СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ
Катедра за болести на устата и пародонтот

Д-р Кристијан Донев

Саливарен лактат како биомаркер на физички напор: може ли плунката да ја замени крвта кај спортистите?

Магистерски труд

Ментор: проф. д-р Ќиро Ивановски

СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ
Катедра за болести на устата и пародонтот

Д-р Кристијан Донев

Саливарен лактат како биомаркер на физички напор: може ли плунката да ја замени крвта кај спортистите?

Магистерски труд

Ментор: проф. д-р Ќиро Ивановски

FACULTY OF DENTAL MEDICINE – SKOPJE
Department of Oral Pathology and Periodontology

Kristijan Donev, DDM

Salivary Lactate as a Biomarker of Physical Effort: Can Saliva Replace Blood in Athletes?

Master's thesis

Mentor: Prof. Kiro Ivanovski, PhD, DDM

Комисија за одбрана:
Претседател: Име и презиме,
Звање, институција
Член Име и презиме
Звање, институција
Член Име и презиме
Звање, институција

Научно поле: стоматологија
Научна област: орална медицина и пародонтологија

Саливарен лактат како биомаркер на физички напор: може ли плунката да ја замени крвта кај спортистите?

АПСТРАКТ

Вовед. Лактатот е централен метаболит во физиологијата на физичкиот напор и рутински се користи во спортската медицина за процена на интензитетот на тренингот и на лактатниот праг. Референтното определување се врши во примерок од капиларна крв — инвазивна постапка зависна од специјализиран анализатор. Плунката, како неинвазивно достапен биолошки медиум, претставува потенцијална алтернатива доколку се утврди соодветна поврзаност со крвниот лактат при оптоварување.

Цел. Да се евалуира валидноста на плунката како неинвазивен биолошки медиум за определување на концентрацијата на лактат за време на акутен физички напор кај активни спортисти, за да се процени нејзиниот потенцијал како алтернатива на капиларната крв.

Материјал и метода. Беше спроведена проспективна, експериментална студија со повторени мерења врз 20 активни велосипедисти (19 мажи, 1 жена; возраст 20–59 години); по примена на однапред дефинирани критериуми за квалитет, финалната аналитичка кохорта изнесуваше 14 испитаници. Оптоварувањето се изведуваше на смарт тренажер (Elite Suito T; Zwift) според прогресивен протокол од четири последователни 10-минутни интервали. Во секој интервал беа определувани капиларен крвен лактат (EKF Lactate Scout Sport) и стимулирана плунка (мастикација/џвакање на парафилм). Саливарниот лактат беше анализиран паралелно на ист примерок со две спектрофотометриски методи (Specord 50): неспецифична метода базирана на 1,10-фенантролин (WO 2013/045443 A1) и ензимска LOX-POD метода, специфична за L-лактатот. Двете саливарни методи беа валидирани во иста лабораторија (Лабораторија за орална биохемија и физиологија, Стоматолошки факултет, УКИМ) согласно ICH Q2(R1) (фенантролин: линеарност R^2 = 0,9968, искористливост ≈ 96 %, CV < 10 %; LOX-POD: линеарност R^2 = 0,9967, со присутни матрикс-ефекти при тестот на искористливост). Статистичката анализа опфати Pearson-ова и Spearman-ова корелација, линеарна регресија, leave-one-subject-out (LOSO) валидација со cluster-bootstrap проценка на неизвесноста (B = 5000), дополнета со линеарен модел со мешани ефекти за интраиндивидуалната поврзаност.

Резултати. Концентрацијата на лактат во двата медиума се зголемуваше прогресивно со механичката моќност и со срцевата фреквенција, при што саливарниот лактат изнесуваше приближно 10 % од крвното ниво (медијана 9,9 %). На интраиндивидуално ниво, проценето со модел со мешани ефекти, саливарниот L-лактат (LOX-POD) покажа силна поврзаност со крвниот лактат (rmcorr r = 0,87; 95 % CI 0,78–0,93; p < 0,001), додека фенантролинската метода не покажа значајна поврзаност (r = 0,18; p = 0,25). Валидацијата Leave-one-subject-out во чистата кохорта даде умерена, но нестабилна предиктивна валидност кај нов испитаник (R^2 = 0,70; RMSE = 1,50 mmol/L наспроти 2,73 mmol/L за референтен модел), која опаѓаше до негативни вредности (R^2 = −0,08 до −0,81) при повторно вклучување на исклучените испитаници; единствена универзална калибрација не се генерализира меѓу поединци. Фенантролинската метода даваше систематски приближно шестпати повисоки апсолутни вредности, што се припишува на нејзината неспецифична реактивност.

Заклучок. Саливарниот L-лактат, определен со L-специфична ензимска метода, претставува ветувачки неинвазивен показател на крвниот лактат при физички напор, со одлична интраиндивидуална, но ограничена и кохортно -зависна интериндивидуална валидност. Аналитичката специфичност е пресудна: неспецифичната 1,10-фенантролинска метода значително ја преценува вистинската концентрација. Поради разликите меѓу испитаниците, почетната индивидуална калибрација би можела да ја подобри точноста на измерените апсолутни вредности. Потребна е валидација врз поголеми и постратифицирани кохорти пред рутинска примена.

Клучни зборови: плунка; млечна киселина; тест на оптоварување; биомаркери; лактат-оксидаза; спортска физиологија; неинвазивно следење.

Salivary Lactate as a Biomarker of Physical Effort: Can Saliva Replace Blood in Athletes?

Abstract

Introduction. Lactate is a central metabolite in exercise physiology and is routinely used in sports medicine to assess training intensity and the lactate threshold. Reference determination is performed in capillary blood — an invasive procedure dependent on a specialised analyser. Saliva, as a non-invasively accessible biological medium, represents a potential alternative provided that an adequate association with blood lactate during loading can be documented.

Aim. To evaluate the validity of saliva as a non-invasive biological medium for determining lactate concentration during acute physical exertion in active athletes, in order to assess its potential as an alternative to capillary blood.

Materials and Methods. A prospective, experimental study with repeated measurements was conducted in 20 active cyclists (19 men, 1 woman; aged 20–59 years); after application of pre-defined quality criteria, the final analytical cohort comprised 14 participants. Loading was performed on a smart trainer (Elite Suito T; Zwift) following a progressive protocol of four consecutive 10-minute intervals. In each interval, capillary blood lactate (EKF Lactate Scout Sport) and stimulated saliva (parafilm mastication) were obtained. Salivary lactate was analysed in parallel on the same sample by two spectrophotometric methods (Specord 50): a non-specific assay based on 1,10-phenanthroline (WO 2013/045443 A1) and an L-specific enzymatic LOX-POD method. Both salivary methods were validated in the same laboratory according to ICH Q2(R1) (phenanthroline: linearity $R^2 = 0.9968$, recovery ≈ 96%, CV < 10%; LOX-POD: linearity $R^2 = 0.9967$, with matrix effects evident in spike-recovery). Statistical analysis comprised Pearson and Spearman correlation, linear regression and leave-one-subject-out (LOSO) validation with cluster-bootstrap uncertainty estimation (B = 5000), complemented by a linear mixed-effects model for the intra-individual association.

Results. Lactate concentration in both media increased progressively with mechanical power output and heart rate, with salivary lactate amounting to approximately 10% of the blood level (median 9.9%). At the intra-individual level, assessed with a linear mixed-effects model, salivary L-lactate (LOX-POD) showed a strong association with blood lactate (rmcorr $r = 0.87$; 95% CI 0.78–0.93; $p < 0.001$), whereas the phenanthroline method showed no significant association ($r = 0.18$; $p = 0.25$). In the clean cohort, leave-one-subject-out validation gave moderate but unstable predictive validity in an unseen participant ($R^2 = 0.70$; RMSE = 1.50 mmol/L versus 2.73 mmol/L for a reference model), which fell to negative values ($R^2 = -0.08$ to -0.81) when excluded subjects were re-admitted; a single universal

calibration does not generalise across individuals. The phenanthroline method yielded systematically ~six-fold higher absolute values, attributable to its non-specific reactivity.

Conclusion. Salivary L-lactate, determined by an L-specific enzymatic method, is a promising non-invasive surrogate of blood lactate during physical exertion, with excellent intra-individual but limited, cohort-dependent inter-individual validity. Analytical specificity is decisive: non-specific methods substantially overestimate the true concentration. Owing to between-subject variability, an initial individual calibration could improve absolute quantification. Validation in larger and stratified cohorts is required before routine application.

Key Words: saliva; lactic acid; exercise test; biomarkers; lactate oxidase; sports physiology; non-invasive monitoring.

СОДРЖИНА

1. ВОВЕД 1
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА 5
2.1. Терминолошка дистинкција: lactic acid (млечна киселина) и lactate (лактат) 5
2.2. Стереоизомери на лактатот: D-лактат и L-лактат 6
2.3. Метаболизам на лактат и улогата на лактат дехидрогеназата 7
2.4. Лактатот во спортската физиологија и во проценатa на интензитетот на тренинг 8
2.5. Лактатот надвор од спортската физиологија 10
2.6. Потекло и транспорт на лактатот во плунката 11
2.7. Саливарен лактат при физички напор: досегашни истражувања 12
2.8. Методи за стимулација и собирање на плунка 14
3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО 16
3.1. Главна цел на трудот 16
3.3. Истражувачки хипотези 16
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДА НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА 18
4.1. Дизајн на студијата 18
4.2. Испитаници 18
4.3. Опрема за физичко оптоварување 20
4.4. Протокол за физичко оптоварување 21
4.5. Колекција на биолошки примероци 22
4.6. Аналитички методи 23
4.7. Валидација на аналитичките методи 24
4.8. Статистичка обработка на податоците 25
5. РЕЗУЛТАТИ 28
5.1. Дескриптивни карактеристики 28
5.2. Корелација на ниво на поединечен испитаник 32
5.3. Здружена корелација и регресија 35
5.4. Предвидување на крвниот лактат кај нов испитаник 35
5.5. Споредба меѓу двете аналитички методи 37
5.6. Проток на плунка при прогресивно оптоварување 39
5.7. Индивидуални резултати 39
6. ДИСКУСИЈА 40

6.1. Главни наоди на студијата 40
6.2. Поврзаност меѓу саливарниот и крвниот L-лактат 40
6.3. Динамика на саливарниот L-лактат во однос на механичката моќност и срцевата фреквенција 41
6.4. Влијание на саливарниот проток и временската динамика на земањето примероци.... 41
6.5. Интериндивидуална предиктивност и можност плунката да ја замени крвта 42
6.6. Споредба на аналитичките методи и значење на аналитичката специфичност....43
6.7. Силни страни и ограничувања на студијата 44
6.8. Практични импликации....45
6.9. Насоки за идни истражувања....45
7. ЗАКЛУЧОК....46
8. ДОДАТОК....47
8.1. Валидациски параметри на аналитичките методи....47
8.2. Индивидуални резултати по испитаник 49
8.3. Исклучени испитаници 64
8.4. Дијаграм на тек на испитаниците (STARD) 71
9. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА (РЕФЕРЕНЦИ) 72

1. ВОВЕД

Современата медицина континуирано се движи кон минимално инвазивни дијагностички методи, кои овозможуваат брза, безбедна и повторлива процена на функционалната состојба на организмот. Во рамките на овој концепт, плунката се наметнува како исклучително погоден биолошки медиум, бидејќи нејзиното земање не бара пункција, не вклучува болка и може да се изведе во кое било опкружување. Плунката е сложен егзокрин флуид што се ослободува од трите пара големи плунковни жлезди (паротидни, субмандибуларни и сублингвални), како и од многубројните мали жлезди дифузно распоредени низ оралната мукоза[1]. Покрај нејзината улога во одржувањето на оралното здравје, плунката содржи бројни системски биомаркери — електролити, хормони, имуноглобулини, ензими и метаболити — кои ја рефлектираат состојбата на целокупниот организам и кои можат да служат како дијагностички и прогностички показатели во клиничката пракса[1].

Меѓу метаболитите што се идентификуваат во плунката, особен научен интерес предизвикува лактатот. Лактатот претставува конјугирана база на млечната киселина, и при физиолошки pH вредности (7.35–7.45) во телесните течности, тој постои практично исклучиво во својата јонизирана форма[2]. Како што истакнуваат Robergs и соработници[3], разликата помеѓу термините „lactic acid" и „lactate" не е само терминолошка туку и суштинска: млечната киселина како таква не опстанува во жив организам, бидејќи веднаш дисоцира на лактат и водороден јон. Оваа прецизност во дефинирањето е особено важна за интерпретирање на метаболичките настани при физичка активност, каде што акумулацијата на лактат, а не на млечна киселина, претставува сигнал за интензивирање на гликолитичкиот метаболизам.

Физичката активност одамна е препознаена како клучен фактор за одржување на здравјето и за превенција на хроничните незаразни заболувања. Уште во 1953 година, Morris и соработници[4], во својата пионерска епидемиолошка студија спроведена на вработените во лондонските двоспратни автобуси, утврдиле дека кондуктерите, кои секојдневно се искачувале и слегувале од 500 до 700 скалила, имале значително помал ризик од коронарна срцева болест во споредба со возачите, кои поголемиот дел од работното време го поминувале седејќи. Овие наоди биле меѓу првите што констатирале директна поврзаност помеѓу нивото на физичка активност и кардиоваскуларниот ризик. На преминот од XX во XXI век, Holloszy[5], анализирајќи ја биологијата на стареењето, разликува примарно стареење, кое е генетски детерминирано и неизбежно, и секундарно стареење, кое е резултат на надворешни фактори, особено на седентарниот начин на живот. Подоцнежните истражувања ја прошируваат оваа

перспектива: Pedersen и Saltin[6] предложиле физичката активност да се препишува како терапевтско средство кај низа хронични заболувања, додека најновите глобални податоци[7] потврдуваат дека кардиоваскуларните болести остануваат водечка причина за смртност во светот. Опсервационата студија на Schnohr и соработници[8] врз околу 5 000 учесници од Copenhagen City Heart Study покажа дека лицата кои редовно се занимаваат со умерено трчање имаат најмалку 30 % помал ризик од морталитет од која било причина во споредба со неактивните поединци. Слично, Viña и соработници[9] ја опишуваат физичката активност како „доживотен суплемент" за здраво стареење и за одложување на појавата на кревкост (frailty).

Лактатот, како клучен метаболит на гликолизата, долго време неточно се толкувал како отпаден производ на анаеробната работа на скелетните мускули. Сепак, истражувањата на Brooks и неговите соработници во последните четири децении ја преобразиле оваа парадигма. Уште во 1985 година, Brooks[10] ги поставил основните постулати за лактатот како активен интермедијарен метаболит, а не како нуспроизвод. Овие идеи понатаму биле развиени од Gladden[11], потоа од Ferguson и соработници[12], кои го реконтекстуализирале историскиот развој на концептот, потоа и од самиот Brooks во неговите подоцнежни сеопфатни ревизии[13,14]. Денес е општо прифатено дека лактатот функционира како (1) енергетски супстрат за митохондриската работа на оксидативни ткива (срцев мускул, мозок, бавно-контрактирачки мускулни влакна), (2) клучен прекурсор во глуконеогенезата и (3) сигнална молекула — концепт за кој некои автори го воведуваат и терминот „lactormone"[15]. Тоа значи дека лактатот не е знак на метаболичка инсуфициенција, туку активен учесник во енергетската размена помеѓу ткивата.

Овие сознанија имаат непосредни импликации за спортската медицина. Концентрацијата на лактат во крвната плазма е еден од најшироко користените биохемиски показатели за процена на интензитетот на тренинг и за дефинирање на индивидуалниот праг на издржливост[16,17]. Кај професионалните атлети, особено во спортовите на издржливост како велосипедизмот, се препознаваат три карактеристични зони: ниско ниво на лактат (≤2 mmol/L), приспособувачко ниво (2–4 mmol/L) и акумулациско ниво (≥4 mmol/L), при што преминот од едната зона во другата е во корелација со со специфични физиолошки одговори[18]. Во подоцнежните истражувања на San-Millán и соработници[17] спроведени на велосипедисти од категоријата UCI[1] World Tour се утврдило дека спортистите со побавна акумулација на лактат поседуваат подобрена митохондриска мрежа и повисоки нивоа на маркерите на физиолошка адаптација кон долгорочниот тренинг.

[1] Union Cycliste Internationale

Покрај својата улога во спортската физиологија, лактатот е тема на интензивни истражувања и во низа други медицински области. Утврдена е неговата улога во заздравувањето на раните преку стимулација на ангиогенезата и ткивната репарација[19], во метаболизмот на неопластичните клетки и во објаснувањето на Варбурговиот (Warburg) ефект[20], во патогенезата на сепсата и хиперлактатемијата[21], во цереброметаболизмот по трауматска повреда на мозокот[22], како и во механизмите на учење и меморија преку SIRT1-зависната активација на хипокампалниот BDNF[2][23]. Дополнително, лактатот учествува и во регулацијата на секрецијата на инсулин од панкреасните β-клетки[24]. Овој широк дијапазон на физиолошки и патофизиолошки улоги го прави лактатот еден од најкомплексните метаболити во современата биомедицинска наука.

И покрај значајниот напредок во разбирањето на лактатот, неговото рутинско определување кај спортистите сè уште бара земање на капиларна крв преку убод на врвот од прстот или на ушната ресичка. Иако постапката е минимална и брза, таа сепак вклучува нарушување на интегритетот на кожата, потенцијален дискомфорт и зависност од специјализиран рачен анализатор и потрошен материјал, што го ограничува нејзиното често повторување за време на тренинг. Од друга страна, плунката како дијагностички медиум би можела да понуди соодветна неинвазивна алтернатива. Сепак, истражувањата што ја споредуваат концентрацијата на лактат во плунка со онаа во крв при физичко оптоварување сè уште се ретки. Уште во 1996 година, Segura и соработници[25], во една од првите такви студии, регистрирале значајна линеарна корелација ($r = 0,813$; $P < 0,05$) помеѓу нивото на лактат во капиларната крв и во стимулираната плунка кај деветте испитаници, при прогресивен тест. Поновите истражувања на Yan и соработници[26] укажуваат дека саливарниот лактат може да биде корисен анаеробен биомаркер, додека систематскиот преглед на Lokesh Kumar S и соработници[27] ја потврдуваат неговата клиничка релевантност и во доменот на оралната патологија.

Контрадикторните ставови за улогата на лактатот, динамичното преобликување на разбирањето за неговата физиолошка функција, значењето на неговото следење за време на интензивен физички напор, како и недоволната истражена примена на плунката како биолошки медиум за неговото неинвазивно определување, ја оцртуваат потребата од ова истражување. Оттука произлегува потребата за систематско споредување на концентрацијата на лактат во плунката и во капиларната крв при стандардизиран протокол на физичко оптоварување, со цел да се испита

[2] SIRT1 (сиртуин 1) — NAD^+-зависна деацетилаза која учествува во регулацијата на клеточниот метаболизам и во невропластичноста; BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) — мозочен неуротрофичен фактор, протеин што ги поддржува преживувањето, растот и синаптичката пластичност на невроните.

можноста плунката да послужи како практична и клинички применлива алатка за следење на метаболичкиот одговор кај активни спортисти.

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

Во последните три децении, научните сознанија суштински го променија традиционалното сфаќање за улогата и за значењето на лактатот. Голем број автори[19,20,21,22,23], меѓу кои особено Brooks и неговите соработници[10,13,14,22], го пренасочија истражувачкиот фокус кон откривање на мултифункционалноста на оваа молекула во човековиот организам. Нивните истражувања опфаќаат повеќе медицински дисциплини — спортска физиологија, онкологија, трауматологија, неврологија и интензивна медицина — и заеднички ја поткопаа долгогодишната парадигма на лактатот како „метаболичка грешка“. Современото гледиште го дефинира лактатот како централен интермедијарен метаболит и како сигнална молекула со клучна улога во енергетскиот метаболизам помеѓу клетките и ткивата. Овој преглед на литературата ги претставува главните научни сознанија што го обликуваат современото разбирање на лактатот, со посебен акцент на неговото значење за спортската физиологија и за можностите за неинвазивно следење преку плунка.

2.1. Терминолошка дистинкција: lactic acid (млечна киселина) и lactate (лактат)

Една од најчестите концептуални нејаснотии во литературата за лактатот произлегува од наизменичното користење на термините „lactic acid“ (млечна киселина) и „lactate“ (лактат). Иако често се третираат како синоними, овие два поима хемиски не се идентични. По дефиниција, lactic acid е слаба монокарбоксилна киселина со pKa од приближно 3,86, која во рамките на физиолошки pH вредности (7,35–7,45) во телесните течности ослободува водороден јон (H^+) и преоѓа во конјугираната база — лактат[2]. Со други зборови, при нормални физиолошки услови, повеќе од 99 % од оваа молекула во крвта и во плунката постои во форма на лактат, а не како слободна киселина.

Robergs и соработници[3] темелно ја разработуваат оваа дистинкција. Тие тврдат дека lactic acid воопшто не опстанува во живите клетки или ткива; денешните познавања од органска хемија, биохемија на метаболизам, ацидобазна хемија и физиологија укажуваат дека млечната киселина не може да опстане во жив организам каде pH-вредностите се движат од 6,00 до 7,45. Авторите ја објаснуваат и историската причина за терминолошката конфузија: млечната киселина е изолирана уште во 1780 година од шведскиот хемичар Карл Вилхелм Шеле (Carl Wilhelm Scheele), додека современото разбирање на ацидобазната рамнотежа е развиено многу подоцна. Втората светска војна и пречката во научниот развој дополнително го забавиле осовременувањето на терминологијата[3].

Оваа разлика има и стоматолошко значење. Млечната киселина е директно поврзана со процесите на деминерализација на хидроксиапатитот и со појавата на дентален кариес. Бактериите од родот Lactobacillus, како и Streptococcus mutans, ферментираат јаглехидрати во денталниот биофилм и ослободуваат млечна киселина, која локално ја намалува pH-вредноста и предизвикува растворање на емајловите кристали[28,29]. Овој процес објаснува зошто терминот „lactic acid“ историски се поврзувал со штетен ефект во усната празнина, додека „lactate“ во системскиот метаболизам има сосема различно физиолошко значење. Затоа, понатаму во оваа теза се користи терминот „лактат“, освен кога станува збор за специфичен ефект на млечната киселина.

2.2. Стереоизомери на лактатот: D-лактат и L-лактат

Покрај разликата помеѓу термините lactic acid и lactate, неопходно е да се направи разлика и помеѓу двата стереоизомери на лактатот — L-лактат и D-лактат. Лактатот постои во две стереоизомерни форми, L-лактат и D-лактат, кои се метаболички и ензимски различни. Оваа дистинкција е особено значајна при определувањето на лактатот во плунка, бидејќи оралниот медиум содржи и ендоген и егзоген лактат.

Во човечката физиологија, L-лактатот е доминантниот изомер и се произведува од сопствените клетки на организмот преку ензимот L-лактат дехидрогеназа (L-LDH) во последниот чекор на гликолизата. Спротивно на тоа, D-лактатот се произведува во многу мали количини и потекнува претежно од бактерискиот метаболизам [30, 31]. Кај здрав човек, нормалната концентрација на D-лактат во плазмата изнесува само околу стоти дел (1:100) од концентрацијата на L-лактатот [32].

Причината за оваа изразена разлика лежи во ензимската специфичност. Додека L-LDH катализира повратна интерконверзија помеѓу L-лактат и пируват, човечкиот ензим D-LDH ја катализира конверзијата на D-лактатот во пируват неповратно. Поради тоа, D-лактатот не се создава од пируват во човечките клетки, туку речиси целосно потекнува од егзоген, претежно микробен извор [32]. Во оралната средина, голем број бактериски видови, особено од родот *Lactobacillus*, продуцираат D-лактат како краен производ на ферментацијата на јаглехидратите [31].

Оваа стереохемиска дистинкција има директни импликации за изборот на аналитичка метода при определувањето на саливарниот лактат. Ензимската метода LOX-POD, базирана на лактат-оксидаза, е стереоспецифична и детектира исклучиво L-лактат — ендогениот лактат што потекнува од метаболизмот на организмот. Спротивно, методата со 1,10-фенантролин не е стереоспецифична: нејзиниот сигнал се заснова на редукцијата на Fe(III) во Fe(II), која не е ограничена на L-лактатот, туку ја предизвикуваат и D-лактатот и други оксидабилни супстанции во плунката.

Всушност, самите автори на методата наведуваат дека покрај млечната киселина, и други карбоксилни киселини (како лимонската) подлежат на истата фотохемиска реакција [33]. Оваа разлика е од суштинско значење за интерпретацијата на резултатите при процена на саливарниот лактат како биомаркер на физички напор.

2.3. Метаболизам на лактат и улогата на лактат дехидрогеназата

Лактатот се создава како краен продукт на гликолизата, која се одвива во цитоплазмата на сите клетки. Од една молекула на глукоза, преку низа на ензимски реакции, се добиваат две молекули пируват, две молекули аденозин трифосфат (ATP) и две молекули никотинамид аденин динуклеотид во редуцирана форма (NADH). Понатаму, пируватот има две метаболички судбини: (1) во присуство на доволна оксигенација и функционални митохондрии да биде декарбоксилиран во ацетил-коензим А (Acetyl-CoA) и да влезе во циклусот на трикарбоксилни киселини (TCA), или (2) преку ензимот лактат дехидрогеназа (LDH) да биде редуциран во лактат, при што истовремено NADH се реоксидира во NAD^+[11,12]. Овој процес е есенцијален затоа што гликолизата може да продолжи само ако количеството на NAD^+ постојано се обновува.

