

Факултет Фармацеутски

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

01 број

Већу научних области
медицинских наука

(Број захтева)

(Назив већа научне области коме се захтев
упућује)

17.10.2024.

(Датум)

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на одлуку о прихватању теме докторске дисертације и о одређивању ментора

Молимо да, сходно члану 47. ст. 5. тач. 3. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 186/15-пречишћени текст и 189/16), дате сагласност на одлуку о прихватању теме докторске дисертације:

„Утицај суплементације хигенамином на физичке перформансе, кардио-метаболичке параметре, дијетарне навике и биохемијске маркере код жена које се рекреативно баве спортом“

(пун назив предложене теме докторске дисертације)

НАУЧНА ОБЛАСТ Фармацеутске науке – Броматологија

ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ:

1. Име , име једног од родитеља и презиме кандидата:

ОЖЕГОВИЋ (СЛАВКО) ЈЕЛЕНА

2. Претходно образовање (назив и седиште факултета, студијски програм):

Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

студијски програм: Дипломирани фармацеут – медицински биохемичар

3. Година дипломирања:

2008.

4. Година уписа на докторске студије:

2018.

5. Назив студијског програма
докторских студија:

Докторске академске студије, Фармацеутске науке , модул
Броматологија

ПОДАЦИ О МЕНТОРИМА:

Име и презиме ментора: **Проф др Брижита Ђорђевић**

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације

1. Michalickova DM, Kostic-Vucicevic MM, Vukasinovic-Vesic MD, Stojmenovic TB, Dikic NV, Andjelkovic MS, **Djordjevic BI**, Tanaskovic BP, Minic RD. Lactobacillus helveticus Lafti L10 supplementation modulates mucosal and humoral immunity in elite athletes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The Journal of Strength & Conditioning Research. 2017 Jan 1;31(1):62-70.
2. Michalickova D, Minic R, Dikic N, Andjelkovic M, Kostic-Vucicevic M, Stojmenovic T, Nikolic I, **Djordjevic B**. Lactobacillus helveticus Lafti L10 supplementation reduces respiratory infection duration in a cohort of elite athletes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Applied physiology, nutrition, and metabolism. 2016;41(7):782-9.
3. Dodevska MS, Sobajic SS, Djordjevic PB, Dimitrijevic-Sreckovic, VS, Spasojevic-Kalimanovska VV, **Djordjevic BI**. Effects of total fibre or resistant starch-rich diets within lifestyle intervention in obese prediabetic adults. European journal of nutrition. 2015;55(1):127-137
4. Baralic I, Andjelkovic M, **Djordjevic B**, Dikic N, Radivojevic N, Suzin-Zivkovic V, Pejic S. Effect of Astaxanthin Supplementation on Salivary IgA, Oxidative Stress, and Inflammation in Young Soccer Players. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015; 1-9.
5. Baralic I, **Djordjevic B**, Dikic N, Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Jelic-Ivanovic Z, Radivojevic N, Andjelkovic M, Pejic S. Effect of Astaxanthin Supplementation on Paraoxonase 1 Activities and Oxidative Stress Status in Young Soccer Players. Phytother. Res. 2013; 27:1536-1542

Име и презиме ментора: **Проф др Forsdahl Guro**

Звање: редовни професор

Списак радова који квалификују ментора за вођење докторске дисертације:

1. Göschl L, Gmeiner G, Gärtner P, Steinacher M, **Forsdahl G**. Detection of DHCMT long-term metabolite glucuronides with LC-MSMS as an alternative approach to conventional GC-MSMS analysis. Steroids. 2022;180.
2. **Forsdahl G**, Zanitzer K, Erceg D, and Gmeiner G. Quantification of endogenous steroid sulfates and glucuronides in human urine after intramuscular administration of testosterone esters. Steroids, 2020.
3. **Forsdahl G**, Jančić-Stojanović B, Anđelković M, Dikić N, Geisendorfer T, Jeitler V, and Gmeiner G. Urinary excretion studies of meldonium after multidose parenteral application. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018. 161: p. 289-295.DOI:
4. **Forsdahl G.**, Erceg D, Geisendorfer T, Turkalj M, Plavec D, Thevis M, Tretzel L, and Gmeiner G. Detection of testosterone esters in blood. Drug Testing and Analysis, 2015. 7(11-12): p. 983-989.
5. **Forsdahl G**, Johnsgaard T, Geisendorfer T, Kainzbauer J, and Gmeiner G. Evaluation of the influence of grapefruit juice on the endogenous urinary steroid profile, in Recent Advances in Doping Analysis (23), W. Schänzer, et al., Editors. 2015, Sport und Buch Strauß: Cologne, Germany. ISBN: ISBN 978-3-86884-041-4

Наставно научно веће Универзитета у Београду-Фармацеутског факултета

Обавештавамо вас да је

_____ (назив надлежног тела факултета).

на седници одржаној 16.05.2024. размотрило предложену тему и закључило да је тема подобна за израду докторске дисертације јер садржи оригиналну идеју и да је од значаја за развој науке, примену њених резултата, односно развој научне мисли уопште.

ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

-
- Прилог
1. Одлука Наставно-научног већа о прихватању теме и одређивању ментора
 2. Извештај Комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације

Напомена: Факултет доставља Универзитету захтев са прилозима у електронској форми и у једном писаном примерку за архиву Универзитета

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАРМАЦЕУТСКИ ФАКУЛТЕТ
11000 БЕОГРАД
Ул. Војводе Степе
450 01 број _____
17.10.2024. године

На основу члана 94. Статута Универзитета у Београду - Фармацеутског факултета и предлога Комисије за последипломске студије – докторске студије, Наставно-научно веће Фармацеутског факултета у Београду на седници одржаној 16.05.2024. године, донело је

О Д Л У К У

ПРИХВАТА СЕ извештај Комисије за оцену испуњености услова кандидата дипломираног фармацеута – медицинског биохемичара **Ожеговић Јелене** и научне заснованости теме за израду докторске дисертације под насловом:

„Утицај суплементације хигенамином на физичке перформансе, кардио-метаболичке параметре, дијетарне навике и биохемијске маркере код жена које се рекреативно баве спортом“

и упућује Већу научних области медицинских наука Универзитета у Београду на усвајање, а по добијеној писаној сагласности одобрава израда докторске дисертације.

Ментори:

1. Др сци. Брижита Ђорђевић - редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет;
2. Др сци. Forsdahl Guro, редовни професор, Катедра за фармацију, Универзитет у Тромсоу, Арктички универзитет Норвешке

Одлуку доставити: именованој, Универзитету, декану, менторима, продекану за последипломску наставу и континуирану едукацију, секретару, Одсеку за наставу и студентска питања, председнику комисије за последипломске студије – докторске студије (Проф др. Биљани Антонијевић), пословном секретару и архиви.

ПРЕДСЕДНИК
НАСТАВНО-НАУЧНОГ
ВЕЋА ФАРМАЦЕУТСКОГ
ФАКУЛТЕТА

Проф. др Наташа Богавац
Станојевић

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА
УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ**

Комисији за последипломске – докторске студије

На основу члана 28. Статута Фармацеутског факултета Универзитета у Београду и предлога Комисије за последипломску наставу – докторске студије, Наставно-научно веће Фармацеутског факултета Универзитета у Београду на седници 11.04.2024. год. донело је одлуку (01. број 886/2 од 11.04.2024. год.) о именовану Комисије за оцену испуњености услова кандидата дипл. фарм. мед. биохем. Јелене Ожеговић и научне заснованости теме докторске дисертације под насловом: ***Утицај суплементације хигенамином на физичке перформансе, кардио-метаболичке параметре, дијетарне навике и биохемијске маркере код жена које се рекреативно баве спортом.***

*Based on Article 28. of the Statute of the University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, and the proposal of the Commission for postgraduate - doctoral studies, the Academic Council of the University of Belgrade - Faculty of Pharmacy on the meeting held on April 11th 2024, decision no (01. no 886/2), has nominated the following Committee for the assessment of the fulfillment of the requirements of candidates of graduated pharmacist - medical biochemist Jelena Ožegović and the scientific justification of the subject of the doctoral thesis entitled: **The influence of higenamine supplementation on physical performance, cardio-metabolic parameters, dietary habits and biochemical markers in physically active females.***

Ментори предложене докторске дисертације / Supervisors of the submitted doctoral thesis:

Др сци. Брижита Ђорђевић, редовни професор, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
professor, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy

Др сци. Forsdahl Guro, редовни професор, Катедра за фармацију, Универзитет у Тромсоу, Арктички универзитет Норвешке
professor, Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Tromsø (UiT), The Arctic University of Norway

Na osnovu uvida u priloženi materijal i analize predmeta i cilja istraživanja, Komisija u sastavu / Based on the documentation submitted and analysis of the study subject and objectives, the nominated Committee members:

1. Др сци. Ивана Недељковић
редовни професор, Универзитет у Београду - Медицински факултет
professor, University of Belgrade - Faculty of Medicine
2. Др сци. Зоран Максимовић,
редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
professor, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy

3. Др сци. Данијела Ристић-Медић
научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за медицинска истраживања
principal research fellow, University of Belgrade - Institute for Medical Research
4. Др сци. Неда Миљинковић
доцент, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
assistant professor, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy
5. Др сци. Невена Ивановић
ванредни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
associate professor, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy

подноси следећи /submits the following:

