pala na vrijednosti prije ronjenja (A_0). Otpuštanje mioglobina događa se najvjerojatnije uslijed vazokonstrikcije, periferne hipoksije i promjena vezanih uz propusnost membrane skeletnih mišića, što su najvjerojatnije uzroci spontanog otpuštanja Gal-3. Ovakav zaključak proizlazi i iz korelacijske analize i procjene povezanosti parametara gdje je uočena umjerena povezanost upravo Gal-3 i

mioglobina, dok povezanost ostalih parametara (hs-TnI, NT-proBNP) s Gal-3 nije uočena. Pored toga, prethodno istraživanje Hättascha i suradnika (106) pokazalo je da je ekspresija mRNA Gal-3 u skeletnim mišićima značajnije viša nego u srčanom mišiću (98% naprema 20%) kod uvježbanih miševa u odnosu na sedentarne životinje te je na taj način identificiralo skeletni mišić kao glavni izvor otpuštanja Gal-3 tijekom i nakon vježbanja.

Jedno od potencijalnih mjesta izlučivanja Gal-3 može biti miokard, istim mehanizmom kao što je to slučaj kod TnI ili BNP, odnosno narušavanjem propusnosti membrane miocita. S obzirom na proupalnu ulogu Gal-3 i njegovu prisutnost u rezidentnim makrofagima (100), prolazni porast njegove plazmatske koncentracije može se povezati i s generaliziranim odgovorom imunosnih stanica na stres uzrokovan SCUBA ronjenjem. Stoga, nije moguće u potpunosti isključiti i ostale izvore Gal-3, poput makrofaga. Međutim, ukoliko dođe do porasta Gal-3 koji prati srčanu disfunkciju onda je vrlo vjerojatno da je izvor Gal-3 kardiomiocit, a ne makrofag (226).

Uočeni porast plazmatske koncentracije Gal-3 odmah nakon ronjenja (A_1) u suglasju je s prethodnim studijama praćenja tjelesnih aktivnosti. Tako je uočeno da koncentracija Gal-3 raste 1 i 3 sata nakon vježbanja te se vraća na bazalne vrijednosti unutar 24 sata od završetka polumaratona (106, 227, 228).

Premda u ovoj studiji nije uočena nikakva značajna promjena koncentracije hs-CRP nakon jednokratnog SCUBA ronjenja, prethodna su istraživanja pokazala da jednokratna epizoda intenzivne tjelesne aktivnosti može aktivirati imunosni sustav i otpuštanje proupalnih citokina (229). Međutim, meta analiza Michigana i suradnika (230) dovela je do zaključka da nema jasnog odgovora na pitanje kako tjelovježba utječe na promjene plazmatske koncentracije CRP-a, s obzirom na to da su rezultati dobiveni različitim istraživanjima kontradiktorni. U ovom istraživanju jednokratna epizoda SCUBA ronjenja nakon zimskog perioda neronjenja nije uzrokovala značajniju aktivaciju općih upalnih procesa koji bi mogli potaknuti izlučivanje CRP-a. Međutim, ne smije se isključiti da je mogući ishod ovakvog rezultata vrlo velika intraindividualna biološka varijabilnost CRP-a (211).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su, nadalje, da je ronjenje u uvjetima rekreacijskog SCUBA ronjenja uzrokovalo značajan pad plazmatske koncentracije ET-1 i to odmah nakon zarona (A_1) koja je takva ostala tijekom cijelog perioda oporavka u uvjetima normalnog tlaka okoline (normobarije), premda uz blagi trend porasta prema bazalnim vrijednostima. Ranija istraživanja pokazala su da smanjenje koncentracije ET-1 najvjerojatnije rezultira supresijom njegove vazokonstriktorske aktivnosti nužne za regulaciju središnje arterijske popustljivosti (engl. *central arterial compliance*) (231). Značajni pad koncentracije ET-1 odmah nakon

ronjenja mogao bi biti nužan za održavanje prikladnog vaskularnog tonusa tijekom, ali i nakon ronjenja, u periodu oporavka. Drastičan pad koncentracije događa se, najvjerojatnije, uslijed potrebe organizma za održavanjem produljene vazodilatacije, s obzirom na to da se vazokonstrikcija događa i u periodu nakon ronjenja, unatoč tome što je djelovanje hladne vode i pritiska izranjanjem prekinuto. Ranija istraživanja pokazala su da redovita tjelovježba značajno smanjuje koncentraciju ET-1 u zdravih starijih ispitanika (142). Nadalje, uočeno je da je aerobna vježba kod mlađih ispitanika reducirala plazmatsku koncentraciju ET-1 te da su se vrijednosti stabilizirale nedugo nakon završetka aktivnosti (142). Osim kao indikator vaskularne funkcije, porast koncentracije ET-1 proučavan je i u kontekstu akutne moždane ishemije koja bi se mogla događati tijekom SCUBA ronjenja uslijed hipoksije koja stimulira sintezu i otpuštanje ET-1 iz oštećenih endotelnih stanica i neurona (193). Također, porast koncentracije ET-1 povezuje se s razvojem endotelne disfunkcije uzrokovane stvaranjem tzv. tihih plinskih mjehurića tijekom razvoja komplikacija SCUBA ronjenja (npr. DCS) (177 – 180). Budući da u ovom dijelu istraživanja (jednokratno SCUBA ronjenje) nije uočen porast ET-1, može se zaključiti da ronjenje u ovakvim uvjetima (dubina, trajanje, plinska smjesa) ne uzrokuje niti značajnu moždanu ishemiju, niti oštećenje endotelne funkcije, niti nakupljanje mjehurića zraka.

Porast koncentracije VEGF, uočen odmah nakon zarona (A_1), najvjerojatnije je posljedica pojačane sinteze i lučenja iz stanica glatkih mišića krvnih žila, uzrokovane hiperoksijom povezanom sa SCUBA ronjenjem (232). Osim toga, otpuštanje VEGF najvjerojatnije je povezano s njegovom glavnom fiziološkom funkcijom tijekom tjelesne aktivnosti u okolišu s visokim tlakom, odnosno stimulacijom kapilarizacije (neovaskularizacije) perifernog tkiva (poglavito mišićnog) kako bi se osigurala dostatna tkivna oksigenacija u uvjetima tjelovježbe (233). Moguće je također da je NO, koji se otpušta iz glatkog mišićja krvnih žila tijekom SCUBA ronjenja (233), jedan od stimulatora sinteze VEGF s obzirom na to da je prepoznat njegov utjecaj na signalnu kaskadu VEGF. Međutim, porast VEGF može se povezati i s nastajanjem ROS-a (233) koje je povezano sa SCUBA ronjenjem (220). S obzirom na to da je 6 sati nakon zarona (A_3) uočen povratak koncentracije VEGF na vrijednosti prije ronjenja, značajni porast uočen odmah nakon ronjenja (A_1) može se smatrati fiziološkim odgovorom i adaptacijom organizma okolišnim uvjetima u kojima se ronjenje događa.

Rezultati dobiveni mjerenjem plazmatskih koncentracija ET-1 i VEGF u suglasju su s jedinom prethodnom studijom provedenom na profesionalnim roniocima u uvjetima tehničkog

ronjenja gdje je jednako tako uočen pad koncentracije ET-1 i porast VEGF odmah nakon ronjenja (192).

5.2. STUDIJA KUMULATIVNOG UČINKA SCUBA RONJENJA

Studija kumulativnog učinka SCUBA ronjenja na biomarkere funkcije i integriteta kardiovaskularnog sustava pokazala je da opetovano izvođenje SCUBA ronjenja nakon 5 mjeseci neronjenja, dinamikom jednog zarona tjedno kroz 5 tjedana za redom na dubinama 20 – 30 m u trajanju 30 min, aktivira mehanizme prilagodbe kardiovaskularnog i mišićnog sustava te najvjerojatnije neke oblike imunosnog odgovora. Kumulativni učinak 5 susljednih zarona očituje se u statistički značajnim promjenama koncentracija biomarkera srčanog (hs-TnI, NT-proBNP, hs-CRP) i mišićnog (mioglobin, Gal-3) oštećenja te aktivacije vaskularnog endotela (ET-1, VEGF) i upale (IL-6). Nadalje, svaki zaron u kojem je uzorkovana krv, uzrokovao je statistički značajne promjene koncentracija svih navedenih parametara, ali i katalitičkih koncentracije CK i LD. Kumulativni učinak nije uočen mjerenjem ukupnog broja leukocita, koncentracije CRP i katalitičke koncentracije CK-MB, iako je za navedene parametre uočen blagi porast vrijednosti nakon 3. zarona.

Brojna istraživanja pokazala su da tjelesna aktivnost može uzrokovati jaki upalni odgovor karakteriziran mobilizacijom leukocitima i porastom koncentracija cirkulirajućih upalnih medijatora koje proizvode imunosne stanice i aktivno mišićno tkivo (152). Međutim, stabilne vrijednosti leukocita i CRP, zajedno sa nepromijenjenim koncentracijama IL-6 prije ronjenja, sugeriraju da redovito rekreacijsko SCUBA ronjenje prakticirano jednom tjedno, kroz mjesec dana, ne uzrokuje aktivaciju sustavne upalne reakcije, a izostanak porasta ukupnog broja leukocita nakon 3. zarona nakon što se iz analize izbace stršeće vrijednosti to dodatno potvrđuje.

Blagi, ali statistički značajan porast koncentracije IL-6 uočen nakon svakog zarona, može značiti aktivaciju imunosnog odgovora organizma. Zanimljivo je, da je otpuštanje proupalnih citokina (TNF-α, IL-1β i IL-6) nakon tjelesne aktivnosti dovoljnog intenziteta praćeno susljednim otpuštanjem protuupalnih regulatornih citokina (IL-4, IL-10, IL-1RA i IL-13) koji umanjuju upalni odgovor (153). S druge strane, IL-6 se sintetizira u aktivnim mišićima (onima u kojima se odvijaju najmasovnije kontrakcije) kao odgovor na dugotrajno vježbanje, s ciljem održavanja energetskog statusa stanica tijekom tjelovježbe i to na način da stimulira proizvodnju glukoze procesom glukoneogeneze i aktivira metabolizam masti stimulacijom oksidacije masnih kiselina (234). Prema tome, pojačane potrebe za energijom u mišićima, kao dio adaptacijskog odgovora na ponavljano ronjenje, mogu biti uzrokom sve većih

porasta IL-6 nakon zarona u odnosu na vrijednosti prije zarona, koji su uočeni u ovom istraživanju.

Rekreacijsko SCUBA ronjenje smatra se tjelesnom aktivnošću umjerenog intenziteta, a statistički značajni porasti koncentracija mioglobina te katalitičkih koncentracija CK i LD nakon svakog zarona potvrđuju narušavanje integriteta membrane skeletnih mišićnih vlakana uslijed fizičkog napora. Druge su studije također uočile porast katalitičke koncentracije CK i LD nakon SCUBA ronjenja (193, 215). Međutim, porasti vrijednosti bilo kojeg od navedenih parametara ne mogu se ni približno uspoređivati s vrijednostima mjerenima nakon tjelesnih aktivnosti visokih i vrlo visokih intenziteta, poput maratona, gdje je uočeno višestruko povećanje u odnosu na bazalne, ali i referentne vrijednosti (235). Stoga je logično zaključiti da se narušavanje integriteta membrane vlakana skeletnih mišića kod SCUBA ronjenja događa u puno manjem opsegu nego je to slučaj kod drugih oblika intenzivne tjelesne aktivnosti. Zanimljivo je primijetiti da su se porasti koncentracije mioglobina nakon svakog zarona smanjivali, što vodi zaključku da se intenzitet oštećenja mišića tijekom vremena smanjivao, odnosno, da su se mišići u periodu praćenja tijekom mjesec dana značajno prilagodili redovitoj tjelesnoj aktivnosti.

Slična dinamika promjene uočena je i za koncentraciju Gal-3. Unatoč tome što je nakon svakog zarona koncentracija Gal-3 bila statistički značajno veća u odnosu na vrijednost prije zarona, porasti su tijekom praćenja bivali sve manji. Gal-3, β-galaktozidni lektin s mnoštvom različitih funkcija u organizmu (100), dobro je poznati novi prognostički biomarker zatajenja srca s visokom pozitivnom prediktivnom vrijednošću za kardiovaskularni mortalitet i rehospitalizaciju pacijenata sa zatajenjem srca (236). Niske plazmatske koncentracije povezuju se s „uspješnim“ starenjem (237). Povišene koncentracije, istog reda veličine kao kod različitih morbiditeta (238), mogu se naći nakon maratona (106) i ultra maratona (84), ali ne i polumaratona (228). Studija na miševima pokazala je da je glavni organ lučenja Gal-3 tijekom i nakon tjelesne aktivnosti skeletni, a ne srčani mišić (106). U ovom istraživanju plazmatska koncentracija Gal-3 zadržala se ispod svoje gornje granice referentnog raspona, prateći dinamiku otpuštanja mioglobina, čemu je zajednički uzrok najvjerojatnije promjena propusnosti membrane vlakana skeletnog mišića koja se događa uslijed tjelesne aktivnosti. Zanimljivo je da, ako se usporede sve vrijednosti prije i sve vrijednosti nakon ronjenja, koncentracija Gal-3, kao i mioglobina, statistički značajno pada nakon svakog izvedenog zarona sugerirajući adaptaciju na razini skeletnog mišića kontinuiranom izvođenju SCUBA ronjenja.