Дејството на LDH е двонасочно: при високи концентрации на лактат ензимот ја катализира и обратната реакција — конверзија на лактатот повторно во пируват, кој потоа може да влезе во TCA-циклусот или во процесот на глуконеогенеза[11,12]. Локалното покачување на концентрацијата на H^+ во работниот мускул, кое претходно се припишуваше на „lactic acidosis“, всушност произлегува од хидролизата на ATP и од неможноста NADH-генерираните протони да бидат отстранети со доволна брзина. Од досега опишаното за lactic acid произлегува дека при физиолошки pH таа молекула моментално дисоцира на лактат и H^+, ослободувајќи го протонот во екстрацелуларниот матрикс[2,15,34].

Brooks[14], во својот сеопфатен преглед од 2022 година, детално го опишува транспортот на лактатот на клеточно ниво. Транспортот низ клеточните мембрани го извршуваат специфични транспортни протеини наречени монокарбоксилатни транспортери (MCT—monocarboxylate transporters), при што во скелетните мускули доминираат изоформите MCT1 (карактеристична за оксидативни ткива) и MCT4 (за гликолитички мускулни влакна). MCT4 пред сè го извезува лактатот од брзоконтрактирачките мускулни влакна, додека MCT1 овозможува навлегување на лактатот во оксидативните клетки—миокардните клетки, бавноконтрактирачки мускулни влакна и невроните — каде што служи како приоритетен енергетски супстрат[14]. Овој т.н. lactate shuttle е централната концепциска рамка во современото разбирање на лактатниот метаболизам. Brooks[14] темелно ги опишува функциите на лактатот во срцевата мускулатура, во гастроинтестиналниот систем и во метаболизмот на липидите.

2.4. Лактатот во спортската физиологија и во проценатa на интензитетот на тренинг

Brooks[10] ги поставил основните постулати за современото гледиште на лактатот уште во 1985 година, во неговиот труд за анаеробниот праг. Сепак, неговата теорија не добила широко признание во научната заедница сè до доцните 1990-ти и раните 2000-ти години. Првичните тврдења на Brooks биле дека лактатот се продуцира и во аеробни и во анаеробни услови при физички напор, како и до одредена мера и во мирување. Причината за зголемување на концентрацијата на лактат во крвната плазма не е поради хипоксијата на ткивата, како што се претпоставувало претходно, туку во тоа што механизмите што го метаболизираат лактатот не можат да дејствуваат со брзината на неговото создавање, па тој се акумулира во циркулацијата[10].

Подоцнежните трудови на Brooks[13,14] ги синтетизираат овие концепти во кохерентна теорија за lactate shuttle. Во својот труд од 2018 година, Brooks[13] сеопфатно ги опишува лактатот и неговите метаболички функции за време на спортска активност, додека во ревизијата од 2022 година[14] детално објаснува како лактатот функционира во различни физиолошки системи. Слично, Ferguson и соработници[12] ги реконтекстуализирале историските погрешни толкувања на лактатниот метаболизам, додека Gladden[11] предложил „нова парадигма за третиот милениум“ (a new paradigm for the third millennium) — гледиште според кое лактатот има централно метаболичко значење, наместо да се смета за отпаден производ.

San-Millán и соработници[17], во својата студија за метаболомиката на издржливоста, испитувале професионални велосипедисти од категоријата „UCI - World Tour“ (специфично атлети кои учествувале престижниот Tour de France). Авторите се обиделе да ја утврдат поврзаноста помеѓу лактатот, употребата на кислород, срцевата работа и вкупниот метаболен капацитет. Тие сметаат дека познавањето на овие параметри е клучно за постигнување на највисок успех во спортот. San-Millán забележал дека акумулацијата на лактат во крвна плазма е директна функција на произведената механичка моќност, и дека спортистите со побавна акумулација имаат подобрена митохондриска мрежа и поголема издржливост за време на физичка активност[17].

Покрај тоа, San-Millán[17] забележал дека кај велосипедистите со најбавна акумулација на лактат постои високо ниво на маркери на оксидативен стрес, што укажува дека овие индивидуи имаат долгорочна физиолошка адаптација кон високите физички оптоварувања за време на трките од UCI World Tour. Истиот автор во друга студија[35] опишува и неинвазивна, индиректна процена на содржината на гликоген во скелетните мускули кај фудбалери преку неинвазивна ултразвучна технологија, што е дополнителен пример за тенденцијата во спортската медицина да се

развиваат неинвазивни методи за мониторинг на метаболичкиот статус на атлетите.

Во практичната спортска медицина, концентрацијата на лактат во крвта е еден од најшироко прифатените показатели за процена на интензитетот на тренинг. Претходно опишаните лактатни зони, заедно со други параметри како што е срцевата фреквенција, произведената механичка моќност изразена во вати (W) или ватажа по килограм телесна маса (W/kg), и количината на извршена работа во килоџули (kJ) служат за индивидуално планирање на тренинзите.

Дополнително, во клиничката пракса и во спортот се користи и субјективна скала на напор (RPE — Rating of Perceived Exertion), развиена од шведскиот психолог Gunnar Borg. Скалата има нумерички вредности од 6 до 20, при што 6 одговара на „воопшто не е напорно“, а 20 на „максимален напор“[18]. Корелацијата помеѓу RPE и концентрацијата на лактат во крвта овозможува приближна процена на интензитетот, без лабораториска опрема.

Mandadzhiev[16], во неговиот неодамнешен преглед од 2025 година, ги сумира современите примени на лактатот во спортската физиологија и во препишувањето на индивидуални тренинг-режими. Тој ја истакнува важноста на лактатот не само како показател на интензитет туку и како сигнал за метаболичка флексибилност — способноста на организмот да преоѓа помеѓу различни енергетски супстрати, во зависност од барањата на физичкото оптоварување.

Во поново време лактатот се испитува и како егзоген супстрат што се внесува орално, во форма на лактатни соли, со цел да обезбеди дополнително метаболичко гориво при напор. Northgraves и соработници[36] уште во 2014 година испитувале дали внесувањето лактатна сол, самостојно или во комбинација со натриум бикарбонат, ја подобрува изведбата при 40-километарски тест кај рекреативно активни велосипедисти, но не забележале значајно скратување на времето, иако во лактатната состојба била регистрирана повисока срцева фреквенција, без зголемен субјективен напор. Слични се и поновите наоди на Ewell и соработници[37], кои во рандомизирана вкрстена студија од 2024 година утврдиле дека акутната орална суплементација со лактат не ги менува VO_2peak[3], вентилаторниот праг[4] ,ниту оптоварувањето при лактатниот праг, со само мало зголемување на просечната моќност во дваесетминутен тест. Pedersen и соработници[38],

[3] VO_2peak (peak oxygen uptake) — највисоката измерена потрошувачка на кислород постигната при тест со прогресивно оптоварување; се користи како показател на аеробниот капацитет кога не е потврдено платото карактеристично за VO_2max.
[4] Вентилаторен праг — точката при прогресивно оптоварување на која вентилацијата почнува непропорционално да расте во однос на потрошувачката на кислород, што неинвазивно ја означува преминот кон поинтензивен метаболички режим.

пак, покажале дека интравенското внесување лактат кај здрави испитаници предизвикува мерливи метаболички ефекти, меѓу кои инхибиција на липолизата, што го поткрепува гледиштето за лактатот како метаболички сигнал, а не само како гориво. Ваквите испитувања покажуваат дека концентрацијата на лактат може да биде под влијание и на надворешен внес, а не само на интензитетот на напорот.

2.5. Лактатот надвор од спортската физиологија

Современите истражувања ја прошируваат улогата на лактатот далеку надвор од границите на спортската физиологија. Hunt и соработници[19] покажале дека аеробно генерираниот лактат стимулира ангиогенеза и ткивна репарација преку редокс-механизми, што го прави клучен медијатор во процесите на заздравување на рани. Во онкологијата, San-Millán и Brooks[20] го реевалуирале Варбурговиот (Warburg) ефект и предложиле дека продукцијата на лактат во неопластичните клетки не е едноставно случајна последица на абнормалниот метаболизам, туку активно придонесува кон карциногенезата преку креирање на соодветна микросредина. Слично, Apostolova и Pearce[2] детално ги разгледуваат физиолошките улоги на лактатот во туморската микросредина, особено во контекст на имунометаболизмот.

Во интензивната медицина, Garcia-Alvarez и соработници[21] ја опишуваат хиперлактатемијата при сепса како комплексен фенотип кој не е едноставен показател на ткивна хипоксија, како што се мислело претходно, туку е резултат на повеќе паралелни процеси: засилена адренергична стимулација, инхибиција на пируват дехидрогеназата и забавен хепатален клиренс. Brooks и Martin[22] ја разработуваат цереброметаболичката улога на лактатот по трауматска повреда на мозокот и сугерираат дека интравенозната администрација на лактат може да биде корисна како неуропротективна стратегија.

Особено интересни се сознанијата за улогата на лактатот во функциите на централниот нервен систем. El Hayek и соработници[23] покажале дека лактатот, продуциран за време на физичка активност, ги поттикнува позитивните ефекти врз учењето и меморијата преку SIRT1-зависна активација на хипокампалниот BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). Овие наоди го поврзуваат лактатниот метаболизам директно со невралната пластичност и објаснуваат, барем делумно, како редовната физичка активност придонесува за подобрување на когнитивните функции. Дополнително, Rutter и соработници[24] ја опишуваат улогата на лактатот во регулацијата на секрецијата на инсулин од панкреасните β-клетки, што го поврзува со метаболичкото здравје и со ризикот од развој на дијабетес мелитус тип 2.

2.6. Потекло и транспорт на лактатот во плунката

Лактатот во мешаната плунка потекнува од два извора: системскиот (крвен) L-лактат што дифундира од циркулацијата во плунката и локалната продукција во оралната празнина. Системскиот L-лактат е краен продукт на анаеробната гликолиза во скелетните мускули и во други ткива, кој при физички напор се акумулира во крвната плазма и се дистрибуира низ телесните течности, во согласност со концептот на лактатен shuttle [13, 14]. Токму овој системски L-лактат е физиолошки релевантниот сигнал што се обидуваме да го следиме неинвазивно преку плунката.

Плунковните жлезди (паротидни, субмандибуларни и сублингвални) се егзокрини органи богато прокрвени со капиларна мрежа; преку нив голем број супстанции од циркулацијата се пренесуваат во плунката [39, 40]. За да пристигне во ацинусниот лумен, лактатот мора да ја помине капиларната ѕидна бариера, интерстициумот на жлездата и епителот на ацинусите и на изводните канали [40]. Ова преминување се одвива преку неколку можни механизми: (1) трансцелуларен транспорт, посредуван од монокарбоксилатните транспортери (MCT1, MCT4) што во мускулите и во другите ткива го пренесуваат лактатот, заедно со протон низ клеточните мембрани [13, 14] и се претпоставува дека дејствуваат и во епителот на плунковните жлезди [39]; (2) парацелуларна дифузија низ меѓуклеточните врски (tight junctions), зависна од електрохемискиот градиент; и (3) едноставна дифузија условена од пермеабилноста на крвно-саливарната бариера [40]. Постоењето на функционална бариера меѓу крвта и ткивните течности упатува на регулирано и селективно, а не на слободно преминување на лактатот [41].

Освен системскиот придонес, лактат се продуцира и локално — од епителните и имуните клетки на оралната мукоза, но особено од оралните микроорганизми (Streptococcus, Lactobacillus) што ферментираат јаглехидрати во денталниот биофилм [30, 31]. Оваа локална микробна продукција е клучна причина за аналитичка загриженост, бидејќи таа генерира и D-лактат — стереоизомер што практично не постои во системската циркулација (каде што D-лактатот изнесува околу 1 % од L-лактатот) [32]. Затоа, во оралниот медиум соодносот L-/D-лактат може значително да отстапува од системскиот.

Дополнителен локален извор може да биде и самото жлездено ткиво. Ацинусните и дуктусните клетки се богати со митохондрии и се метаболички активни, бидејќи активниот транспорт на електролити при создавањето на плунката се одвива со потрошувачка на ATP [40]. При интензивна секреторна активност, метаболизмот на самата плунковна жлезда теоретски може да придонесе за концентрацијата на лактат во плунката независно од системскиот лактат, што претставува дополнителен фактор при толкувањето на саливарните вредности.

Концентрацијата на лактат во плунката не зависи само од количеството што пристигнува, туку и од степенот на разредување со саливарниот флуид. Брзината на саливарното лачење (mL/min) варира силно меѓу поединци и со стимулацијата: стимулираната плунка (на пр. со џвакање парафилм) има повисок проток и поинаков електролитен и белковински состав од нестимулираната, што директно влијае врз измерената концентрација на лактат [39, 40]. Дел од изразената меѓуиндивидуална варијабилност во апсолутните саливарни вредности веројатно потекнува токму од разликите во саливарниот проток; во согласност со ова, покажано е дека телесниот состав (процент на масти, содржина на вода, мускулна маса) влијае врз врвните саливарни концентрации на лактат [42].

Бидејќи лактатот мора да помине неколку компартмани пред да стигне во плунката, саливарниот одговор може временски да заостанува зад крвниот. Во студии на издржливост, саливарниот лактат почнува значајно да расте подоцна од крвниот — на пример, при трка од 30 km крвниот лактат се зголемил веќе на 6-тиот километар, додека саливарниот пораст станал значаен дури по 18-тиот километар [43]. Ова временско задоцнување има методолошки импликации за времето на земање на примерокот и за интерпретацијата на кинетиката.

Составот на плунката е чувствителен на предтестни фактори: неодамнешниот внес на храна (особено јаглехидрати) го менува микробниот метаболизам и гликемискиот статус, хидратацискиот статус влијае врз протокот, а плакнењето на устата ги отстранува резидуалните супстанции. Затоа стандардизацијата на овие фактори (гладување, без плакнење непосредно пред земањето, исфрлање на првиот млаз плунка) е неопходна за веродостојно мерење.

2.7. Саливарен лактат при физички напор: досегашни истражувања

Иако постои обемна научна литература за капиларниот лактат, истражувањата за неговото определување во плунка сè уште се ретки и методолошки хетерогени. Уште во 1996 година, Segura и соработници[25] објавиле една од најраните студии која директно ја споредуваше концентрацијата на лактат во крвна плазма и во плунка при прогресивно физичко оптоварување. Истражувањето е спроведено на девет испитаници и претставува едно од ретките истражувања во кои се мерат двата дијагностички медиума паралелно. Во моментот на објавување, во 1996 година, современата теорија за лактатниот метаболизам сè уште не била широко распространета, и затоа интерпретацијата на резултатите во голема мерка била ограничена на класичното гледиште за лактатот како метаболички индикатор.

Резултатите на Segura[25] покажале дека кај сите девет испитаници постои линеарен пораст на концентрацијата на лактат (изразена во mmol/L) истовремено и во капиларната крв и во плунката. Паралелно со

зголемувањето на лактатот, испитаниците генерирале и поголема механичка моќност, изразена во вати (W). Покрај индивидуалните графикони, авторите изготвиле и кумулативен графикон со просечни вредности кои го потврдиле истиот заклучок. Концентрациите на лактат во плунката биле значително пониски од оние во крвната плазма — приближно 15 % од крвното ниво — но паралелно се зголемуваа со зголемувањето на крвното ниво. Точките на премин од една лактатна зона во друга се многу слични и во двата биолошки медиуми. Севкупната корелација помеѓу лактатот во плунка и во крв изнесувала r = 0,813 (P < 0,05)[25].

Методолошки важна одлука во студијата на Segura[25] е употребата на стимулирана плунка. Стимулацијата била постигната со 5 mL разреден раствор на лимонска киселина. Авторите го објаснуваат овој избор со тоа што при максимална секреција, составот на плунката најмногу се приближува до составот на крвната плазма, со што се сведува разликата на составот на минимум.

Скорашните истражувања ја прошируваат оваа линија на испитување. Yan и соработници[26], во својот труд од 2023 година, систематски ја испитуваат можноста саливарниот лактат да служи како анаеробен биомаркер. Авторите укажуваат дека додека постојат значајни корелации помеѓу плунката и крвта при високи интензитети на оптоварување, варијабилноста помеѓу субјектите е значителна, и дека стандардизирани протоколи за земање примероци (време од последно хранење, стимулација, повторливост) се клучни за добивање на репродуцибилни резултати. Од друга страна, систематскиот преглед и метаанализата на Lokesh Kumar S и соработници[27] од истата година ја потврдува клиничката релевантност на саливарната лактат дехидрогеназа како потенцијален биомаркер кај орални потенцијално малигни нарушувања и кај карциномите на главата и на вратот, што го раширува дијапазонот на примена и на доменот на оралната онкологија.

Интересот за саливарниот лактат како неинвазивен показател не е нов. Уште Ohkuwa и соработниците (1995) споредиле саливарен и крвен лактат по супрамаксимален напор кај спринтери и кај трчачи на долги патеки, документирајќи и задоволителна повторливост (test–retest) на саливарното мерење [44] — наод директно релевантен за прашањето за репродуцибилноста. Pérez и соработниците (1999) го вовеле концептот на саливарната максимална стабилна лактатна состојба (maximal lactate steady state, MLSS), покажувајќи паралелизам меѓу саливарната и крвната лактатна крива [45]. Подоцна, Tékus и соработниците (2012) потврдиле висока корелација помеѓу крвниот и саливарниот лактат по максимален напор [46], а Bocanegra и соработниците (2012), при инкрементален тест извршен на пливачи, забележале дека акумулацијата на лактат во плунката го следи истиот образец како во крвта (r = 0,91), со препознатливи точки на

прекршување [47]. Santos и соработниците (2006) кај маратонци нашле висока корелација (r ≈ 0,77), но и временско задоцнување на саливарниот одговор [43]. Поновите истражувања ја прошируваат сликата: Okano и соработниците (2022) покажале дека телесниот состав влијае врз врвните саливарни концентрации [42], додека Kojima, Iemitsu и соработниците (2025) ја испитале кинетиката на крвниот и саливарниот лактат при активен наспроти пасивно опоравување [48]. Паралелно, развојот на електрохемиски биосензори за лактат во интерстициум, плунка и пот ги истакнува предизвиците на биолошката интерпретација на неинвазивните мерења [41].

Досегашните студии конзистентно покажуваат дека саливарниот лактат го следи крвниот, но со променлив сооднос (типично ~10–20 % од крвното ниво), значајна меѓуиндивидуална варијабилност и, во некои протоколи, со временско задоцнување. Токму оваа хетерогеност, заедно со недоволната стандардизација на аналитичките методи, ја оправдува потребата од студии што директно ја испитуваат аналитичката специфичност — што е фокус на овој труд.

И покрај овие постигнувања, можеме да заклучиме дека постојат многу истражувања поврзани со лактатот во различни области на медицината, но дека многу малку од нив се посветени конкретно на негово детектирање во плунка во контекст на спортска физиологија. Постојните студии се ограничени со мал број испитаници, методолошки хетерогени и често со различни протоколи за земање и за обработка на плунка, што го отежнува нивното меѓусебно споредување и формирањето на цврсти генерализирани заклучоци.

2.8. Методи за стимулација и собирање на плунка

Стимулираната саливарна секреција настанува како одговор на мастикаторна, густаторна или друг вид стимулација, а видот на стимулусот е еден од факторите што влијаат врз обемот и врз составот на излачената плунка [40]. Мастикаторната (механичка) стимулација се постигнува со џвакање на индиферентно средство што не влијае врз сетилото за вкус — на пример, парафински топчиња или парафилмска лента — додека густаторната стимулација се предизвикува со вкусови дразби, најчесто со лимонска киселина [40]. Киселата дразба предизвикува најголемо зголемување на протокот, а составот на стимулираната плунка се менува и со должината на стимулацијата и временски во текот на самата колекција — во pH, пуферскиот капацитет и во концентрациите на фосфати и уреа [40, 49]. Затоа, стандардизацијата на видот на стимулусот, времетраењето и временскиот прозорец на собирање е неопходна за веродостојно и споредливо мерење.

Мастикаторната стимулација со парафилм е хемиски инертна и репродуцибилна и не внесува егзогени супстанции во примерокот, поради што се претпочита кога предмет на анализа е самиот состав на плунката. Овој избор е особено важен кога лактатот се определува со методи базирани на железо. Лимонската киселина (цитрат) е ефикасен фоторедуктант на Fe(III) преку пренос на полнеж од лиганд кон метал, со квантни приноси од ист ред на големина како оние на α-хидроксикарбоксилните киселини какви што е лактатот [50, 51]. Стимулацијата со лимонска киселина, затоа, би внела во примерокот супстанција што сама го редуцира Fe(III), што кај методите базирани на реакција со железо (како фенантролинската) би довело до лажно зголемен сигнал независен од концентрацијата на лактат. Инертната стимулација со парафилм го избегнува овој извор на аналитичка интерференца.

3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО

3.1. Главна цел на трудот

Главната цел на ова истражување е да се евалуира валидноста на плунката како неинвазивен биолошки медиум за определување на концентрацијата на лактат за време на акутен физички напор кај активни спортисти, со цел да се процени нејзиниот потенцијал како алтернатива на капиларната крв.

3.2. Специфични цели

За да се оствари општата цел на истражувањето, поставени се следниве специфични цели:

1. Да се утврди степенот на корелација помеѓу концентрацијата на лактат во капиларната крв и концентрацијата на лактат во плунката за време на прогресивен физички напор кај активни спортисти.
2. Да се анализира динамиката на промените на саливарниот лактат во однос на зголемувањето на срцевата фреквенција, како индикатор на физиолошкиот одговор на организмот на оптоварување.
3. Да се утврди поврзаноста помеѓу произведената механичка моќност (W) при возење на статичен велосипед и концентрацијата на лактат во плунката.
4. Да се процени дали саливарниот лактат покажува линеарен или нелинеарен тренд на покачување во однос на интензитетот на физичката активност.
5. Да се процени применливоста на саливарниот лактат како практичен и клинички релевантен биомаркер за следење на метаболичкиот одговор на физички напор кај активни спортисти.
6. Да се споредат две аналитички методи за определување на лактат во плунката — методата со 1,10-фенантролин и ензимската метода LOX-POD — и да се процени влијанието на аналитичката специфичност на методата врз валидноста на резултатите.

3.3. Истражувачки хипотези

Врз основа на досегашните научни сознанија изложени во прегледот на литературата, како и врз основа на оригиналните наоди на Segura и соработници[25], во рамките на ова истражување се поставуваат следниве работни хипотези:

1. Постои статистички значајна позитивна корелација помеѓу концентрацијата на лактат во плунката и во капиларната крв при прогресивно физичко оптоварување.
2. Концентрацијата на саливарниот лактат расте паралелно со зголемувањето на произведената механичка моќност и со срцевата фреквенција за време на физичкото оптоварување.
3. Саливарниот L-лактат, определен со L-специфична метода, валидно ја следи индивидуалната динамика на крвниот лактат при прогресивен физички напор (интраиндивидуална валидност), додека единствената универзална калибрација не постигнува точност доволна за одредување на лактатните прагови (2 и 4 mmol/L) кај нов испитаник (ограничена интериндивидуална валидност).

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДА НА ИСТРАЖУВАЧКАТА РАБОТА

4.1. Дизајн на студијата

Студијата беше дизајнирана како проспективна, експериментална, контролирана студија со повторени мерења, насочена кон процена на саливарниот лактат како потенцијален неинвазивен биомаркер на физички напор. Дизајнот овозможи паралелно следење на крвниот и на саливарниот лактат кај истите испитаници во повеќе временски точки, при стандардизиран протокол на прогресивно оптоварување. Бидејќи повторените мерења овозможуваа следење кај секој испитаник поединечно во рамките на истиот тест, се намалува меѓусубјектната варијабилност и се зголемува ефикасноста на проценките.

Тестирањето се изведуваше во контролирани лабораториски услови, а биохемиските анализи на саливарните примероци се вршеа во Лабораторијата за орална биохемија и физиологија при Катедрата за болести на устата и пародонтот (Стоматолошки факултет, УКИМ — Скопје), со стандардизирана опрема, реагенси од аналитички степен на чистота и со единствен протокол применуван идентично кај сите испитаници. Сите учесници дадоа писмена информирана согласност пред тестирањето, по претходно усно и писмено запознавање со целта, методологијата и потенцијалните ризици на истражувањето. Студијата беше спроведена во согласност со начелата на Хелсиншката декларација и беше одобрена од Етичката комисија при Стоматолошкиот факултет во Скопје (Одобрение бр. 02-682/2 од 23.02.2026 година).

4.2. Испитаници

Во истражувањето беа вклучени 20 активни спортисти — велосипедисти од двата пола, на возраст од 18 до 60 години. Сите учесници редовно тренираа најмалку четири часа неделно во рамките на најмалку шест месеци пред почетокот на истражувањето.