ИЗВЕШТАЈ / REPORT

Б. Биографија кандидата / Candidate's biography

Јелена Ожеговић рођена је 17. марта 1983. године у Лесковцу, где је завршила основну школу „Коста Стаменковић“ и прве три године средње медицинске школе, смер фармацеутски техничар, са одличним успехом. Школске 2001/2002. године мења место пребивалишта због професионалног бављења кошарком и уписује четврту годину средње медицинске школе у Нишу „Др Миленко Хаџић“, смер фармацеутски техничар и завршава са одличним успехом. Носилац је Вукове дипломе у основној и средњој школи. Фармацеутски факултет Универзитета у Београду, смер дипломирани фармацеут – медицински биохемичар уписала је 2002. године, а завршила 2008. године. Након полагања свих испита са просечном оценом 8.72, одбранила је дипломски рад из броматологије 29. септембра 2008. године на тему „Процена утицаја стаклене и пластичне амбалаже на садржај тешких метала у белом вину“, чиме је завршила студије и стекла звање магистра фармације. По завршетку студија, приправнички стаж је обављала од октобра 2008. до октобра 2009. године у биохемијској лабораторији Клиничког Центра Србије у Београду, након чега је положила стручни испит 2009. године при Министарству здравља Републике Србије. У новембру 2008. године постаје сарадник Антидопинг агенције Републике Србије и учествује на свим домаћим и међународним такмичењима у Србији и ван Србије. Од децембра 2010. године до августа 2011. године радила је у „Yunusom-у“ као продукт менаџер. Послове дипломираног фармацеута – медицинског биохемичара обављала је у периоду од 2011 – 2023. године у следећим биохемијским лабораторијама: здравствена установа „Југолаб“ у Новом Саду, у Служби за ургентну лабораторијску дијагностику Клиничког центра Србије у Београду, у „Реа Лаб Аналитик“ у Београду и „Бео-лабу“ у Београду. Школске 2018/2019. године, уписала се на програм докторских академских студија Фармацеутског факултета, Универзитета у Београду – модул броматологија. Положила је све испите предвиђене планом и програмом са просечном оценом 9,80. Од 2020. године члан је извршног одбора Удружења за медицину спорта Србије (УМСС), а од 2022. године члан Скупштине коморе биохемичара Србије. Запослена је у Антидопинг

агенцији Републике Србије у Београду на радном месту координатор послова међународне сарадње. Тренутно учествује на пројекту унапређења капацитета сарадње одељења за прикупљање информација и истрага Националних антидопинг агенција и одељења унутрашњих послова земаља Европе, у организацији Светске антидопинг агенције. Учествоваће на Олимпијским играма у Паризу 2024. године као допинг контролор.

Jelena Ožegović was born on 17th March 1983 in Leskovac, where is finished elementary school "Kosta Stamenkovic" and the first three years of high medical school as a pharmaceutical technician, with excellent success. She changed place of residence 2001/2002 because she played basketball professionally. She enrolled the fourth year of high medical school in Niš " Dr Milenko Hadžić " as a pharmaceutical technician and finished with excellent success. She holds Vuk Karadžić diploma in elementary and high school. She enrolled the University of Belgrade – Faculty of Pharmacy in 2002/2003 and graduated in 2008 as a graduate pharmacist – medical biochemist, with the average grade 8.72 out of 10.00 and 10 at the final thesis defense. She defended her graduate thesis in bromatology on 29th September 2008 on the topic "Evaluation of the impact of glass and plastic packaging on the content of heavy metals in white wine", completing her studies and obtaining the title of Master of Pharmacy. Jelena completed the internship from October 2008 to October 2009 in the biochemical laboratory of the Clinical Center of Serbia in Belgrade, after which she passed the professional exam in 2009 at the Ministry of Health of the Republic of Serbia. In November 2008, she became an associate of the Anti-Doping Agency of Serbia and participated in all domestic and international competitions in Serbia and abroad. She worked at "Yunycor" as a product manager from December 2010 to August 2011. She worked as a graduate pharmacist - medical biochemist in the period from 2011 to 2023 in the following biochemical laboratories: "Jugolab" health institution in Novi Sad, at the Centre of medical biochemistry, department for urgent laboratory diagnostic of Clinical Center of Serbia in Belgrade, in "Rea Lab Analytic" in Belgrade and "Beo-lab" in Belgrade. Jelena enrolled doctoral studies at the University of Belgrade – Faculty of Pharmacy in 2018/2019. She has passed all exams provided by the plan and program with an average grade of 9.80. She is a member of the executive board of the Sports Medicine Association of Serbia (UMSS) since 2020. She is a member of the Assembly of the Chamber of Biochemists of Serbia since 2022. She is employed at the Anti-Doping Agency of Serbia in Belgrade in the position of coordinator of international cooperation. She is currently participating in a project to improve the cooperation capacities of the information gathering and investigation departments of the National Anti-Doping Agencies and the law enforcement departments of European countries, organized by the World Anti-Doping Agency. She will participate in the Olympic Games in Paris in 2024 as a doping control officer.

Списак објављених научних радова и саопштења / List of research papers and poster presentations

Рад у истакнутом међународном часопису (M21) / Research paper published in the international journal

1. Stajić A, Anđelković M, Dikić N, Rašić J, Vukašinović-Vesić M, Ivanović D, Jančić-Stojanović B. *Determination of higenamine in dietary supplements by UHPLC/MS/MS method*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Elsevier 146 (2017) 48-52, doi: 10.1016/j.jpba.2017.08.017
2. Rašić J, Ivanović N, Anđelković M, Nedeljković I, Nikolić I, Stojanović S, Ristić-Medić D, Takić M, Đorđević B, Dikić N. *Influence of higenamine on exercise performance of*

recreational female athletes: A randomized double-blinded placebo-controlled trial. Science and Sport Psychology. *Frontiers in Psychology* 12 (2021) 633110, doi: 10.3389/fpsyg.2021.633110

3. Stojanović B, Rašić J, Anđelković M, Dikić N, Dragičević N, Djordjević B, Forsdahl G, Gmeiner G. *Urinary excretion profile of higenamine in females after oral administration of supplements – Doping scenario.* *Journal of Chromatography B* (2024), <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2024.124047>

Предавања по позиву са међународних скупова штампана у изводу (M32) / Lectures presented at the international scientific meetings

1. Cakić Ž, Rašić J, Savić D, Šobajić S. *Assessment of the impact glass and plastic packaging to the contents of heavy metals in white wine.* *Proceedings* (2008) 236–238. 11. Congress on nutrition with international participation, Belgrade, 15.-18. October 2008

Саопштења са међународних скупова штампана у изводу (M34) / Poster presentations presented at the international scientific meetings

1. Stojanović B, Rašić J, Anđelković M, Dikić N, Forsdahl G, Gmeiner G. *Characterization of the urinary excretion profile of higenamine after multiple dose oral administration utilizing on-line SPE LC with HRMS detection.* *Proceedings of the Manfred Donike Workshop 40th Cologne Workshop on Dope* (page 203), Germany, 2022, ISBN 978-3-86884-048-3
2. Stojanović B, Rašić J, Anđelković M, Dikić N, Forsdahl G, Gmeiner G. *Quantitative analysis of higenamine and its metabolite in human urine.* ANAKON Book of Abstract, (page 278) Vienna, Austria, 2023
3. Ožegović Rašić J, Takić M, Ivanović N, Ristić Medić D, Vukašinović Vesić M, Đorđević B. *The Effect of Higenamine Supplementation on the Fatty Acid Profiles of Serum Phospholipids.* 14th European Nutrition Conference 2023, Belgrade 14-17; *Proceedings* 2023, 91(1),213; <https://doi.org/10.3390/proceedings2023091213>

Предавања по позиву и усмена излагања са скупа националног значаја штампана у изводу (M62) / Lectures and oral presentations at the national scientific meetings

1. Rašić J, Dikić N. *Introduction of biological passport to the doping control of athletes in Serbia.* Book of abstracts (2015) 17-19. First Congress on Prevention of Doping in Sport, Belgrade, July 7, 2015.

В. Образложење плана израде докторске дисертације / Justification of the doctoral dissertation plan

1. Научна област / Field of research

Bromatologija / Bromatology

2. Предмет научног истраживања / Scientific research topic

Предмет научног истраживања је праћење утицаја суплементације хигенамином на физичке перформансе код жена које се рекреативно баве кошарком. Поред параметара спортске способности (антропометријских, биохемијских, метаболичких, кардиопулмонарних и ехокардиографских), пратиће се и дијетарне навике, биохемијски маркери, ергогени ефекат хигенамина, фармакокинетички профил елиминације хигенамина и његовог метаболита коклаурина у урину.

The subject of scientific research is monitoring the influence of higenamine supplementation on physical performance in women who play basketball recreationally. In addition to sports performance parameters (anthropometric, biochemical, metabolic, cardiopulmonary and echocardiographic) will be monitored dietary habits, biochemical markers, ergogenic effect of higenamine, pharmacokinetic profile of elimination higenamine and its metabolite coclaurine in urine.

3. Научна заснованост предложене теме докторске дисертације / Scientific justification of the proposal study topic

Дијететски суплементи или додаци исхрани су намирнице које допуњују исхрану. Представљају концентроване изворе нутријената, али и других супстанци са нутритивним или физиолошким ефектима. Намењени су особама које имају повећане потребе или смањени унос појединих нутријената или особама код којих је потребно постићи одређено физиолошко деловање контролисаном суплементацијом. Дијететски суплементи намењени су како општој популацији, тако и у великој мери популацији спортиста и рекреативаца. На тржишту постоји велики број различитих суплемената који се издају у апотекама, али су доступни и у теретанама, путем интернета, у продавницама здраве хране. Велики број спортиста верује да су ови производи неопходни за успех у спорту и да ће им пружити предност на такмичењу. Нажалост, само за мањи број дијететских суплемената постоје научни докази о ергогеном деловању односно позитивном деловању на спортске способности (*Djordjevic et al., 2016*).