NT-proBNP vrijedan je biomarker zatajenja srca i indikator stresa i rastezanja srčanih komora uzrokovanog jačim priljevom krvi u srce (239) koje se kod SCUBA ronjenja događa uslijed imerzije i povišenog tlaka okoline. S druge pak strane, njegov aktivni oblik BNP ima važan fiziološki natriuretski, vazodilatacijski i simpato-inhibicijski učinak kojima smanjuje stres u srčanim komorama reducirajući volumno i tlačno opterećenje. Slično učinku jednokratnog SCUBA ronjenja, uočen je statistički značajan porast koncentracije NT-proBNP nakon svakog ronjenja. Međutim, ovo istraživanje pokazalo je da su se uočeni porasti pojačavali nakon svakog sljedećeg zarona, što nije u suglasju s dvije prethodne studije na roniocima u uvjetima tehničkog ronjenja (177, 183), gdje kumulativni učinak nije uočen. Ovakav rezultat upućuje na zaključak da je dizajn studije ključan element u praćenju dinamike adaptacijskog i kumulativnog učinka ronjenja na mjerene biomarkere. Naime, uvjeti ronjenja (tehničko ili rekreacijsko, dubina, trajanje, plin za disanje i dr.) i učestalost provođenja zarona, zajedno s karakteristikama ronilaca uključenih u istraživanje (profesionalci ili rekreativci, početnici ili iskusni) su iznimno važni čimbenici poticanja i intenziteta aktivacije molekularnih mehanizama koji dovode do adaptacijskog odgovora nekog tkiva ili organa. Stoga je razumno zaključiti da kontinuirano izvođenje rekreacijskog SCUBA ronjenja može dovesti do fiziološkog mehanizma adaptacije srca na način da ono pojačano otpušta BNP kako bi se zaštitilo od ozljede te u konačnici, ukoliko aktivnost ronjenja potraje, aktivirati fiziološki proces remodeliranja poznat pod terminom „atletsko srce“ koje pomaže sportašima da lakše podnesu buduće tjelesne napore. Zanimljivo je uočiti da porast BNP dovodi do vazodilatacije i smanjenja hipertrofije srca (89) inhibicijom simpatičkih živaca (240) djelujući protektivno na srce kao što je uočeno u studijama na staničnim linijama i životinjama (241).

Značajan porast koncentracije hs-TnI nakon svakog zarona potvrđuje rezultate prvog dijela studije te je najvjerojatnije posljedica međudjelovanja različitih čimbenika kao što su oštećenje integriteta membrane miocita (214), djelovanje slobodnih radikala (200) i pojačano otpuštanje kateholamina uslijed aktivacije simpatičkog živčanog sustava zbog duge izloženosti hladnom okolišu (221). S druge pak strane, stalan pad koncentracija prije kao i poslije ronjenja na molekularnoj razini upućuje na adaptaciju stanica srčanog mišića te redukciju prolazne nekroze i oksidacijskog stresa.

Dok porast koncentracije CRP odražava sistemsku upalu, CRP mjeren metodom visoke osjetljivosti (hs-CRP) opće je prihvaćen kao neovisni prediktivni biljeg razvoja kardiovaskularnih bolesti (242, 243). Različita istraživanja povezuju smanjenje koncentracije CRP s redovitom tjelesnom aktivnošću kako kod zdravih pojedinaca tako i kod srčanih bolesnika (244). U ovom dijelu istraživanja koncentracija hs-CRP ostala je unutar granica

referentnog raspona. Međutim, uočen je statistički značajan porast nakon 3. i 5. zarona uz kontinuirani rast tijekom cijelog promatranog razdoblja. Premda je varijabilnost rezultata hs-CRP u ovom dijelu istraživanja bila velika, odbacivanjem jako stršećih vrijednosti koje su mogle doprinijeti pogrešnoj interpretaciji rezultata, ipak je potvrđena ista dinamika promjene kroz promatrano razdoblje uz izostanak porasta koncentracije hs-CRP nakon 3. zarona. Takav rezultat mogao bi biti posljedica rane faze lokalnog upalnog odgovora u srčanom mišiću uslijed promijenjene ventrikularne funkcije (242) ili zbog početka remodeliranja srca. Stoga bi bilo zanimljivo pratiti promjene u koncentracijama hs-CRP kroz dulji vremenski period nego što je bilo u ovoj studiji, a s primarnim ciljem razlučivanja jesu li porasti koncentracija hs-CRP prolazna epizoda adaptacijskog odgovora organizma koji će se vremenom smanjivati ili je za povratak koncentracije hs-CRP na početnu vrijednost nužan prestanak ronjenja.

Premda poznat kao najsnažniji vazokonstriktor u ljudskom organizmu, ET-1 ima mnoštvo pleiotropnih i protektivnih učinaka na srce modulirajući njegovu funkciju aktiviranjem signalnih puteva koji utječu na hipertrofiju, proliferaciju i preživljenje stanica (245). Uočeni statistički značajan pad koncentracije ET-1 odmah nakon svakog zarona može se povezati s regulacijom prikladnog vaskularnog tonusa tijekom ronjenja kao i održavanjem produljene vazodilatacije u periodu oporavka. Zanimljivo je da su vrijednosti ET-1 mjerene prije svakog zarona rasle kroz promatrani period, dok su vrijednosti nakon zarona ostale nepromijenjene, čineći na taj način padove nakon svakog zarona jače izraženima. Porast koncentracija uočen usporedbom svih vrijednosti prije zarona najvjerojatnije je reguliran proizvodnjom NO za kojeg je dokazano kardioprotektivno djelovanje (246). Adekvatan omjer ET-1 i NO tijekom ronjenja pridonosi pravilnoj prokrvljenosti miokarda i održavanju adekvatnog vaskularnog tonusa, što dodatno pomaže smanjenju oksidacijskog stresa i ozljede. Nadalje, s obzirom na to da ET-1 utječe na kontraktilne karakteristike miokarda i rast srčanih miocita (247), kontinuirani porast njegove koncentracije uzrokovan SCUBA ronjenjem može se povezati s remodeliranjem i rastom srčanog tkiva uslijed opetovanog srčanog opterećenja.

VEGF se smatra ključnim čimbenikom aktivnošću uzrokovane angiogeneze (248) koja se događa uslijed periferne hipoksije tkiva koja je uočena i kod SCUBA ronjenja (220). Neovaskularizacija koja se uslijed toga događa omogućava bolju mišićnu aktivnost s obzirom na to da je olakšana doprema i izmjena kisika između mikrocirkulacije i mišićnih mitohondrija (250, 251). Zanimljivo je istaknuti da se ekspresija gena za VEGF u tkivu mišića povećava u odgovoru na tjelesnu aktivnost (248) te da je povezana s trajanjem aktivnosti na način da se smanjuje na početne vrijednosti tijekom vremena promatranja (249). Isti je efekt uočen u ovom istraživanju s obzirom na to da su se vrijednosti prije i nakon ronjenja tijekom trajanja studije

sve više smanjivale. Adaptacijski mehanizam također podupire činjenica da repetitivna aktivnost utječe na selektivnu ekspresiju mRNA za VEGF receptor 2 (VEGFR2) (252) preko kojeg VEGF ostvaruje najveći angiogenezni učinak (253). Odbacivanjem stršećih vrijednosti izostala je značajnost pada koncentracije prije 3. zarona u odnosu na bazalnu koncentraciju, međutim to ne umanjuje činjenicu da je učinak adaptacije organizma do kraja promatranog razdoblja ipak ostvaren, nego najvjerojatnije upućuje na to da učinak nije trenutan i da uključuje brojne unutarstanične mehanizme prilagodbe.

5.3. INTERPRETACIJA REZULTATA PREMA KLINIČKOJ ZNAČAJNOSTI

Klinička značajnost promjene rutinskih parametara poput hs-TnI, NT-proBNP, mioglobina, Gal-3 i hs-CRP-a, vrlo je važna kliničaru prilikom procjene stanja ronioca nakon ronjenja u slučaju potrebe za medicinskom intervencijom. Rezultati laboratorijskih testova često se interpretiraju isključivo prema referentnim rasponima koji za neke parametre mogu biti relativno široki, pa postoji mogućnost da se porasti kod pojedinih osoba, koji mogu biti i klinički značajni, zadrže unutar dozvoljenog raspona zdrave populacije. To je najčešći problem kod parametara koji pokazuju visok indeks individualnosti (II < 0,6), poput hs-TnI, Gal-3 i mioglobina. Način da se izbjegne pogreška u procjeni rezultata jest interpretacija prema izračunanim vrijednostima RCV-a, koje za kliničku važnost promjene dvaju ili više uzastopnih mjerenja kod iste osobe podrazumijeva uzimanje u obzir analitičku i intraindividualnu biološku varijaciju određenog parametra (254).

Statistička značajnost promjene u ovakvim situacijama također ne daje puno informacija o stanju pacijenta prilikom evaluacije s obzirom na to da se vrijednosti nakon ronjenja uspoređuju s vrijednostima prije ronjenja. S kliničke strane gledanja, teško je očekivati da će liječniku biti dostupna informacija o vrijednostima pojedinih parametara prije ronjenja. To je posebice bitno kod onih parametara, poput hs-TnI, gdje se dinamika promjene (ovisno o algoritmu testiranja) najčešće prati 1 do 3 sata nakon razvoja prvih simptoma akutnog koronarnog sindroma (bol u prsištu, zaduha, povraćanje i sl.). Stoga je ovo istraživanje po prvi put ispitalo postoje li promjene u vrijednostima mjerenih parametara nakon ronjenja koje bi trebalo smatrati klinički značajnima s obzirom na njihovu analitičku nepreciznost te intraindividualnu biološku varijabilnost.

Uspoređujući vrijednosti 3 (A_2) i 6 sati nakon zarona (A_3) u odnosu na vrijednosti prije ronjenja (A_0) u studiji jednokratnog učinka SCUBA ronjenja, uz statističku, uočena je klinički značajna promjena hs-TnI i NT-proBNP-a. Isto tako, klinički značajna promjena Gal-3 uočena je kada je vršna koncentracija (A_2) uspoređena s bazalnom vrijednošću (A_0). Međutim, u

kontekstu procjene stanja pacijenta i potrebe za medicinskom intervencijom, najprikladnije je komentirati eventualne promjene pojedinih parametara u odnosu na vrijednosti nakon ronjenja (A_1). U tom slučaju, značajnom kliničkom promjenom može se smatrati samo porast hs-TnI 6 sati nakon ronjenja (46,4%). Uzimajući u obzir da je mjerenje troponina I u ovom istraživanju provedeno metodom visoke osjetljivosti zadnje generacije testova, retestiranje preporučeno algoritmom od strane proizvođača reagensa trebalo bi provesti 1 – 3 sata nakon prvog određivanja, a porasti pri ovako niskim koncentracijama trebali bi nadilaziti više od 5 ng/L troponina I u apsolutnoj vrijednosti (255). S obzirom na to da u točki mjerenoj 3 sata nakon zarona (A_3) nije uočen klinički značajan porast hs-TnI (33,2%) te uzimajući u obzir da se ovdje zapravo radi o iznimno niskim koncentracijama (medijani redom: A_1 = 0,81 ng/L, A_2 = 1,71 ng/L, A_3 = 2,24 ng/L) daleko ispod 99. percentile zdrave populacije za muškarce (19,8 ng/L) nije realno donositi zaključke da bi bilo kakva, pa i klinički značajna promjena, u ovakvom koncentracijskom području trebala navesti kliničara da posumnja na dijagnozu akutnog infarkta miokarda ili slično patofiziološko stanje.

Rezultati procjene kliničke značajnosti promjene parametara u studiji kumulativnog učinka potvrdili su rezultate prvog dijela istraživanja. Svaki zaron uzrokovao je klinički značajan porast hs-TnI i Gal-3, dok je 1. zaron dodatno uzrokovao klinički značajan porast mioglobina, a 3. zaron NT-proBNP. Međutim, zanimljivo je primijetiti da su se porasti hs-TnI i Gal-3 tijekom vremena smanjivali, što dodatno potvrđuje aktivaciju mehanizama prilagodbe. Najveća prilagodba uočena je na razini pada koncentracije mioglobina, kod kojeg statistička značajnost ne prati kliničku, iako su 1. i 3. zaron uzrokovali porast koncentracije mioglobina s medijanom iznad gornje granice referentnog raspona što je u potpunosti anulirano u 5. zaronu kada se medijan spustio ispod dozvoljenog raspona zdrave populacije. Ovaj je primjer također pokazao da porast koncentracije mioglobina iznad referentnog intervala (nakon 3. zarona) ne mora značiti klinički značajan rezultat, što dodatno potvrđuje korisnost interpretacije rezultata za parametre koji pokazuju visoku individualnost prema RCV-vrijednostima.