Критериуми за вклучување во истражувањето:

- возраст: 18–60 години;
- редовна физичка активност — возење велосипед минимум 4 часа неделно;
- добра општа психофизичка состојба;
- отсуство на акутни воспалителни или метаболички заболувања;
- потпишана информирана согласност за учество во студијата.

Критериуми за исклучување од студијата:

- акутни респираторни или системски воспалителни состојби;
- хронични кардиоваскуларни, метаболички или ендокрини нарушувања;
- користење лекови што можат да влијаат на метаболизмот на лактат (на пр. метформин), како и аналгетици, антипиретици или антиоксидантни суплементи (на пр. витамин С), во период од 12 часа пред тестирањето;
- неспособност за изведување на стандардизираниот физички протокол;
- одбивање давање информирана согласност.

Учесниците добија стандардизирани инструкции што требаше да ги почитуваат пред доаѓањето на тестот:

- да ја задржат вообичаената исхрана во деновите пред тестот;
- да избегнат внес на храна најмалку 2 часа пред тестирањето;
- да не консумираат лекови, аналгетици, антипиретици или антиоксидантни суплементи (на пр. витамин С) во период од 12 часа пред тестирањето;
- да избегнат интензивна физичка активност во период од 24 часа пред тестирањето.

Дополнително на однапред дефинираните критериуми за вклучување и за исклучување, за време на самото изведување на тестирањето и при последователната анализа на собраните примероци, беа идентификувани шест испитаници кои не ги исполнија условите за вклучување во финалната („чиста“) аналитичка кохорта. Нивното исклучување беше извршено според строго документирани, објективни критериуми поврзани со преданалитичка контаминација, со неуспех да се изведе целосниот стандардизиран протокол, или со јасно документиран аналитички артефакт, а не врз основа на статистичкото однесување на нивните резултати. Конкретните причини за секој од шестминатa исклучени испитаници се наведени подолу, поделени во три методолошки различни категории. Целокупниот тек на испитаниците е прикажан на Слика 29 (потсекција 8.4).

Прва категорија — преданалитичка контаминација на примерокот (еден испитаник): Кај испитаникот 04MB беше забележана видлива контаминација на саливарниот примерок со пот за време на колекцијата, што директно ги наруши саливарните состојки и доведе до екстремни вредности неконзистентни со физиолошкиот опсег.

Втора категорија — отстапување од стандардизираниот протокол (четворица испитаници): Испитаникот 15SN, спротивно на стандардизираните инструкции, имал појадок приближно еден час и триесет минути пред терминот на тестирање, а 15 минути пред самиот тест консумирал јаглехидрати, што може да го промени постпрандијалниот гликемиски и

лактатен профил. Испитаникот 20TP консумирал пијалок со мешавина од електролити и шеќер пред почетокот на тестот и продолжил со неговото внесување сè додека истражувачкиот тим не го воочи и не интервенираше; иако за време на самиот тест пиел само вода, претходно внесените јаглехидрати веќе го промениле метаболичкиот статус. Испитаникот 18MT отстапи од протоколот на два начина: внесуваше јаглехидрати за време на самиот тест, а во последниот интервал произведената механичка моќност опадна (од 240 на 220 W) наместо да расте, што покажува дека прогресивниот протокол не беше изведен целосно до максималниот интензитет (дополнително, неговите саливарни концентрации беа повеќекратно над физиолошкиот опсег на кохортата). Конечно, испитаникот 05II не успеа да го заврши четвртиот (последен) интервал од прогресивниот тест, што е потврдено од објективните податоци запишани во неговата .fit/.gpx датотека од смарт-тренажерот; бидејќи истражувачкиот дизајн бара комплетен сет од четири мерни точки по испитаник, податоцишто недостасуваат за највисокиот интензитет го направија неговиот сет неупотреблив за анализа.

Трета категорија — документиран аналитички артефакт (еден испитаник): Кај испитаникот 19LK, сигналот на методата LOX-POD покажа однесување неспоиво со валиден аналитички отчит. Во првите три интервали методата регистрираше практично нула концентрација на лактат (0,00, 0,03 и 0,01 mmol/L) и покрај јасно измерливиот крвен лактат (1,3, 0,8 и 0,8 mmol/L), а во последниот интервал нагло скокна на 5,40 mmol/L — вредност еднаква на приближно 104 % од паралелно измерениот крвен лактат (5,2 mmol/L), додека типичниот сооднос на L-специфичната метода со крвта во кохортата изнесува околу 10 %. Ваквото однесување (рамен, речиси нулти сигнал проследен со екстремен скок и сооднос саливарен/крвен лактат што драстично отстапува од соодносот на кохортниот) го задоволува однапред дефинираниот критериум за аналитички артефакт и укажува на грешка во отчитувањето, а не на вистинска висока концентрација. Соодветната фенантролинска вредност во тој интервал изнесуваше 13,9 mmol/L. Поради тоа, податоците за овој испитаник беа исклучени од финалната аналитичка кохорта.

Финалната („чиста“) аналитичка кохорта врз која се базираат сите статистички анализи во оваа теза опфаќа 14 испитаници (20 вклучени минус шестминатa наведени погоре). Заради транспарентност, индивидуалните лактатни криви на сите 20 тестирани испитаници (вклучувајќи ги и исклучените) се прикажани збирно во прегледниот приказ во поглавјето Резултати, што го документира влијанието на горенаведените преданалитички, процедурални и аналитички фактори.

4.3. Опрема за физичко оптоварување

Физичкото оптоварување беше изведувано на статичен интерактивен смарт-тренажер од директен погон (Elite Suito T, Elite S.r.l., Италија) со

монтиран друмски велосипед (Giant Contend 1). Тренажерот е опремен со интегриран мерач на моќност со декларирана точност од ±2,5 %, како и со електромагнетски систем за регулација на отпорот, што овозможува динамично приспособување на оптоварувањето во реално време. На испитаникот пред почетокот на тестот беа подесени седлото и управувачот на велосипедот, со цел да се постигне ергономска положба и да се минимизира појава на дискомфорт за време на тестирањето.

Тренажерот беше поврзан со компјутер на кој беше инсталиран софтверот Zwift (Zwift Inc., верзија 1.105.3), кој служеше како визуелен интерфејс за испитаниците и истовремено како систем за регистрирање на следниве параметри: срцева фреквенција (преку градналента Garmin HRM200), произведена механичка моќност (W), каденца (вртежи на минута, rpm) и виртуелна брзина.

4.4. Протокол за физичко оптоварување

Беше применет стандардизиран протокол со прогресивно зголемување на интензитетот, дизајниран да ги опфати четирите главни метаболички зони на издржливост. Протоколот се состоеше од четири последователни 10-минутни интервали, разделени со паузи од 30 секунди, наменети за земање на биолошки примероци, со вкупно времетраење на тестот од 45 до 55 минути, вклучувајќи го и завршниот cool-down период.

Интензитетот на оптоварувањето во секој интервал беше дефиниран според метаболичките зони на издржливост базирани на лактат[52]:

- Интервал #1 — Зона 1: фаза на загревање со низок интензитет, наменета за постепено физиолошко приспособување кон оптоварувањето;
- Интервал #2 — Зона 2: фаза околу првиот лактатен праг (LT1 — најниската интензитет при кој концентрацијата на лактат во крвта почнува трајно да расте над базалното ниво, приближно 2 mmol/L) и максималната стапка на оксидација на масти (FATmax), традиционално асоцирана со интензитет на „соодветно темпо“ во спортовите на издржливост;
- Интервал #3 — Зона 3: фаза со значително зголемен напор, помеѓу LT1 и LT2, карактеризирана со зголемена употреба на гликолитичкиот метаболизам;
- Интервал #4 — Зона 4 (LT2 — вториот лактатен праг, интензитетот над кој продукцијата на лактат го надминува неговото отстранување, што доведува до нагла акумулација; приближно 4 mmol/L): фаза на анаеробниот праг, карактеризирана со забележителна акумулација на лактат во крвната плазма.

По завршувањето на четвртиот интервал следеше пасивен cool-down период во максимално времетраење од 10 минути, со цел постепено

намалување на срцевата фреквенција и метаболичкото оптоварување, согласно стандардните препораки за безбедно завршување на интензивен физички напор. Испитаниците имаа право на консумирање вода во текот на целиот тест, но без внес на изотонични напивки или други супстанции што би можеле да го изменат составот на плунката или крвната биохемија.

4.5. Колекција на биолошки примероци

Во рамките на секој од четирите 10-минутни интервали беше извршено стандардизирано земање на биолошки примероци по следниов распоред:

4.5.1. Земање капиларна крв

Капиларна крв во волумен од 0,2 µL беше земана еднаш во рамките на секој интервал, помеѓу 5-тата и 6-тата минута на возењето. Примерокот беше земан со стерилна ланцета за еднократна употреба (Medisign) од врвот на избраниот прст. Местото на убодот претходно беше дезинфицирано со раствор на 70 % етанол и просушено со стерилен тупфер. Првата капка крв беше исфрлена со цел да се избегне контаминација со интерстицијална течност или со остатоци од дезинфекциско средство; втората капка беше нанесена директно на тест-лента (EKF Diagnostic) и веднаш беше анализирана со валидиран рачен анализатор (EKF Lactate Scout Sport). Концентрацијата на лактат во крвта се отчитуваше во рок од приближно 10 секунди и се изразуваше во mmol/L.

4.5.2. Земање стимулирана плунка

Колекцијата на плунка беше изведувана по методата на стимулирано лачење со механичка мастикација на парафилмска лента. Парафилмот му се подаваше на испитаникот точно на 5-тата минута од секој интервал, истовремено со земањето на капиларна крв. Првиот млаз плунка беше исфрлен (со голтање), со цел да се избегне контаминација со резидуални супстанции од оралната шуплина и да се обезбеди репрезентативна стимулирана секреција.

Колекцијата на плунка започнуваше точно во 6-тата минута и траеше 4 минути, до 10-тата минута на интервалот. Во овој временски прозорец, испитаникот континуирано ја испушташе стимулираната плунка во стерилен пластичен сад со широк отвор. По завршувањето на колекцијата, садот се мереше на аналитичка вага, потоа се затвораше со капаче и веднаш се обележуваше со кодот на испитаникот и бројот на интервалот. Минималниот волумен на собрана плунка по интервал изнесуваше ≥1 mL.

За секој од четирите интервали, количеството на собраната плунка беше прецизно измерено со аналитичка вага RADWAG AS 160.X2 PLUS (RADWAG, Полска; резолуција d = 0,1 mg) пред и по колекцијата, со цел да се определи нето-количеството на плунката. Примероците понатаму се процесираа на следниов начин: (1) мешање со вортекс на максимална брзина (Heidolph Reax

2000) во траење од 30 секунди; (2) центрифугирање во ладена центрифуга (Eppendorf Centrifuge 5810 R) при +4°C и 5000 rcf во траење од 15 минути; (3) собирање на бистриот супернатант во посебни ладени стерилни епрувети и негова непосредна употреба за аналитички мерења. Сите примероци беа третирани во рок од 60 минути по колекцијата, со цел да се избегне деградација на лактат и измена на составот.

4.6. Аналитички методи

4.6.1. Определување на лактат во капиларна крв

Концентрацијата на лактат во капиларна крв беше определувана со валидиран рачен ензимски анализатор EKF Lactate Scout Sport (EKF Diagnostic GmbH, Германија). Овој инструмент користи амперометриски сензорски систем со имобилизирана лактат оксидаза, и е дизајниран за брзо мерење во теренски услови. Деклариранот аналитички опсег е 0,5–25,0 mmol/L, со време на анализа од приближно 10 секунди и потребен волумен на примерок од само 0,2 μL. Сензорот е специфичен за L-лактатот, што исклучува интерференција од D-лактатот и од други редуцирачки супстанции. Анализаторот беше калибриран според препораките на производителот пред секое тестирање, со стандардни контролни раствори со позната концентрација на лактат. Според спецификацијата на производителот, прецизноста при хематокрит од 35–50 % изнесува ≤0,2 mmol/L за концентрации 0,5–6,7 mmol/L и ≤3 % за 6,8–25,0 mmol/L (деклариранот хематокритен опсег е 20–70 %); долниот крај на мерниот опсег (0,5 mmol/L) ја претставува практичната долна граница на квантификација, бидејќи посебна вредност за LOD/LOQ не е декларирана. Дополнително, декларирани се граници на толеранција за интерференции (парацетамол до 0,662 mmol/L, аскорбат до 0,342 mmol/L и урична киселина до 0,550 mmol/L), што ја поткрепува аналитичката специфичност на референтната метода.

4.6.2. Определување лактат во плунка — метода со 1,10-фенантролин

Концентрацијата на лактат во плунка беше определувана со метода базирана врз реакцијата помеѓу лактатот и 1,10-фенантролин во присуство на железо(III) јони и под дејство на ултравиолетово зрачење. Методата, оригинално опишана во патентот WO 2013/045443 A1, се заснова на оксидација на лактатот и формирање стабилен обоен ферус-комплекс со 1,10-фенантролин, чија апсорпција е пропорционална на концентрацијата на лактат во примерокот.

Постапката беше адаптирана и оптимизирана за анализа на саливарни примероци во Лабораторијата за орална биохемија и физиологија при Катедрата за болести на устата и пародонтот (Стоматолошки факултет — Скопје). Отчитувањето на апсорбанцијата беше изведувано со двозрачен UV-Vis спектрофотометар Specord 50 (Analytik Jena AG, Германија), при бранова

должина од 512 nm, во согласност со патентната постапка [33]. Примероците од плунка беа разредувани 1:10 пред анализа. Калибрацијата беше изведувана со серија стандардни раствори на млечна киселина (Sigma-Aldrich) во опсег од 0,05 до 2,00 mM (што одговара на 0,5–20 mM во неразредена плунка), а сите мерења беа изведувани во дупликат за намалување на стохастичката грешка.

4.6.3. Определување лактат во плунка — метода LOX-POD

Како паралелна споредбена метода со повисока аналитичка специфичност за L-лактатот, истиот примерок од плунка беше анализиран и со ензимска метода базирана врз спрегната реакција помеѓу лактат оксидаза (LOX) и пероксидаза (POD). Лактат оксидазата катализира оксидација на L-лактатот до пируват, при што се ослободува водород пероксид (H_2O_2), кој потоа реагира со хромоген во присуство на пероксидаза, давајќи обоен производ кој се отчитува спектрофотометриски [53]. Бидејќи лактат оксидазата е стерео-специфична за L-изомерот на лактатот, оваа метода детектира исклучиво ендогено продуциран лактат и не реагира со D-лактатот од орални микроорганизми, ниту со уричната киселина и со други неспецифични редуцирачки супстанции во плунката.

Методата LOX-POD беше изведувана во истите услови како и фенантролинската метода — со ист процесиран супернатант на плунка, во истата лабораторија и со истиот спектрофотометар (Specord 50). Реакционата смеса се состоеше од 350 µL реагенс R1, 90 µL реагенс R2 и 50 µL примерок или стандард; по инкубација од 10 минути на 37 °C и стабилизација од 4 минути на собна температура, апсорбанцата се отчитуваше при 600 nm [54]. Примероците чија концентрација го надминуваше горниот калибрационен опсег (0,8 mM) беа претходно разредувани со познат фактор и повторно мерени во рамките на линеарниот опсег, по што конечната вредност се пресметуваше со множење со факторот на разредување. Сите мерења беа изведувани во дупликат. Како контрола на квалитетот, паралелно се анализираа стандарди со позната концентрација на L-лактат во рамките на аналитичкиот опсег на методата. Паралелното изведување на двете методи (фенантролинска и LOX-POD) на ист примерок овозможи директна аналитичка споредба на резултатите и проценка на влијанието на специфичноста на методата врз корелациите со крвниот лактат.

4.7. Валидација на аналитичките методи

Двете саливарни методи (фенантролинска и LOX-POD) беа валидирани во истата лабораторија, согласно со препораките на International Council for Harmonisation, ICH Q2(R1) (2005), преку истиот сет аналитички параметри: линеарност, осетливост (LOD и LOQ), точност (recovery), прецизност и матрикс-ефект, под контролирани лабораториски услови (температура 22 ±2 °C, релативна влажност <60 %, реагенси од аналитички степен на чистота). Споредбен приказ на валидациските параметри е даден во Прилог (Табела 8).

4.7.1. Валидација на фенантролинската метода

Калибрациониот модел на фенантролинската метода покажа висока линеарност (Abs = 0,6244·C + 0,0027; R^2 = 0,9968) во опсегот 0,05–2,00 mM (за плунка разредена 1:10 што одговара на 0,5–20 mM во неразредена плунка). Границата на детекција (LOD) изнесуваше 0,049 mM, а функционалната граница на квантификација (LOQ) 0,149 mM. Прецизноста (повторливост), проценета преку дупликат анализи на три примероци, изнесуваше просечен коефициент на варијација CV = 8,0 % (опсег 6,6–9,5 %), а точноста, проценета со тест на искористливост при надодавање од +1,00 mM, даде recovery од 95,9 % (95,4–97,6 %), во рамките на прифатливиот критериум од 80–120 %. Матрикс-ефектот беше минимален, потврден со високиот recovery (≈96 %). Резултатите под границата на квантификација беа третирани како полуквантитативни и користени првенствено за проценка на трендови, а не за строго квантитативни споредби.

4.7.2. Валидација на методата LOX-POD

Калибрациониот модел на методата LOX-POD покажа висока линеарност (A = 0,5302·C + 0,0057; R^2 = 0,9967) во опсегот 0,025–0,8 mM. Границата на детекција (LOD) изнесуваше приближно 0,04–0,06 mM, а границата на квантификација (LOQ) приближно 0,11–0,19 mM, со стабилна базна линија (релативна стандардна девијација на бланкот, RSD = 0,40 %). Точноста, проценета со тест на искористливост (recovery), даде вредности во опсег од 62 % до 145 %: пониската искористливост кај примерокот со висока изворна концентрација (близу горната граница на калибрацијата) се должи на делумно заситување на ензимската реакција, додека повисоката искористливост при висок spike укажува на матрикс-ефекти во плунката (протеини, муцини и редуцирачки супстанции што влијаат на пероксидазната реакција); при пониски, физиолошки концентрации искористливоста беше поблиску до очекуваната (приближно 85 %). Примероците чија концентрација го надминуваше горниот калибрационен опсег (0,8 mM) беа претходно разредувани и повторно мерени во рамките на линеарниот опсег. Деталните валидациски податоци (калибрациона крива и spike-recovery тест) се дадени во Прилог (Табела 6 и Табела 7).

4.8. Статистичка обработка на податоците

Сите статистички анализи беа изведени во Python (верзија 3.11), со користење на стандардни нумерички и статистички библиотеки: NumPy (за нумерички пресметки и работа со податочни матрици), SciPy (модулот scipy.stats — за корелациони коефициенти, линеарна регресија и тестови за значајност), pandas (за организација и манипулација на табеларни податоци), Matplotlib (за изработка на графиконите) и statsmodels (за линеарниот модел со мешани ефекти и за повторувано-мерната корелација). Сите нумерички податоци (крвен лактат, саливарен лактат со двете методи, произведена моќност и срцева фреквенција) беа организирани во стандардизирана Excel-

табела и програмски вчитани за анализа со библиотеката openpyxl. Граничниот статистички праг на значајност за сите тестови беше поставен на $p < 0,05$, со двостранични (two-tailed) тестови.

Дескриптивната статистика беше изведена за сите континуирани променливи (крвен лактат, саливарен лактат добиен со LOX-POD и фенантролинската метода, произведена механичка моќност, срцева фреквенција и маса на собраната плунка). За секоја променлива по интервал на оптоварување беа пресметани просечна вредност, стандардна девијација, медијана, минимална и максимална вредност. Нормалноста на распределбата на резидуалите беше проценувана со Shapiro–Wilk тест ($W \approx 0,97$; $p > 0,05$), со напомена дека во случај на групирани повторени мерења, ваквите тестови имаат ограничена интерпретативна вредност и се користат единствено за дијагностички цели.

Поврзаноста помеѓу саливарниот и крвниот лактат беше испитувана со Персонов (Pearson) коефициент на корелација (r) за параметарска проценка и со Сперманов (Spearman) коефициент (ρ) за непараметарска проценка која не претпоставува линеарна врска. Корелациите беа пресметани на две нивоа: (а) на ниво на поединечен испитаник (within-subject), пресметани одделно за секој испитаник низ неговите четири мерни точки, и потоа агрегирани во просечна коефициентна вредност; и (б) на ниво на здружена кохорта (pooled), каде што сите мерни точки од сите испитаници беа третирани заедно. Двата пристапа беа изведени паралелно за двете аналитички методи (LOX-POD и фенантролинска).

Деведесет и пет процентните доверливи интервали (95 % CI) за корелационите коефициенти беа пресметани со Fisher z-трансформација за поединечни Пирсонови (Pearson) коефициенти, а за просечните корелации од повеќе испитаници — преку непараметарска bootstrap метода со 5 000 ресемплувања (со случаен seed = 42 за репродуцибилност). Методата Bootstrap не претпоставува нормална распределба на проценуваната статистика и е особено соодветен за мали кохорти.

Линеарната регресија помеѓу саливарниот и крвниот лактат беше изведувана со методата на најмали квадрати (Ordinary Least Squares, OLS). Генерализациониот капацитет на регресиониот модел врз нов, незавиден испитаник беше проценуван преку leave-one-subject-out (LOSO) крос-валидација, во која секој од испитаниците последователно беше исклучуван од тренинг-сетот, а потоа, неговите вредности беа предвидувани со моделот изграден врз другите. Овој пристап е особено соодветен за студии со повторени мерења и со мал број испитаници, бидејќи симулира работа на моделот врз непознати индивидуи. Беа пресметани следниве метрики на регресиската перформанса: коефициент на детерминација (R^2) и коренско средно квадратично отстапување (RMSE). Неизвесноста на овие метрики беше квантифицирана преку процедурата cluster-bootstrap (ресемплување на ниво

на испитаник, B = 5 000 ресемплувања), која ја почитува групираната структура на податоците.

Интраиндивидуалната поврзаност меѓу саливарниот и крвниот лактат беше моделирана со линеарен модел со мешани ефекти (крвен лактат како зависна променлива, саливарен лактат како фиксен ефект, случаен пресек и случаен наклон по испитаник), при што повторувано-мерната корелација (repeated-measures correlation, rmcorr) служеше како мерка на within-subject поврзаност. Овој пристап ги користи сите мерни точки истовремено и ја почитува групираната структура на податоците, за разлика од просекот на поединечните коефициенти. Истиот rmcorr пристап беше применет и за проценка на интраиндивидуалната поврзаност на саливарниот лактат со произведената механичка моќност и со срцевата фреквенција (хипотеза H2).

Конкретните причини за исклучување на шестмина испитаници (04MB, 05II, 15SN, 18MT, 20TP и 19LK) од финалната „чиста“ аналитичка кохорта се документирани во потсекцијата 4.2 (Испитаници). Исклучувањата беа извршени врз основа на објективно забележани преданалитички, процедурални или аналитички фактори, а не врз основа на статистичкото однесување на нивните резултати. Не беше применета никаква post-hoc филтрација на поединечни мерни точки (на пример монотоничност или delta-праг); сите задржани мерни точки на сите вклучени испитаници влегоа во анализите.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Дескриптивни карактеристики

Финалната аналитичка кохорта опфати 14 испитаници (13 мажи и една жена) на возраст од 20 до 59 години. Секој испитаник изврши четири последователни интервали на прогресивно оптоварување, што резултираше со вкупно 56 спарени мерни точки по аналитичка варијабла. Демографските карактеристики се прикажани во Табела 1.

Табела 1. Демографски карактеристики на финалната кохорта (n=14).