Према Експертском панелу Аустралијског института за спорт дијететски суплементи су подељени у четири групе, према нивоу научних доказа о њиховом деловању. Групу А чине „одобрени суплементи“ чије је деловање потврђено и показано да унапређује спортске способности, ако се даје према одговарајућем протоколу за одређене намене. Групу Б чине „суплементи у разматрању“, групу Ц „суплементи без доказа о јасној ефикасности“, док групу Д чине „суплементи који су забрањени“, било због тога што су на негативној листи Светске антидопинг агенције (енгл. *World Antidoping Agency, WADA*) или постоји велики ризик да доведу до допинг позитивног резултата (*Djordjevic et al., 2016; WADA, 2017; AIS*)

Висока је учесталост употребе дијететских суплемената код рекреативаца, посебно из категорије сагоревача масти (енгл. *fat burners*) (*Ahmadian and Mohsen, 2022*). Један од главних разлога за употребу дијететских суплемената за сагоревање масти у овој популацији је физички изглед (*Ahmadian and Mohsen, 2022*). Истраживања су показала да ова категорија суплемената може садржати неку од недозвољених супстанци, чешће него друге категорије суплемената. Присуство недозвољених супстанци представља значајан проблем са више аспеката. Посебно су угрожени спортисти, јер ове супстанце поред тога што могу показати негативан ефекат по здравље, могу довести и до дисквалификације са

такмичења, као и одговарајуће санкционисање према кодексу Светске антидопинг агенције (WADA, 2021).

Међу супстанцама које се налазе на негативној листи, од интереса је и хигенамин, чести састојак дијететских суплемената. Хигенамин као састојак додатака исхрани популаран је међу спортистима који се такмиче и рекреативцима због своје документоване ергогене активности (Cohen et al., 2019; Jagim et al., 2019; Yen et al., 2020). Жене су популација са највећим процентом коришћења суплемената посебно оних за редукцију телесне масе и смањења процента масти (Jagim et al., 2019; Jedrejko et al., 2021)

Хигенамин је алкалоид (1-[4-хидроксифенил] метил]-1,2,3,4-тетрахидроизохинолин-6,7-диол) и налази се у различитим биљкама. У дијететским суплементима и производима који се могу купити без рецепта може бити присутан и означен под различитим именима (норкоклаурин, деметилкоклаурин), или под називом биљака које су извор хигенамина: *Tinospora crispa*, *Nandina domestica*, *Nelumbo nucifera*, *Asarum heterotropioides*, *Aconitum japonicum*, *Gnetum parvifolium*, *Asarum sieboldii*, *Galium divaricatum* (Okano et al., 2017; Grucza et al., 2018).

У традиционалној кинеској медицини хигенамин као активни састојак биљака користи се за редукцију телесне масе. Документована је и β -агонистичка активност хигенамина (Okano et al., 2017). Постоје докази да би хигенамин могао имати агонистичку активност на β_1 и β_2 -адренергичке рецепторе (Zhang et al., 2017). Поред овог ефекта, постоје литературни подаци који указују да хигенамин поседује хронотропни и термогени ефекат као агонист β_1 -рецептора, док као агонист β_2 -рецептора може индуковати липолизу (Stajic et al, 2017).

In vitro и *in vivo* студије (Cohen et al., 2019; Zhang et al., 2017) показале су да хигенамин може имати позитиван инотропни и хронотропни ефекат, као и бронходилататорни ефекат углавном као резултат његове β_2 -агонистичке активности (Zhang et al., 2017). Позитиван инотропни и хронотропни ефекат такође је испитиван и у хуманим студијама (Zhang et al., 2017).

Бронходилататорни ефекат хигенамина потврђен је само у *in vitro* студијама (Zhang et al., 2017; Kato et al., 2017). Фармакокинетика хигенамина након интравенске примене интензивно је проучавана код животиња и људи, док су подаци за оралну примену хигенамина оскудни. Једини подаци у литератури добијени на моделу зеца и пацова показују веома лошу биорасположивост хигенамина (Lo et al., 1996; Wang et al, 2020).

Хигенамин није лек и 2017. године додат је на листу забрањених допинг средстава ВАДА у категорији С3, која укључује β_2 -агонисте (салбутамол, салметерол, формотерол) (Feng et al., 2020; Jan et al., 2019; WADA, 2017). Хигенамин је забрањен на такмичењу, као и ван такмичења, што је довело до тога да намерна или ненамерна употреба хигенамина може представљати ризик за спортисте и њихову каријеру (Grucza et al., 2018). Као допинг супстанца забрањен је за спортисте који се професионално баве спортом, али није забрањен за спортисте који се рекреативно баве спортом. Сматра се да је хигенамин ергогено средство, али не постоје конкретни подаци о ефикасности и безбедности његове примене (Zhang et al., 2017).

У досада изведеним истраживањима, примењен је већи број различитих метода за праћење испитаника. Кардиопулмонално и ехокардиографско праћење испитаника подразумева осим ергоспирометрије (енгл. *cardiopulmonary exercise test*, CPET), праћење и хемодинамских параметара: систолни крвни притисак [SBP max (mmHg)], дијастолни крвни притисак [DBP max (mmHg)], максималну срчану фреквенцу (HR max), кисеонични

пулс (O_2 pulse), максималну вољну вентилацију (MVV), док ехокардиографско праћење испитаника подразумева праћење ејекционе фракције (EF) и митралног прилива (E/A) (Nedeljkovic et al., 2012).

Кардиопулмонални тест физичким оптерећењем – ергосприометрија (CPET) подразумева директно мерење садржаја гасова у издахнутом ваздуху. CPET мери фракције O_2 и CO_2 у издахнутом ваздуху, волумен издахнутог ваздуха или проток ваздуха - минутну вентилацију (VE). Пик VO_2 је највиша постигнута потрошња за време CPET и он је најрепродукцибилнији индекс аеробних способности. Предвиђени пик кисеоничног пулса (O_2 pulse) представља однос VO_2 (ml O_2 /min) и HR (otk/min.). Кисеонични пулс је количина O_2 која се допреми ткивима у сваком откуцају срца и зависи од ударног волумена и артериовенске разлике O_2 (Nedeljkovic et al., 2012).

У спроведеним студијама испитивали су се дијететски суплементи са стандардном дозом хигенамина (Cohen et al., 2019). Кохен и сарадници анализирали су дијететске суплементе, који се налазе у слободној продаји у Сједињеним Америчким Државама, на присуство и количину хигенамина и показали просечну дозу хигенамина око $62 \pm 6,0$ mg.

Подаци у литератури показали су да β_2 -агонисти могу побољшати спортске перформансе, довести до липолизе и повећати термогенезу (Riiser et al., 2020). Хигенамин као неселективни β -агонист би могао имати β -агонистичку активност на β_3 -рецепторе углавном на ћелије белог масног ткива што такође може довести до губитка масног ткива стимулацијом масних киселина, мобилизацијом и директно или индиректно оксидацијом масти (Hostrup et al., 2020). Ограничен је број објављених студија на људима где су испитивани липолитички и термогени ефекат хигенамина. Једина хумана студија у којој се пратио утицај хигенамина на липолизу и метаболизам је студија спроведена од стране Лее и сарадника (Lee et al., 2013). У овој студији аутори су испитивали акутни ефекат суплемента, који поред хигенамина садржи екстракт коре јохимба и кофеин. Акутна орална примена овог суплемента који садржи три компоненте довела је до повећане термогенезе и повећања циркулишућих масних киселина укључујући повећање крвног притиска и срчаних откуцаја у групи здравих, активних мушких и женских рекреативаца. Пошто свака од три компоненте може да испољи ове ефекте својим механизмом деловања, аутори нису могли да утврде који од састојака је био одговоран за деловање и на који начин. У другој студији коју је спровела иста група аутора, а која је укључивала само једну групу мушких рекреативаца који су орално суплементирани хигенамином и у комбинацији са кофеином и екстрактом коре јохимба током 8 недеља испитивала је безбедност примене хигенамина (Bloomer et al., 2015).

Међутим, у литератури не постоје поуздани научни докази да хигенамин има ергогену активност или да испољава бронходилататорни ефекат. Студије спроведене у претходном периоду нису у потпуности испитале основни механизам деловања хигенамина, тако да ефикасност и безбедност оралног узимања хигенамина није у потпуности објашњен (Zhang et al., 2017).

Поред тога, још увек не постоји довољан број студија које би на одговарајући начин испитале безбедност након дугорочне примене дијететских суплемената које садрже хигенамин. С обзиром на дугорочно повећање потрошње енергије и липолизе, реално је очекивати било какву значајну промену у групи са хигенамином.

Прегледом литературе која се односи на фармакокинетички профил хигенамина пронађено је да након интравенске примене, хигенамин има кратак полуживот, као и да се скоро деведесет шест процената хигенамина елиминише се из организма у року од 30

минута (Feng et al., 2012). Група аутора која је одређивала концентрацију хигенамина у урину након *per os* администрације капсула *Lotus plumule* три пута на дан по 0,8 g закључила је да концентрација хигенамина у урину већ после три сата од прве дозе прелази концентрацију од 10 ng/mL (Yan et al., 2019). Према WAДА регулативи концентрација хигенамина у урину мања од 10 ng/mL не извештава се као неповољан аналитички резултат (енгл. *Adverse Analytical Findings*, AAF) (WADA, 2022).

У студијама (Guo et al., 2022; Grucza et al, 2018; Leaney et al., 2023; Muniz-Santos et al., 2023; Okano et al., 2017; Rubio et al., 2023; Yan et al., 2019; Zhao et al., 2022), хигенамин је одређиван у узорцима урина након администрације пастила за грло које садрже плод *Nandina domestica* (Okano et al., 2017), капсула *Plumula nelumbinis* (Yan et al., 2019), праха који садржи семе лотуса биљака из рода *Nelumbo* (*Nelumbo nucifera*) (Guo et al., 2022), таблета (Zhao et al., 2022), плодовима биљака рода *Annona* (*Annona muricata*, *Annona squamosa*) (Muniz-Santos et al., 2023; Rubio et al., 2023), корена цвекле (Leaney et al., 2023). Okano и сарадници (Okano et al., 2017) су поред концентрације хигенамина у урину одређивали и присуство његовог метаболита коклаурина након примене пастила за грло. У својој студији, Зхао и сарадници (Zhao et al., 2022) су приказали идентификацију и карактеризацију метаболита хигенамина укључујући и коњуговане облике. Један од новијих научних радова (Rubio et al., 2023) даје опис синтезе и карактеризације сулфо коњугованих деривата хигенамина и приказује који метаболити могу служити као маркери за процењивање извора хигенамина тј. да ли је резултат последица уноса хигенамина биљног порекла или је последица администрације суплемената који садрже хигенамин.