Zaključno, statistička značajnost uočena u ovom istraživanju pokazala je postojanje promjena uzrokovanih rekreacijskim SCUBA ronjenjem na molekularnoj razini. Međutim, klinički gledano, uočene promjene ne dovode do značajnog razvoja patofizioloških stanja. To je dodatno potvrđeno činjenicom da niti jedan ronilac uključen u ovo istraživanje nije razvio nikakve simptome bilo kakvog patološkog stanja. Bitno je, također, naglasiti da se uočene kliničke promjene trebaju interpretirati u kontekstu više varijabli, koje osim stanja pacijenta, trebaju uključivati i veličinu uočene promjene (razliku koncentracija) te mogućnost utjecaja malih brojeva na izračun.

5.4. OGRANIČENJA STUDIJE

Premda je ovo prva studija ikad provedena s ciljem istraživanja utjecaja jednokratnog i opetovanog rekreacijskog SCUBA ronjenja na kardiovaskularni sustav i biomarkere njegove funkcije i integriteta kod rekreativnih ronilaca nakon zimskog perioda neronjenja, u obzir ipak treba uzeti i neka od njezinih značajnijih ograničenja. U studiji jednokatnog utjecaja ronjenja na odabrane biomarkere većoj značajnosti istraživanja pridonijelo bi svakako uzorkovanje i 24 – 48 sati nakon ronjenja, a u studiji kumulativnog učinka i dulje od mjesec dana, s obzirom na to da se kinetika promjene različitih biomarkera razlikuje u različitim vremenskim intervalima. Produljeno uzorkovanje svakako bi bilo korisno za praćenje dinamike promjene parametra poput hs-TnI i NT-proBNP s obzirom na to da povratak ova dva biomarkera na bazalne vrijednosti nije uočen do zadnje točke mjerenja (6 sati nakon zarona – A_3). U studiji kumulativnog učinka produljenje studije razjasnilo bi kontinuirane poraste hs-CRP i NT-proBNP. S obzirom na to da do sada nije provedena niti jedna slična studija te da je kontinuirano praćenje parametara vrlo teško realizirati, i dalje postoji mogućnost da će se, bez obzira na vremensko proširenje uzorkovanja u nekim sljedećim studijama, opet propustiti uočiti u kojem točno vremenskom intervalu pojedini parametri dosegnu svoje vršne koncentracije te počnu padati ka svojim bazalnim vrijednostima.

Nadalje, oba istraživanja provedena u sklopu ove disertacije uključivala su samo muške ispitanike, pa usporedba vrijednosti među spolovima nije bila moguća.

Uz to, dobivene je rezultate bilo gotovo nemoguće usporediti s prethodnim studijama zato što su iste uglavnom provedene na profesionalnim roniocima koji rone u uvjetima tehničkog ronjenja ili zato što usporedive studije do sada nisu provedene.

Premda je veličina uzorka dobivena na način opisan u materijalima i metodama pokazala zadovoljavajući broj sudionika za pojedine parametre, uslijed nedovoljne količine uzorka plazme, ET-1, VEGF i hs-CRP u studiji jednokratnog učinka mjereni su u 10 od ukupno 16 prikupljenih uzoraka. Nadalje, mali broj ispitanika onemogućio je grupiranje ronilaca prema dobi i iskustvu ronjenja. Stoga je, premda smo bili svjesni mogućeg utjecaja, navedene varijable bilo nemoguće u potpunosti uzeti u interpretaciju dobivenih rezultata. Premda su tijekom analize rezultata obiju studija uočene i identificirane stršeće vrijednosti, statistička analiza rezultata nakon uklanjanja stršećih vrijednosti nije pokazala značajna odstupanja od prvotno dobivenih rezultata. Stoga se može zaključiti da je u ovakvim studijama nužno uključiti i rezultate koji jesu stršeće vrijednosti jer oni potvrđuju koliko je odgovor svakog pojedinaca na

ekstremne uvjete okoliša u kojem se SCUBA ronjenje odvija nepredvidiv, različit i biološki varijabilan.

Uz to, svi parametri nisu bili mjereni u plazmi i na istim analizatorima. CK, CK-MB, LD i CRP određivani su u uzorcima seruma na drugim analizatorima u odnosu na ostale parametre, što može biti dodatno objašnjenje kontradiktornih rezultata između CRP i hs-CRP.

Uzimajući u obzir sve navedeno, postoji velika potreba za daljnjim istraživanjima u ovom području.

6 ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i provedene rasprave, može se zaključiti sljedeće:

- Jednokratno rekreacijsko SCUBA ronjenje u trajanju od 30 minuta na dubini od 30 metara provedeno nakon 5 mjeseci neronjenja:
  - uzrokuje blago oštećenje srčanog mišića, što je praćeno porastom plazmatskih koncentracija biomarkera srčanog oštećenja i rastezanja (hs-TnI, NT-proBNP);
  - uzrokuje oštećenje integriteta membrane vlakana skeletnih mišića, što je praćeno porastom plazmatskih koncentracija Gal-3 i mioglobina;
  - uzrokuje aktivaciju i prilagodbu vaskularnog endotela, što je praćeno porastom plazmatske koncentracije VEGF-a te padom koncentracije ET-1;
  - ne uzrokuje aktivaciju sistemskog imunosnog odgovora s obzirom na to da nije uočen porast koncentracije hs-CRP;
- Period oporavka za Gal-3, mioglobin i VEGF iznosi 6 sati nakon ronjenja s obzirom na to da su se u navedenom periodu njihove koncentracije vratile na bazalne vrijednosti, dok se isto ne može zaključiti za hs-TnI, NT-proBNP i ET-1, jer unutar promatranog perioda nisu uspostavljene vrijednosti izmjerene prije ronjenja;
- Uočene klinički značajne promjene u uzastopnim mjerenjima biomarkera (do 6 sati nakon ronjenja), posebice hs-TnI, ne zadovoljavaju kriterije za postavljanje bilo kakve patološke dijagnoze i mogu se smatrati beznačajnima;
- Primarni izvor izlučenog Gal-3 tijekom ronjenja najvjerojatnije je skeletni mišić s obzirom na to da je u studiji jednokratnog učinka rekreacijskog SCUBA ronjenja uočena jednaka dinamika promjene te umjerena povezanost koncentracije Gal-3 i koncentracije mioglobina;
- Opetovano ronjenje (5 zarona tijekom mjesec dana, nakon 5 mjeseci neronjenja, s razmacima od tjedan dana između svakog zarona), aktivira mehanizme prilagodbe:
  - kardiovaskularnog sustava, što je praćeno kontinuiranim padom koncentracije hs-TnI te porastom koncentracija NT-proBNP i ET-1;
  - mišićnog sustava, što je praćeno kontinuiranim padom koncentracija Gal-3 i mioglobina te porastom koncentracije IL-6;
  - vaskularnog endotela, što je praćeno kontinuiranim padom koncentracije VEGF-a i porastom koncentracije ET-1.

7 POPIS LITERATURE

(1) Edmonds C, McKenzie B, Thomas R, Pennefather J. Diving Medicine for Scuba Divers. 5. izd. Manly: Carl Edmonds, 2013.

(2) Rossi C, Russo F, Russo F. Ancient Engineers Inventions. Hystory of Mechanism and Machine Science. e-izdanje: Springer, 2009.

(3) CMAS, Universal standards and procedures. Datum izdavanja dokumenta: 21.4.2012. Dostupno na: http://www.cmas.org/technique/general-documents. Zadnji pristup: 20.9.2020.

(4) Carney B, Bisset D. A guide to advanced nitrox: the full spectrum of nitrox mixtures. Jensen Beach: International Training, 2012.

(5) Richardson D. Recreational diving. U: Brubakk AO, Neuman TS. The physiology and medicine of diving. 5. izd. Edinburgh: Saunders, 2002.

(6) Arborelius MJ, Balldin UI, Lilja B, Lundgren CEG. Hemodynamic changes in man with head above water. Aerospace Med 1972;43:592-8.

(7) Pendergast DR, Lundgren CEG. The underwater environment: cardiopulmonary, thermal, and energetic demands. J Appl Physiol 2009;106:276-83.

(8) Gauer OH, Henry JP. Neurohumoral control of plasma volume. U: Guyton AC, Cowley AW. Baltimore, MD. Cardiovascular Physiology II, University Park Press, 1976.

(9) Johansen LB, Jensen TU, Pump B, Norsk P. Contribution of abdomen and legs to central blood volume expansion in humans during immersion. J Appl Physiol 1997;83:695-9.

(10) Johansen LB, Bie P, Warberg J, Christensen NJ, Norsk P. Role of hemodilution on renal responses to water immersion in humans. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 1995;269:R1068-76.

(11) Krasney JA. Physiological responses to head-out water immersion: animal studies. U: Bethesda, MD. Handbook of Physiology. Environmental Physiology. Am Physiol Soc, 1996.

(12) Johansen LB, Foldager N, Stadeager C, Kristensen MS, Bie P, Warberg J i sur. Plasma volume, fluid shifts, and renal responses in humans during 12 h of head-out water immersion. J Appl Physiol 1992;3:539-44.

(13) Christie JL, Sheldahl LM, Tristani FE, Wann LS, Sagar KB, Levankoski SG i sur. Cardiovascular regulation during head-out water immersion exercise. J Appl Physiol 1990;69:657-64.

(14) Balldin U, Lundgren CEG, Lundvall J, Mellander S. Changes in the elimination of 133-xenon from the anterior tibial muscle in man induced by immersion in water and by shifts in body position. Aerospace Med 1971;42:489-93.

(15) Watenpaugh DE, Pump B, Bie P, Norsk P. Does gender influence human cardiovascular and renal responses to water immersion? J Appl Physiol 2000;89:621-8.

(16) Pendergast DR, Fisher NM, Calkins E. Cardiovascular, neuromuscular, and metabolic alterations with age leading to frailty. J Gerontol Biol Sci 1993;48:61-7.

(17) Norsk P, Epstein M. Effects of water immersion on arginine vasopressin release in humans. J Appl Physiol 1988;64:1-10.

(18) Epstein M, Johnson M, DeNunzio AG. Effects of water immersion on plasma catecholamine's in normal humans. J Appl Physiol 1983;54:244-8.

(19) Pendergast DR, DeBold AJ, Pazik M, Hong SK. Effect of head-out immersion on plasma atrial natriuretic factor in man. Proc Soc Exp Biol Med 1987;184:429-35.

(20) Goetz KL, Wang BC, Geer PG, Lendly RJ Jr, Reinhardt HW. Atrial stretch increases sodium excretion independently of release of atrial peptides. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 1986;250:R946-50.

(21) DiBona GF, Kopp UG. Neural control of renal function. Physiol Rev 1997;77:76-197.

(22) Arieli R, Ariei Y, Daskalovic Y, Eyman M, Abramovich A. CNS oxygen toxicity in closed-circuit diving: signs and symptoms before loss of consciousness. Aviat Space Med 2006;77:1153-7.

(23) Bhandari V. The role of nitric oxide in hyperoxia-induced injury to the developing lung. Front Biosci 2003;8:e361-9.

(24) Dean JB, Mulkey DK, Henderson RA 3rd, Potter SJ, Putnam RW. Hyperoxia, reactive oxygen species, and hyperventilation: oxygen sensitivity of brain stem neurons. J Appl Physiol 2004;96:784-91.

(25) Hlastala M, P, Berger A, J. Physiology of Respiration. New York: Oxford Press, 1996.

(26) Warkander DE, Norfleet WT, Nagasawa GK, Lundgren CEG. Physiological and subjectively acceptable breathing resistance in divers' breathing gear. Undersea Biomed Res 1992;19:427-45.

(27) Camporesi E, Bosco G. Ventilation, gas exchange, and exercise under pressure. U: Brubakk A and Neuman T. Bennett and Elliot's Physiology and Medicine of Diving. 5. izd. Edinburgh: Saunders, 2003.

(28) Leddy JJ, Limprasertkul A, Patel S, Modlich F, Buyea C, Pendergast DR, Lundgren CEG. Isocapnic hyperpnea training improves performance in competitive male runners. Eur J Appl Physiol 2007;99:665-76.

(29) Pendergast DR, Lindholm P, Wylegala J, Warkander D, Lundgren CEG. Effects of respiratory muscle training on CO2 sensitivity in SCUBA divers. Undersea Hyperb Med 2006;33:447-55.

(30) Wylegala J, Pendergast DR, Gosselin LE, Warkander DE, Lundgren CEG. Respiratory muscle training improves swimming endurance in divers. Eur J Appl Physiol 2007;99:393-404.

(31) Curry T, Lundgren CEG. Negative pressure breathing enhances nitrogen elimination. Aviat Space Environ Med 2003;74:1034-9.

(32) Dujic Z, Duplancic D, Marinovic-Terzic I, Bakovic D, Ivancev V, Valic Z i sur. Aerobic exercise before diving reduces venous gas bubble formation in humans. J Physiol 2004;555:637-42.