Иницијали	Возраст	Пол	Тежина (kg)
01SB	59	Машки	70
02DN	59	Машки	84
03II	20	Машки	72,5
06MF	36	Машки	76
07VS	41	Машки	83
08VL	39	Машки	87
09GS	36	Машки	83
10DJ	27	Женски	56
11DG	27	Машки	71
12IT	47	Машки	73
13IA	41	Машки	75
14KD	26	Машки	64
16JL	45	Машки	87
17ZI	41	Машки	78
Просек ± SD	**38,9 ± 11,6**	**13 М / 1 Ж**	**75,7 ± 8,9**

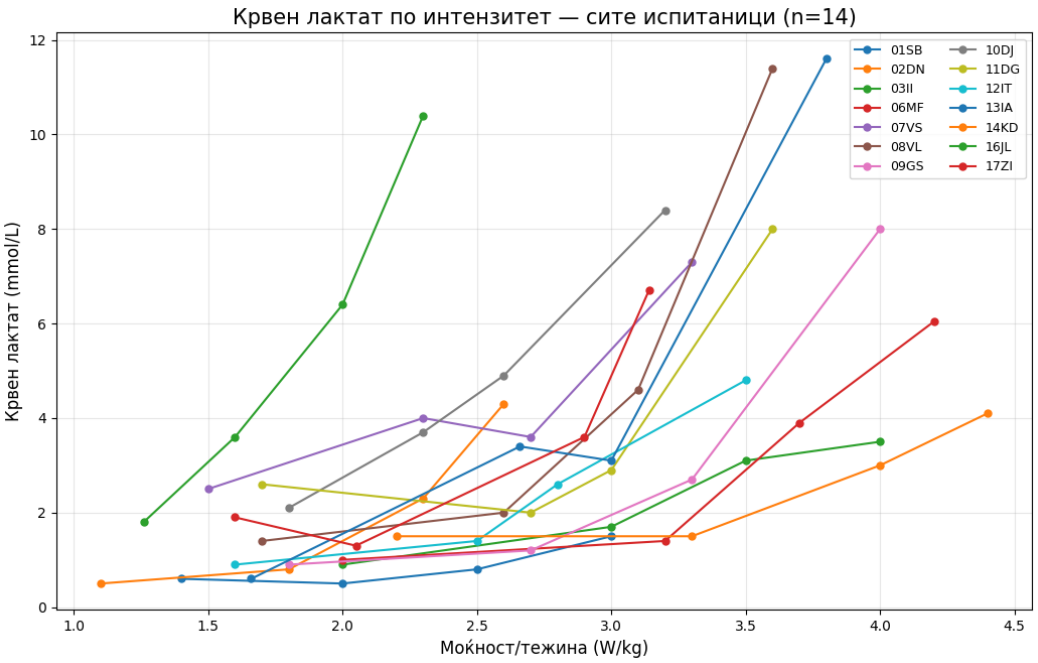
Со зголемувањето на релативниот интензитет (W/kg), концентрациите на крвниот лактат и на саливарниот L-лактат (LOX-POD) монотоно се зголемуваа, додека фенантролинскиот сигнал беше нерегуларен и не покажа конзистентен монотон тренд. Просечните вредности (± SD) по интервал — за крвниот и саливарниот лактат, изведената моќност и срцевата фреквенција — се сумирани во Табела 2. Брзината на саливарното лачење (стимулирана плунка) изнесуваше во просек 1,02 ± 0,60 mL/min, со опаѓачки тренд низ интервалите (1,14; 1,20; 1,02 и 0,73 mL/min соодветно) и широк меѓуиндивидуален опсег (0,26–2,79 mL/min). Срцевата фреквенција, исто

така, прогресивно се зголемуваше низ четирите интервали, паралелно со порастот на крвниот и на саливарниот L-лактат. На индивидуално ниво, саливарниот L-лактат (LOX-POD) се зголемуваше значајно и со произведената механичка моќност (rmcorr r = 0,62; 95 % CI 0,39–0,78; p < 0,001) и со срцевата фреквенција (rmcorr r = 0,65; 95 % CI 0,44–0,80; p < 0,001), при што монотон пораст беше забележан кај 13 од 14 испитаници. Крвниот лактат покажа уште посилна интраиндивидуална поврзаност со двата параметри (rmcorr r ≈ 0,79; p < 0,001). Неспецифичната фенантролинска метода не покажа значајна интраиндивидуална поврзаност ниту со моќноста (r = 0,14; p = 0,38) ниту со срцевата фреквенција (r = 0,17; p = 0,28). Бидејќи произведената моќност и срцевата фреквенција се меѓусебно колинеарни показатели на интензитетот, тие се прикажани како одделни within-subject поврзаности, а не како независни предиктори.

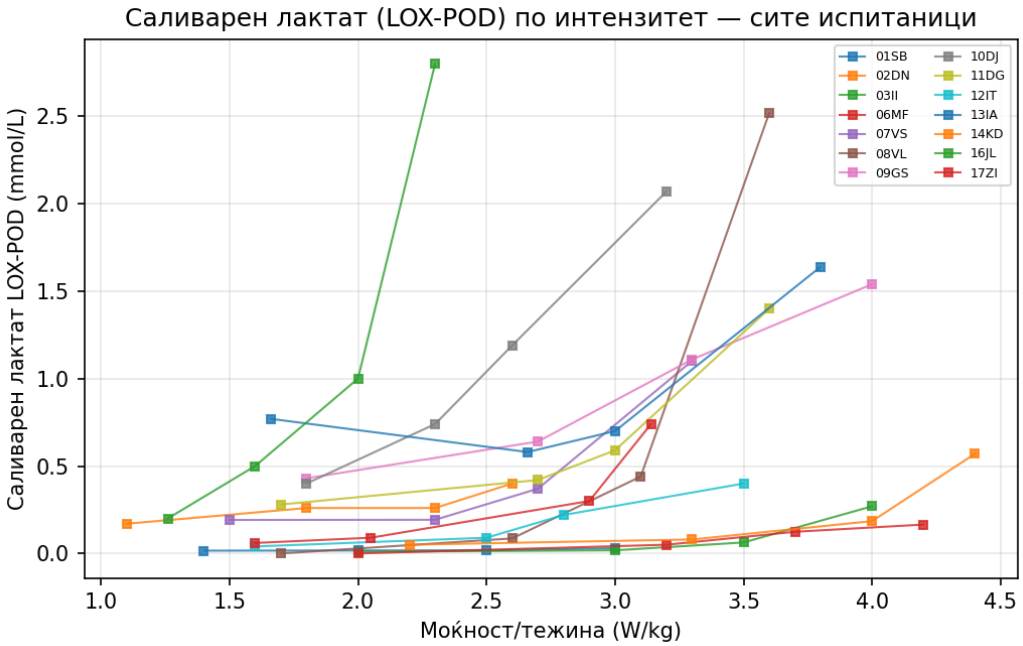
Табела 2. Просечни вредности (± SD) по интервал на оптоварување, за целата кохорта (n=14).

Интервал	Моќност (W)	Крвен лактат (mmol/L)	LOX-POD (mmol/L)	Фенантролин (mmol/L)	HR (bpm)
1	126	1,37 ± 0,71	0,19 ± 0,22	2,73 ± 1,40	115 ± 14
2	184	2,04 ± 1,15	0,27 ± 0,26	3,47 ± 3,12	137 ± 17
3	223	3,39 ± 1,32	0,47 ± 0,39	3,13 ± 1,41	154 ± 15
4	258	6,86 ± 3,04	1,12 ± 0,90	3,52 ± 2,29	170 ± 14

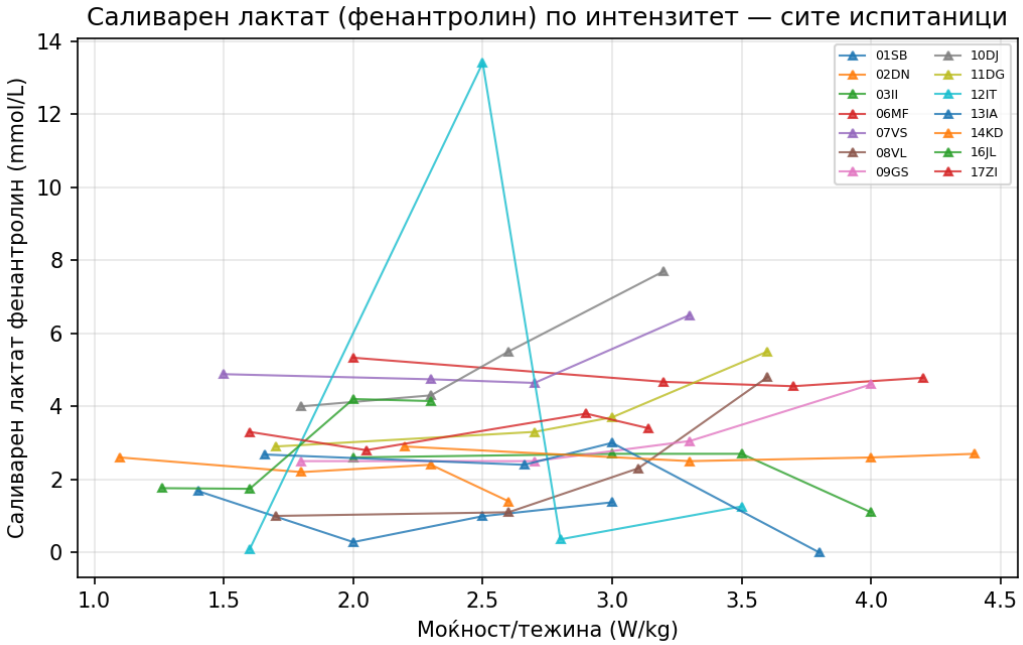
Индивидуалните профили на крвниот и саливарниот лактат (LOX-POD и фенантролин) по интензитет за сите 14 испитаници се прикажани на Сликите 1, 2 и 3 и потврдуваат конзистентен прогресивен пораст со оптоварувањето.



Слика 1. Крвен лактат според интензитет (W/kg) за сите 14 испитаници.

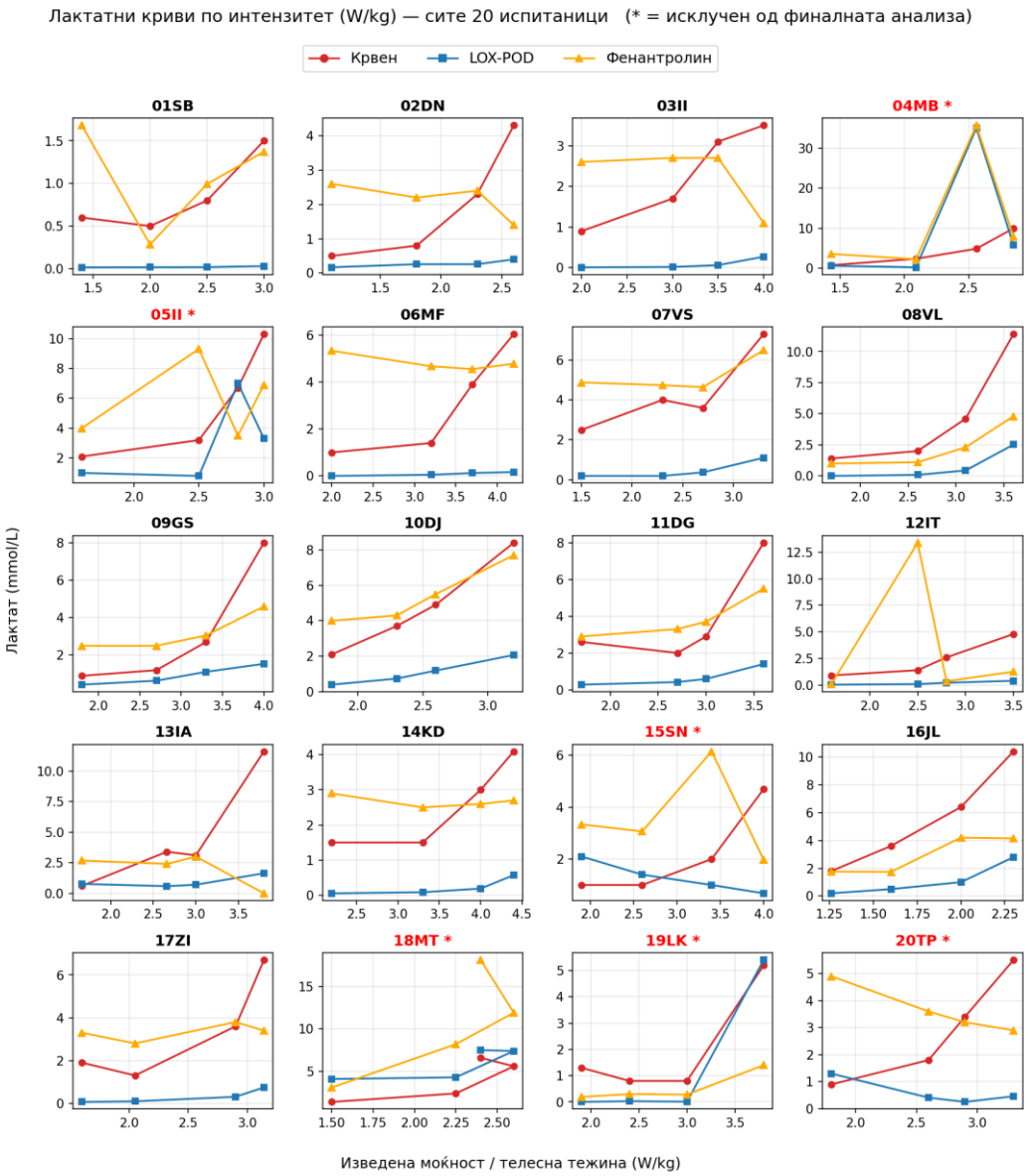


Слика 2. Саливарен лактат (LOX-POD) според интензитет (W/kg) за сите 14 испитаници.



Слика 3. Саливарен лактат (фенантролин) по интензитет (W/kg) за сите 14 испитаници.

На Слика 4 се прикажани лактатните профили на сите 20 тестирани испитаници, вклучувајќи ги и шесте исклучени од финалната анализа (означени со црвена ѕвездичка). Кај исклучените се воочливи карактеристичните отстапувања што ја мотивираа нивната ексклузија — нагли скокови, немонотони профили и аналитички артефакти.



Слика 4. Лактатни криви по интензитет за сите 20 испитаници; исклучените од финалната кохорта се означени со црвена ѕвездичка (*).

5.2. Корелација на ниво на поединечен испитаник

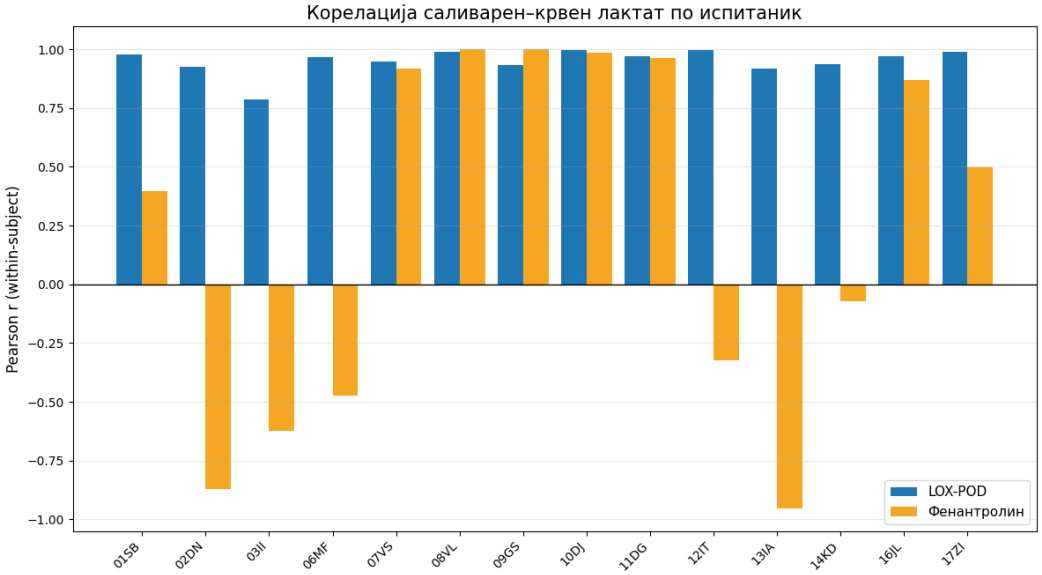
Врската меѓу саливарниот и крвниот лактат на интраиндивидуално ниво беше проценета со линеарен модел со мешани ефекти (крвен лактат како зависна променлива, саливарен лактат како фиксен ефект, случаен пресек и случаен наклон по испитаник), кој ги користи сите 56 мерни точки истовремено и ја почитува структурата на повторените мерења. За методата LOX-POD, популацискиот наклон беше значаен и изнесуваше 3,92 mmol/L крвен лактат по единица саливарен лактат (SE 0,65; $p < 0,001$), а корелацијата при повторени мерења (rmcorr) изнесуваше $r = 0,87$ (95 % CI 0,78–0,93; $p < 0,001$). Спротивно на тоа, кај фенантролинската метода наклонот не беше статистички значаен (0,67; SE 0,50; $p = 0,19$), со rmcorr $r = 0,18$ (95 % CI −0,13–0,46; $p = 0,25$).

За илустрација, поединечните коефициенти Pearson по испитаник се прикажани во Табела 3 и на Слика 5. Овие коефициенти се пресметани врз основа на само четири мерни точки по испитаник (n = 4), со широки доверливи интервали, и зависат од начинот на агрегирање: аритметичкиот просек изнесува 0,95 за LOX-POD (пресметан од 13-те испитаници кај кои можеше да се процени коефициентот; кај испитаникот 01SB сите вредности се под LOD) и 0,24 за фенантролинската метода, додека Fisher-z просекот изнесува 0,97 и 0,66, соодветно. Дополнително, при исклучување на четвртиот интервал, просечниот интраиндивидуален (within-subject) коефициент се намалува од 0,95 на 0,71. Конечно, во однос на валидираните аналитички граници (потсекција 4.7), 8 од 56 LOX-POD отчитувања паднаа под границата на детекција (≈0,04 mM), а 17 од 56 (30 %) под практичната граница на квантификација (≈0,11 mM). Како проверка на стабилноста на резултатите, исклучувањето на вредностите под LOD/LOQ практично не ја промени интраиндивидуалната поврзаност (rmcorr r = 0,87 и наклон од моделот со мешани ефекти ≈3,9 во сите случаи), додека меѓуиндивидуалната предиктивна валидност само благо опаѓаше (LOSO R^2 од 0,70 на 0,61); сепак, при прагот на квантификација остануваат проценливи само 39 од 56 мерни точки и 7 од 14 испитаници со најмалку три квантификувани вредности, поради што оваа проверка се однесува на испитаниците со мерливи вредности.

*Табела 3. Интраиндивидуалните Персонови (Within-subject Pearson) корелации со крвниот лактат, по испитаник. * н.п. = не е пресметлив: кај испитаникот 01SB сите четири LOX-POD вредности се под границата на детекција, поради што коефициентот би претставувал корелација со инструментален шум. Просечниот интраиндивидуален*

(within-subject) коефициент е пресметан од 13-те проценливи испитаници и изнесува 0,949.

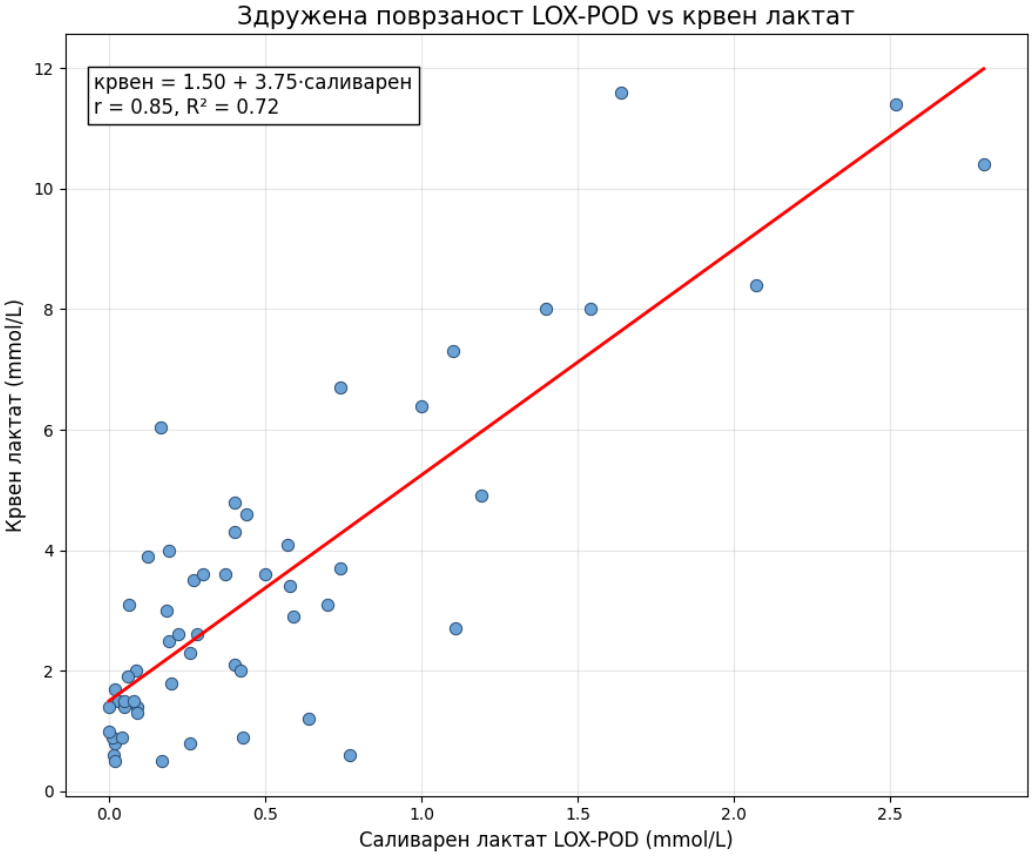
Иницијали	r (LOX-POD)	r (фенантролин)
01SB	н.п.*	0,396
02DN	0,925	−0,869
03II	0,788	−0,624
06MF	0,975	−0,475
07VS	0,949	0,919
08VL	0,989	0,999
09GS	0,931	0,999
10DJ	0,997	0,985
11DG	0,972	0,962
12IT	0,998	−0,323
13IA	0,917	−0,952
14KD	0,933	−0,073
16JL	0,971	0,869
17ZI	0,989	0,496



Слика 5. Корелација саливарен–крвен лактат по испитаник за двете методи. (n = 4 мерни точки по испитаник).

5.3. Здружена корелација и регресија

За илустрација, здружената (pooled) регресија што ги третира сите 56 мерни точки заедно даде силна поврзаност за LOX-POD (пулиран r = 0,85; R^2 = 0,72), опишана со равенката: крвен лактат = 1,50 + 3,74 × саливарен лактат (Слика 6). Сепак, овој показател ја игнорира групираната структура на повторените мерења, ги меша интра- и интериндивидуалната варијанса и ја преценува прецизноста, па се наведува само како илустративен приказ, а не како примарна проценка — примарни се моделот со мешани ефекти (потсекција 5.2) и LOSO-валидацијата (потсекција 5.4). Фенантролинската метода и на здружено ниво покажа занемарлива поврзаност (R^2 = 0,06). Регресиската права е потпрена претежно на високоинтензитетскиот кластер, што делумно ја објаснува тенденцијата за благо преценување при ниските интервали и потценување при највисокиот интервал.



Слика 6. Здружена поврзаност помеѓу саливарниот (LOX-POD) и крвниот лактат, со регресиона права.

5.4. Предвидување на крвниот лактат кај нов испитаник

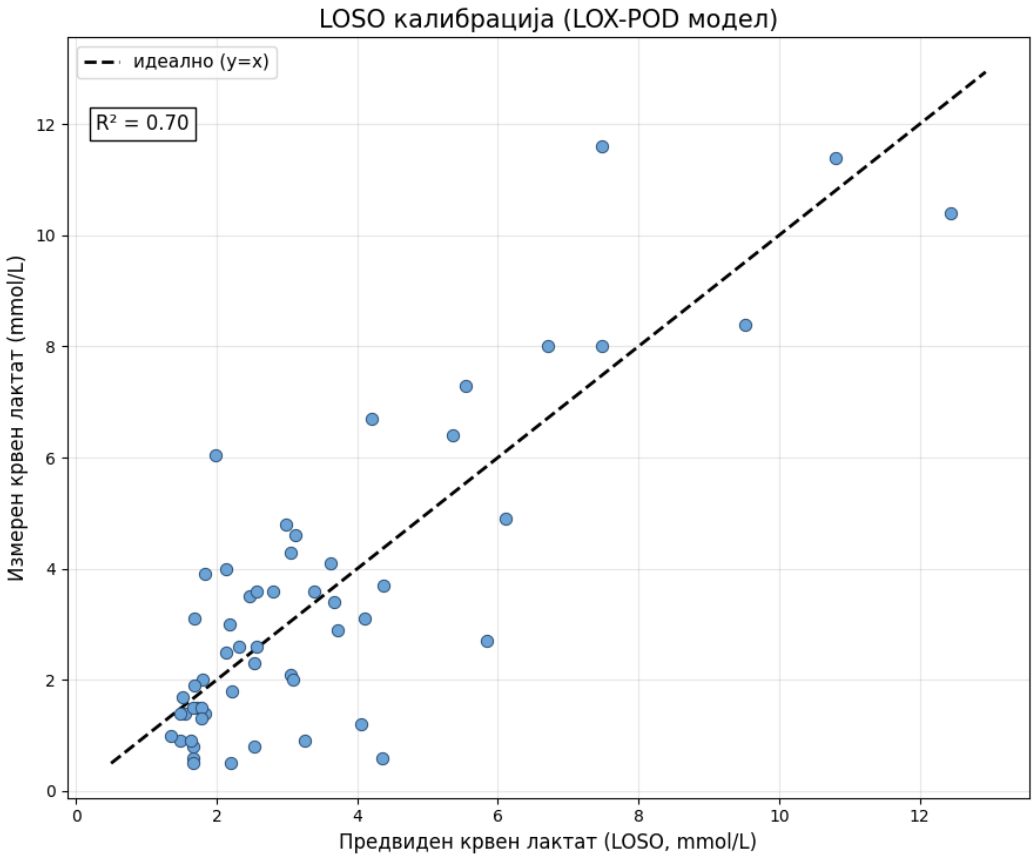
Способноста на регресискиот модел за генерализација кај нов испитаник кој не бил вклучен во развојот на моделот беше проценета со leave-one-subject-out (LOSO) валидација. За методата LOX-POD, во чистата аналитичка кохорта (n = 14) моделот постигна R^2 = 0,70 (95 % CI 0,50–0,83) и RMSE = 1,50 mmol/L, наспроти RMSE = 2,73 mmol/L за референтниот модел

заснован само на просекот (Слика 7). Фенантролинската метода постигна негативна вредност на LOSO R^2 (−0,17).