Познато је присуство хигенамина у различитим биљним екстрактима и дијететским суплементима (Cohen et al., 2019). На пример, хигенамин је одређен као састојак у традиционалном Тајландском антихипертензивном биљном рецепту (*Boesenbergia pandurata*, *Tinospora crispa*, *Piper nigrum*, *Aegle marmelos*, *Acanthus ebracteatus*, *Cyperus rotundus*) (Charoonratana et al., 2014), у *Plumula nelumbinis* (Lin et al., 2014), плодовима биљака рода *Annona* (*Annona muricata*, *Annona squamosa*) (Muniz-Santos et al., 2023; Rubio et al., 2023), у *korenu* цвекле (Leaney et al., 2023) и у различитим дијететским суплементима (са екстрактом *Nelumbo nucifera*) (Grucza et al, 2019; Stajic et al., 2017). У прегледном раду (Kozhuharov et al., 2022) аутори су дали преглед биљака које садрже хигенамин који показује да специфични биљни екстракти нису довели до неповољног аналитичког резултата (AAF), али то наравно зависи од унетих доза (Leaney et al., 2023; Muniz-Santos et al., 2023; Okano et al., 2017; Rubio et al., 2023). С друге стране, дијететски суплементи обично имају већу количину супстанце (20 mg/дозе или више) и јасно могу довести до неповољног аналитичког резултата (AAF).

Хигенамин и његов метаболит коклаурин могу се елиминисати из организма у облику глукуронида и сулфата. Према WADA TD2022MRPL (енгл. *Minimum Required Performance Levels*) (WADA, 2022) спортиста је позитиван на хигенамин ако концентрација у урину пређе 10 ng/mL рачунато на слободни облик хигенамина – коњуговани облици се не узимају у обзир.

Dietary supplements or nutritional supplements are foods that supplement nutrition. They represent concentrated sources of nutrients, but also of other substances with nutritional or physiological effects. They are intended for people who have increased needs or reduced intake of certain nutrients or for people who need to achieve a certain physiological effect through controlled supplementation. Dietary supplements are intended both for the general population and mostly for the population of athletes and recreationists. There are many

different supplements on the market that are dispensed in pharmacies, but are also available in gyms, online, and in health food stores. Many athletes believe that these products are essential for success in sports and will give them an edge in competition. Unfortunately, only a small number of dietary supplements have scientific evidence of an ergogenic effect, or positive effect on sports performance (Djordjevic et al., 2016).

According to the Expert Panel of the Australian Institute of Sport, dietary supplements are divided into four groups, according to the level of scientific evidence of their effectiveness. Group A consists of "approved supplements" whose action has been confirmed and shown to improve sports performance, if given according to the appropriate protocol for specific purposes. Group B consists of "supplements under consideration", group C "supplements without evidence of clear efficacy", while group D consists of "supplements that are banned", either because they are on the negative list of the World Anti-Doping Agency (WADA) or there is a high risk of leading to a doping positive result (Djordjevic et al., 2016; WADA, 2017; AIS).

The frequency of use of dietary supplements among recreational athletes is high, especially from the category of fat burners (Ahmadian and Mohsen, 2022). One of the main reasons for using dietary supplements to burn fat in this population is physical appearance (Ahmadian and Mohsen, 2022). Research has shown that this category of supplements may contain some of the prohibited substances, more often than other categories of supplements. The presence of illegal substances represents a significant problem in many aspects. Athletes are especially at risk, because these substances, in addition to having a negative effect on health, can also lead to disqualification from the competition, as well as appropriate sanctions according to the code of the World Anti-Doping Agency (WADA, 2021).

Among the substances that are on the negative list, from interest is higenamine, a common ingredient in dietary supplements. Higenamine as a dietary supplement ingredient is popular among competitive and recreational athletes due to its documented ergogenic activity (Cohen et al., 2019; Jagim et al., 2019; Yen et al., 2020). Women are the population with the highest percentage of use of supplements, especially those for reducing body mass and reducing fat percentage (Jagim et al., 2019; Jedrejko et al., 2021).

Higenamine is an alkaloid (1-[4-hidroksifenil] metil]-1,2,3,4-tetrahidroizohinolin-6,7-diol) found in various plants. In dietary supplements and products that can be bought without a prescription, it can be present and labeled under different names (norcoclaurin, demethylcoclaurin), or under the name of the plants that are the source of higenamine: *Tinospora crispa*, *Nandina domestica*, *Nelumbo nucifera*, *Asarum heterotropioides*, *Aconitum japonicum*, *Gnetum parvifolium*, *Asarum sieboldii*, *Galium divaricatum* (Okano et al., 2017; Gruzca et al., 2018).

In traditional Chinese medicine, higenamine as an active ingredient of plants is used to reduce body weight. The beta-agonist activity of higenamine has also been documented (Okano et al., 2017). There is evidence that higenamine could have agonistic activity on β_1 and β_2 -adrenergic receptors (Zhang et al., 2017). In addition to this effect, there is data literature indicating that higenamine has a chronotropic and thermogenic effect as an agonist of the β_1 -receptor, while as an agonist of the β_2 -receptor it can induce lipolysis (Stajic et al., 2017).

In vitro and *in vivo* studies (Cohen et al., 2019; Zhang et al., 2017) have shown that higenamine can have a positive inotropic and chronotropic effect, as well as a bronchodilator effect mainly because of its β_2 -agonist activity (Zhang et al., 2017). Positive inotropic and chronotropic effects have also been investigated in human studies (Zhang et al., 2017).

The bronchodilator effect of higenamine was confirmed only *in vitro* studies (Zhang et al., 2017; Kato et al., 2017). Pharmacokinetics of higenamine after intravenous administration have been intensively studied in animals and humans, while data for oral administration of higenamine are scarce. The only data in the literature obtained from rabbit and rat models show a very poor bioavailability of higenamine (Lo et al., 1996; Wang et al., 2020).

Higenamine is not a drug and in 2017 it was added to the WADA list of prohibited substances in category S3, which includes β_2 -agonists (salbutamol, salmeterol, formoterol) (Feng et al., 2020; Jan et al., 2019; WADA, 2017). Higenamine is banned in-competition and out-of-competition, which has led to the fact that the intentional or unintentional use of higenamine can pose a risk to athletes and their careers (Grucza et al., 2018). As a doping substance, it is prohibited for athletes who practice sports professionally, but it is not prohibited for athletes who practice sports recreationally. It is considered that higenamine is an ergogenic agent, but there are no specific data on the effectiveness and safety of its use (Zhang et al., 2017).

In previous research, many different methods were used to monitor participants. Cardiopulmonary and echocardiographic monitoring of participants includes, in addition to ergospirometry (CPET), monitoring of hemodynamic parameters: systolic blood pressure [SBP max (mmHg)], diastolic blood pressure [DBP max (mmHg)], maximum heart rate (HR max), oxygen pulse (O_2 pulse), maximum voluntary ventilation (MVV), while the echocardiographic monitoring of participants involves the monitoring of ejection fraction (EF) and mitral inflow (E/A) (Nedeljkovic et al., 2012).

Cardiopulmonary exercise test - ergospirometry (CPET) involves direct measurement of gas content in exhaled air. CPET measures fractions of O_2 and CO_2 in exhaled air, volume of exhaled air or airflow - minute ventilation (VE). Peak VO_2 is the highest energy expenditure achieved during CPET and is the most reproducible index of aerobic capacity. The predicted peak oxygen pulse (O_2 pulse) is the ratio of VO_2 (ml O_2 /min) to HR (rpm). Oxygen pulse is the amount of O_2 delivered to the tissues in each heartbeat and depends on stroke volume and arteriovenous O_2 difference (Nedeljkovic et al., 2012).

In the conducted studies, dietary supplements with a standard dose of higenamine were examined (Cohen et al., 2019). Cohen et al. analyzed dietary supplements over the counter in the United States of America for the presence and amount of higenamine and reported an average dose of higenamine of about 62 ± 6.0 mg (Cohen et al., 2019).

Data in the literature have shown that β_2 -agonists can improve sports performance, lead to lipolysis, and increase thermogenesis (Riiser et al., 2020). Higenamine as a non-selective beta-agonist could have beta-agonist activity on β_3 -receptors mainly on white adipose tissue cells which can also lead to adipose tissue loss by stimulation of fatty acids, mobilization and directly or indirectly fat oxidation (Hostrup et al., 2020). There are a limited number of published human studies examining the lipolytic and thermogenic effects of higenamine. The only human study in which the effect of higenamine on lipolysis and metabolism was monitored was the study conducted by Lee et al., 2013. In this study, the authors examined the acute effect of a supplement that, in addition to higenamine, contains yohimbe bark extract and caffeine. Acute oral administration of this tricomponent supplement led to increased thermogenesis and increases in circulating fatty acids including increases in blood pressure and heart rate in a group of healthy, active male and female recreational athletes. Since each of the three components can exert these effects with its own mechanism of action, the authors could not determine which of the components was responsible for the action and in what way. Another study conducted by the same group of authors, which included only one group of male recreational athletes who were orally supplemented with higenamine and combined with caffeine and yohimbe bark extract for 8 weeks, investigated the safety of higenamine administration (Bloomer et al., 2015).

However, there is not enough scientific evidence in the literature that higenamine has ergogenic activity or that it exhibits a bronchodilator effect. Studies conducted in the previous period did not fully examine the basic mechanism of action of higenamine, so the effectiveness and safety of oral intake of higenamine is not fully explained (Zhang et al., 2017).