(33) Pendergast DR, Krasney JA, DeRoberts D. Effects of immersion in cool water on lung-exhaled nitric oxide at rest and during exercise. Respir Physiol 1999;115:73-81.

(34) Iwamoto J, Pendergast DR, Suzuki H, Krasney JA. Effect of graded exercise on nitric oxide in exhaled air in humans. Respir Physiol 1994;97:333-45.

(35) Balldin U, Lundgren CEG. Effects of immersion with the head above water on tissue nitrogen elimination in man. Aerospace Med 1972;43:1101-8.

(36) Pendergast DR. The effect of body cooling on oxygen transport during exercise. Med Sci Sports Exerc 1988;20:S171-6.

(37) Gerth WA, Ruterbusch VL, Long ET. The Influence of Thermal Exposure on Diver Susceptibility to Decompression Sickness. Panama City: Navy Experimental Diving Unit (NEDU), 2007.

(38) Sramek P, Simeckova M, Jansky L, Savlikova J, Vybiral S. Human physiological responses to immersion into water of different temperatures. Eur J Appl Physiol 2000;81:436-42.

(39) O'Brien C, Young AJ, Lee DT, Shitzer A, Sawka MN, Pandolf KB. Role of core temperature as a stimulus for cold acclimation during repeated immersion in 20°C water. J Appl Physiol 2000;89:242-50.

(40) Simon E. Nitric oxide as a peripheral and central mediator in temperature regulation. Amino Acids 1998;14:87-93.

(41) Parkin JM, Carey MF, Zhao S, Febbraio MA. Effect of ambient temperature on human skeletal muscle metabolism during fatiguing submaximal exercise. J Appl Physiol 1999;86:902-8.

(42) Bardy E, Mollendorf J, Pendergast DR. A comparison of the thermal resistance of a foam neoprene wetsuit to a wetsuit fabricated from aerogelsyntactic foam hybrid insulation. J Phys D Appl Phys 2006;39:4068-76.

(43) Davis FM, Baddeley AD, Hancock TR. Diver performance: the effect of cold. Undersea Hyperb Med 1975;2:195-213.

(44) Tikuisis P, Jacobs I, Moroz D, Vallerand AL, Martineau L. Comparison of thermoregulatory responses between men and women in cold water. J Appl Physiol 2000;89:1403-11.

(45) Hampson NB, Dunford RG. Pulmonary edema of scuba divers. Undersea Hyperb Med 1997;24:29-33.

(46) Koehle MS, Lepawsky M, and McKenzie DC. Pulmonary oedema of immersion. Sports Med 2005;35:183-90.

(47) Lund KL, Mahon RT, Tanen DA, Bakhda S. Swimming-induced pulmonary edema. Ann Emerg Med 2003;41:251-6.

(48) Edmonds C, Lippmann J, Lockley S, Wolfers D. Scuba divers' pulmonary oedema: Recurrences and fatalities. Diving Hyperb Med 2012;42:40-4.

(49) Gempp E, Louge P, Henckes A, Demaistre S, Heno P, Blatteau JE. Reversible myocardial dysfunction and clinical outcome in scuba divers with immersion pulmonary edema. Am J Cardiol 2013;111:1655-9.

(50) Beinart R,Matetzky S, Arad T, Hod H. Cold water-induced pulmonary edema. Am J Med 2007;120:e3.

(51) Gempp E, Boussuges A, Poyet R, Blatteau JE. Acute coronary event revealed by diving-related pulmonary edema. Ann Cardiol Angeiol (Paris) 2009;58:240-3.

(52) Vann RD, Butler FK, Mitchell SJ, Moon RE. Decompression illness. Lancet 2011;377:153-64.

(53) Thom SR, YangM, Bhopale VM, Huang S, Milovanova TN. Microparticles initiate decompression-induced neutrophil activation and subsequent vascular injuries. J Appl Physiol 2001;110:340-51.

(54) Yang M, Kosterin P, Salzberg BM, Milovanova TN, Bhopale VM, Thom SR. Microparticles generated by decompression stress cause central nervous system injury

manifested as neurohypophisial terminal action potential broadening. J Appl Physiol 2013;115:1481-6.

(55) Nelson ME, Rejeski WJ, Blair SN, Duncan PW, Judge JO, King AC i sur. Physical activity and public health in older adults, Med Sci Sport Exerc 2007;39:1435-45.

(56) Sweeting J, Semsarian C. Sudden cardiac death in athletes, Hear Lung Circ 2018;27:1072-7.

(57) Donnellan E, Phelan D. Biomarkers of cardiac stress and injury in athletes: what do they mean? Curr Heart Fail Rep 2018;15:116-22.

(58) Le Goff C, Farré Segura J, Dufour P, Kaux JF, Cavalier E. Intense sport practices and cardiac biomarkers. Clin Biochem. 2020;79:1-8.

(59) Stevens SM, Reinier K, Chugh SS. Increased left ventricular mass as a predictor of sudden cardiac death: is it time to put it to the test? Circ Arrhythm Electrophysiol 2013;6212-7.

(60) Aengevaeren VL, Van Kimmenade RRJ, Hopman MTE, VAN Royen N, Snider JV, Januzzi JL i sur. Exercise-induced changes in Soluble ST2 concentrations in marathon runners. Med Sci Sport Exerc 2019;51:405-10.

(61) Knechtle B, Nikolaidis PT. Physiology and pathophysiology in ultra-marathon running. Front Physiol 2018;9:e634.

(62) Plebani M, Zaninotto M. Cardiac troponins: what we knew, what we know - where are we now? Clin Chem Lab Med 2009;47:1165-6.

(63) Lippi G, Targher G, Franchini M, Plebani M. Genetic and biochemical heterogeneity of cardiac troponins: clinical and laboratory implications. Clin Chem Lab Med 2009;47:1183-94.

(64) Cummins P, Young A, Auckland ML, Michie CA, Stone PCW, Shepstone BJ. Comparison of serum cardiac specific troponin-I with creatine kinase, creatine kinase-MB isoenzyme, tropomyosin, myoglobin and C-reactive protein release in marathon runners: cardiac or skeletal muscle trauma? Eur J Clin Inves. 1987;17:317-24.

(65) Gresslien T, Agewall S. Troponin and exercise. Int J Cardiol 2016;221:609-21.

(66) Christensen DL, Espino D, Infante-Ramirez R, Cervantes-Borunda MS, Hernandez-Torres RP, Rivera-Cisneros AE i sur. Transient cardiac dysfunction but elevated cardiac and kidney biomarkers 24 h following an ultra-distance running event in Mexican Tarahumara. Extrem Physiol Med 2017;6:e3.

(67) Shave R, Baggish A, George K, Wood M, Scharhag J, Whyte G i sur. Exercise-induced cardiac troponin elevation. J Am Coll Cardiol 2010;56:169-76.

(68) McNeil PL, Khakee R. Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. Am J Pathol 1992;140:1097-109.

(69) Hultman E, Sahlin K. Acid-base balance during exercise. Exerc Sport Sci Rev 1980;8:41-128.

(70) Hammarsten O, Mair J, Mockel M, Lindahl B, Jaffe AS. Possible mechanisms behind cardiac troponin elevations, Biomarkers 2018;23:725-34.

(71) van Wijk XMR, Claassen S, Enea NS, Li P, Yang S, Brouwer MA i sur. Cardiac troponin I is present in plasma of type 1 myocardial infarction patients and patients with troponin I elevations due to other etiologies as complex with little free I. Clin Biochem 2019;7:35-43.

(72) Urhausen A, Scharhag J, Herrmann M, Kindermann W. Clinical significance of increased cardiac troponins T and I in participants of ultra-endurance events. Am J Cardiol 2004;94:696-8.

(73) Danielsson T, Carlsson J, Schreyer H, Ahnesjo J, Ten Siethoff L, Ragnarsson T i sur. Blood biomarkers in male and female participants after an Ironman-distance triathlon, PLoS One 2017;1:21-9.

(74) Shave R, Baggish A, George K, Wood M, Scharhag J, Whyte G i sur. Exercise-induced cardiac troponin elevation: Evidence, mechanisms, and implications. J Am Coll Cardiol 2010:56:169-76.

(75) Wallace TW, Abdullah SM, Drazner MH i sur. Prevalence and determinants of troponin T elevation in the general population. Circulation 2006;113:1958-65.

(76) Jassal DS, Moffat D, Krahn J, Das SR, Khera A, McGuire DK i sur. Cardiac injury markers in non-elite marathon runners. Int J Sports Med 2009;30:75-9.

(77) de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Life Sci 1981;28:89-94.

(78) Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. Biochem Biophys Res Commun 1990;168:863-70.

(79) Wiese S, Breyer T, Dragu A, Wakili R, Burkard T, Schmidt-Schweda S i sur. Gene expression of brain natriuretic peptide in isolated atrial and ventricular human myocardium. Circulation 2012;102:3074-9.

(80) Ogawa Y, Nakao K, Nakagawa O, Komatsu Y, Hosoda K, Suga S i sur. C-type natriuretic peptide: characterization of the gene and peptide. Hypertension 1992;19:809-13.

(81) Nishikimi T, Maeda N, Matsuoka H. The role of natriuretic peptides in cardioprotection Cardiovasc Res 2006;69:318-28.

(82) Le Goff C, Laurent T, Kaux JF, Chapelle JP. Intense physical exercise related to the emergent generation of cardio-vascular risk markers. Biol Sport 2012;29:11-6.

(83) Huang YT, Tseng YT, Chu TW, Chen J, Lai MY, Tang WR i sur. N-terminal pro b-type natriuretic peptide (NT-pro-BNP)-based score can predict in-hospital mortality in patients with heart failure. Sci Rep 2017;7:466-8.

(84) Salvagno GL, Schena F, Gelati M, Danese E, Cervellin G, Guidi GC i sur. The concentration of high-sensitivity troponin I, galectin-3 and NT-proBNP substantially increase after a 60-km ultramarathon. Clin Chem Lab Med 2014;52:267-72.

(85) Faviou E, Zachari A, Nounopoulos C, Agrafiotis E, Vourli G, Dionyssiou-Asteriou A. Elevation of serum N-terminal pro-brain natriuretic peptide after exercise is an index of myocardial damage or a cytoprotective reflection? J Sports Med Phys Fitness 2008;48:90-6.

(86) Scharhag J, Herrmann M, Urhausen A, Haschke M, Herrmann W, Kindermann W. Independent elevations of N-terminal pro-brain natriuretic peptide and cardiac troponins in endurance athletes after prolonged strenuous exercise Am Heart J 2005;150:1128-34.

(87) Ohba H, Takada H, Musha H, Nagashima J, Mori N, Awaya T i sur. Effects of prolonged strenuous exercise on plasma levels of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in healthy men. Am Heart J 2001;141:751-8.

(88) D'Souza SP, Yellon DM, Martin C, Schulz R, Heusch G, Onody A i sur. B-type natriuretic peptide limits infarct size in rat isolated hearts via K ATP channel opening. Am J Physiol Circ Physiol 2015;284:H1592-600.

(89) Scharhag J, Urhausen A, Schneider G, Herrmann M, Schumacher K, Haschke M i sur. Reproducibility and clinical significance of exercise-induced increases in cardiac troponins and N-terminal pro brain natriuretic peptide in endurance athletes. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil 2006;13:388-97.

(90) Gelfi C, De Palma S, Ripamonti M, Eberini I, Wait R, Bajracharya A i sur. New aspects of altitude adaptation in Tibetans: a proteomic approach. FASEB J 2004;18:612-4.

(91) Lippi G, Schena F, Salvagno GL, Aloe R, Banfi G, Guidi GC. Foot-strike haemolysis after a 60-km ultramarathon. Blood Transfus 2012;10:377-83.

(92) Plotnikov EY, Chupyrkina AA, Pevzner IB, Isaev NK, Zorov DB. Myoglobin causes oxidative stress, increase of NO production and dysfunction of kidney's mitochondria. Biochim Biophys Acta 2009;1792:796-803.

(93) Gerth J, Ott U, Funfstuck R, Bartsch R, Keil E, Schubert K i sur. The effects of prolonged physical exercise on renal function, electrolyte balance and muscle cell breakdown. Clin Nephrol 2002;57:425-31.

(94) Madrazo Delgado M, Una Orejon R, Redondo Calvo FJ, Criado Jimenez A. Ischemic rhabdomyolysis and acute renal failure. Rev Esp Anestesiol Reanim 2007;54:425-35.

(95) Cockburn E, Hayes PR, French DN, Stevenson E, St Clair Gibson A. Acute milk-based protein-CHO supplementation attenuates exercise-induced muscle damage. Appl Physiol Nutr Metab 2008;33:775-83.

(96) Ascensao A, Rebelo A, Oliveira E, Marques F, Pereira L, Magalhaes J. Biochemical impact of a soccer match - analysis of oxidative stress and muscle damage markers throughout recovery. Clin Biochem 2008;41:841-51.