Оваа предиктивна валидност е специфична за чистата кохорта и е чувствителна на квалитетот на податоците. Во анализа на чувствителност, при повторно вклучување на исклучените испитаници, LOSO R^2 за LOX-POD нагло опаѓа: од +0,70 (n = 14) на −0,08 при повторно вклучување само на 19LK — единствениот испитаник исклучен според аналитички (наместо преданалитички или процедурален) критериум, чија вредност во четвртиот интервал е документиран артефакт (n = 15) — и на −0,81 при вклучување на сите 20 испитаници (Табела 4); пулираниот R^2 следи иста траекторија (0,72 → 0,43 → 0,07). Спротивно, интраиндивидуалната поврзаност останува робусна низ сите кохорти (Fisher-z просек ≥ 0,94; видете потсекција 5.2).

Табела 4. Анализа на чувствителност: влијание на исклучувањата врз показателите за LOX-POD (крвен лактат).

Кохорта	**within-r (Fisher-z)**	**Пулиран R^2**	**LOSO R^2**	**LOSO RMSE (mmol/L)**
Чиста (n = 14)	0,97	0,72	+0,70	1,50
− 01SB (n = 13)	0,97	0,71	+0,68	1,54
+ 19LK (n = 15)	0,97	0,43	−0,08	2,80
Сите (n = 20)	0,94	0,07	−0,81	3,69



Слика 7. LOSO калибрација: измерен наспроти предвиден крвен лактат (LOX-POD модел).

5.5. Споредба меѓу двете аналитички методи

Директната споредба на двете методи на ист саливарен примерок откри систематско отстапување. Фенантролинската метода даваше во просек приближно шестпати повисоки апсолутни вредности од LOX-POD (3,21 наспроти 0,51 mmol/L). Медијаната на односот саливарен/крвен лактат по мерна точка изнесуваше 9,9 % за LOX-POD и приближно 105 % за фенантролинот; просекот на односите по интервал за LOX-POD е малку повисок (~13–16 %).

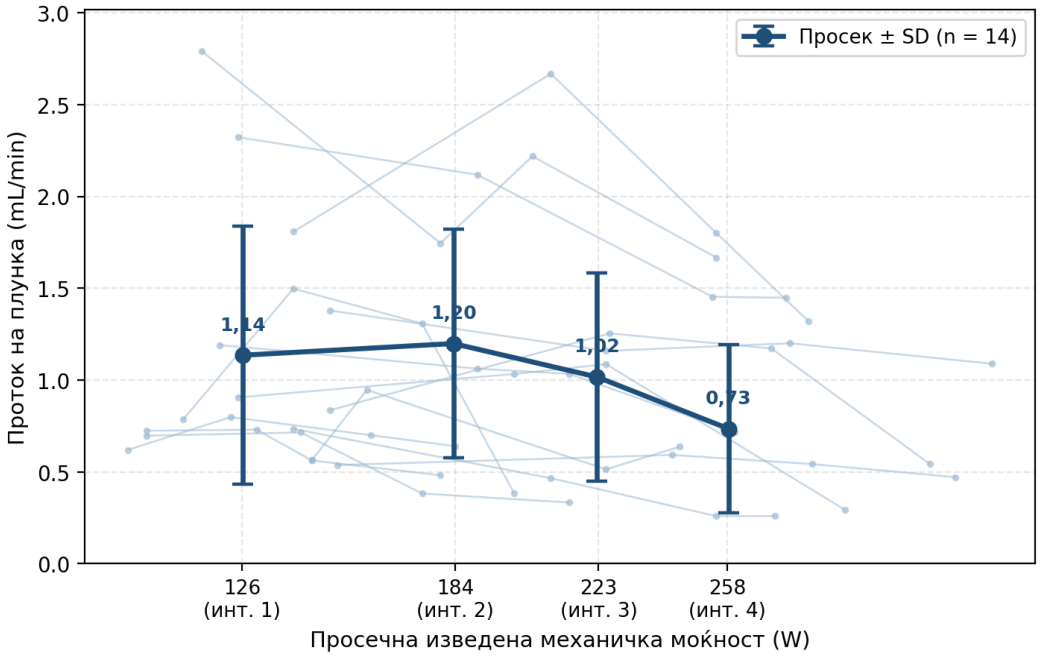
Табела 5. Збирна споредба на статистичките показатели за двете методи (n = 14). Within-subject r и Spearman ρ се просек на поединечните вредности; доверливите

интервали за within-subject r и за LOSO се добиени со bootstrap на ниво на испитаник (cluster/athlete bootstrap), а пулираниот R^2 ги третира сите мерни точки заедно.

Показател (vs крвен лактат)	**LOX-POD**	**Фенантролин**
rmcorr r [95 % CI] — примарна мерка	0,87 [0,78; 0,93]	0,18 [−0,13; 0,46]
Наклон (модел со мешани ефекти)	3,92 (p < 0,001)	0,67 (незначаен)
Within-subject r (аритм. просек; илустративно)	0,95 [0,92; 0,97]	0,24 [−0,15; 0,62]
Within-subject Spearman ρ	0,88	0,30
Пулиран r (R^2)	0,85 (0,72)	0,24 (0,06)
LOSO R^2 [95% CI]	0,70 [0,50; 0,83]	−0,17 [−0,83; 0,14]
LOSO RMSE (baseline 2,73)	1,50	2,95
Саливарен/крвен (медијана)	9,9%	105%

5.6. Проток на плунка при прогресивно оптоварување

Брзината на саливарното лачење беше пресметана од измерената маса на собраната плунка во секој интервал. Просечниот проток изнесуваше 1,14 ± 0,70; 1,20 ± 0,62; 1,02 ± 0,57 и 0,73 ± 0,46 mL/min од првиот до четвртиот интервал (вкупен просек 1,02 ± 0,60 mL/min; опсег 0,26–2,79 mL/min). Разликата помеѓу првиот и четвртиот интервал беше статистички значајна (парен t-тест p = 0,0005; Wilcoxon p = 0,0009). Односот меѓу протокот и произведената механичка моќност е прикажан на Слика 8.



Слика 8. Проток на плунка (mL/min) во однос на просечната изведена механичка моќност по интервал. Дебелата линија е просек ± SD за финалната кохорта (n = 14); светлите линии се поединечните испитаници.

5.7. Индивидуални резултати

Поради големиот обем, поединечните нумерички вредности, индивидуалните коефициенти на корелација и лактатните криви за сите 14 испитаници од финалната кохорта, како и за шесте исклучени испитаници, се прикажани во Прилог (потсекции 8.2 и 8.3). Збирниот преглед на сите индивидуални профили е даден на Сликите 1–4 (потсекција 5.1).

6. ДИСКУСИЈА

6.1. Главни наоди на студијата

Оваа студија ја процени применливоста на саливарниот лактат како неинвазивен биомаркер на физички напор кај велосипедисти, со паралелна споредба на две аналитички методи на ист примерок — L-специфичната ензимска метода LOX-POD и неспецифичната метода а со 1,10-фенантролин. Главните наоди можат да се сумираат на следниов начин.

6.2. Поврзаност меѓу саливарниот и крвниот L-лактат

При прогресивно оптоварување, концентрацијата на саливарниот лактат се зголемуваше паралелно со крвната, при сооднос плунка/крв од приближно 10 % за L-специфичната метода. Добиените резултати се во согласност со основните публикации од оваа област. Пионерската работа на Segura и соработниците [25] прво го има предложено саливарниот лактат како неинвазивен показател на анаеробниот метаболизам, наведувајќи дека концентрацијата во плунката изнесува приближно 10–15 % од крвното ниво — пропорција речиси идентична со медијаната од 9,9 % забележана во оваа студија за L-специфичната метода.

Високата интраиндивидуална поврзаност помеѓу саливарниот L-лактат и крвниот лактат има јасна физиолошка основа. L-лактатот, како краен продукт на анаеробната гликолиза, се транспортира низ клеточните мембрани преку монокарбоксилатните транспортери (MCT1, MCT4) и се дистрибуира во циркулацијата, во согласност со концептот на лактатен shuttle [13, 14]; оттаму, дел од системскиот лактат преминува во плунката преку крвно-саливарната бариера, според механизмите опишани во потсекција 2.6 [40]. Истовремено, резултатите се вклопуваат во поширокиот современ концепт за лактатот не само како отпаден продукт, туку како значаен метаболички супстрат и сигнална молекула кај издржливите спортисти [16, 17].

Повторувано-мерната корелација (rmcorr r = 0,87; 95 % CI 0,78–0,93) и наклонот од моделот со мешани ефекти (3,92; $p < 0,001$), заедно со умерено добрата LOSO валидност во чистата кохорта ($R^2 = 0,70$; 95 % CI 0,50–0,83; RMSE = 1,50 наспроти 2,73 mmol/L за моделот заснован само на просекот), укажуваат дека L-специфичната метода верно ја следи динамиката на крвниот лактат во рамките на даден поединец. Сепак, исклучувањето на вредностите под границите на детекција и квантификација практично не ја менуваше поврзаноста (пулиран r 0,85 → 0,83 → 0,81; просечен within-subject r 0,95 → 0,96 → 0,95), што покажува дека наодите се потпираат на веродостојните мерења над границата на детекција, а не на вредностите близу шумот. Треба да се истакне дека при построгиот праг на квантификација остануваат 39 од 56 мерни точки, а само 7 од 14 испитаници задржуваат најмалку три

квантифицирани вредности; оваа анализа на чувствителност затоа покажува робусност меѓу учесниците со квантифицирани вредности, што е поограничена тврдња од целосна независност на поврзаноста од цензурираните мерења. Медијаната на односот саливарен/крвен лактат се известува бидејќи е поробусна од просекот, кој кај LOX-POD е повисок поради влијанието на многуте ниски вредности.

Во однос на поставените хипотези, првата хипотеза (H1) е потврдена за L-специфичната метода — постои силна и статистички значајна интраиндивидуална поврзаност меѓу саливарниот и крвниот лактат (rmcorr r = 0,87; p < 0,001) — но не и за неспецифичната фенантролинска метода (r = 0,18; незначајно).

6.3. Динамика на саливарниот L-лактат во однос на механичката моќност и срцевата фреквенција

Срцевата фреквенција растеше прогресивно со интензитетот и го следеше порастот на лактатот во двата медиума, потврдувајќи го очекуваниот физиолошки одговор, но беше задржана само како контекстуален параметар (видете потсекција 6.7).

Силната интраиндивидуална поврзаност за LOX-POD делумно се потпира на мерните точки со највисок интензитет: при нивно исклучување просечниот интраиндивидуален (within-subject) коефициент опаѓа од 0,95 на 0,71, што укажува дека тие носат значителна тежина. Срцевата фреквенција растеше приближно линеарно со произведената механичка моќност, во согласност со нејзината етаблирана улога како показател на интензитетот на напор [55]; сепак, таа претставува општ кардиоваскуларен одговор што не е специфичен за лактатот и што значајно варира меѓу поединците (под влијание на фактори како што се нивото на тренираност, внес на кофеин, сон и замор), поради што, иако претставува валиден within-subject показател на интензитетот што расте паралелно со саливарниот лактат (видете 5.1, хипотеза H2), не беше вклучена како предиктор во калибрацискиот модел за предвидување на крвниот лактат кај нов испитаник.

Втората хипотеза (H2) е потврдена: саливарниот L-лактат расте паралелно со произведената механичка моќност (rmcorr r = 0,62) и со срцевата фреквенција (r = 0,65), со монотон пораст кај 13 од 14 испитаници.

6.4. Влијание на саливарниот проток и временската динамика на земањето примероци

Апсолутниот сооднос плунка/крв значајно се разликува меѓу поединците, веројатно поради индивидуалните разлики во функцијата на саливарните жлезди, протокот на плунка и пермеабилноста на крвно-саливарната бариера. Во прилог на ова, брзината на саливарното лачење во нашата кохорта опаѓаше со интензитетот и силно вариираше меѓу поединците

(0,26–2,79 mL/min); бидејќи концентрацијата на лактат зависи од степенот на разредување со плунка, оваа варијабилност во протокот е веројатен дополнителен извор на меѓуиндивидуалните разлики во апсолутните саливарни вредности (видете потсекција 2.6).

Дополнително, крвниот и саливарниот примерок не беа земени во ист временски момент: крвта беше земена во 5.–6. минута (моментна вредност), додека плунката беше собирана од 6. до 10. минута и претставува просек од четириминутна секреција. Ова доцнење е делумно намерно — дел од системскиот лактат треба време за да дифундира од крвта во плунката (видете потсекција 2.6) — но воведува можно временско неусогласување меѓу двете мерења, особено при нагли промени на интензитетот, што треба да се земе предвид при толкувањето на нивната поврзаност.

6.5. Интериндивидуална предиктивност и можност плунката да ја замени крвта

Саливарниот L-лактат покажа одлична интраиндивидуална поврзаност со крвниот лактат (rmcorr r = 0,87; 95 % CI 0,78–0,93), а при leave-one-subject-out (LOSO) валидација во чистата кохорта и умерена предиктивна валидност кај невиден испитаник (R^2 = 0,70), која сепак беше чувствителна на составот на кохортата и не се генерализираше при вклучување на компромитирани примероци. Поновата ревизија на Yan и соработниците [26] заклучува дека, иако корелацијата со крвниот лактат е конзистентно докажана, апсолутната квантификација сè уште останува предизвик; нашите наоди ја поткрепуваат оваа конклузија, бидејќи високата интраиндивидуална поврзаност соодветствува со умерена, но не и совршена, интериндивидуална предиктивна валидност.

Дисоцијацијата помеѓу одличната интраиндивидуална и умерената интериндивидуална валидност сугерира дека саливарниот L-лактат верно ја следи динамиката кај даден поединец, додека единствена универзална калибрациона равенка предвидува апсолутни вредности кај нов испитаник со ограничена прецизност. Изразената меѓуиндивидуална хетерогеност во апсолутниот сооднос плунка/крв ја ограничува прецизноста на единствена универзална калибрациона равенка и упатува на потребата од индивидуална калибрација.

Соодветно, иницијалната индивидуална калибрација се препорачува за апликации што бараат апсолутна квантификација — пристап аналоген на индивидуализираните референтни вредности што рутински се применуваат за други физиолошки параметри во спортската физиологија. Сепак, оперативната изводливост на ваквата калибрација зависи од повторливоста и временската репродуцибилност на саливарното мерење кај ист испитаник, што претставува приоритетна насока за идна валидација (видете 6.6).

Третата хипотеза (H3) е делумно потврдена: интраиндивидуалното следење е валидно, но единствената универзална калибрација не постигнува точност доволна за одредување на лактатните прагови (2 и 4 mmol/L) кај нов испитаник (LOSO R^2 = 0,70; RMSE = 1,50 mmol/L — типична грешка споредлива со ширината на една тренинг-зона), при што меѓуиндивидуалната предиктивност е чувствителна на составот на кохортата (LOSO R^2 опаѓа до −0,08 и −0,81 при повторно вклучување на исклучените испитаници), што покажува дека единствена универзална калибрација не се генерализира меѓу поединци.

6.6. Споредба на аналитичките методи и значење на аналитичката специфичност

Фенантролинската метода покажа слаба и неконзистентна поврзаност со крвниот лактат, систематски преценети вредности (приближно шестпати повисоки од L-специфичните) и негативна предиктивна валидност, што укажува на ограничена аналитичка специфичност во медиумот на плунката. Заедно, овие наоди го истакнуваат изборот на аналитичка метода како клучна детерминанта на валидноста на заклучоците за саливарниот лактат.

Систематски повисоките вредности и слабата поврзаност со крвниот лактат добиени со фенантролинската метода укажуваат на ограничена аналитичка специфичност во биолошкиот матрикс на плунката. Здружената поврзаност беше занемарлива ($R^2 \approx 0{,}06$), а LOSO валидноста дури негативна ($R^2 = -0{,}17$), односно, фенантролинскиот модел предвидува полошо отколку ако едноставно за секој испитаник се претпостави просечната вредност на крвниот лактат во кохортата. Притоа, фенантролинските вредности беа во просек приближно шестпати повисоки од L-специфичните (3,21 наспроти 0,51 mmol/L) и достигнуваа медијана од приближно 105 % од крвното ниво, наспроти околу 10 % за LOX-POD. Реакцијата на 1,10-фенантролин не е стереоспецифична за L-изомерот и може да реагира со други редуцирачки супстанции присутни во плунката, вклучувајќи урична киселина, антиоксиданти и D-лактат продуциран од оралниот микробиом [30, 31].

Иако системската концентрација на D-лактат е ниска (приближно 1 % од онаа на L-лактатот) [32], во оралната средина неговиот придонес може да биде значителен поради непосредниот микробен метаболизам на јаглехидрати во денталниот биофилм. Соодветно, фенантролинскиот сигнал веројатно одразува збирно ниво на редуцирачки супстанции, наместо исклучиво ендоген L-лактат. Систематското, концентрациски-зависно преценување на фенантролинскиот сигнал дополнително го поткрепува овој механизам, бидејќи отстапувањето меѓу методите систематски расте со порастот на вредностите. Негативниот LOSO R^2 (−0,17) за фенантролинската метода значи дека таа предвидува полошо од проста претпоставка за просечниот крвен лактат, што дополнително ја нагласува нејзината ограничена аналитичка специфичност во матриксот на плунката. Изборот на

парафилм (наместо лимонска киселина) за стимулација ја избегнува аналитичката интерференца опишана во потсекција 2.8, што претставува дополнителна предност при определувањето со фенантролинската метода.

Иако двете саливарни методи беа валидирани во плунка, методата LOX-POD покажа матрикс-ефекти во тестот spike-recovery (искористливост 62–145 %), а околу 30 % од саливарните LOX-POD вредности паднаа под практичната граница на квантификација; поради тоа, апсолутните саливарни концентрации, особено при најниските нивоа, треба да се толкуваат претпазливо, што дополнително ја нагласува вредноста на интраиндивидуалното следење наспроти апсолутната квантификација. Аналитичкиот профил на фенантролинската метода, иако ги задоволи стандардните валидациски критериуми, покажа неспецифична реактивност во матриксот на плунката.

Дополнително, проценката на аналитичката и биолошката повторливост на методата LOX-POD преку повторени мерења кај ист испитаник во иста физиолошка состојба (test–retest), како и на временската стабилност на индивидуалната калибрација, би ги дефинирала условите за апсолутна проценка на крвниот лактат од плунка и претставува природен нареден чекор кон нејзина практична примена.

6.7. Силни страни и ограничувања на студијата

Методолошкиот придонес на оваа студија — директната споредба на специфична и неспецифична аналитичка метода на ист саливарен примерок — претставува новина, имајќи предвид дека поголемиот дел од досегашните истражувања користат единствена метода, без проценка на влијанието на аналитичката специфичност врз заклучоците. Исклучувањето на испитаници беше спроведено врз основа на документирани преаналитички, процедурални и аналитички критериуми (потсекција 4.2), транспарентно и без post-hoc филтрација на поединечни мерни точки.

Студијата има неколку ограничувања. Релативно малиот број испитаници (n = 14 во финалната аналитичка кохорта) ги проширува доверливите интервали и ја намалува статистичката моќност, поради што генерализацијата кон поголеми и хетерогени популации бара дополнителна валидација. Кохортата вклучуваше само една жена, што оневозможува смислена анализа според полот. Коефициентите на within-subject се засноваат на четири мерни точки по испитаник, што налага претпазливост при толкувањето на поединечните вредности. Прецизноста на методата LOX-POD беше карактеризирана во стандарден раствор (RSD на бланкот 0,40 %); интра- и интераналитичката прецизност во саливарниот матрикс не беше проценета и претставува насока за идна работа. Дополнително, не беше изведена a priori пресметка на статистичката моќност, поради што заклучоците на меѓуиндивидуално ниво се од експлоративен карактер. Аналитичките

ограничувања поврзани со матрикс-ефектите, вредностите под границата на квантификација и хетерогеноста меѓу испитаниците се разработени подетално во потсекциите 6.5 и 6.6.

Конечно, тестирањето се изведуваше во контролирани лабораториски услови, поради што екстраполацијата кон теренски сценарија бара дополнителна потврда.

6.8. Практични импликации

Од наодите произлегуваат неколку практични импликации. Во спортската медицина, саливарниот L-лактат определен со специфична ензимска метода може да послужи како неинвазивна алатка за следење на индивидуалниот метаболички одговор на оптоварувањето, особено во дисциплини каде што честите крвни проби се непрактични. За валидна примена е потребна иницијална индивидуална калибрација, по која саливарните мерења можат самостојно да го следат тренинг-оптоварувањето.

Од стоматолошка перспектива, релевантна за научниот придонес на оваа теза, способноста да се разликува ендогениот (метаболички) L-лактат од егзогениот (микробен) D-лактат има пошироко значење, бидејќи продукцијата на млечна киселина од Streptococcus mutans и Lactobacillus има улога во патогенезата на денталниот кариес [28, 29]. Сепак, пред саливарната лактатна дијагностика да навлезе во рутинска практика остануваат значајни предизвици, вклучувајќи стандардизација на собирањето на плунка, достапност на специфичните ензимски методи и недостаток на интернационални референтни вредности за интерпретација.

6.9. Насоки за идни истражувања

Резултатите отвораат неколку конкретни насоки за идни истражувања. Прво, повторувањето на студијата на поголеми и постратифицирани кохорти (според пол, возраст и ниво на тренираност) би овозможило прецизирање на доверливите интервали и подгрупни анализи. Второ, паралелното мерење на потенцијалните интерферирачки супстанции (саливарна амилаза, тотален антиоксидантен капацитет, продукти на оксидативна модификација на протеини и урична киселина) во истите примероци би овозможило квантификација на нивниот придонес кон неспецифичниот сигнал. Конечно, валидацијата во теренски услови и истражувањето на саливарната биохемија во различни фази од менструалниот циклус кај жени-спортисти би ја зголемиле можноста за генерализација на наодите [56].

7. ЗАКЛУЧОК

Главната цел на оваа студија беше да се оцени валидноста на плунката како неинвазивен медиум за определување на лактат за време на прогресивен физички напор кај активни велосипедисти и нејзиниот потенцијал како алтернатива на стандардното земање капиларна крв. За таа цел, спроведена беше директна споредба на две саливарни аналитички методи L-специфичната ензимска метода LOX-POD и неспецифичната метода со 1,10-фенантролин — наспроти референтниот капиларен крвен лактат. Централниот наод е дека саливарниот L-лактат верно ја следи динамиката на крвниот лактат во рамките на поединецот, додека апсолутната квантификација меѓу различни поединци останува ограничена, при што аналитичката специфичност на методата е пресудна за валидноста на резултатите.

Врз основа на добиените резултати, во однос на поставените специфични цели, може да се извлечат следниве заклучоци:

1. Саливарниот L-лактат, определен со L-специфична (LOX-POD) метода, покажа силна интраиндивидуална поврзаност со крвниот лактат (rmcorr r = 0,87; p < 0,001).

2. Саливарниот L-лактат значајно се зголемуваше со срцевата фреквенција (rmcorr r = 0,65; p < 0,001).

3. Саливарниот L-лактат значајно се зголемуваше со произведената механичка моќност (rmcorr r = 0,62; p < 0,001).

4. Забележан беше претежно монотон пораст на саливарниот лактат со интензитетот (кај 13 од 14 испитаници); дефинитивна оцена за линеарноста наспроти нелинеарноста не е можна без дополнително моделирање.

5. Плунката не може да ја замени крвта за апсолутно определување на лактат и за одредување на лактатните прагови кај нов испитаник, но има потенцијал за следење на индивидуалната динамика на лактатот.

6. Неспецифичната метода со 1,10-фенантролин не е соодветна за специфично определување на саливарниот L-лактат во матриксот на плунката (систематско преценување и отсуство на предиктивна валидност).

7. Потребни се поголем и постратифициран примерок, проценка на test–retest повторливоста и подобрена аналитичка валидација пред рутинска примена.

Резултатите не ја поддржуваат плунката како целосна замена за крвта, туку како потенцијален дополнителен медиум за следење на индивидуалните промени на L-лактатот при физички напор.

8. ДОДАТОК

8.1. Валидациски параметри на аналитичките методи

Во продолжение се дадени валидациските податоци за саливарната метода LOX-POD (калибрациона крива и spike-recovery тест; видете потсекција 4.7).

Табела 6. Калибрациона крива на методата LOX-POD (стандарди на L-лактат).

Концентрација (mM)	**Апсорбанца**
0,025	0,0154
0,05	0,0327
0,1	0,0601
0,2	0,103
0,4	0,2344
0,8	0,4236

Табела 7. Spike-recovery тест за методата LOX-POD во саливарен матрикс.

Примерок	**Non-spike (mM)**	**Spike L (mM)**	**Spike H (mM)**	**Recovery L (%)**	**Recovery H (%)**
Примерок 1	0,6093	0,6713	0,7404	62,0	65,5
Примерок 2	0,005	0,0902	0,2946	85,2	144,8

Табела 8. Споредбен приказ на валидациските параметри на двете саливарни методи.