In addition, there are still insufficient studies to adequately examine the safety of long-term use of dietary supplements containing higenamine. Given the long-term increase in

energy expenditure and lipolysis, it is realistic to expect any significant change in the higenamine group.

After intravenous administration, higenamine has a short half-life, almost ninety-six percent of higenamine is eliminated from the body within 30 minutes (Feng et al., 2012). A group of authors who measured the concentration of higenamine in urine during the oral intake of Lotus plumule capsules three times a day at 0.8g each concluded that the concentration of higenamine in urine already three hours after the first dose exceeded the concentration of 10 ng/mL (Yan et al., 2019). A concentration of higenamine in urine of less than 10 ng/mL is not reported as an adverse analytical finding (Adverse Analytical Findings, AAF) (WADA, 2022).

In studies (Guo et al., 2022; Grucza et al., 2018; Leaney et al., 2023; Muniz-Santos et al., 2023; Okano et al., 2017; Rubio et al., 2023; Yan et al., 2019; Zhao et al., 2022), higenamine was determined in urine samples after the administration of throat lozenges containing the fruit of Nandina domestica (Okano et al., 2017), the capsule of Plumula nelumbinis (Yan et al., 2019), and powder that contains lotus seeds of Nelumbo plants (Nelumbo nucifera) (Guo et al., 2022), tablets (Zhao et al., 2022), fruits of Annona plants (Annona muricata, Annona squamosa) (Muniz-Santos et al., 2023; Rubio et al., 2023), beet roots (Leaney et al., 2023). Okano et al., 2017 determined, in addition to the concentration of higenamine in urine, the presence of its metabolite coclaurine after the use of throat lozenges. In their study, Zhao et al., 2022 reported the identification and characterization of higenamine metabolites including conjugated forms. One of the more recent scientific papers (Rubio et al., 2023) describes the synthesis and characterization of sulfo-conjugated derivatives of higenamine and shows which metabolites can serve as markers for evaluating the source of higenamine, i.e. whether the result is due to the intake of higenamine of plant origin or is due to the administration of supplements containing higenamine.

Higenamine is known to be present in various plant extracts and dietary supplements (Cohen et al., 2019). For example, higenamine has been identified as an ingredient in a traditional Thai antihypertensive herbal recipe (Boesenbergia pandurata, Tinospora crispa, Piper nigrum, Aegle marmelos, Acanthus ebracteatus, Cyperus rotundus) (Charoonratana et al., 2014), in Plumula nelumbinis (Lin et al., 2014), the fruits of Annona plants (Annona muricata, Annona squamosa) (Muniz-Santos et al., 2023; Rubio et al., 2023), in beet roots (Leaney et al., 2023) and in various dietary supplements (with Nelumbo nucifera extract) (Grucza et al., 2019; Stajic et al., 2017). In a review paper (Kozhuharov et al., 2022) the authors reviewed plants containing higenamine showing that specific plant extracts did not lead to an adverse analytical finding (AAF), but this of course depends on the ingested doses (Leaney et al., 2023; Muniz-Santos et al., 2023; Okano et al., 2017; Rubio et al., 2023). On the other hand, dietary supplements usually have a higher amount of substance (20 mg/dose or more) and can clearly lead to an adverse analytical finding (AAF).

Higenamine and its metabolite coclaurin can be eliminated from the body in the form of glucuronides and sulfates. According to WADA TD2022MRPL (Minimum Required Performance Level) (WADA, 2022) an athlete is positive for higenamine if the concentration in urine exceeds 10 ng/mL calculated on the free form of higenamine - conjugated forms are not considered.

4. Циљеви научног истраживања / The aims of the study

Циљеви истраживања су испитати утицај суплементације хигенамином код жена које се рекреативно баве спортом на:

- 1) спортске перформансе;

- 2) енергетску потрошњу у мировању;
- 3) профил масних киселина;
- 4) параметре крвне слике, параметре функције јетре, биохемијске параметре, хемодинамске, кардиопулмонарне и ехокардиографске параметре;

Додатни циљеви истраживања су и:

- 5) Развој и валидација нове, и високо осетљиве методе *онлајн* чврсто-течне екстракције – течне хроматографије – масене спектрометрије високе резолуције (енгл. *online solid phase extraction – liquid chromatography high resolution mass spectrometry - SPE-LC-HRMS*) за одређивање хигенамина и његовог метаболита коклаурина у урину;
- 6) Профил реналног излучивања хигенамина и његовог метаболита коклаурина након пер ос адиминстрације суплемената који садрже хигенамин.

The study objectives are:

The study objectives of the research are to examine the influence of higenamine supplementation in physically active females on:

- 1) *sports performance;*
- 2) *energy consumption at rest;*
- 3) *fatty acid profile;*
- 4) *blood count parameters, liver function parameters, biochemical parameters, hemodynamic, cardiopulmonary and echocardiographic parameters;*

Additional research objectives are:

- 5) *Development and validation of a new and highly sensitive method of online solid-liquid extraction - liquid chromatography - high resolution mass spectrometry (online - SPE-LC-HRMS) for the determination of higenamine and its metabolite coclaurin in the urine;*
- 6) *Renal excretion profile of higenamine and its metabolite coclaurine after per os administration of supplements containing higenamine.*

5. Методологија научног истраживања / *The study methodology*

Избор испитаника и процедура истраживања / *Selection of participants and research procedures*

Етички комитет Удружења за медицину спорта Србије у Београду 15.03.2019. дао је сагласност за извођење истраживачке студије на људима под називом: „Утицај суплементације хигенамином на физичке перформансе, кардио-метаболичке параметре, дијетарне навике и биохемијске маркере код жена које се рекреативно баве спортом“ у оквиру плана израде докторске дисертације кандидаткиње Јелене Ожеговић.

Истраживање ће обухватити здраве испитанице у репродуктивном периоду које се рекреативно баве кошраком. Критеријуми укључења у студију биће: жене са више од > 5 сати тренирања недељно (> 5 h·wk⁻¹), чији је VO₂ max > 30 ml·kg⁻¹·min⁻¹. Критеријуми за искључење из студије биће: присуство болести које могу да утичу на метаболизам, као што су: хроничне болести (неуролошке, бубрежне, имунолошке), кардиоваскуларне болести (висок крвни притисак, оштећење срца, кардиомиопатија, кардитис, реуматска болест срца), метаболички поремећај (дијабетес, малапсорпција, кахексија и поремећаји ацидо-базне равнотеже), болести штитне жлезде (хипотиреоза и хипертиреоза), болести респираторног тракта (астма), недавне операције и акутне инфекције.

Пред почетак студије, добровољци ће у усменој и писаној форми бити упознати са детаљним протоколом студије. Испитивања ће бити спроведена тек након добијања пристанка у писаној форми, у складу са постулатима Хелсиншке декларације и одобрења Етичког комитета.

Након давања информисане сагласности за учешће у истраживању, испитанице ће попунити међународни упитник о физичкој активности (енгл. *International Physical Activity Questionnaires*, IPAQ) и упитник о историји евентуалних обољења. Након попуњених упитника, испитанице ће приступити антропометријским анализама, интернистичком, ехокардиографском и кардиопулмонарном прегледу. Такође, пре почетка интервенције, испитанице ће водити дневник исхране током два дана, након чега ће добити усмене инструкције о придржавању уобичајеног режима исхране.

Истраживање ће бити спроведено као рандомизована, двоструко слепа, плацебо-контролисана студија. Методом рандомизације испитанице биће распоређене у експерименталну и контролну групу.

Експериментална група добијаће додаток исхрани са хигенамином у укупној дози од 75 mg, док ће контролна група добијати плацебо капсуле идентичних органолептичких особина. Испитанице ће узимати капсуле хигенамина пре оброка, прву капсулу у 8 часова, затим у 13 часова и последњу у 18 часова. Истраживање ће трајати 21 дан.

Испитанице ће бити упућене да одржавају уобичајени режим исхране и тренинга и да воде дневник исхране у току два дана (24 часа пре тестирања). Од испитаница ће се захтевати да се уздрже од узимања дијететских суплемената и других лекова.

У току истраживања планиране су две посете и то:

Посета 1: упознавање испитаница са протоколом студије и увођење у студију, потписивање обрасца информисаног пристанка за учешће у студију, попуњавање IPAQ, мерење антропометријских параметара, мерење крвног притиска, метаболички, интернистички, ехокардиографски и кардиопулмонарни преглед, давање инструкција за попуњавање дневника исхране у току два одвојена дана током трајања студије, прикупљање узорака периферне венске крви у складу са планираним биохемијским анализама. Испитанице ће донети први јутрањи урин и биће упознате се процедуром сакупљања урина током студије. Испитанице ће при посети 1 добити капсуле у тачној количини потребној за

21 дан студије уз упутство да врате све што не попију у циљу бољег праћења просечне комплијансе.

Посета 2: Након 21. дана од почетка студије испитанице ће опет бити подвргнуте мерењу антропометријских параметара, мерењу крвног притиска, као и интернистичком, ехокардиографском и кардиопулмонарном прегледу. Такође, биће прикупљани узорци периферне венске крви у складу са планираним биохемијским анализама. Испитанице ће током ове посете добити и детаљне инструкције о процедури сакупљања комплетног урина у наредних 48 сати. Током ове посете биће извршена евалуација и бележење евентуалних нежељених ефеката, као и провера да ли су редовно користили производ како би се проценила просечна комплијанса (на основу броја враћених капсула).

Испитанице ће сакупљати јутарњи урин током 21 дана, сваког јутра пре прве узете капсуле хигенамина. Након последње орално узете капсуле хигенамина испитанице ће сакупљати целокупну запремину урина наредних 48 сати. У прикупљеним узорцима урина биће дефинисан фармакокинетички профил елиминације хигенамина и његовог главног метаболита коклаурина онлајн чврсто-течном екстракцијом – течном хроматографијом – масеном спектрометријом високе резолуције.