(97) Neubauer O, Konig D, Wagner KH. Recovery after an Ironman triathlon: sustained inflammatory responses and muscular stress. Eur J Appl Physiol 2008;104:417-26.

(98) Suzuki K, Totsuka M, Nakaji S, Yamada M, Kudoh S, Liu Q i sur. Endurance exercise causes interaction among stress hormones, cytokines, neutrophil dynamics, and muscle damage. J Appl Physiol 1999;87:1360-7.

(99) Speranza L, Grilli A, Patruno A, Franceschelli S, Felzani G, Pesce M i sur. Plasmatic markers of muscular stress in isokinetic exercise. J Biol Regul Homeost Agents 2007;21:21-9.

(100) Dumic J, Dabelic S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. Biochim Biophys Acta 2006;1760:616-35.

(101) Sciacchitano S, Lavra L, Morgante A, Ulivieri A, Magi F, De Francesco GP i sur. Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. Int J Mol Sci 2018;19:e379.

(102) de Boer RA, Yu L, van Veldhuisen DJ. Galectin-3 in Cardiac Remodeling and Heart Failure. Curr Heart Fail Rep 2010;7:1-8.

(103) Agnello L, Bivona G, Lo Sasso B, Scazzone C, Bazan V, Bellia C i sur. Galectin-3 in acute coronary syndrome. Clin Biochem 2017;50:797-803.

(104) Hrynchyshyn N, Jourdain P, Desnos M, Diebold B, Funck F. Galectin-3: a new biomarker for the diagnosis, analysis and prognosis of acute and chronic heart failure. Arch Cardiovasc Dis 2013;106:541-6.

(105) Gupta A, Ghimire G, Hage FG. Guidelines in review: 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure. J Nucl Cardiol 2014;21:397-9.

(106) Hättasch R, Spethmann S, de Boer RA, Ruifrok WP, Schattke S, Wagner M i sur. Galectin-3 increase in endurance athletes. Eur J Prev Cardiol 2014;21:1192-9.

(107) Le Goff C, Kaux JF, Segura JF, Stojkovic V, Ancion A, Seidel L i sur. Evolution of the slopes of ST2 and galectin-3 during marathon and ultratrail running compared to a control group. Clin Chem Lab Med 2020;58:314-21.

(108) Le Goff C, Lennartz L, Vranken L, Kaux JF, Cavalier E. Comparison of cardiac biomarker dynamics in marathon, semi-marathon and untrained runners: what is the impact on results interpretation? J Lab Precis Med 2019;4:1-10.

(109) Stadhouders AM, Jap PH, Winkler HP, Eppenberg HM, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase: a major constituent of pathological inclusions seen in mitochondrial myopathies. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:5089-93.

(110) Nigro G, Comi LI, Limongelli FM, Giugliano MA, Politano L, Petretta V i sur. Prospective study of X-linked progressive muscular dystrophy in Campania. Muscle Nerve 1983;6:253-62.

(111) Rajappa M, Sharma A. Biomarkers of cardiac injury: an update. Angiology 2005;56:677-91.

(112) Brayne CE, Dow L, Calloway SP, Thompson RJ. Blood creatine kinase isoenzyme BB in boxers. Lancet 1982;11:1308-9.

(113) Nuviala RJ, Roda L, Lapieza MG, Boned B, Giner A. Serum enzymes activities at rest and after a marathon race. J Sports Med Phys Fitness 1992;32:180-6.

(114) Denvir MA, Galloway PJ, Meighan AS, Blyth M, Alexander C, Fleming C i sur. Changes in skeletal and cardiac muscle enzymes during the Scottish Coast to Coast Triathlon. Scott Med J 1999;44:49-51.

(115) Kratz A, Lewandrowski KB, Siegel AJ, Chun KY, Flood JG, Van Cott EM i sur. Effect of marathon running on hematologic and biochemical laboratory parameters, including cardiac markers. Am J Clin Pathol 2002;118:856-63.

(116) Fallon KE, Sivyer G, Sivyer K, Dare A. The biochemistry of runners in a 1600 km ultramarathon. Br J Sports Med 1999;33:264-9.

(117) Vincent HK, Vincent KR. The effect of training status on the serum creatine kinase response, soreness and muscle function following resistance exercise. Int J Sports Med 1997;18:431-7.

(118) Fehrenbach E, Niess AM, Schlotz E, Passek F, Dickhuth HH, Northoff H. Transcriptional and translational regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners. J Appl Physiol 2000;89:704-10.

(119) Hurley BF, Redmond RA, Pratley RE, Treuth MS, Rogers MA, Goldberg AP. Effects of strength training on muscle hypertrophy and muscle cell disruption in older men. Int J Sports Med 1995;16:378-4.

(120) Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E. Lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5: differential expression by neoplastic and stromal cells in non-small cell lung cancer and other epitelial malignant tumors. Tumor Biol 2003;24:199-202.

(121) Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. Clin Chem Lab Med 2010;48:757-67.

(122) Mena P, Maynar M, Campillo JE. Changes in plasma enzyme activities in professional racing cyclist. Br J Sports Med 1996;30:122-4.

(123) Munjal DD, McFadden JA, Matix PA, Coffman KD, Cattaneo SM. Changes in serum myoglobin, total creatine kinase, lactate dehydrogenase and creatine kinase MB levels in runners. Clin Biochem 1983;16:195-9.

(124) Kobayashi Y, Takeuchi T, Hosoi T, Yoshizaki H, Loeppky JA. Effect of a marathon run on serum lipoproteins, creatine kinase, and lactate dehydrogenase in recreational runners. Res Q Exerc Sport 2005;76:450-5.

(125) Wolf PL, Nitti GJ, Bookstein R. An analysis of serum changes and biochemical abnormalities of the anemia in Olimpic runners. Am J Cardiovasc Pathol 1988;2:231-40.

(126) Agner E, Kelbaek H, Fogh-Andersen N, Morck HI. Coronary and skeletal muscle enzyme changes during a 14 km run. Acta Med Scand 1988;224:183-6.

(127) Costill DL, Daniels J, Evans W, Fink W, Krahenbuhl G, Saltin B. Skeletal muscle enzymes and fiber composition in male and female track athletes. J Appl Physiol 1976;40:149-54.

(128) Haram PM, Kemi OJ, Wisloff U. Adaptation of endothelium to exercise training: insights from experimental studies. Front Biosci 2008;13:336-46.

(129) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 1993;362:801-9.

(130) Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. Circulation 2002;105:546-9.

(131) Di Francescomarino S, Sciartilli A, Di Valerio V, Di Baldassarre A, Gallina S. The effect of physical exercise on endothelial function. Sports Med 2009;39:797-812.

(132) Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, Shushy M, Schubert S, Zilberman LC i sur. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. Prog Biophys Mol Biol 2003;81:177-99.

(133) Lee JS, Feldman AM. Gene therapy for therapeutic myocardial angiogenesis: a promising synthesis of two emerging technologies. Nat Med 1998;4:739-42.

(134) Kawanabe Y, Nauli SM. Endothelin. Cell Mol Life Sci 2011;68:195-203.

(135) D'Orléans-Juste P, Plante M, Honoré JC, Carrier E, Labonté J. Synthesis and degradation of endothelin-1. Can J Physiol Pharmacol 2003;81:503-10.

(136) MacCumber MW, Ross CA, Snyder SH. Endothelin in brain: receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:2359-63.

(137) Goraca A. New views on the role of endothelin (minireview). Endocr Regul 2002;36:161-7.

(138) Stewart DJ, Cernacek P, Mohamed F, Blais D, Cianflone K, Monge JC. Role of cyclic nucleotides in the regulation of endothelin-1 production by human endothelial cells. Am J Physiol 1994;266:H944-51.

(139) Otsuki T, Maeda S, Iemitsu M, Saito Y, Tanimura Y, Ajisaka R i sur. Effects of athletic strength and endurance exercise training in young humans on plasma endothelin-1 concentration and arterial distensibility. Exp Biol Med 2008;234:778-83.

(140) Ito H, Hirata Y, Adachi S, Tanaka M, Tsujino M, Koike A i sur. Endothelin-1 is an autocrine/paracrine factor in the mechanism of angiotensin II-induced hypertrophy in cultured rat cardiomyocytes. J Clin Invest 1993;92:398-403.

(141) József L, Khreiss T, Fournier A, Chan JS, Filep JG. Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in endothelin-1-induced homotypic adhesion of human neutrophil granulocytes Br J Pharmacol 2002;135:1167-74.

(142) Maeda S, Miyauchi T, Kakiyama T, Sugawara J, Iemitsu M, Irukayama-Tomobe Y i sur. Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. Life Sci 2001;69:1005-16.

(143) Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. Pharmacol Rev 1994;46:325-415.

(144) Maeda S, Tanabe T, Otsuki T, Sugawara J, Iemitsu M, Miyauchi T i sur. Moderate regular exercise increases basal production of nitric oxide in elderly women. Hypertens Res 2004;27:947-53.

(145) Miyauchi T, Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. Annu Rev Physiol 1999;61:391-415.

(146) Otsuki T, Maeda S, Iemitsu M, Saito Y, Tanimura Y, Ajisaka R i sur. Effects of athletic strength and endurance exercise training on plasma endothelin-1 concentration and arterial distensibility. Exp Biol Med (Maywood) 2006;231:789-93.

(147) Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). J Cell Mol Med 2005;9:777-94.

(148) Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SR, Saucedo E, Henry R, Wagner PD. Exercise adaptation attenuates VEGF gene expression in human skeletal muscle. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;279: H772-8.

(149) Hang J, Kong L, Gu JW, Adair TH. VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle. Am J Physiol 1995;269: H1827-31.

(150) Bebout DE, Hogan MC, Hempleman SC, Wagner PD. Effects of training and immobilization on VO2 and DO2 in dog gastrocnemius muscle in situ. J Appl Physiol 1993;74:1697-1703.

(151) Gustafsson T, Puntschart A, Kaijser L, Jansson E, Sundberg CJ. Exercise induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. Am J Physiol 1999;276: H679-85.

(152) Cerqueira É, Marinho DA, Neiva HP, Lourenço O. Inflammatory Effects of High and Moderate Intensity Exercise-A Systematic Review. Front Physiol 2020;10:e1550.

(153) Moldoveanu, AI, Shephard, RJ, Shek, PN. The cytokine response to physical activity and training. Sport Med 2001;31:115-44.

(154) Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. Nat Rev Immunol 2011;11:607-10.

(155) Pedersen BK. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. Eur J Clin Invest 2017;47:600-11.

(156) Chen L, Liu H, Yuan M, Lu W, Wang J, Wang T. The roles of interleukins in perfusion recovery after peripheral arterial disease. Biosci Rep 2018;38:BSR20171455.

(157) Allen J, Sun Y, Woods JA. Exercise and the regulation of inflammatory responses. Prog Mol Biol Transl Sci 2015;135:337-54.

(158) Fedewa MV, Hathaway ED, Ward-Ritacco CL. Effect of exercise training on C reactive protein: a systematic review and meta-analysis of randomised and non-randomised controlled trials. Br J Sports Med 2016;51:670-6.

(159) Palacios G, Pedrero-Chamizo R, Palacios N, Maroto-Sánchez B, Aznar S, González-Gross M i sur. Biomarkers of physical activity and exercise. Nutr Hosp. 2015;31:237-44.

(160) Scirica BM, Morrow DA, Cannon CP, de Lemos JA, Murphy S, Sabatine MS i sur. Clinical application of C-reactive protein across the spectrum of acute coronary syndromes. Clin Chem 2007;53:1800-7.

(161) Fatouros IG, Destouni A, Margonis K, Jamurtas AZ, Vrettou C, Houretas D i sur. Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. Clin Chem 2006;52:1820-4.

(162) Draganidis D, Chatzinikolaou A, Jamurtas AZ, Carlos Barbero J, Tsoukas D, Theodorou AS i sur. The time-frame of acute resistance exercise effects on football skill performance: the impact of exercise intensity. J Sports Sci 2013;31:714-22.

(163) Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. J Appl Physiol 2005;98:1154-62.

(164) Pal M, Febbraio MA, Whitham M. From cytokine to myokine: the emerging role of interleukin-6 inmetabolic regulation. Immunol. Cell Biol 2014;92:331-9.

(165) Futterman LG, Lemberg L. Novel markers in the acute coronary syndrome: BNP, IL-6, PAPP-A. Am J Crit Care 2002;11:168-72.

(166) Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Ostrowski K, Schjerling P. Exercise and cytokines with particular focus on muscle-derived IL-6. Exerc Immunol Rev 2001;7:18-31.

(167) Chan MH, McGee SL, Watt MJ, Hargreaves M, Febbraio MA. Altering dietary nutrient intake that reduces glycogen content leads to phosphorylation of nuclear p38 MAP kinase in human skeletal muscle: association with IL-6 gene transcription during contraction. FASEB J 2004;18:1785-7.

(168) Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Saltin B, Pedersen BK i sur. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletalmuscle: influence of muscle glycogen content. FASEB J 2001;15:2748-50.