Параметар	**Фенантролин**	**LOX-POD**
Калибрационен модел	Abs = 0,6244·C + 0,0027	A = 0,5302·C + 0,0057
Коефициент R^2	0,9968	0,9967
Линеарен опсег	0,05–2,00 mM (плунка 1:10)	0,025–0,8 mM
LOD	0,049 mM	≈ 0,04–0,06 mM
LOQ	0,149 mM	≈ 0,11–0,19 mM
Прецизност	CV 8,0 % (повторливост)	RSD 0,40 % (бланк)
Точност (recovery)	95,9% (95,4–97,6%)	62–145 % (матрикс-ефекти)
Матрикс-ефект	минимален	присутен при високи концентрации

8.2. Индивидуални резултати по испитаник

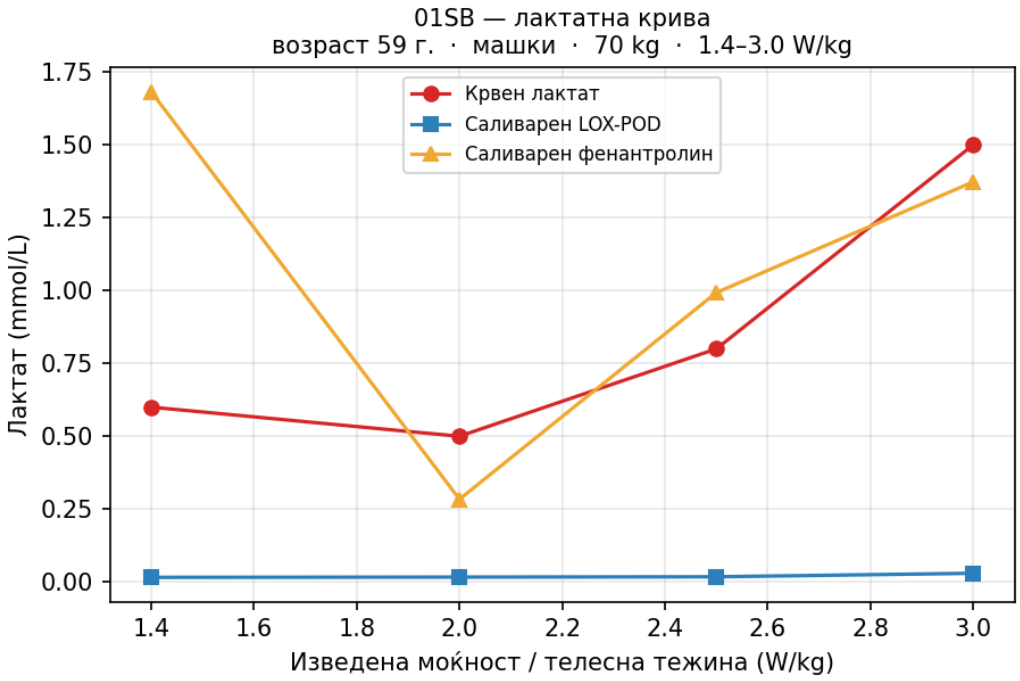
Табела 9. Проток на плунка по испитаник и интервал (mL/min) за финалната аналитичка кохорта (n = 14).

Испитаник	Инт. 1	Инт. 2	Инт. 3	Инт. 4	Просек
01SB	0,70	0,71	0,38	0,33	0,53
02DN	0,62	0,80	0,70	0,64	0,69
03II	0,73	0,47	0,26	0,26	0,43
06MF	0,54	0,59	0,54	0,47	0,53
07VS	2,32	2,12	1,45	1,45	1,83
08VL	0,84	1,25	1,17	0,54	0,95
09GS	1,38	1,16	1,20	1,09	1,21
10DJ	0,72	0,73	0,56	0,48	0,62
11DG	1,19	1,06	1,03	0,72	1,00
12IT	2,79	1,74	2,22	1,67	2,10
13IA	0,91	1,03	1,09	0,29	0,83
14KD	1,81	2,67	1,80	1,32	1,90
16JL	0,78	1,50	1,31	0,39	1,00
17ZI	0,56	0,95	0,51	0,64	0,67

Индивидуалните резултати за секој од 14-те испитаници се прикажани подолу. Основните демографски податоци (возраст, пол, тежина и опсег на W/kg) се означени на самата лактатна крива на секој испитаник. Срцевата фреквенција беше регистрирана како мерен параметар, но не е графички прикажана ниту подложена на формално корелационо или предиктивно моделирање поради нејзината висока интер- и интраиндивидуална варијабилност (под влијание на хидратација, температура, кофеин, стрес и кардиоваскуларен дрифт), што ја прави несоодветна за оваа цел; таа служи единствено како контекстуален показател за вложениот напор. Изведената моќност по интервал е наведена транспарентно за секој испитаник, без класификација во специфични физиолошки зони, бидејќи таквата класификација би барала дополнителна референтна литература за поврзување на измерените параметри (крвен лактат, моќност, срцева фреквенција). Вредностите на саливарниот L-лактат под аналитичките граници се означени со <LOD (под границата на детекција, ≈0,04 mM) и <LOQ (под границата на квантификација, ≈0,11 mM) и се третираат како полуквантитативни (видете потсекција 4.7).

8.2.1. 01SB

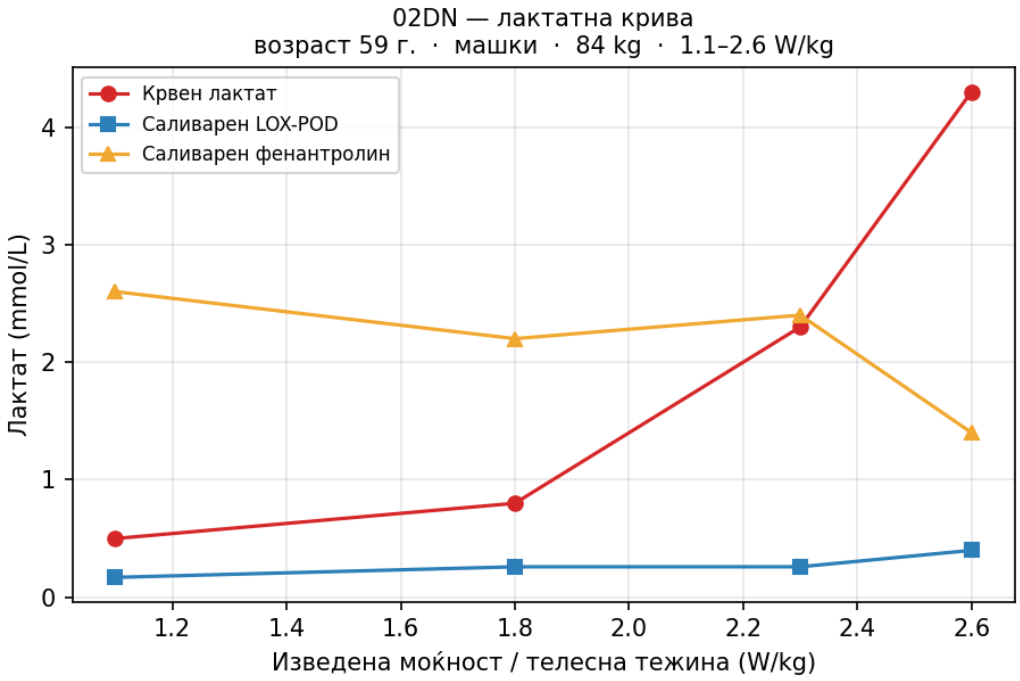
Испитаникот 01SB (59-годишен испитаник, 70 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 100, 142, 175 и 215 W (соодветно 1,4, 2,0, 2,5 и 3,0 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 0,6, 0,5, 0,8 и 1,5 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше <LOD, <LOD, <LOD и <LOD mmol/L, а со фенантролинската метода 1,68, 0,28, 0,99 и 1,37 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 126, 127, 148 и 157 bpm. Бидејќи сите четири вредности со методата LOX-POD се под границата на детекција, Pearson коефициентот за оваа метода не е пресметлив и не се известува; за фенантролинската метода тој изнесуваше r = 0,40.



Слика 9. Лактатна крива на испитаникот 01SB (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.2.2. o2DN

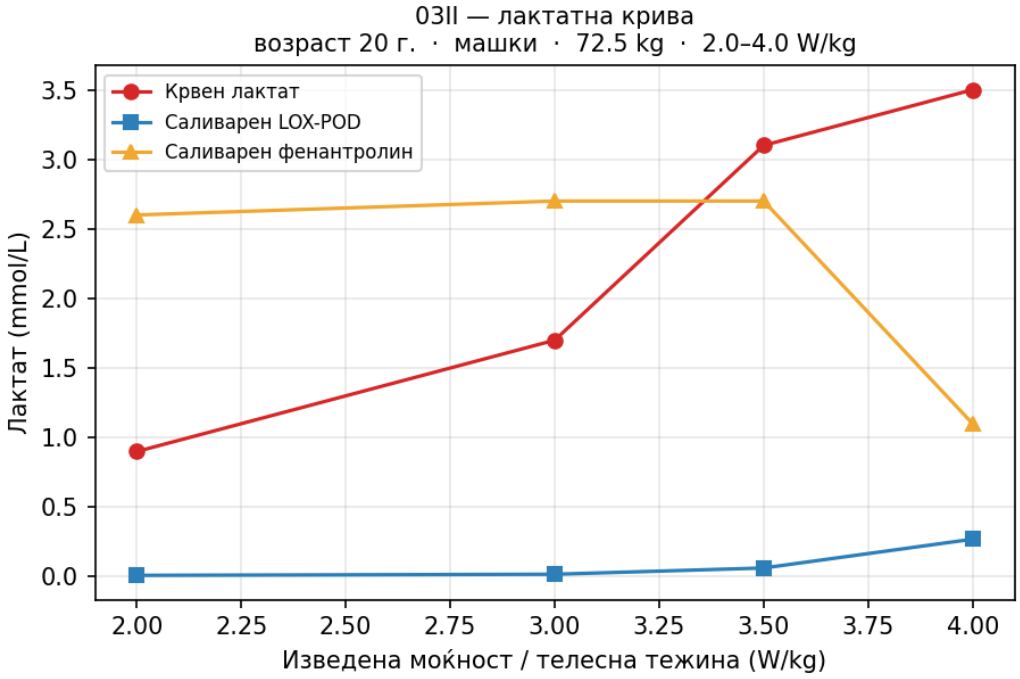
Испитаникот o2DN (59-годишен испитаник, 84 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 95, 123, 161 и 184 W (соодветно 1,1, 1,8, 2,3 и 2,6 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 0,5, 0,8, 2,3 и 4,3 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше 0,17, 0,26, 0,26 и 0,40 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 2,60, 2,20, 2,40 и 1,40 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 79, 100, 120 и 136 bpm. Pearson коефициентот на корелација со крвниот лактат изнесуваше r = 0,92 за методата LOX-POD и r = −0,87 за фенантролинската метода.



Слика 10. Лактатна крива на испитаникот o2DN (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.2.3. 03II

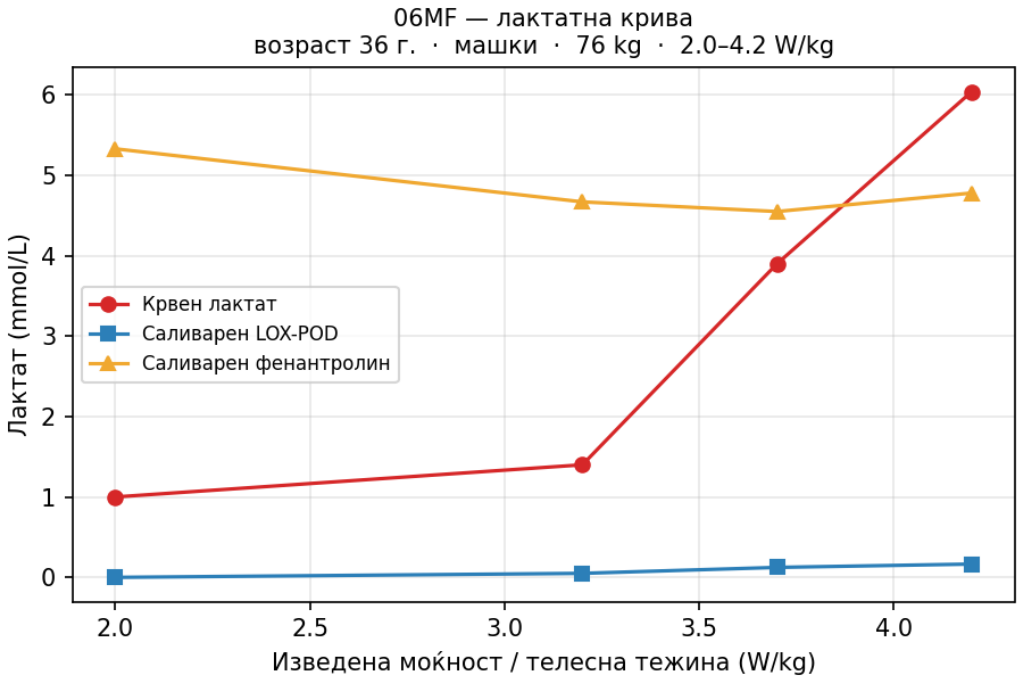
Испитаникот 03II (20-годишен испитаник, 72,5 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 140, 210, 255 и 271 W (соодветно 2,0, 3,0, 3,5 и 4,0 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 0,9, 1,7, 3,1 и 3,5 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше <LOD, <LOD, <LOQ и 0,27 mmol/L, а со фенантролинската метода 2,60, 2,70, 2,70 и 1,10 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 119, 145, 164 и 176 bpm. Коефициентот Pearson на корелација со крвниот лактат изнесуваше r = 0,79 за методата LOX-POD и r = −0,62 за фенантролинската метода.



Слика 11. Лактатна крива на испитаникот 03II (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.2.4. 06MF

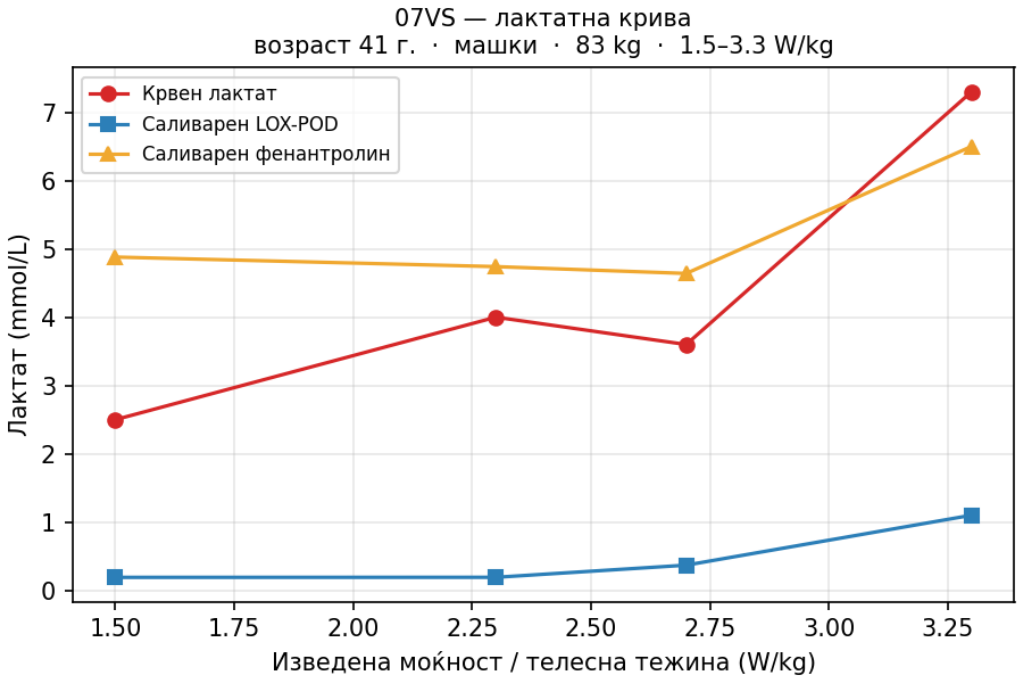
Испитаникот 06MF (36-годишен испитаник, 76 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 152, 243, 281 и 320 W (соодветно 2,0, 3,2, 3,7 и 4,2 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 1,0, 1,4, 3,9 и 6,0 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше <LOD, <LOQ, 0,12 и 0,17 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 5,33, 4,67, 4,55 и 4,78 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 133, 163, 175 и 182 bpm. Pearson коефициентот на корелација со крвниот лактат изнесуваше r = 0,97 за методата LOX-POD и r = −0,47 за фенантролинската метода.



Слика 12. Лактатна крива на испитаникот 06MF (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.2.5. 07VS

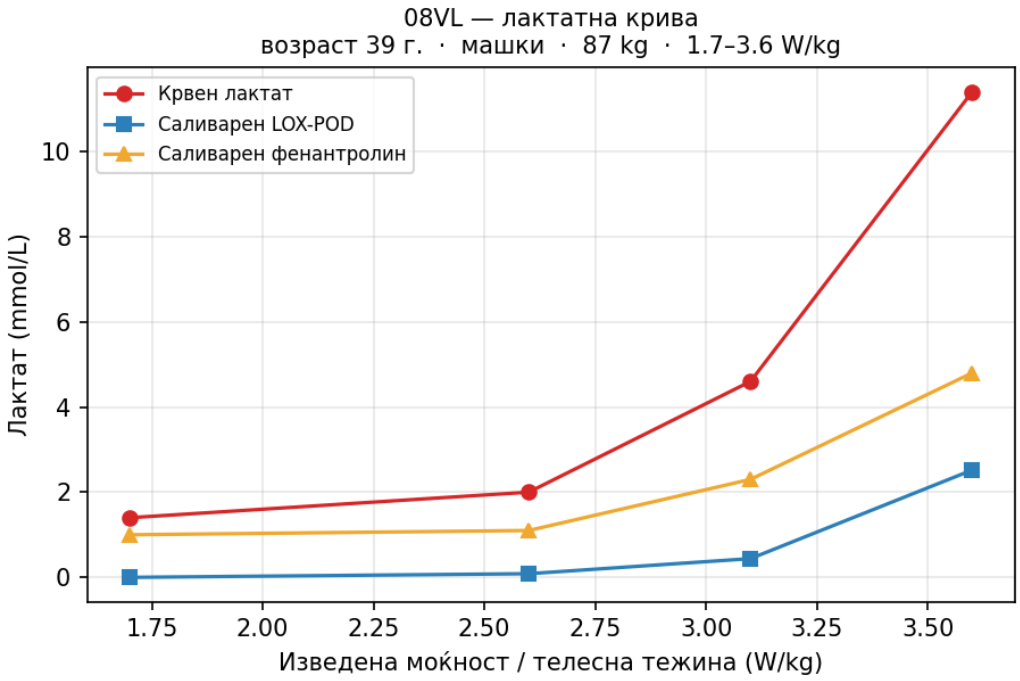
Испитаникот 07VS (41-годишен испитаник, 83 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 125, 190, 254 и 274 W (соодветно 1,5, 2,3, 2,7 и 3,3 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 2,5, 4,0, 3,6 и 7,3 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше 0,19, 0,19, 0,37 и 1,10 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 4,88, 4,74, 4,64 и 6,50 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 120, 142, 157 и 183 bpm. Pearson коефициентот на корелација со крвниот лактат изнесуваше r = 0,95 за методата LOX-POD и r = 0,92 за фенантролинската метода.



Слика 13. Лактатна крива на испитаникот 07VS (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.2.6. o8VL

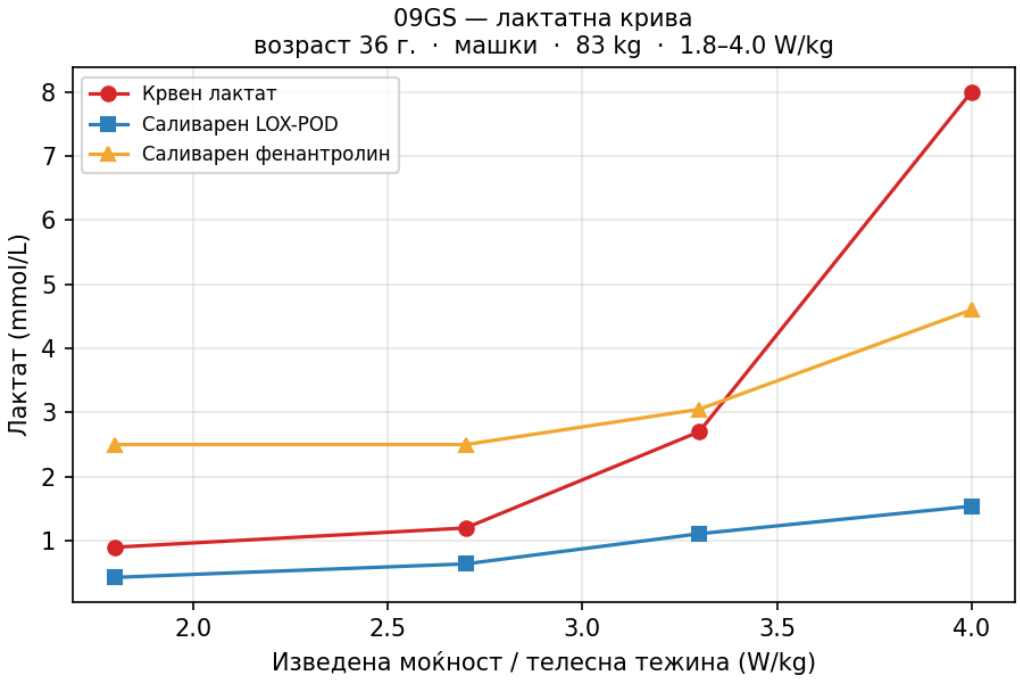
Испитаникот o8VL (39-годишен испитаник, 87 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 150, 226, 270 и 313 W (соодветно 1,7, 2,6, 3,1 и 3,6 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 1,4, 2,0, 4,6 и 11,4 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше <LOD, <LOQ, 0,44 и 2,52 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 1,00, 1,10, 2,30 и 4,80 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 122, 146, 162 и 185 bpm. Pearson коефициентот на корелација со крвниот лактат изнесуваше r = 0,99 за методата LOX-POD и r = 1,00 за фенантролинската метода.



Слика 14. Лактатна крива на испитаникот o8VL (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.2.7. 09GS

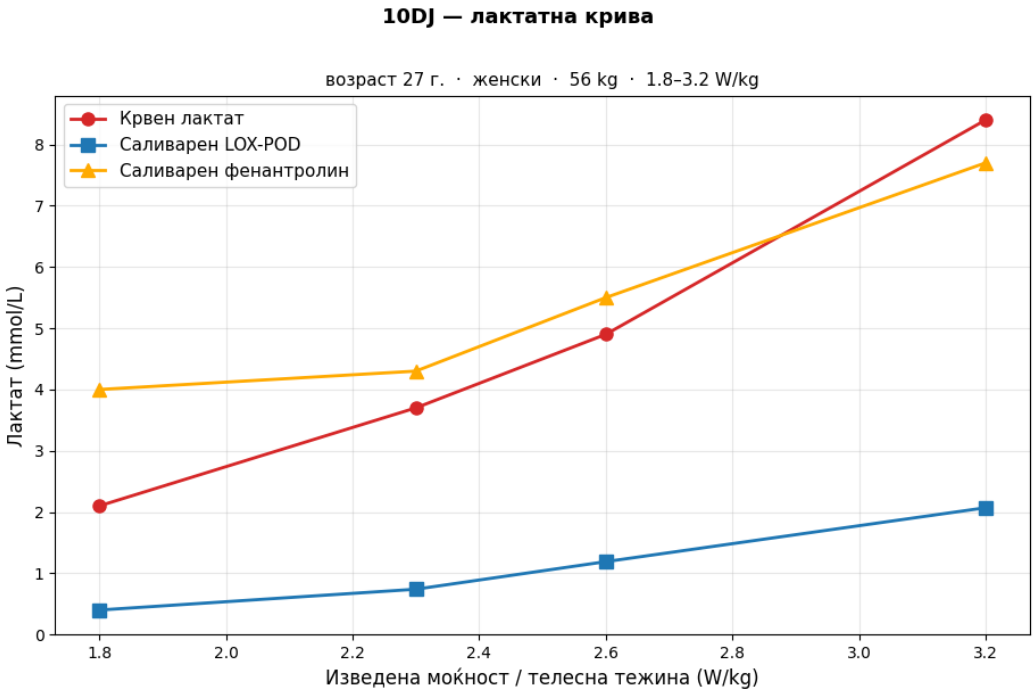
Испитаникот 09GS (36-годишен испитаник, 83 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 150, 225, 275 и 330 W (соодветно 1,8, 2,7, 3,3 и 4,0 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 0,9, 1,2, 2,7 и 8,0 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше 0,43, 0,64, 1,11 и 1,54 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 2,50, 2,50, 3,05 и 4,60 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 116, 137, 152 и 168 bpm. Pearson коефициентот на корелација со крвниот лактат изнесуваше r = 0,93 за методата LOX-POD и r = 1,00 за фенантролинската метода.