Ethics Committee of the Sports Medicine Association of Serbia in Belgrade 03/15/2019. gave her consent to perform a research study on humans entitled: "The influence of higenamine supplementation on physical performance, cardio-metabolic parameters, dietary habits and biochemical markers in physically active females." as part of the doctoral dissertation plan of candidate Jelena Ožegović.

The research will include healthy female participants in the reproductive period who play basketball recreationally. The criteria for inclusion in the study will be: women with more than > 5 hours of training per week (> 5 h·wk⁻¹), whose VO₂ max is > 30 ml·kg⁻¹·min⁻¹. Exclusion criteria from the study will be: the presence of diseases that can affect metabolism, such as: chronic diseases (neurological, renal, immunological), cardiovascular diseases (high blood pressure, heart damage, cardiomyopathy, carditis, rheumatic heart disease), metabolic disorder (diabetes, malabsorption, cachexia and acid-base balance disorders), thyroid diseases (hypothyroidism and hyperthyroidism), respiratory tract diseases (asthma), recent operations and acute infections.

Before the start of the study, the participants will be informed orally and in writing about the detailed protocol of the study. Tests will be conducted only after obtaining consent in written form, in accordance with the postulates of the Declaration of Helsinki and the approval of the Ethics Committee.

After giving informed consent to participate in the research, the participants will fill out the International Physical Activity Questionnaires (IPAQ) and the history of possible diseases. After completing the questionnaires, the participants will undergo anthropometric parameters, internal medicine, echocardiography and cardiopulmonary examination. Also, before the start of the intervention, the participants will keep a food diary for two days, after which they will receive oral instructions following their usual diet.

The research will be conducted as a randomized, double-blind, placebo-controlled study. Using the method of randomization, the participants will be assigned to an experimental and a control group. The experimental group will receive a dietary supplement with higenamine in a total dose of 75 mg, while the control group will receive placebo capsules with identical organoleptic properties. Participants will take higenamine capsules before meals, the first capsule at 8 am, then at 1 pm and the last at 6 pm. The research will last 21 days.

The participants will be instructed to maintain their usual diet and training regime and

to keep a food diary for two days (24 hours before the test). Participants will be required to refrain from taking dietary supplements and other medications.

During the research, two visits are planned:

Visit 1: introducing the participants to the study protocol and introducing them to the study signing the informed consent form for participation in the study, filling out the IPAQ, measuring anthropometric parameters, measuring blood pressure, metabolic, internal, echocardiographic and cardiopulmonary examination, giving instructions for filling in a food diary on two separate days during the duration of the study, collection of peripheral venous blood samples in accordance with the planned biochemical analyses. Participants will bring their first morning urine and will be familiarized with the urine collection procedure during the study. At visit 1, the participants will receive capsules in the exact amount needed for the 21 days of the study, with the instruction to return everything they do not drink in order to better monitor average compliance.

Visit 2: After the 21st day from the start of the study, the participants will again undergo measurement of anthropometric parameters, measurement of blood pressure, as well as internist, echocardiographic and cardiopulmonary examination. Also, peripheral venous blood samples will be collected in accordance with the planned biochemical analyses. During this visit, the participants will also receive detailed instructions on the procedure for collecting complete urine in the next 48 hours. During this visit, an evaluation and recording of possible side effects will be carried out, as well as checking whether they have used the product regularly in order to estimate the average compliance (based on the number of returned capsules).

Participants will collect morning urine for 21 days, every morning before taking the first higenamine capsule. After the last higenamine capsule taken orally, the participants will collect the entire volume of urine for the next 48 hours. In the collected urine samples, the pharmacokinetic profile of the elimination of higenamine and its main metabolite coclaurin will be defined by online solid-liquid extraction - liquid chromatography - high resolution mass spectrometry.

Материјал за дијетарну интервенцију / Material for dietary intervention

У студији ће бити коришћен дијететски суплемент који ће бити набављен *онлајн*, преко сајта који се бави продајом дијететских суплемената. Према спецификацији произвођача, капсуле ће садржати само хигенамин као активни састојак и микрокристалну целулозу као ексципијенс. За потребе студије фармацеутска компанија Есенса (Essensa, Београд, Србија) произвешће плацебо капсуле (100% чистоће). Како би се постигло да капсуле за интервентну и плацебо групу имају идентичан изглед, компанија Есенса ће препаковати капсуле за интервентну групу на начин да се добије исти изглед капсула као за плацебо групу, а коришћене капсуле ће бити од хидроксипропилметилцелулозе.

The study will use a dietary supplement that will be purchased online, through a website that sells dietary supplements. According to the manufacturer's specification, the capsules will contain only higenamine as an active ingredient and microcrystalline cellulose as an excipient. For the purposes of the study, the pharmaceutical company Essensa (Essensa, Belgrade, Serbia) will produce placebo capsules (100% pure). In order to achieve that the capsule for the intervention group and the placebo group have an identical appearance, the company Essensa will repackage the capsules for the intervention group in

such a way as to obtain the same appearance of the capsules as for the placebo group, and the capsules used will be made of hydroxypropylmethylcellulose.

Узорковање биолошког материјала и методе / Sampling of biological material and methods

Планирано је да се узорковање крви и доношење првог јутарњег урина испитаница спроведе у просторијама Бео-лаб лабораторије у Београду. Узорци периферне венске крви биће сакупљени стандардним поступком венепункције из предње кубиталне вене након ноћног гладовања од 12 сати, у периоду између 7:00 и 9:00 сати, како би се избегле дневне варијације биохемијских параметара. Биолошки материјал (венску крв) испитаника узорковаће лиценцирани лабораторијски техничари биохемијске лабораторије Бео-лаб у Београду. Узорковање крви вршиће се пре почетка студије и након завршетка студије (након 21 дана). Користиће се затворен систем за узорковање (холдер, игле и вакутејнери) произвођача Бектон Дикинсон. Користиће се игле промера 22 SWG (енгл. *Standard Wire Gauge*).

Венска крв ће се сакупљати вакутајнер системима (3mL) са ди-калијум етилендиаминотетрасирћетном киселином (K_2EDTA) и вакутејнерима са серум сепаратор гелом (10 mL) (BD Vacutainer R SST™ II Advance tube) за добијање серума. За потребе одвајања серума, узорци крви ће након периода потребног за коагулацију (до 30 минута), бити центрифугирани 10 минута на 3000 обротаја/минути на собној температури, коришћењем стоне центрифуге (LACE32, COLO lab experts, Slovenia). Серуми ће бити подељени у два аликвота. Узорци венске крви сакупљени са K_2EDTA и један аликвот серума биће анализирани истог дана, док ће други аликвот серума (3 mL) бити замрзнут на температури од $-80\text{ }^\circ\text{C}$ до анализе. Први јутарњи урини биће преливени у стерилне пластичне епрувете (10 mL) (SARSTEDT AG & Co. KG, Немачка) и одложени у замрзивач на температуру од $-20\text{ }^\circ\text{C}$ до анализе. Током 21 дана испитанице ће сакупљати јутарње урине, бележити запремине и одлагати у замрзивач. Након завршетка студије испитанице ће сакупљати целокупну запремину урина наредних 48 часова.

Узорци серума и венске крви сакупљене са K_2EDTA биће анализирани у медицинско-биохемијској лабораторији Бео-лаб, у Београду. У узорцима венске крви сакупљеним са K_2EDTA биће анализирани параметри комплетне крвне слике на потпуно аутоматизованом хематолошком бројачу (Sysmex XT1800i, Sysmex, Japan) методом флуоресцентне проточне цитометрије (енгл. *fluorescence flow cytometry, FFC*).

Узорци серума биће анализирани на биохемијском модулу Роцхе ц501 који је саставни део интегрисаног анализатора (Cobas R 6000 Roche Diagnostics, Germany) стандардизованим спектрофотометријским методама употребом комерцијалних реагенаса произвођача Roche за параметре: глукоза, уреа, креатинин, аспартат аминотрансфераза (AST), аланин аминотрансфераза (ALT), гама-глутамилтрансфераза (GGT), креатин киназа (СК), укупан холестерол, HDL холестерол, LDL холестерол и триглицериди.

У делу узетих узорака биолошког материјала у лабораторијама Института за медицинска истраживања, у Центру изузетне вредности у области истраживања исхране и метаболизма у Београду, вршиће се одређивање укупних слободних масних киселина гасном хроматографијом (Shimadzu 2014, Kyoto, Japan) и анализа маснокиселинског

профила фосфолипида серума гасно-течном хроматографијом (Shimadzu 2014, Kyoto, Japan).

It is planned that blood sampling and taking the first morning urine of the participant will be carried out in the department of the Beo-lab laboratory in Belgrade. Peripheral venous blood samples will be collected by standard venipuncture procedure from the anterior cubital vein after a 12-hour overnight fast, between 7:00 and 9:00 a.m., in order to avoid diurnal variations in biochemical parameters. The biological material (venous blood) of the participants will be sampled by licensed laboratory technicians of the biochemical laboratory Beo-lab in Belgrade. Blood sampling will be done before the start of the study and after the end of the study (after 21 days). A closed sampling system (holder, needles and vacuum containers) manufactured by Becton Dickinson will be used. 22 SWG (Standard Wire Gauge) needles will be used.

Venous blood will be collected using vacutainer systems (3 mL) with dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid (K₂EDTA) and vacutainers with serum separator gel (10 mL) (BD Vacutainer R SST™ II Advance tube) to obtain serum. For the purpose of serum separation, after the period required for coagulation (up to 30 minutes), the blood samples will be centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm/minute at room temperature, using a table centrifuge (LACE32, COLO lab experts, Slovenia). The serum will be divided into two aliquots. Venous blood samples collected with K₂EDTA and one aliquot of serum will be analyzed on the same day, while the other aliquot of serum (3 mL) will be frozen at –80 °C until analysis. The first morning urine will be poured into sterile plastic tubes (10 mL) (SARSTEDT AG & Co. KG, Germany) and stored in a freezer at a temperature of –20 °C until analysis. During 21 days, the participants will collect morning urine, record the volume and store it in the freezer. After the end of the study, the participants will collect the entire volume of urine for the next 48 hours.