(169) Keller C, Keller P, Marshal S, Pedersen BK. IL-6 gene expression in human adipose tissue in response to exercise – effect of carbohydrate ingestion. J Physiol 2003;550: 927-31.

(170) Lyngsø D, Simonsen L, Bulow J. Interleukin-6 production in human subcutaneous abdominal adipose tissue: the effect of exercise. J Physiol 2002;543:373-8.

(171) Steensberg A, Febbraio MA, Osada T, Schjerling P, van Hall G, Saltin B i sur. Interleukin-6 productionin contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. J Physiol 2001;537:633-9.

(172) MacDonald C,Wojtaszewski JF, Pedersen BK, Kiens B, Richter EA. Interleukin-6 release from human skeletal muscle during exercise: relation to AMPK activity. J Appl Physiol (1985) 2003;95:2273-7.

(173) Febbraio MA, Hiscock N, Sacchetti M, Fischer CP, Pedersen BK. Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. Diabetes 2004;53,1643-8.

(174) Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? Exerc Immunol Rev 2006;12:6-33.

(175) Abbasi A, Hauth M, Walter M, Hudemann J, Wank V, Niess AM i sur. Exhaustive exercise modifies different gene expression profiles and pathways in LPS-stimulated and un-stimulated whole blood cultures. Brain Behav Immun 2013;39:130-41.

(176) Bonsignore MR, Morici G, Riccobono L, Insalaco G, Bonanno A, Profita M i sur. Airway inflammation in nonasthmatic amateur runners. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001;281:L668-76.

(177) Marinovic J, Ljubkovic M, Obad A, Breskovic T, Salamunic I, Denoble PJ i sur. Assessment of extravascular lung water and cardiac function in trimix SCUBA diving. Med Sci Sports Exerc 2010;42:1054-61.

(178) Marinovic J, Ljubkovic M, Obad A, Bakovic D, Breskovic T, Dujic Z. Effects of successive air and trimix dives on human cardiovascular function. Med Sci Sports Exerc 2009;41:2207-12.

(179) Dujic Z, Obad A, Palada I, Valic Z, Brubakk AO. A single open sea air dive increases pulmonary artery pressure and reduces right ventricular function in professional divers. Eur J Appl Physiol 2006;97:478-85.

(180) Marinovic J, Ljubkovic M, Breskovic T, Gunjaca G, Obad A, Modun D i sur. Effects of successive air and nitrox dives on human vascular function. Eur J Appl Physiol 2012;112:2131-7.

(181) Grassi P, Stenner E, Rinaldi A, Delbello G, Piccinini C, Bussani A i sur. B-type natriuretic peptide after open-water and hyperbaric chamber exposure to 10 msw. Aviat Space Environ Med 2009;80:716-9.

(182) Gempp E, Blatteau JE, Louge P, Drouillard I, Galland FM. N-terminal pro brain natriuretic peptide increases after 1-h scuba dives at 10 m depth. Aviat Space Environ Med 2005;76:114-6.

(183) Ljubkovic M, Gaustad SE, Marinovic J, Obad A, Ivancev V, Bilopavlovic N i sur. Ultrasonic evidence of acute interstitial lung edema after SCUBA diving is resolved within 2-3h. Respir Physiol Neurobiol 2010;171:165-70.

(184) Passino C, Franzino E, Giannoni A, Prontera C, Goetze JP, Emdin M i sur. B-type natriuretic peptide secretion following scuba diving. Biomark Med 2011;5:205-9.

(185) Eichhorn L, Doerner J, Luetkens JA, Lunkenheimer JM, Dolscheid-Pommerich RC, Erdfelder F i sur. Cardiovascular magnetic resonance assessment of acute cardiovascular effects of voluntary apnoea in elite divers. J Cardiovasc Magn Reson 2018;20:e40.

(186) Louge P, Coulange M, Beneton F, Gempp E, Le Pennetier O, Algoud M i sur. Pathophysiological and diagnostic implications of cardiac biomarkers and antidiuretic hormone release in distinguishing immersion pulmonary edema from decompression sickness. Medicine (Baltimore) 2016;95:e4060.

(187) Marlinge M, Coulange M, Fitzpatrick RC, Delacroix R, Gabarre A, Lainé N i sur. Physiological stress markers during breath-hold diving and SCUBA diving. Physiol Rep 2019;7:e14033.

(188) Marlinge M, Deharo P, Joulia F, Coulange M, Vairo D, Gaudry M i sur. Troponins in scuba divers with immersion pulmonary edema. Biosci Rep 2018;38:BSR20181024.

(189) Andersson JP, Linér MH, Jönsson H. Asystole and increased serum myoglobin levels associated with 'packing blackout' in a competitive breath-hold diver. Clin Physiol Funct Imaging 2009;29:458-61.

(190) Kjeld T, Jattu T, Nielsen HB, Goetze JP, Secher NH, Olsen NV. Release of erythropoietin and neuron-specific enolase after breath holding in competing free divers. Scand J Med Sci Sports 2015;25:e253-7.

(191) Sureda A, Batle JM, Tauler P, Cases N, Aguiló A, Tur JA i sur. Neutrophil tolerance to oxidative stress induced by hypoxia/reoxygenation. Free Radic Res 2004;38:1003-9.

(192) Sureda A, Batle JM, Ferrer MD, Mestre-Alfaro A, Tur JA, Pons A. Scuba diving activates vascular antioxidant system. Int J Sports Med 2012;33:531-6.

(193) Bilopavlovic N, Marinovic J, Ljubkovic M, Obad A, Zanchi J, Pollock NW i sur. Effect of repetitive SCUBA diving on humoral markers of endothelial and central nervous system integrity. Eur J Appl Physiol 2013;113:1737-43.

(194) Baković D, Eterović D, Saratlija-Novaković Z, Palada I, Valic Z, Bilopavlović N i sur. Effect of human splenic contraction on variation in circulating blood cell counts. Clin Exp Pharmacol Physiol 2005;32:944-51.

(195) Sureda A, Ferrer MD, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A. Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. Med Sci Sports Exerc 2009;41:1271-6.

(196) Perovic A, Nikolac N, Braticevic MN, Milcic A, Sobocanec S, Balog T i sur. Does recreational scuba diving have clinically significant effect on routine haematological parameters?. Biochem Med (Zagreb) 2017;27:325-31.

(197) Thom SR, Milovanova TN, Bogush M, Bhopale VM, Yang M, Bushmann K i sur. Microparticle production, neutrophil activation, and intravascular bubbles following open-water SCUBA diving. J Appl Physiol (1985) 2012;112:1268-78.

(198) Ersson A, Walles M, Ohlsson K, Ekholm A. Chronic hyperbaric exposure activates proinflammatory mediators in humans. J Appl Physiol (1985) 2002;92:2375-80.

(199) Madden LA, Chrismas BC, Mellor D, Vince RV, Midgley AW, McNaughton LR i sur. Endothelial function and stress response after simulated dives to 18 msw breathing air or oxygen. Aviat Space Environ Med 2010;81:41-5.

(200) Bosco G, Rizzato A, Quartesan S, Camporesi E, Mangar D, Paganini M i sur. Effects of the Ketogenic diet in overweight divers breathing Enriched Air Nitrox. Sci Rep 2018;8:e2655.

(201) Sureda A, Batle JM, Capó X, Martorell M, Córdova A, Tur JA i sur. Scuba diving induces nitric oxide synthesis and the expression of inflammatory and regulatory genes of the immune response in neutrophils. Physiol Genomics 2014;46:647-54.

(202) Morishima R, Nakashima K, Suzuki S, Yamami N, Aoshima M. A diver with immersion pulmonary oedema and prolonged respiratory symptoms. Diving Hyperb Med 2018;48:259-61.

(203) Bennett PB. Rate of ascent revised. Alert diver Magazine. Divers Alert Network. Durham, 1996.

(204) Simundic AM, Bölenius K, Cadamuro J, Church S, Cornes MP, van Dongen-Lases EC i sur. Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE), of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) and Latin American Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE-LATAM) of the Latin America Confederation of Clinical Biochemistry (COLABIOCLI). Joint EFLM-COLABIOCLI recommendation for venous blood sampling. Clin Chem Lab Med 2018;56:2015-38.

(205) Conover WJ. Practical Nonparametric Statistics. 3. izd. New York: John Wiley & Sons, 1999.

(206) Young JK, Jae KA, Kyung AS, Chul-Hyun K, Yoon-Hee L, Young-Min P. Correlation of cardiac markers and biomarkers with blood pressure of middle-aged marathon runners. Jour Clin Hypert 2015;11:868-73.

(207) Ferrer MD, Sureda A, Batle JM, Tauler P, Tur JA, Pons A. Scuba diving enhances endogenous antioxidant defenses in lymphocytes and neutrophils. Free Radic Res 2007;41:274-81.

(208) Toft AD, Falahati A, Steensberg A. Source and kinetics of interleukin-6 in humans during exercise demonstrated by a minimally invasive model. Eur J Appl Physiol 2011;111:1351-9.

(209) Simundic AM, Kackov S, Miler M, Fraser CG, Petersen PH. Terms and symbols used in studies on biological variation: the need for harmonization. Clin Chem 2015;61:438-9.

(210) Fraser CG. Reference change value. Clin Chem Lab Med 2011;50:807-12.

(211) Minchinela J, Ricós C, Perich C, Fernández-Calle P, Alvarez V, Domenech M i sur. Biological variation database, and quality specifications for imprecision, bias and total error (desirable and minimum). The 2014 update. Dostupno na: https://www.westgard.com/biodatabase-2014-update.htm. Zadnji pristup: 20.9.2020.

(212) Schindler EI, Szymanski JJ, Hock KG, Geltman EM, Scott MG. Short- and long-term biologic variability of galectin-3 and other biomarkers in patients with stable heart failure and healthy adults. Clin Chem 2016;62:360-6.

(213) Cava F, González C, Pascual MJ, Navajo JA, González-Buitrago JM. Biological variation of interleukin 6 (IL-6) and soluble interleukin 2 receptor (sIL2R) in serum of healthy individuals. Cytokine 2000;12:1423-5.

(214) Lippi G, Banfi G. Exercise-related increase of cardiac troponin release in sports: an apparent paradox finally elucidated? Clin Chim Acta 2010;411:610-1.

(215) Lippi G, Schena F, Dipalo M, Montagnana M, Salvagno GL, Aloe R i sur. Troponin I measured with a high sensitivity immunoassay is significantly increased after a half marathon run. Scand J Clin Lab Invest 2012;72:467-70.

(216) Eijsvogels TM, Hoogerwerf MD, Oudegeest-Sander MH, Hopman MT, Thijssen DH. The impact of exercise intensity on cardiac troponin I release. Int J Cardiol 2014;171:e3-4.

(217) Duttaroy S, Thorell D, Karlsson L, Börjesson M. A single-bout of one-hour spinning exercise increases troponin T in healthy subjects. Scand Cardiovasc J 2012;46:2-6.

(218) Scherr J, Braun S, Schuster T, Hartmann C, Moehlenkamp S, Wolfarth B i sur. 72-h kinetics of high-sensitive troponin T and inflammatory markers after marathon. Med Sci Sports Exerc 2011;43:1819-27.

(219) Legaz-Arrese A, López-Laval I, George K, Puente-Lanzarote JJ, Mayolas-Pi C, Serrano-Ostáriz E i sur. Impact of an endurance training program on exercise-induced cardiac biomarker release. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2015;308:H913-20.

(220) Perovic A, Sobocanec S, Dabelic D, Balog T, Dumic J. Effect of scuba diving on the oxidant/antioxidant status, SIRT1 and SIRT3 expression in recreational divers after a winter nondive period. Free Rad Res 2018;52:188-97.

(221) Anegg U, Dietmaier G, Maier A, Tomaselli F, Gabor S, Kallus KW i sur. Stress-induced hormonal and mood responses in scuba divers: a field study. Life Sci 2002;70:2721-34.

(222) McGrath MF, deBold AJ. Determinants of natriuretic peptide gene expression. Peptides 2005;26:933-43.

(223) Lippi G, Schena F, Salvagno GL, Montagnana M, Gelati M, Tarperi C i sur. Influence of a half-marathon run on NT-proBNP and troponin T. Clin Lab 2008;54:251-4.

(224) Gabrielsen A, Sorensen VB, Pump B, Galatius S, Videbaek R, Bie P i sur. Cardiovascular and neuroendocrine responses to water immersion in compensated heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;279:H1931-40.

(225) Gabrielsen A, Warburg J, Christensen NJ, Bie P, Stadeager C, Pump B i sur. Arterial pulse pressure and vasopressin release during graded water immersion in humans. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000;278:R1583-8.

(226) Frunza O, Russo I, Saxena A, Shinde AV, Humeres C, Hanif W i sur. Myocardial Galectin-3 Expression Is Associated with Remodeling of the Pressure-Overloaded Heart and May Delay the Hypertrophic Response without Affecting Survival, Dysfunction, and Cardiac Fibrosis. Am J Pathol 2016;186:1114-27.

(227) Issa SF, Christensen AF, Lottenburger T, Junker K, Lindegaard H, Hørslev-Petersen K i sur. Within-day variation and influence of physical exercise on circulating Galectin-3 in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. Scand J Immunol 2015;82:70-5.