Слика 15. Лактатна крива на испитаникот 09GS (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.2.8. 10DJ

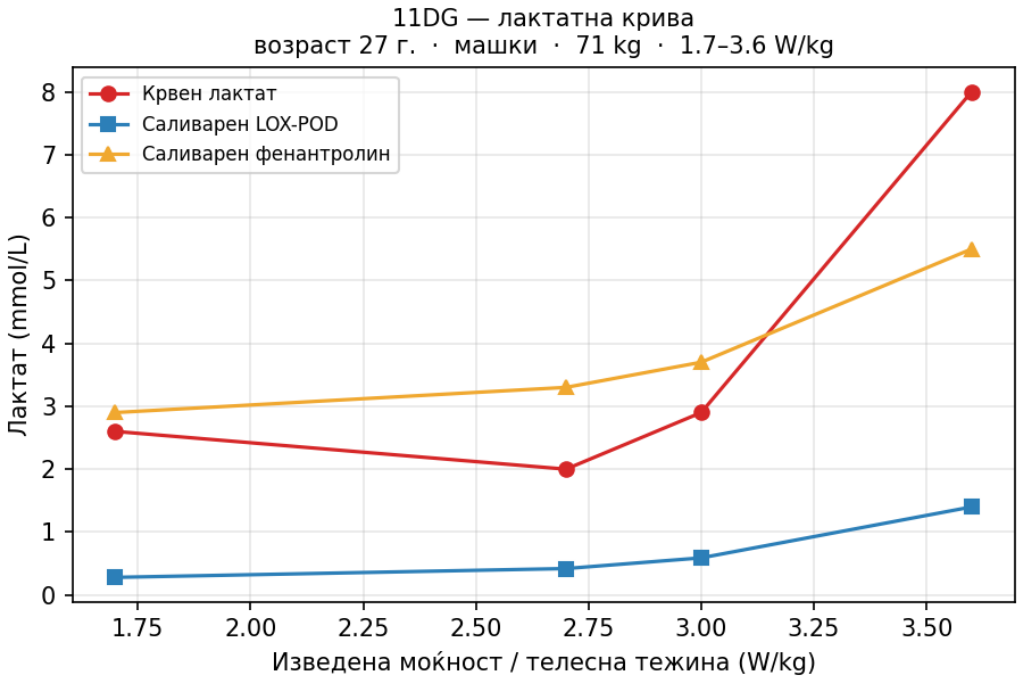
Испитаникот 10DJ (27-годишна испитаничка, 56 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 100, 130, 145 и 180 W (соодветно 1,8, 2,3, 2,6 и 3,2 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 2,1, 3,7, 4,9 и 8,4 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше 0,40, 0,74, 1,19 и 2,07 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 4,00, 4,30, 5,50 и 7,70 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 125, 140, 155 и 172 bpm. Pearson коефициентот на корелација со крвниот лактат изнесуваше r = 1,00 за методата LOX-POD и r = 0,98 за фенантролинската метода.



Слика 16. Лактатна крива на испитаникот 10DJ (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.2.9. 11DG

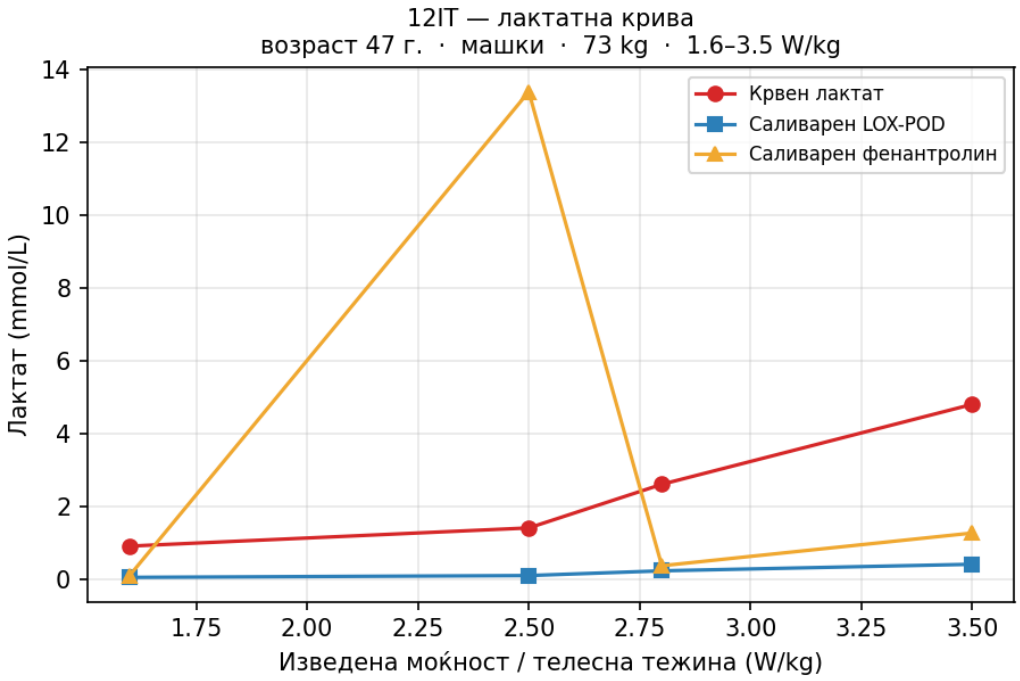
Испитаникот 11DG (27-годишен испитаник, 71 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 120, 190, 215 и 260 W (соодветно 1,7, 2,7, 3,0 и 3,6 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 2,6, 2,0, 2,9 и 8,0 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше 0,28, 0,42, 0,59 и 1,40 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 2,90, 3,30, 3,70 и 5,50 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 125, 156, 176 и 191 bpm. Pearson коефициентот на корелација со крвниот лактат изнесуваше r = 0,97 за методата LOX-POD и r = 0,96 за фенантролинската метода.



Слика 17. Лактатна крива на испитаникот 11DG (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.2.10. 12IT

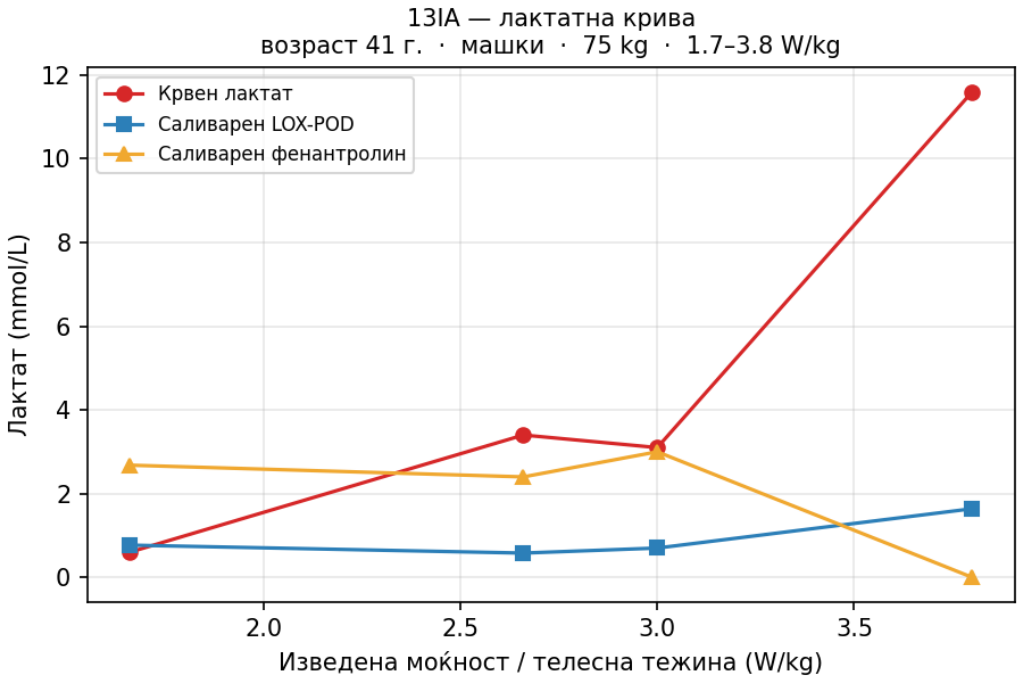
Испитаникот 12IT (47-годишен испитаник, 73 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 115, 180, 205 и 255 W (соодветно 1,6, 2,5, 2,8 и 3,5 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 0,9, 1,4, 2,6 и 4,8 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше <LOQ, <LOQ, 0,22 и 0,40 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 0,090, 13,40, 0,36 и 1,26 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 99, 131, 143 и 161 bpm. Pearson коефициентот на корелација со крвниот лактат изнесуваше r = 1,00 за методата LOX-POD и r = −0,32 за фенантролинската метода.



Слика 18. Лактатна крива на испитаникот 12IT (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.2.11. 13IA

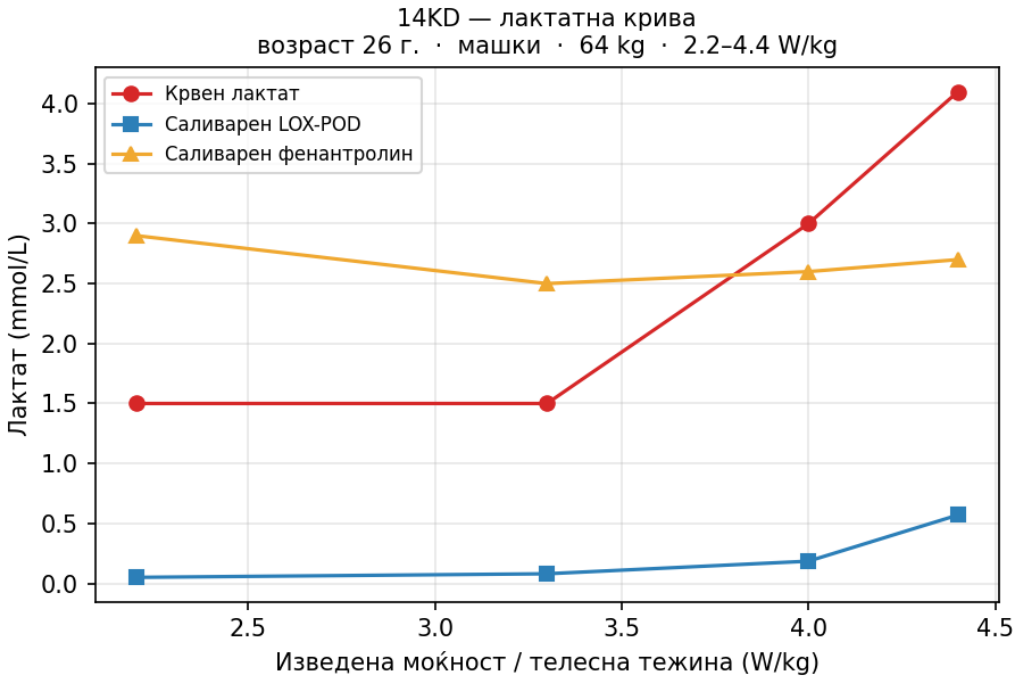
Испитаникот 13IA (41-годишен испитаник, 75 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 125, 200, 225 и 290 W (соодветно 1,7, 2,7, 3,0 и 3,8 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 0,6, 3,4, 3,1 и 11,6 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше 0,77, 0,58, 0,70 и 1,64 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 2,68, 2,40, 3,00 и 0,000 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 115, 141, 155 и 174 bpm. Pearson коефициентот на корелација со крвниот лактат изнесуваше r = 0,92 за методата LOX-POD и r = −0,95 за фенантролинската метода.



Слика 19. Лактатна крива на испитаникот 13IA (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.2.12. 14KD

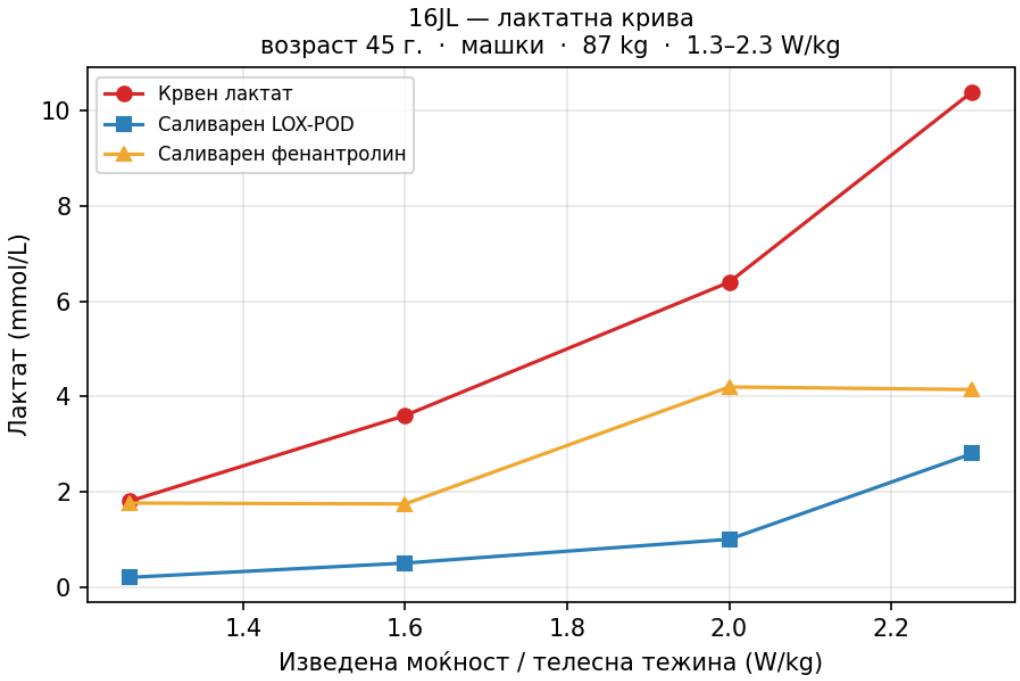
Испитаникот 14KD (26-годишен испитаник, 64 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 140, 210, 255 и 280 W (соодветно 2,2, 3,3, 4,0 и 4,4 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 1,5, 1,5, 3,0 и 4,1 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше <LOQ, <LOQ, 0,18 и 0,57 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 2,90, 2,50, 2,60 и 2,70 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 107, 144, 163 и 176 bpm. Pearson коефициентот на корелација со крвниот лактат изнесуваше r = 0,93 за методата LOX-POD и r = −0,07 за фенантролинската метода.



Слика 20. Лактатна крива на испитаникот 14KD (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.2.13. 16JL

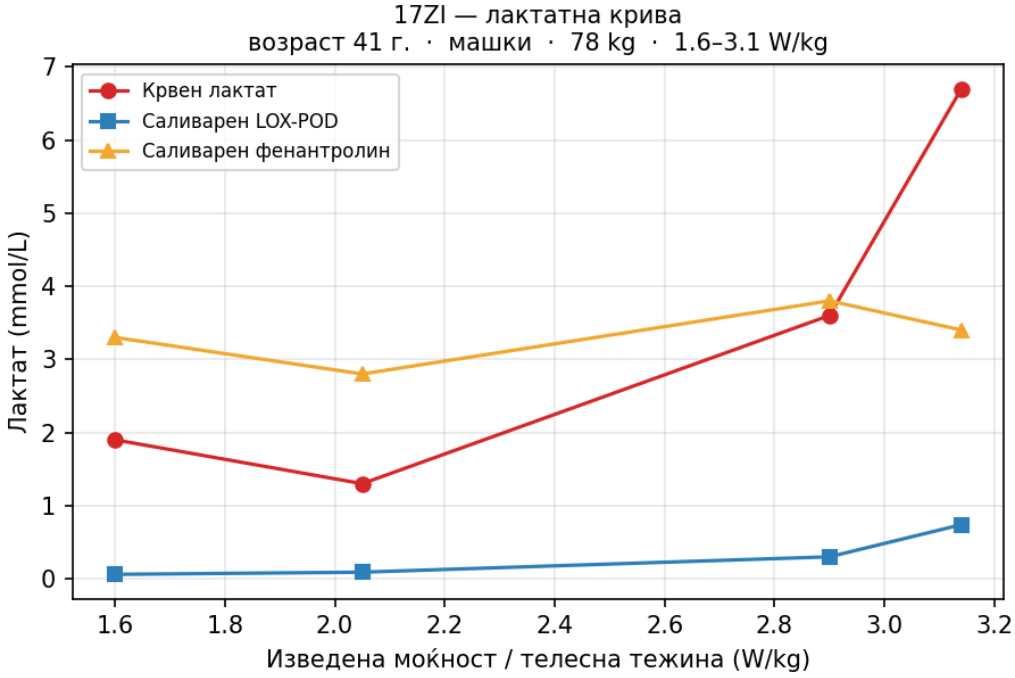
Испитаникот 16JL (45-годишен испитаник, 87 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 110, 140, 175 и 200 W (соодветно 1,3, 1,6, 2,0 и 2,3 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 1,8, 3,6, 6,4 и 10,4 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше 0,20, 0,50, 1,00 и 2,80 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 1,76, 1,74, 4,20 и 4,14 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 120, 130, 145 и 160 bpm. Pearson коефициентот на корелација со крвниот лактат изнесуваше r = 0,97 за методата LOX-POD и r = 0,87 за фенантролинската метода.



Слика 21. Лактатна крива на испитаникот 16JL (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.2.14. 17ZI

Испитаникот 17ZI (41-годишен испитаник, 78 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 145, 160, 225 и 245 W (соодветно 1,6, 2,0, 2,9 и 3,1 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 1,9, 1,3, 3,6 и 6,7 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше <LOQ, <LOQ, 0,30 и 0,74 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 3,30, 2,80, 3,80 и 3,40 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 98, 110, 140 и 160 bpm. Pearson коефициентот на корелација со крвниот лактат изнесуваше r = 0,99 за методата LOX-POD и r = 0,50 за фенантролинската метода.



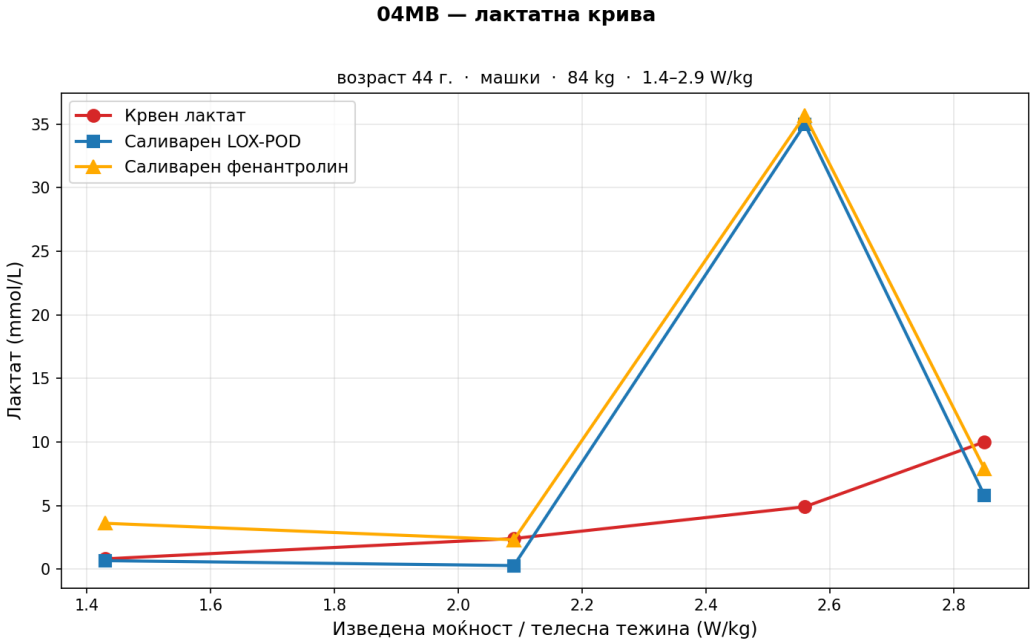
Слика 22. Лактатна крива на испитаникот 17ZI (крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.3. Исклучени испитаници

Заради целосна транспарентност, во продолжение се прикажани поединечните податоци и лактатни криви и за шест испитаници кои беа исклучени од финалната аналитичка кохорта (видете потсекција 4.2). Овие сетови не се вклучени во ниту една статистичка анализа во тезата и се прикажани исклучиво за да се документираат преданалитичките, процедуралните и аналитичките фактори што доведоа до нивно исклучување.

8.3.1. 04MB

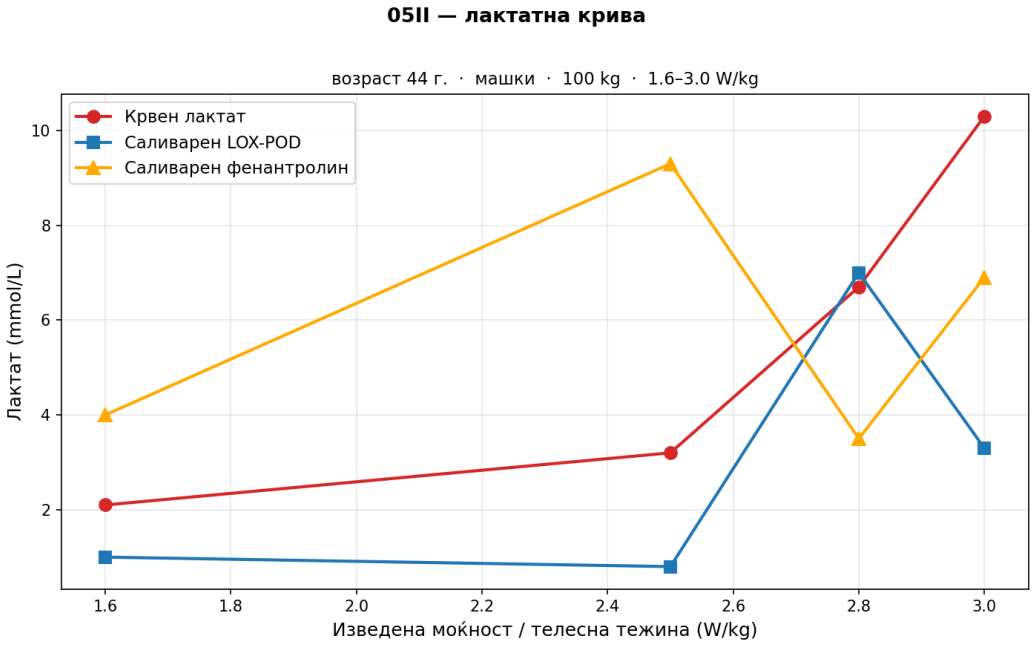
Испитаникот 04MB (44-годишен испитаник, 84 kg) ги изврши четирите интервали со изведена моќност од 120, 176, 215 и 240 W (соодветно 1,4, 2,1, 2,6 и 2,9 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 0,8, 2,4, 4,9 и 10,0 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше 0,66, 0,27, 35,0 и 5,8 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 3,6, 2,3, 35,7 и 7,9 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 130, 150, 169 и 177 bpm. Овој испитаник е исклучен од финалната аналитичка кохорта поради преданалитичка контаминација на саливарниот примерок со пот за време на колекцијата, што доведе до екстремни, нефизиолошки вредности — особено во третиот интервал, каде што и двете саливарни методи дадоа концентрации од приближно 35 mmol/L.



Слика 23. Лактатна крива на испитаникот 04MB (исклучен; крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.3.2. 05II

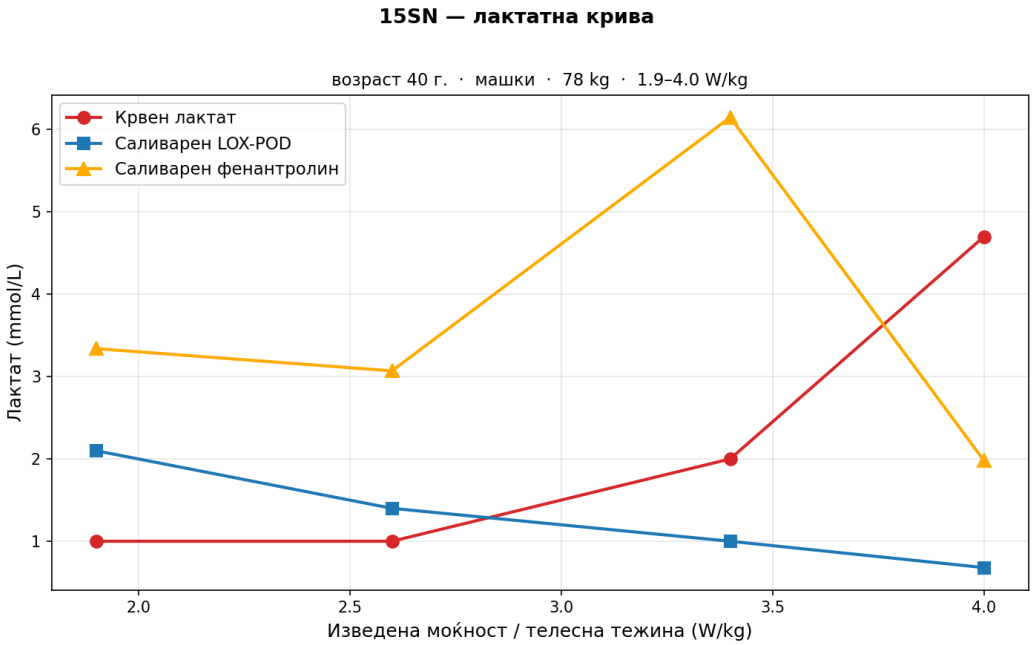
Испитаникот 05II (44-годишен испитаник, 100 kg) ги изврши интервалите со изведена моќност од 160, 250, 280 и 300 W (соодветно 1,6, 2,5, 2,8 и 3,0 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 2,1, 3,2, 6,7 и 10,3 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше 1,0, 0,8, 7,0 и 3,3 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 4,0, 9,3, 3,5 и 6,9 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 125, 149, 162 и 169 bpm. Овој испитаник е исклучен бидејќи последниот интервал не беше изведен според стандардизираните услови на протоколот (потврдено преку .fit/.gpx телеметријата од смарт-тренажерот), што го прави неговиот сет неупотреблив за корелациона и регресиона анализа.