Serum and venous blood samples collected with K₂EDTA will be analyzed in the medical-biochemical laboratory Beo-lab, in Belgrade. In the venous blood samples collected with K₂EDTA, the parameters of the complete blood count will be analyzed on a fully automated hematology counter (Sysmex XT1800i, Sysmex, Japan) using the fluorescence flow cytometry (FFC) method.

Serum samples will be analyzed on the biochemical module Roche c501, which is an integral part of the integrated analyzer (Cobas R 6000 Roche Diagnostics, Germany) by standardized spectrophotometric methods using commercial reagents manufactured by Roche for the following parameters: glucose, urea, creatinine, AST, ALT, GGT, CK, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides.

In part of the biological material samples taken in the laboratories of the Institute for Medical Research, in the Centre of Research Excellence in nutrition and metabolism in Belgrade, the determination of total free fatty acids will be performed by gas chromatography (Shimadzu 2014, Kyoto, Japan) and the analysis of the fatty acid profile of serum phospholipids by gas-liquid chromatography (Shimadzu 2014, Kyoto, Japan).

Антропометријски параметри / Anthropometric parameters

У ординацији за спортеку медицину „Vita maxima“, у Београду, након узроковања биолошког материјала, испитанице ће бити подвргнуте мерењу антропометријских параметара (телесна маса, телесна висина, обим струка), евалуацији телесне структуре (процент масти у организму, одређивању индекса телесне масе (енгл. *body mass index*,

BMI), базалног метаболизма, (енгл. *Basal Metabolic Rate, BMR*) и енергетске потрошње у мировању (енгл. *Resting Metabolic Rate, RMR*).

Евалуација телесне структуре ће се вршити помоћу ваге BC-418MA (Tanita, Tokyo, Japan). Телесна маса и телесна структура (процент масног ткива, маса масног ткива, маса мишићног ткива, безмасна маса тела) ће се мерити помоћу ваге BC-418MA која израчунава наведене параметре на основу биоелектричне импеданце.

Потрошња енергије у мировању (*RMR*), биће одређивана индиректном калориметријом користећи метаболички десктоп монитор Fitmate PRO (Fitmate, COSMED, Italy) на основу потрошње кисеоника (VO_2) у мировању.

In the "Vita Maxima" sports medicine practice in Belgrade, after the biological material has been collected, the participants will be subjected to the measurement of anthropometric parameters (body weight, body height, waist circumference), evaluation of the body structure (percentage of fat in the body, determination of the body mass index (body mass index, BMI), basal metabolism (Basal Metabolic Rate, BMR) and energy consumption at rest (Resting Metabolic Rate, RMR).

Body composition evaluation will be performed using a BC-418MA scale (Tanita, Tokyo, Japan). Body mass and body structure (percentage of fat tissue, fat tissue mass, muscle tissue mass, lean body mass) will be measured using a BC-418MA scale that calculates the specified parameters based on bioelectrical impedance.

Energy consumption at rest (RMR) will be determined by indirect calorimetry using a metabolic desktop monitor Fitmate PRO (Fitmate, COSMED, Italy) based on oxygen consumption (VO_2) at rest.

Интернистички преглед / Internal medicine examination

Интернистички преглед испитаника обухватиће поред ЕКГ записа, анамнезу, клинички преглед и мерење крвног притиска. За добијање ЕКГ записа користиће се електрокардиограф Fukuda Denshi FX-7202 (Fukuda Denshi, Tokyo, Japan).

The internist examination of the participants will include, in addition to ECG records, medical history, clinical examination and blood pressure measurement. A Fukuda Denshi FX-7202 electrocardiograph (Fukuda Denshi, Tokyo, Japan) will be used to obtain ECG records.

Ехокардиографски преглед / Echocardiographic examination

Стандардна 2D ехокардиографија биће урађена пре суплементације хигенамином и 21 дан након суплементације коришћењем апарата (Logiq 5, General Electric, United States).

Standard 2D echocardiography will be performed before higenamine supplementation and 21 days after supplementation using analyzer (Logiq 5, General Electric, United States).

Кардиопулмонално тестирање – ергоспирометрија (СПЕТ) - Одређивање максималног аеробног капацитета / Cardiopulmonary testing - ergospirometry (CPET) - Determination of maximum aerobic capacity

Кардиопулмонално тестирање биће изведено на траци за трчање (T-140, Cosmos, Germany) два пута (пре и после студије). Интензитет трчања ће се прогресивно повећавати док ће концентрације кисеоника и угљен-диоксида бити мерене у удахнутом и издахнутом ваздуху. Мерење размене гасова у даху (енгл. *breath-by-breath*) биће анализирано на метаболичком апарату (Quarck b2, COSMED, Italy). Вентилаторни анаеробни праг (VAT) одређиваће се помоћу нагиба “V-slope” метаболичким порастом угљен-диоксида (VCO₂) у односу на потрошњу кисеоника VO₂.

Cardiopulmonary testing will be performed on a treadmill (T-140, Cosmos, Germany) twice (before and after the study). The intensity of running will be progressively increased while the concentrations of oxygen and carbon dioxide will be measured in inhaled and exhaled air.

Breath-by-breath measurement will be analyzed on a metabolic cart (Quarck b2, COSMED, Italy). Ventilatory Anaerobic Threshold (VAT) will be determined using the “V-slope” by the metabolic increase in carbon dioxide (VCO₂) in relation to oxygen consumption VO₂.

Анализа дневника исхране / Analysis of food diaries

Анализа дневника исхране биће извршена коришћењем базе података намирница - CapNutra (Food Composition Database). / *Analysis of food diaries will be performed using CapNutra (Food Composition Database) software.*

Одређивање хигенамина у урину Online SPE-LC-HRMS методом / Determination of higenamine in urine using *online* SPE LC-HRMS

Одређивање садржаја хигенамина и коклаурина биће урађена на систему Vanquish Horizon UHPLC спојеним са Q-Exactive Orbitrap масеним спектрометром високе резолуције (Thermo Fisher, Austin, USA). Развијена *online* SPE-LC-HRMS метода валидираће се према важећим смерницама ВАДА Интернационалног стандарда за лабораторије (енгл. *International Standard for Laboratories, ISL*) (WADA ISL, 2021).

The determination of higenamine and coclaurine content will be performed on a Vanquish Horizon UHPLC system coupled with a high-resolution Q-Exactive Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher, Austin, USA). The developed online SPE-LC-HRMS method will be validated according to the current guidelines of the WADA International Standard for Laboratories (WADA ISL, 2021).

Статистичка анализа / Statistical analysis

Статистичком анализом *a priori* применом софтвера *G*-Power 3.1.9.2*, израчунато је да је при $\alpha=0.05$ и $\beta=0.81$, потребно укључити укупно 27 испитаница, рандомизовано распоређених у експерименталну и контролну групу еквивалентног броја чланова.

Предвиђени број испитаника сагласан је са другим истраживањима у којима је испитиван утицај хигенамина на различите параметре телесне структуре и одређиван хигенамин у хуманом урину (Lee et al., 2013; Yan et al., 2019;).

Обрада података вршиће се *SPSS* софтвером (*SPSS v. 21.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA*). Расподела података по групама ће бити анализирана *Shapiro-Wilk* тестом нормалности расподеле. У зависности од нормалности расподеле података разлика између група биће анализирана Студент *t*-тестом или *Mann-Whitney U* тестом, а корелације ће бити испитиване *Pearson*-овим или *Spearman*-овом корелационом анализом.

By a priori statistical analysis using the G-Power 3.1.9.2 software, it was calculated that at $\alpha=0.05$ and $\beta=0.81$, it is necessary to include a total of 27 participants, randomly assigned to experimental and control groups of equivalent number of members.*

The predicted number of participants agrees with other studies in which the influence of higenamine on various body structure parameters was investigated and higenamine was determined in human urine (Lee et al., 2013; Yan et al., 2019).

Data processing will be done with SPSS software (SPSS v. 21.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The distribution of data by group will be analyzed by the Shapiro Wilk test of normality of distribution. Depending on the normality of data distribution, the difference between groups will be analyzed with the Student t-test or Mann-Whitney U test, and correlations will be examined with Pearson's or Spearman's correlation analysis.

Место спровођења истраживања / Place of conducting research

Истраживање ће се спроводити у оквиру следећих установа:

1. Катедра за броматологију, Фармацеутски факултет, Универзитет у Београду, Србија;
2. Поликлиника Бео-лаб, биохемијска лабораторија, Београд;
3. Ординација за спортску медицину „Vita maxima“, Београд;
4. Центар изузетне вредности у области исхране и метаболизма (CENM), Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду, Београд, Србија;
5. Лабораторија за допинг контролу, Seibersdorf Labor GmbH, Сајберсдорф Лабораторије, Аустрија.

The research will be conducted within the following institutions:

1. *Department of Bromatology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Serbia;*
2. *Polyclinic Beolab, biochemical laboratory, Belgrade;*
3. *Practice for sports medicine "Vita maxima ", Belgrade;*
4. *Center of Research Excellence in Nutrition and Metabolism (CENM), Institute for Medical Research, National Institute of Republic of Serbia, University of Belgrade, Belgrade;*
5. *Doping control laboratory, Seibersdorf Labor GmbH, Seibersdorf Laboratories, Austria.*

6. Литература / References

Ahmadian M and Mohsen EM (2022). Evaluation of the Prevalence of Dietary Supplements and Weight Loss Drugs Usage by Recreational Athletes in Fars, Iran. *J Health Sci Surveillance Sys.* 10:3

Australian Institute of Sport. Available online at: <https://www.ais.gov.au/nutrition/supplements> (accessed December 26, 2023).