(228) Vassalle C, Masotti S, Lubrano V, Basta G, Prontera C, Di Cecco P i sur. Traditional and new candidate cardiac biomarkers assessed before, early, and late after half marathon in trained subjects. Eur J Appl Physiol 2018;118:411-7.

(229) Nakajima T, Kurano M, Hasegawa T, Takano H, Iida H, Yasuda T i sur. Pentraxin-3 and high-sensitive C-reactive protein are independent inflammatory markers released during high-intensity exercise. Eur J Appl Physiol 2010;110:905-13.

(230) Michigan A, Johnson TV, Master VA. Review of the relationship between C-reactive protein and exercise. Mol Diagn Ther 2011;15:265-75.

(231) Maeda S, Sugawara J, Yoshizawa M, Otsuki T, Shimojo N, Jesmin S i sur. Involvement of endothelin-1 in habitual exercise-induced increase in arterial compliance. Acta Physiol (Oxf) 2009;196:223-9.

(232) Yuan J, Handy RD, Moody AJ, Bryson P. Response of blood vessels in vitro to hyperbaric oxygen (HBO): modulation of VEGF and NO(x) release by external lactate or arginine. Biochim Biophys Acta 2009;1787:828-34.

(233) Zachary I, Gliki G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. Cardiovasc Res 2001;49:568-81.

(234) Hennigar SR, McClung JP, Pasiakos SM. Nutritional interventions and the IL-6 response to exercise. FASEB J 2017;31:3719-28.

(235) Bernat-Adell MD, Collado-Boira EJ, Moles-Julio P, Panizo-González N, Martínez-Navarro I, Hernando-Fuster B i sur. Recovery of Inflammation, Cardiac, and Muscle Damage Biomarkers After Running a Marathon. J Strength Cond Res 2021;35:626-32.

(236) McCullough PA. Practical experience using galectin-3 in heart failure. Clin Chem Lab Med 2014;52:1425-31.

(237) Sanchis-Gomar F, Santos-Lozano A, Pareja-Galeano H, Garatachea N, Alis R, Fiuza-Luces C i sur. Galectin-3, osteopontin and successful aging. Clin Chem Lab Med. 2016;54:873-7.

(238) Mueller T, Leitner I, Egger M, Haltmayer M, Dieplinger B. Association of the biomarkers soluble ST2, galectin-3 and growth-differentiation factor-15 with heart failure and other non-cardiac diseases. Clin Chim Acta 2015;445:155-60.

(239) Scharhag J, George K, Shave R, Urhausen A, Kindermann W. Exercise-associated increases in cardiac biomarkers. Med Sci Sports Exerc 2008;40:1408-15.

(240) D'Souza SP, Baxter GF. B Type natriuretic peptide: a good omen in myocardial ischaemia?. Heart 2013;89:707-9.

(241) Filippatos GS, Gangopadhyay N, Lalude O, Parameswaran N, Said SI, Spielman W i sur. Regulation of apoptosis by vasoactive peptides. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001;281:L749-61.

(242) He LP, Tang XY, Ling WH, Chen WQ, Chen YM. Early C-reactive protein in the prediction of long-term outcomes after acute coronary syndromes: a meta-analysis of longitudinal studies. Heart 2010;96:339-46.

(243) Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO 3rd, Criqui M i sur. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. Circulation 2003;107:499-511.

(244) Hammonds TL, Gathright EC, Goldstein CM, Penn MS, Hughes JW. Effects of exercise on c-reactive protein in healthy patients and in patients with heart disease: A meta-analysis. Heart Lung 2016;45:273-82.

(245) Schorlemmer A, Matter ML, Shohet RV. Cardioprotective signaling by endothelin. Trends Cardiovasc Med 2008;18:233-9.

(246) Tawa M, Fukumoto T, Ohkita M, Yamashita N, Geddawy A, Imamura T i sur. Contribution of nitric oxide in big endothelin-1-induced cardioprotective effects on ischemia/reperfusion injury in rat hearts. J Cardiovasc Pharmacol 2011;57:575-8.

(247) Olfert IM, Howlett RA, Wagner PD, Breen EC. Myocyte vascular endothelial growth factor is required for exercise-induced skeletal muscle angiogenesis. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2010;299:R1059-67.

(248) Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SR, Henry R, Noyszewski EA, Wagner PD. Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise. Am J Physiol 1999;277:H2247-52.

(249) Gustafsson T, Rundqvist H, Norrbom J, Rullman E, Jansson E, Sundberg CJ. The influence of physical training on the angiopoietin and VEGF-A systems in human skeletal muscle. J Appl Physiol (1985) 2007;103:1012-20.

(250) Brodal P, Ingjer F, Hermansen L. Capillary supply of skeletal muscle fibers in untrained and endurance-trained men. Am J Physiol 1977;232:H705-12.

(251) Hang J, Kong L, Gu JW, Adair TH. VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle. Am J Physiol 1995;269:H1827-31.

(252) Gustafsson T, Puntschart A, Kaijser L, Jansson E, Sundberg CJ. Exerciseinduced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. Am J Physiol 1999;276:H679-85.

(253) Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 1999;13:9-22.

(254) Ricós C, Perich C, Minchinela J, Álvarez V, Simón M, Biosca C i sur. Application of biological variation - a review. Biochem Med 2009;19:250-9.

(255) Boeddinghaus J, Nestelberger T, Twerenbold R, Koechlin L, Meier M, Troester V i sur. High-Sensitivity Cardiac Troponin I Assay for Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. Clin Chem 2019; 65:893-904.

8 POPIS KRATICA

ACC	engl. *American College of Cardiology* (Američki kolegij za kardiologiju)
ADP	adenozin-difosfat
AGE	engl. *arterial gas embolism* (arterijska plinska embolija)
AHA	engl. *American Heart Association* (Američka udruga za srce)
AMPK	engl. *adenosine monophosphate-activated protein kinase* (protein kinaza aktivirana adenozin monofosfatom)
ANP	atrijski natriuretski peptid
ATP	adenozin-trifosfat
BNP	moždani (B-tip) natriuretski peptid
BV	biološka varijabilnost
CDC	engl. *Center for Disease Control* (Centar za kontrolu bolesti)
cGMP	ciklički gvanozin-monofosfat
CK	kreatin-kinaza
CK-BB	BB izoenzim kreatin-kinaze
CK-MB	MB izoenzim kreatin-kinaze
CK-MM	MM izoenzim kreatin-kinaze
CLIA	kemiluminiscentna imunoanaliza
CMAS	fra. *Confédération Mondiale des Activités Subaquatiques* (Svjetska konfederacija za podvodne aktivnosti)
CMIA	kemiluminiscentna imunoanaliza potpomognuta mikročesticama
CNP	C-tip natriuretskog peptida
CO_2	ugljikov dioksid
CRP	C-reaktivni protein
CRD	engl. *carbohydrate recognition domain* (domena koja prepoznaje ugljikohidrate)
CV_A	analitički koeficijent varijacije
CV_G	interindividualna biološka varijacija
CV_I	intraindividualna biološka varijacija
DCI	engl. *decompression illness* (dekompresijska bolest)

DCS	engl. *decompression syndrome* (dekompresijski sindrom)
EAN	engl. *enriched air nitrox* (nitrox obogaćen zrakom)
ECE-1	engl. *endothelin converting enzyme-1* (endotelin-konvertirajući enzim-1)
EFLM	engl. *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*
EKG	elektrokardiografija
ELISA	engl. *enzyme-linked immunosorbent assay* (enzimski imunotest na čvrstoj fazi)
ET-1	endotelin-1
FC	engl. *flow citometry* (protočna citometrija)
FGF	engl. *fibroblast growth factor* (faktor rasta fibroblasta)
Gal-3	galektin-3
hs	engl. *high-sensitivity* (visoko-osjetljiv)
II	indeks individualnosti
IL	interleukin
IL-1RA	engl. *interleukin-1 receptor antagonist* (antagonist receptora za interleukin-1)
IPE	engl. *immersion pulmonary edema* (imerzijom uzrokovan edem pluća)
IT	imunoturbidimetrija
ITM	indeks tjelesne mase
K_2EDTA	dikalij-etilendiamintetraoctena kiselina
K_{ATP}	adenozin-trifosfat osjetljivi kalijev kanal
kDa	kilodalton
KVS	kardiovaskularni sustav
KZ	komprimirani zrak
LD	laktat-dehidrogenaza
LGALS3	gen za galektin-3
MAPK	engl. *mitogen-activated protein kinase* (protein kinaza aktivirana mitogenom)
MMP	matriks-metaloproteinaza
mRNA	engl. *messenger RNA* (glasnička RNA)

N_2	dušik
NK	engl. *natural killer cells* (citotoksične stanice ubojice)
NO	dušikov oksid
NT-proBNP	engl. *N-terminal proBrain Natriuretic Peptide* (N-terminalni fragment prohormona moždanog natriuretskog peptida)
O_2	kisik
pCO_2	parcijalni tlak ugljikovog dioksida
PDGF	engl. *platelet-derived growth factor* (faktor rasta trombocita)
pO_2	parcijalni tlak kisika
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronski sustav
RCV	engl. *reference change value* (referentna vrijednost promjene)
RNA	engl. *ribonucleic acid* (ribonukleinska kiselina)
SCUBA	engl. *self-contained underwater breathing apparatus* (samostalni uređaj za disanje pod vodom)
SF	spektrofotometrija
TnC	troponin C
TNFα	engl. *tumor necrosis factor alpha* (faktor nekroze tumora alfa)
TnI	troponin I
TnT	troponin T
UZV	ultrazvuk
VEGF	engl. *vascular endothelial growth factor* (faktor rasta endotela krvnih žila)
VEGFR2	VEGF receptor tipa 2
VPF	engl. *vascular permeability factor* (faktor propusnosti krvnih žila)
WUF	engl. *World Underwater Federation* (Svjetska podvodna federacija)

9 ŽIVOTOPIS

Marko Žarak rođen je 26. svibnja 1989. god. u Zagrebu gdje je pohađao osnovnu i srednju školu. Godine 2009. upisao je Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, studij medicinska biokemija. Tijekom posljednje godine studiranja dobio je CEEPUS stipendiju za boravak na Farmaceutskom fakultetu Sveučilišta u Ljubljani u sklopu kojeg je odradio praktični dio diplomskog rada. Diplomirao je 2014. god. stekavši zvanje magistra medicinske biokemije.

Nakon obavljenog pripravničkog staža u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava, 2016. god. u istom je Zavodu započeo specijalističko usavršavanje iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine. Iste godine upisao je istoimeni Poslijediplomski specijalistički studij te Poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti, u području biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Specijalistički ispit položio je 2020. god. od kada i radi na mjestu specijalista medicinske biokemije i laboratorijske medicine u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava.

Član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB), Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) te Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB).

Aktivno je sudjelovao na više domaćih i međunarodnih znanstvenih i stručnih skupova. Održao je jedno pozvano predavanja na međunarodnom znanstvenom skupu i jedno na domaćem znanstvenom skupu s međunarodnim sudjelovanjem. U koautorstvu je objavio 7 znanstvenih radova i 12 kongresnih priopćenja.