Слика 24. Лактатна крива на испитаникот 05II (исклучен; крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.3.3. 15SN

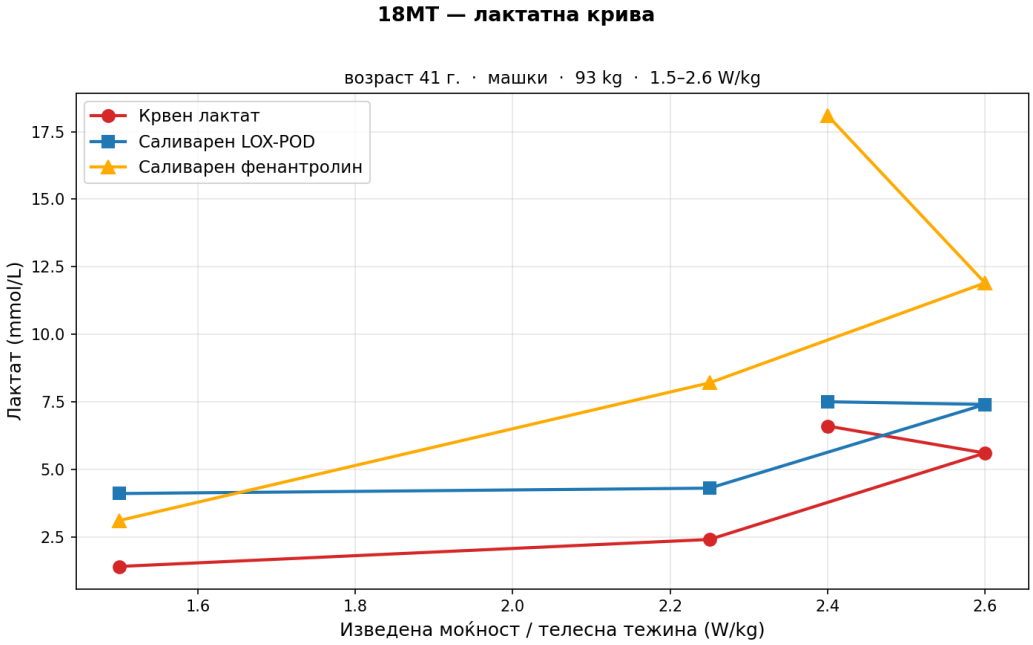
Испитаникот 15SN (40-годишен испитаник, 78 kg) ги изврши интервалите со изведена моќност од 145, 205, 265 и 310 W (соодветно 1,9, 2,6, 3,4 и 4,0 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 1,0, 1,0, 2,0 и 4,7 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше 2,1, 1,4, 1,0 и 0,68 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 3,34, 3,07, 6,15 и 1,98 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 124, 143, 167 и 177 bpm. Овој испитаник е исклучен поради внес на брзи јаглехидрати непосредно пред тестирањето, што го наруши гликемискиот и лактатниот профил, спротивно на стандардизираните инструкции.



Слика 25. Лактатна крива на испитаникот 15SN (исклучен; крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.3.4. 18MT

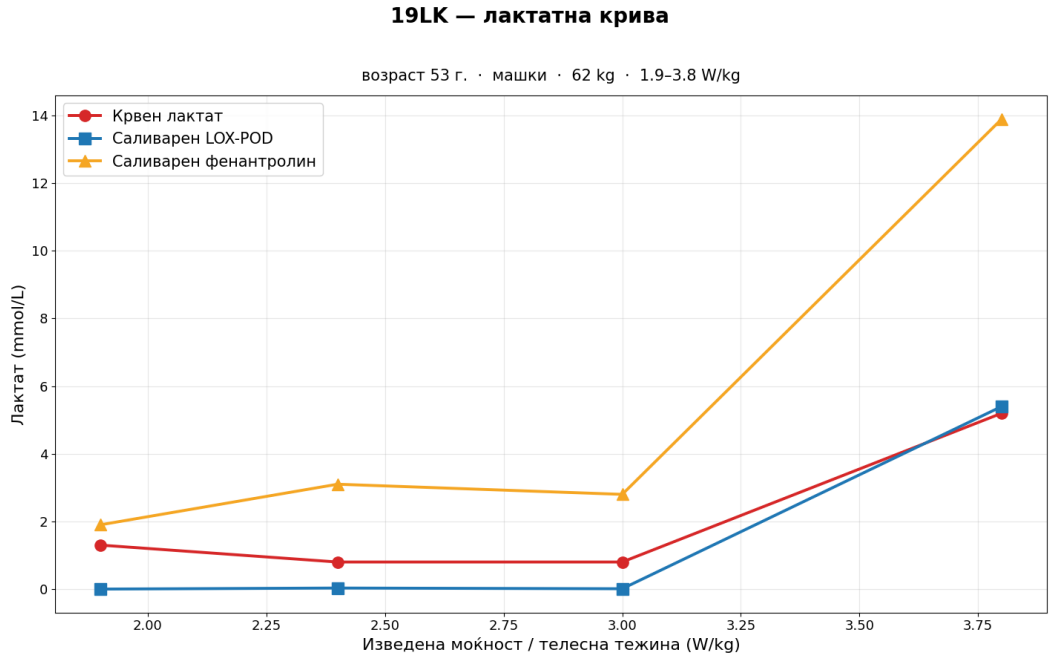
Испитаникот 18MT (41-годишен испитаник, 93 kg) ги изврши интервалите со изведена моќност од 140, 210, 240 и 220 W (соодветно 1,5, 2,3, 2,6 и 2,4 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 1,4, 2,4, 5,6 и 6,6 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше 4,1, 4,3, 7,4 и 7,5 mmol/L, а со фенантролинската метода 3,1, 8,2, 11,9 и 18,1 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 117, 139, 159 и 156 bpm. Овој испитаник е исклучен поради внес на јаглехидрати за време на самиот протокол; саливарните вредности беа повеќекратно над физиолошкиот опсег на кохортата (LOX-POD до 7,5 mmol/L), а изведената моќност во последниот интервал опадна (240 → 220 W) наместо да расте, што укажува на нарушено изведување на прогресивниот протокол.



Слика 26. Лактатна крива на испитаникот 18MT (исклучен; крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.3.5. 19LK

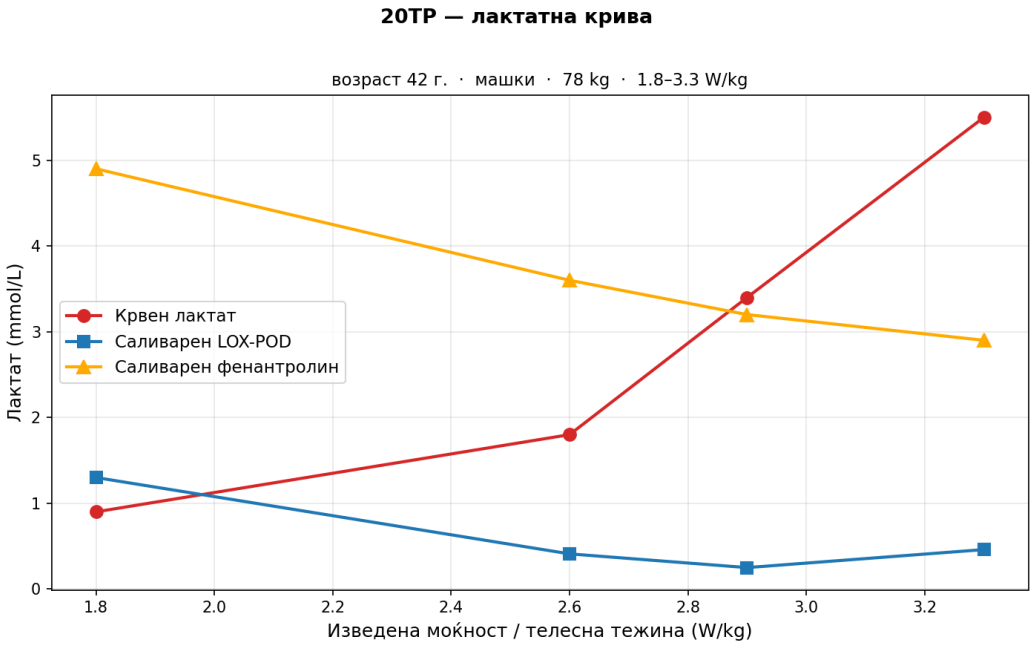
Испитаникот 19LK (53-годишен испитаник, 62 kg) ги изврши интервалите со изведена моќност од 120, 150, 190 и 235 W (соодветно 1,9, 2,4, 3,0 и 3,8 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 1,3, 0,8, 0,8 и 5,2 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше <LOD, <LOD, <LOD и 5,40 mmol/L, а со фенантролинската метода 1,9, 3,1, 2,8 и 13,9 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 115, 120, 146 и 172 bpm. Овој испитаник е исклучен поради аналитички артефакт во сигналот на методата LOX-POD: во првите три интервали методата регистрираше практично нула лактат (0,00, 0,03 и 0,01 mmol/L) и покрај измерливиот крвен лактат, а во последниот интервал нагло скокна на 5,40 mmol/L — вредност еднаква на приближно 104 % од паралелно измерениот крвен лактат (5,2 mmol/L), што е физиолошки неверодостојно за L-специфичната метода, чиј типичен сооднос со крвта е околу 10 %. Ваквото однесување укажува на грешка во отчитувањето наместо на вистинска концентрација.



Слика 27. Лактатна крива на испитаникот 19LK (исклучен; крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.3.6. 20TP

Испитаникот 20TP (42-годишен испитаник, 78 kg) ги изврши интервалите со изведена моќност од 140, 200, 225 и 260 W (соодветно 1,8, 2,6, 2,9 и 3,3 W/kg). Измерениот крвен лактат по интервал изнесуваше 0,9, 1,8, 3,4 и 5,5 mmol/L. Саливарниот лактат определен со методата LOX-POD изнесуваше 1,3, 0,41, 0,25 и 0,46 mmol/L, а со фенантролинската метода изнесуваше 4,9, 3,6, 3,2 и 2,9 mmol/L. Срцевата фреквенција по интервал беше 122, 140, 152 и 168 bpm. Овој испитаник е исклучен поради внес на јаглехидрати пред почетокот на тестот (пијалок со мешавина од шеќер и електролити), што го промени метаболичкиот статус пред мерењата.



Слика 28. Лактатна крива на испитаникот 20TP (исклучен; крвен, саливарен LOX-POD и фенантролин по интензитет).

8.4. Дијаграм на тек на испитаниците (STARD)

Патот на испитаниците од регрутирање до финалната аналитичка кохорта, со причините за исклучување, е прикажан на Слика 29.



Слика 29. Дијаграм на тек на испитаниците (STARD): регрутирани n = 20, исклучени n = 6 со наведени причини, финална аналитичка кохорта n = 14 (56 спарени мерни точки).

9. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА (РЕФЕРЕНЦИ)

1. Surdu A, Foia LG, Luchian I, Trifan D, Tatarciuc MS, Scutariu MM, et al. Saliva as a Diagnostic Tool for Systemic Diseases—A Narrative Review. Medicina (Kaunas). 2025;61(2):243. doi:10.3390/medicina61020243.

2. Apostolova P, Pearce EL. Lactic acid and lactate: revisiting the physiological roles in the tumor microenvironment. Trends Immunol. 2022;43(12):969-977. doi:10.1016/j.it.2022.10.005.

3. Robergs RA, McNulty CR, Minett GM, Holland J, Trajano G. Lactate, not Lactic Acid, is Produced by Cellular Cytosolic Energy Catabolism. Physiology (Bethesda). 2018;33(1):10-12. doi:10.1152/physiol.00033.2017.

4. Morris JN, Heady JA, Raffle PA, Roberts CG, Parks JW. Coronary heart-disease and physical activity of work. Lancet. 1953;262(6795):1053-1057. doi:10.1016/s0140-6736(53)90665-5.

5. Holloszy JO. The biology of aging. Mayo Clin Proc. 2000;75 Suppl:S3-8; discussion S8-9. doi:10.1016/S0025-6196(19)30634-2.

6. Pedersen BK, Saltin B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. Scand J Med Sci Sports. 2006;16 Suppl 1:3-63. doi:10.1111/j.1600-0838.2006.00520.x.

7. Di Cesare M, Perel P, Taylor S, Kabudula C, Bixby H, Gaziano TA, et al. The Heart of the World. Glob Heart. 2024;19(1):11. doi:10.5334/gh.1288.

8. Schnohr P, O'Keefe JH, Marott JL, Lange P, Jensen GB. Dose of jogging and long-term mortality: the Copenhagen City Heart Study. J Am Coll Cardiol. 2015;65(5):411-419. doi:10.1016/j.jacc.2014.11.023.

9. Viña J, Rodriguez-Mañas L, Salvador-Pascual A, Tarazona-Santabalbina FJ, Gomez-Cabrera MC. Exercise: the lifelong supplement for healthy ageing and slowing down the onset of frailty. J Physiol. 2016;594(8):1989-1999. doi:10.1113/JP270536.

10. Brooks GA. Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research. Med Sci Sports Exerc. 1985;17(1):22-34. doi:10.1249/00005768-198502000-00005.

11. Gladden LB. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. J Physiol. 2004;558(Pt 1):5-30. doi:10.1113/jphysiol.2003.058701.

12. Ferguson BS, Rogatzki MJ, Goodwin ML, Kane DA, Rightmire Z, Gladden LB. Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding. Eur J Appl Physiol. 2018;118(4):691-728. doi:10.1007/s00421-017-3795-6.

13. Brooks GA. The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. Cell Metab. 2018;27(4):757-785. doi:10.1016/j.cmet.2018.03.008.

14. Brooks GA, Arevalo JA, Osmond AD, Leija RG, Curl CC, Tovar AP. Lactate in contemporary biology: a phoenix risen. J Physiol. 2022;600(5):1229-1251. doi:10.1113/JP280955.

15. Brooks GA. Lactate as a fulcrum of metabolism. Redox Biol. 2020;35:101454. doi:10.1016/j.redox.2020.101454.

16. Mandadzhiev N. The contemporary role of lactate in exercise physiology and exercise prescription – a review of the literature. Folia Medica. 2025;67(1):e144693. doi:10.3897/folmed.67.e144693.

17. San-Millán I, Stefanoni D, Martinez JL, Hansen KC, D'Alessandro A, Nemkov T. Metabolomics of Endurance Capacity in World Tour Professional Cyclists. Front. Physiol. 2020;11:578. doi:10.3389/fphys.2020.00578.

18. Dantas JL, Doria C, Rossi H, Rosa G, Pietrangelo T, Fanò-Illic G, et al. Determination of blood lactate training zone boundaries with rating of perceived exertion in runners. J Strength Cond Res. 2015;29(2):315-320. doi:10.1519/JSC.0000000000000639.

19. Hunt TK, Aslam RS, Beckert S, Wagner S, Ghani QP, Hussain MZ, et al. Aerobically derived lactate stimulates revascularization and tissue repair via redox mechanisms. Antioxid Redox Signal. 2007;9(8):1115-1124. doi:10.1089/ars.2007.1674.

20. San-Millán I, Brooks GA. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. Carcinogenesis. 2017;38(2):119-133. doi:10.1093/carcin/bgw127.

21. Garcia-Alvarez M, Marik P, Bellomo R. Sepsis-associated hyperlactatemia. Crit Care. 2014;18(5):503. doi:10.1186/s13054-014-0503-3.

22. Brooks GA, Martin NA. Cerebral metabolism following traumatic brain injury: new discoveries with implications for treatment. Front Neurosci. 2014;8:408. doi:10.3389/fnins.2014.00408.

23. El Hayek L, Khalifeh M, Zibara V, Abi Assaad R, Emmanuel N, Karnib N, et al. Lactate Mediates the Effects of Exercise on Learning and Memory through SIRT1-Dependent Activation of Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). J Neurosci. 2019;39(13):2369-2382. doi:10.1523/JNEUROSCI.1661-18.2019.

24. Rutter GA, Pullen TJ, Hodson DJ, Martinez-Sanchez A. Pancreatic β-cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. Biochem J. 2015;466(2):203-218. doi:10.1042/BJ20141384.

25. Segura R, Javierre C, Ventura JL, Lizarraga MA, Campos B, Garrido E. A new approach to the assessment of anaerobic metabolism: measurement of lactate in saliva. Br J Sports Med. 1996;30(4):305-309. doi:10.1136/bjsm.30.4.305.

26. Yan P, Qin C, Yan Z, Chen C, Zhang F. Can salivary lactate be used as an anaerobic biomarker?. PeerJ. 2023;11:e15274. doi:10.7717/peerj.15274.

27. S LK, Naik Z, Lagali-Jirge V, M S, Panwar A, Keluskar V. Salivary Lactate Dehydrogenase as a Potential Biomarker in Oral Potentially Malignant Disorders and Head & Neck Cancer- A Systematic Review and Meta-analysis. Gulf J Oncolog. 2023;1(41):78-99.

28. Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR, Firestone ND, Schwartzbaum JA, Janies DA, et al. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. J Clin Microbiol. 2010;48(11):4121-4128. doi:10.1128/JCM.01232-10.

29. Shimada A, Noda M, Matoba Y, Kumagai T, Kozai K, Sugiyama M. Oral lactic acid bacteria related to the occurrence and/or progression of dental caries in Japanese preschool children. Biosci Microbiota Food Health. 2015;34(2):29-36. doi:10.12938/bmfh.2014-015.

30. Wang S, Zhang L. Stereospecific lactylation in bacteriology: L/D-lactate partitioning shapes host metabolic-disease axis. Front. Microbiol. 2025;16:1693700. doi:10.3389/fmicb.2025.1693700.

31. Li J, Ma P, Liu Z, Xie J. L- and D-Lactate: unveiling their hidden functions in disease and health. Cell Commun Signal. 2025;23(1):134. doi:10.1186/s12964-025-02132-z.

32. Levitt MD, Levitt DG. Quantitative Evaluation of D-Lactate Pathophysiology: New Insights into the Mechanisms Involved and the Many Areas in Need of Further Investigation. Clin Exp Gastroenterol. 2020;13:321-337. doi:10.2147/CEG.S260600.

33. Bramanti E, Zucchini F, Onor M, Di Muro V, inventors; Power Fit S.R.L., assignee. Measurement of lactic acid in biological fluids. Patent WO 2013/045443 A1. 2013.

34. Rabinowitz JD, Enerbäck S. Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. Nat Metab. 2020;2(7):566-571. doi:10.1038/s42255-020-0243-4.

35. San-Millán I, Hill JC, Calleja-González J. Indirect Assessment of Skeletal Muscle Glycogen Content in Professional Soccer Players before and after a Match through a Non-Invasive Ultrasound Technology. Nutrients. 2020;12(4):971. doi:10.3390/nu12040971.

36. Northgraves MJ, Peart DJ, Jordan CA, Vince RV. Effect of lactate supplementation and sodium bicarbonate on 40-km cycling time trial performance. J Strength Cond Res. 2014;28(1):273-280.

37. Ewell TR, Bomar MC, Brown DM, Brown RL, Kwarteng BS, Thomson DP, et al. The influence of acute oral lactate supplementation on responses to cycle ergometer exercise: a randomized, crossover pilot clinical trial. Nutrients. 2024;16(16):2624. doi:10.3390/nu16162624.

38. Pedersen MGB, Rittig N, Bangshaab M, Berg-Hansen K, Gopalasingam N, Gormsen LC, et al. Effects of exogenous lactate on lipid, protein, and glucose

metabolism — a randomized crossover trial in healthy males. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2024;326(4):E443-E453. doi:10.1152/ajpendo.00301.2023.

39. Ntovas P, Loumprinis N, Maniatakos P, Margaritidi L, Rahiotis C. The Effects of Physical Exercise on Saliva Composition: A Comprehensive Review. Dent J (Basel). 2022;10(1):7. doi:10.3390/dj10010007.

40. Ивановски Ќ, Пешевска С, Дирјанска К, Ристоска С. Орална биохемија и физиологија. Скопје: Стоматолошки факултет, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“; 2022.

41. Spehar-Délèze AM, Anastasova S, Vadgama P. Monitoring of Lactate in Interstitial Fluid, Saliva and Sweat by Electrochemical Biosensor: The Uncertainties of Biological Interpretation. Chemosensors. 2021;9(8):195. doi:10.3390/chemosensors9080195.

42. Okano S, Nishizawa H, Yui J, et al. Impact of body fat, body water content, and skeletal muscle mass index on peak salivary lactate levels after squat jump exercise in healthy non-athlete adult males. BMC Sports Sci Med Rehabil. 2022;14(1):89. doi:10.1186/s13102-022-00482-6.

43. Santos RVT, Almeida ALR, Caperuto EC, Martins E Jr, Costa Rosa LFBP. Effects of a 30-km race upon salivary lactate correlation with blood lactate. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2006;145(1):114-117. doi:10.1016/j.cbpb.2006.07.001.

44. Ohkuwa T, Itoh H, Yamazaki Y, Sato Y. Salivary and blood lactate after supramaximal exercise in sprinters and long-distance runners. Scand J Med Sci Sports. 1995;5(5):285-290. doi:10.1111/j.1600-0838.1995.tb00046.x.

45. Pérez M, Lucia A, Carvajal A, Pardo J, Chicharro JL. Determination of the maximum steady state of lactate (MLSS) in saliva: an alternative to blood lactate determination. Jpn J Physiol. 1999;49(4):395-400. doi:10.2170/jjphysiol.49.395.

46. Tékus É, Kaj M, Szabó E, Szénási NL, Kerepesi I, Figler M, et al. Comparison of blood and saliva lactate level after maximum intensity exercise. Acta Biol Hung. 2012;63 Suppl 1:89-98. doi:10.1556/ABiol.63.2012.Suppl.1.9.

47. Bocanegra OL, Diaz MM, Teixeira RR, Soares SS, Espindola FS. Determination of the lactate threshold by means of salivary biomarkers: chromogranin A as novel marker of exercise intensity. Eur J Appl Physiol. 2012;112(9):3195-3203. doi:10.1007/s00421-011-2294-4.

48. Kojima C, Morishima T, Ito R, Yasunaga S, Shimogaki T, Hashimoto T, et al. Blood and salivary lactate responses to active rest following circuit exercise. Front Physiol. 2025;16:1534668. doi:10.3389/fphys.2025.1534668.

49. Vuletić L, Peroš K, Špalj S, Rogić D, Alajbeg I. Time-related changes in pH, buffering capacity and phosphate and urea concentration of stimulated saliva. Oral Health Prev Dent. 2014;12(1):45-53. doi:10.3290/j.ohpd.a31221.

50. Abrahamson HB, Rezvani AB, Brushmiller JG. Photochemical and spectroscopic studies of complexes of iron(III) with citric acid and other carboxylic acids. Inorg Chim Acta. 1994;226(1-2):117-127. doi:10.1016/0020-1693(94)04077-X.

51. Zhang Y, Richards DS, Schöneich C. Near UV light photo-degradation of lactate and related α-hydroxycarboxylates in the presence of Fe(III): formation of carbon dioxide radical anion. J Pharm Sci. 2024;113(9):2683-2687. PMID: 39002725.

52. San-Millán I, Brooks GA. Assessment of Metabolic Flexibility by Means of Measuring Blood Lactate, Fat, and Carbohydrate Oxidation Responses to Exercise in Professional Endurance Athletes and Less-Fit Individuals. Sports Med. 2018;48(2):467-79. doi:10.1007/s40279-017-0751-x.

53. Artiss JD, Karcher RE, Cavanagh KT, Collins SL, Peterson VJ, Varma S, et al. A liquid-stable reagent for lactic acid levels. Application to the Hitachi 911 and Beckman CX7. Am J Clin Pathol. 2000;114(1):139-143. doi:10.1309/65UJ-FQ75-DVGC-XX1N.

54. BioSystems S.A. LACTATE: lactate oxidase/peroxidase. Reagent insert. Barcelona, Spain: BioSystems S.A.; 2016.

55. Fletcher GF, Ades PA, Kligfield P, Arena R, Balady GJ, Bittner VA, et al. Exercise standards for testing and training: a scientific statement from the American Heart Association. Circulation. 2013;128(8):873-934. doi:10.1161/CIR.0b013e31829b5b44.

56. Prodan A, Brand HS, Ligtenberg AJM, Imangaliyev S, Tsivtsivadze E, Weijden F, et al. Interindividual variation, correlations, and sex-related differences in the salivary biochemistry of young healthy adults. Eur J Oral Sci. 2015;123(3):149-157. doi:10.1111/eos.12182.