Popis objavljenih radova i kongresnih priopćenja

Znanstveni radovi u časopisima indeksiranima u *Web of Science Core Collection*

1. **Žarak M**, Perović A, Njire Bratičević M, Šupraha Goreta S, Dumić J. Adaptive response triggered by the repeated SCUBA diving is reflected in cardiovascular, muscular, and immune biomarkers. Physiol Rep. 2021;9:e14691. doi: 10.14814/phy2.14691
2. Tesija Kuna A, Hanžek M, Vukasovic I, Nikolac Gabaj N, Vidranski V, Celap I , Miler M, Stančin N, Šimac B, Živković M, **Žarak M**, Kmet M, Jovanović M, Tadinac S, Supraha Goreta S, Periša J, Samija I, Stefanovic M. Comparison of Diagnostic Accuracy for Eight SARS-CoV-2 Serological Assays. Biochem Med (Zagreb). 2020;31:010708. doi: 10.11613/BM.2021.010708
3. Perović A, **Žarak M**, Njire Bratičević M, Dumić J. Effects of recreational scuba diving on erythropoiesis-"normobaric oxygen paradox" or "plasma volume regulation" as a trigger for erythropoietin? Eur J Appl Physiol. 2020;120:1689-97. doi: 10.1007/ s00421-020-04395-5
4. Matkovic Z, Tudoric N, Cvetko D, Esquinas C, Rahelic D, **Žarak M**, Miravitlles M. Easy to Perform Physical Performance Tests to Identify COPD Patients with Low Physical Activity in Clinical Practice. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2020;15:921-9. doi: 10.2147/COPD.S246571
5. **Žarak M**, Perović A, Dobrović I, Šupraha Goreta S, Dumić J. Galectin-3 and Cardiovascular Biomarkers Reflect Adaptation Response to Scuba Diving. Int J Sports Med. 2020;41:285-91. doi: 10.1055/a-1062-6701
6. Matkovic Z, Cvetko D, Rahelic D, Esquinas C, **Žarak M**, Miravitlles M, Tudoric N. Nutritional Status of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Relation to their Physical Performance. COPD. 2017;14:626-34. doi: 10.1080/15412555. 2017.1386643
7. Nikolić I, Kukulj S, Samaržija M, Jeleč V, **Žarak M**, Orehovec B, Taradi I, Romić D, Kolak T, Patrlj L. Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratio help identify patients with lung cancer, but do not differentiate between lung cancer subtypes. Croat Med J. 2016;57:287-92. doi: 10.3325/cmj.2016.57.287

Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u časopisima s međunarodnom recenzijom

1. Matković Z, Cvetko D, Rahelić D, Esquinas C, **Žarak M**, Tudorić N, Miravitlles M. Bone health of patients with COPD in relation to their exercise capacity and gait speed. European Respiratory Journal 2019 54: PA3900; doi: 10.1183/13993003.congress-2019.PA3900
2. Matković Z, Cvetko D, Rahelić D, Esquinas C, **Žarak M**, Miravitlles M, Tudorić N. Nutritional status and physical activity in patients with COPD, and factors associated with malnutrition. European Respiratory Journal 2019 54: PA4312; doi: 10.1183/ 13993003.congress-2019.PA4312
3. Brkić I, Kranjčina A, Starčić J, **Žarak M**, Škorvaga S, Stančin N, Živković M. 5th EFLM Conference on Preanalytical Phase: Is Sample Mixing Necessary Prior to HbA1c Measurement on the BioRad D-10 Analyser? doi: 10.1515/cclm-2019-0104
4. **Žarak M**, Starčić J, Stančin N, Bradić N, Šimac B, Jovanović M, Škorvaga S, Živković M. 5th EFLM-UEMS European Joint Congress in Laboratory Medicine: Laboratory Medicine at the Clinical Interface: Is There An Additional Clinical Value Of Lipopolysaccharide-Binding Protein In Identification And Outcome Prediction Of Patients With Severe Sepsis? – A Case Report. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) (1434-6621) 56 (2018):11;eA203-eA359.
5. **Žarak M**. Starčić J, Stančin N. 9. kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu: Uloga medicinskog biokemičara u procesu postavljanja dijagnoze pseudohiperkalemije – prikaz slučaja. Biochemia Medica 2018;28(Suppl 1):S1–S223;155-156.
6. Tomičević M, **Žarak M**, Šimac, B, Škorvaga S. 9. kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu: Verifikacija metode za određivanje kalprotektina u ekstraktu stolice na automatskom analizatoru Beckman Coulter AU2700Plus. Biochemia Medica 2018;28(Suppl 1):S1–S223;134-135.
7. Starčić J, **Žarak M**, Stančin N. 9. kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu: Interferencija monoklonalnog imunoglobulina G u određivanju ukupnog i konjugiranog bilirubina – prikaz slučaja. Biochemia Medica 2018;28(Suppl 1):S1–S223;149-150.
8. Jovanović M, Starčić J, **Žarak M**, Stančin N. 9. kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu: Usporedba dviju imunokemijskih metoda za određivanje troponina I na analizatoru Beckman Coulter UniCel DxI600. Biochemia Medica 2018;28(Suppl 1):S1–S223;127-128.

9. **Žarak M**, Taradi I. 15th EFLM Continuous Postgraduate Course in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: Verification of method for tacrolimus in whole blood on automatic analyser abbott architect i1000sr. Clinical chemistry and laboratory medicine. 2015;11;234-237.
10. Taradi I, **Žarak M**. 15th EFLM Continuous Postgraduate Course in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: Comparison of cyclosporin A concentrations determined using ECLIA and FPIA methods. Clinical chemistry and laboratory medicine. 2015;11: 234-237.

Sažeci kongresnih priopćenja objavljeni u knjigama sažetaka

1. **Žarak, M**. Kongres Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju HDBMB2019 "Crossroads in Life Sciences", Lovran, Hrvatska: Galectin-3 and other cardiovascular biomarkers reflect adaptational mechanisms to scuba diving. Knjiga sažetaka kongresa, 2019.
2. Dobrović I, **Žarak M**, Perović A, Dumić J. 7. simpozij studenata farmacije i medicinske biokemije: Učinak rekreacijskog ronjenja na plazmatsku koncentraciju galektina-3. Knjiga sažetaka, Zagreb, Farmaceutsko- biokemijski fakultet SuZG, 2018.

Pozvano predavanje na domaćem skupu s međunarodnim sudjelovanjem

1. **Žarak M**. Kongres Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju HDBMB2019 "Crossroads in Life Sciences", Lovran, Hrvatska: Galectin-3 and other cardiovascular biomarkers reflect adaptational mechanisms to scuba diving. Knjiga sažetaka kongresa, 2019.

Pozvano predavanje na međunarodnom skupu

1. **Žarak M**. 10th EFLM Symposium for Balkan region, Beograd, Srbija: RS143383 mutation in GDF5 gene in correlation with osteoporosis. Journal of Medical Biochemistry, 2014.

10 PRILOG

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet Doktorski rad

UČINAK RONJENJA S KOMPRIMIRANIM ZRAKOM NA BILJEGE FUNKCIJE I INTEGRITETA KARDIOVASKULARNOGA SUSTAVA

MARKO ŽARAK

Uvod: Rekreacijsko ronjenje s komprimiranim plinskim smjesama (engl. *self-contained underwater breathing apparatus*, SCUBA) poseban je oblik tjelesne aktivnosti koja, zbog specifičnih uvjeta okoline predstavlja stres za organizam. Dosadašnje su studije, pokušavajući objasniti odgovor organizma na SCUBA ronjenje, prepoznale važnost njegovog učinka na kardiovaskularni sustav, no molekularni mehanizmi koji dovode do tog učinka još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni.
Cilj rada: Cilj je ovog istraživanja bio pridonijeti razumijevanju promjena kardiovaskularnog, mišićnog i imunosnog sustava izazvanih rekreacijskim SCUBA ronjenjem na molekularnoj razini praćenjem specifičnih biokemijskih biljega.
Ispitanici i metode: U tu je svrhu jedna skupina ronilaca (N=16) izvela 1 neovisan, a druga skupina (N=14) 5 susljednih zarona kako bi se procijenio jednokratni, odnosno kumulativni učinak SCUBA ronjenja na kardiovaskularni sustav. Plazmatske koncentracije Gal-3, hs-TnI, NT-proBNP, mioglobina, hs-CRP, IL-6 VEGF i ET-1 te serumske koncentracije CRP, CK, CK-MB i LD, kao i ukupan broj leukocita određene su u različitim vremenskim točkama odgovarajućim analitičkim postupcima.
Rezultati: Analizom dobivenih rezultata studije učinka jednokratnog SCUBA ronjenja utvrđeni su statistički značajni porasti Gal-3, hs-TnI, NT-proBNP, mioglobina i VEGF te pad koncentracije ET-1 odmah nakon ronjenja u odnosu na vrijednosti prije ronjenja. Koncentracija hs-CRP se nije značajno mijenjala. Vršne koncentracije, uz povratak na bazalne vrijednosti 6 sati nakon ronjenja, mioglobin i VEGF postigli su odmah nakon zarona, dok je za Gal-3 to ostvareno 3 sata nakon zarona. hs-TnI i NT-proBNP kontinuirano su rasli kroz cijeli period praćenja. Nakon inicijalnog pada, konc. ET-1 3 sata nakon ronjenja počinje rasti, međutim do 6. sata ne vraća se na svoju bazalnu vrijednost. Studijom kumulativnog učinka SCUBA ronjenja potvrđene su sve promjene koncentracija nakon ronjenja utvrđene studijom jednokratnog učinka SCUBA ronjenja. Međutim, uočeni kumulativni učinak na kardiovaskularni i mišićni sustav očituje se kontinuiranim padom koncentracija Gal-3, hs-TnI, mioglobina i VEGF te porastom koncentracija NT-proBNP, IL-6 i ET-1 kroz promatrani period praćenja od mjesec dana. Studijom je utvrđena i klinička značajnost promjene hs-TnI, Gal-3, NT-proBNP i mioglobina koja se odvija unutar fizioloških mehanizama prilagodbe kardiovaskularnog sustava rekreacijskom SCUBA ronjenju.
Zaključak: Rekreacijsko SCUBA ronjenje u uvjetima studije jednokratnog učinka uzrokuje blago oštećenje srčanog mišića, narušavanje integriteta membrane skeletnog mišića te prilagodbu vaskularnog endotela. Opetovanim ronjenjem jednom tjedno u periodu od mjesec dana, dolazi do aktivacije mehanizama prilagobe koji taj učinak čine blažim za organizam.

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

Rad sadrži: 109 stranica, 30 slika, 10 tablica i 255 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: SCUBA ronjenje, kardiovaskularni sustav, adaptacijski mehanizmi, biomarkeri

Mentor: dr. sc. Jerka Dumić, red. prof. u trajnom zvanju

Povjerenstvo: dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, doc.
dr. sc. Ana-Maria Šimundić, nasl. izv. prof.
dr. sc. Danica Galešić Ljubanović, nasl. red. prof.

Rad je prihvaćen: 21. travnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry Doctoral thesis

EFFECT OF SCUBA DIVING ON CARDIOVASCULAR SYSTEM FUNCTION AND INTEGRITY BIOMARKERS

MARKO ŽARAK

Background: Recreational SCUBA (self-contained underwater breathing apparatus) diving is a special form of physical activity which due to specific environmental conditions represents a stress for the organism. In order to explain this response, previous studies have recognized the importance of changes in cardiovascular system (CVS). However, the molecular mechanisms that lead to these changes are still unclear.
Aim of the study: The aim of this study is to contribute to the understanding of (pato)physiological changes in CVS caused by recreational SCUBA (rSCUBA) diving at molecular level by monitoring specific biochemical markers.
Participants and Methods: For this purpose, one group of divers (N=16) performed 1 independent dive, while the other group (N=14) performed 5 dives in series after 5 months of non-diving to evaluate the single and cumulative effect of rSCUBA diving on CVS, respectively. In the single dive effect study blood samples were collected in 4 time-points, while in cumulative effect study in 6 time-points. Gal-3, hs-TnI, NT-proBNP, myoglobin, hs-CRP, IL-6 VEGF, and ET-1 plasma concentrations, CK, CK-MB, LD serum catalytic concentrations as well as total leukocyte count were determined using appropriate analytical methods.
Results: In single dive effect study, statistically significant increases in NT-proBNP, hs-TnI, VEGF, myoglobin, and Gal-3 plasma concentrations were detected immediately after the dive compared with pre-dive concentrations. ET-1 significantly decreased immediately after the dive then increased 3 h after diving continuing to rise at 6 h after the dive, but it did not reach its initial pre-dive value. hs-TnI and NT-proBNP remained elevated during the whole recovery period. Myoglobin, VEGF, and Gal-3 returned to their initial values 6 h after diving. Clinically significant change for hs-TnI and NT-proBNP during recovery as compared to the pre-dive period was observed. Gal-3 was clinically significantly higher in its peak value as compared to pre-dive. In cumulative effect study first dive induced statistically significant changes for all biomarkers except for total leukocyte count, CRP, hs-CRP, CK-MB, and LD. Myoglobin, hs-TnI, NT-proBNP, VEGF, Gal-3, IL-6, and CK significantly increased, while ET-1 decreased immediately after the first dive. Third and fifth dive caused the same significant changes in all biomarkers, including the increase for total leukocyte count, CRP, hs-CRP, CK-MB, and LD after the dive. There is also a significant change in all biomarkers if comparing pre-dive 3 and 5 values to the pre-dive 1 values; hs-CRP, IL-6, NT-proBNP, and ET-1 concentrations increased significantly by each preformed dive, while myoglobin, hs-TnI, VEGF, and Gal-3 values decreased. If comparing all post-dive values, only ET-1 did not changed significantly.
Conclusion: The single dive study showed that rSCUBA diving (30 m, 30 min) is followed by plasma level changes of hs-TnI, NT-proBNP, Gal-3, myoglobin, ET-1, and VEGF that reflect adverse but reversible consequences on cardiovascular function and integrity. However, under challenging environmental conditions, stress forces organisms to adapt to the rapidly changing surroundings. Therefore, in cumulative effect study, we showed that repeatedly performed rSCUBA diving (five dives, one per week) triggered activation of an adaptive response of the cardiovascular, muscular, and immune systems that were reflected in changes in the specific biomarkers.

Thesis includes: 109 pages, 30 figures, 10 tables and 255 references. Original is in Croatian language.

Keywords: SCUBA diving, cardiovascular system, adaptational mechanisms, biomarkers

Supervisors: Professor Jerka Dumić, PhD

Reviewers: Ass. Professor Sandra Šupraha Goreta, PhD
Titular Assoc. Professor Ana-Maria Šimundić, PhD
Titular Professor Danica Galešić Ljubanović, MD, PhD

Accepted: 21st April 2021