Bloomer RJ, Schriefer JM, and Gunnels TA (2015). Clinical safety assessment of oral higenamine supplementation in healthy, young men. *Hum. Exp. Toxicol.* 34:935–945.

Charoonratana T, Songsak T, Monton C, Saingam W, Bunluepuech K, Suksaeree J et al (2014). Quantitative analysis and formulation development of a traditional Thai antihypertensive herbal recipe, *Phytochem. Rev.* 13:511–524.

Cohen PA, Travis JC, Keizers PHJ, Boyer FE, and Venhuis BJ (2019). The stimulant higenamine in weight loss and sports supplements. *Clin. Toxicol.* 57:125–130.

Djordjevic B, Stojanovic B, Baralic I. *Sportska farmacija, odabrana poglavlja I. Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu*, 2016.

Feng S, Jiang J, Hu P, Zhang JY, Liu T, Zhao Q, et al (2012). A phase I study on pharmacokinetics and pharmacodynamics of higenamine in healthy Chinese subjects. *Acta Pharm. Sinica* 33:1353–1358.

Feng YR, Wang B, Li GJ, Kang WJ, Lian KQ, and Lu XL (2020). Determination of higenamine in multi-matrix by gas chromatography-mass spectrometry combined with derivatization technology. *J. Food Drug Anal.* 28:124–131.

Guo C, Zhang N, Zhang X, Chi M, Liu D, and Zhang J (2020). Use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of higenamine in urine following oral administration of traditional Chinese medicine. *Drug Test Anal.* 14(8):1547-1552

Grucza K, Kwiatkowska D, Kowalczyk K, Wicka M, Szutowski M, and Cholbinski P (2018). Analysis for higenamine in urine by means of ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Interpretation of results. *DrugTest. Anal.* 10:1017–1024.

Grucza K, Kowalczyk K, Wicka M, Szutowski M, Bulska E, and Kwiatkowska D (2019). The use of valid and straightforward method for the identification of higenamine in dietary supplements in view of the anti-doping rule violation cases. *Drug Test. Anal.* 11(6):912-917

Hostrup M, Jacobson GA, Jessen S, and Lemminger AK (2020). Anabolic and lipolytic actions of beta₂-agonists in humans and antidoping challenges. *Another Test. Anal.* 12:597–609.

Jagim AR, Camic CL, and Harty PS (2019). Common Habits, Adverse Events, and Opinions Regarding Pre-Workout Supplement Use Among Regular Consumers. *Nutrients* 11:11040855.

Jedrejko K, Lazur J, and Muszynska B (2021). Risk associated with the use of selected ingredients in food supplements. *Chem. Biodiv.* 18: e2000686

Kato E, Kimura S, and Kawabata J (2017). Ability of higenamine and related compounds to enhance glucose uptake in L6 cells. *Bioorg Med. Chem.* 25:6412–6416.

Kozhuharov VR, Ivanov K, and Ivanova S (2022). Higenamine in Plants as a Source of Unintentional Doping. 354:1-17

Leaney AE, Heath J, Midforth E, Beck P, Brown P, and Mawson DH. Presence of higenamine in beetroot containing ‘foodstuffs’ and the implication for WADA-relevant anti-doping testing. *Drug Test. Anal.* 15:173-180.

Lee SR, Schriefer JM, Gunnels TA, Harvey IC, and Bloomer RJ (2013). Acute oral intake of a higenamine-based dietary supplement increases circulating free fatty acids and energy expenditure in human subjects. *Lipids Health Dis.* 12:148.

Lin Y, Yang R, Guan Z, Chen A, and Li W (2014). Ultra-performance LC separation and quadrupole time-of-flight MS identification of major alkaloids in plumula nelumbinis, *Phytochem.* 25(6):485-94.

Lo CF, and Chen CM (1996). Pharmacokinetics of higenamine in rabbits. *Biopharm . Comrade Disposit.* 17:791–803.

Muniz-Santos R, Avezum J, Abidao-Neto B, and Cameron LC (2023). Dietary higenamine from Annonacea family fruits as a possible source of unintentional doping. *Forensic Sci. Int.* 342: 111539.

Nedeljković I, Mazić S, Žugić V, Giga V, Dekleva M, Popović D, Stepanović J (2012). Klinička primena kardiopulmonalnog testa fizičkim opterećenjem u savremenoj kardiologiji i posebnim grupama bolesnika. *Srce i krvni sudovi*; 31(3): 166-173

Okano M, Sato M, and Kageyama S (2017). Determination of higenamine and coclaurine levels in human urine after the administration of a throat lozenge containing *Nandina domestica* fruit. *Another Test. Anal.* 9:1788–1793.

Riiser A, Stensrud T, Stang J, and Andersen LB (2020). Can β 2-agonists have an ergogenic effect on strength, sprint, or power performance? *Syst. rev. metaanalysis of RCTs.* No. *J. Sports Med.* 54:1351–1359.

Rubio A, Thomas A, Euler L, Geyer H, Krug O, Reis G et al (2023). Investigations into *Annona* fruits as a potential source of dietary higenamine intake in the context of sports drug testing. *Drug Test. Anal.* 15(11-12):1488-1502

Stajic A, Anđelković M, Dikić N, Rasić J, Vukasinović-Vešić M, Ivanović D (2017). Determination of higenamine in dietary supplements by UHPLC/MS/MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 146:48–52.

WADA, 2017. Prohibited List 2017. Available online at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2016-09-29_-_wada_prohibited_list_2017_eng_final.pdf (accessed December 26, 2023)

WADA, 2021. World Anti-Doping Code 2021. Available online at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021_wada_code.pdf (accessed December 26, 2023).

WADA ISL, 2021. World Anti-Doping Agency, International Standard for Laboratories (ISL), (nd). Available online at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/isl_2021.pdf (accessed December 28, 2023).

WADA, 2022. World Anti-Doping Agency, TD2022MRPL – Minimum required performance levels and applicable minimum reporting levels for non-threshold substances analyzed by chromatographic – mass spectrometric analytical methods; Available online at: https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/td2022mrpl_v1.1_eng_0.pdf (accessed December 26, 2023)

Wang R, Xiong X, Yang M, He S, and Xu X. (2020). A pharmacokinetics study of orally administered higenamine in rats using LC-MS/MS for doping control analysis. *Another Test. Anal.* 12:485–495.

Yan K, Wang X, Wang Z, Wang Y, Luan Z, Gao X, et al (2019). The risk of higenamine adverse analytical findings following oral administration of plumula nelumbinis capsules. *Another Test. Anal.* 11:1731–1736.

Yen CC, Tung C, Chang CW, Tsai CC, Hsu MC, and Wu YT (2020). Potential Risk of Higenamine Misuse in Sports: Evaluation of Lotus Plumule Extract Products and a Human Study. *Nutrients* 12:1202085.

Zhang N, Lian Z, Peng X, Li Z, and Zhu H (2017). Applications of Higenamine in pharmacology and medicine. *J. Ethnopharm.* 196:242–252.

Zhao X, Yuan Y, Wei H, Fei Q, Luan Z, Wang X, Xu Y, and Lu J (2022). Identification and characterization of higenamine metabolites in human urine by quadrupole-orbitrap LC-MS/MS for doping control. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 214:11473

7. Очекивани резултати / *The expected results*

У складу са задатим циљевима и планираном методологијом, очекују се следећи резултати:

- 1) Процена утицаја суплементације хигенамином на спортске перформансе код жена које се рекреативно баве кошарком;
- 2) Процена утицаја суплементације хигенамином на енергетску потрошњу у мировању (RMR);
- 3) Процена утицаја суплементације хигенамином на серумски профил масних киселина код жена које се рекреативно баве кошарком;
- 4) Процена утицаја суплементације хигенамином на параметре крвне слике, параметре функције јетре, биохемијске параметре, параметре крвног притиска, кардиопулмонарне и ехокардиографске параметре код жена које се рекреативно баве кошарком;
- 5) Развој и валидација нове, брзе, високо осетљиве методе (online SPE-LC/HRMS) за одређивање хигенамина и коклаурина у урину.
- 6) Дефинисање екскреционог профила хигенамина и његовог метаболита коклаурина у урину након пер ос администрације хигенамином, чиме ће се проширити знања о времену задржавања хигенамина у организму, као и добити информације о интериндивидуалном варирању процеса елиминације.

In accordance with the goals and the planned methodology, the following results are expected:

- 1) *Assessment of the influence of higenamine supplementation on sports performance in physically active females;*
- 2) *Assessment of the influence of higenamine supplementation on energy consumption at rest;*
- 3) *Assessment of the influence of higenamine supplementation on the serum fatty acid in physically active females;*
- 4) *Assessment of the influence of higenamine supplementation on blood count parameters, liver function parameters, biochemical parameters, blood pressure parameters, cardiopulmonary and echocardiographic parameters in physically active females;*
- 5) *Development and validation of a new, rapid, highly sensitive method (online SPE-LC/HRMS) for the determination of higenamine and coclaurine in urine.*
- 6) *Defining the excretory profile of higenamine and its metabolite coclaurine in the urine after oral supplementation with higenamine, which will expand knowledge about the retention time of the higenamine in the body, as well as obtain information on the interindividual variation of the elimination process.*

Г. Име и одабране референце предложених ментора / Name and selected references of proposed mentors

Др сци. Брижита Ђорђевић - редовни професор, Катедра за броматологију, Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет
professor, Department of Bromatology, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy

1. Michalickova DM, Kostic-Vucicevic MM, Vukasinovic-Vesic MD, Stojmenovic TB, Dikic NV, Andjelkovic MS, **Djordjevic BI**, Tanaskovic BP, Minic RD. Lactobacillus helveticus Lafti L10 supplementation modulates mucosal and humoral immunity in elite athletes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of Strength & Conditioning Research*. 2017 Jan 1;31(1):62-70.
2. Michalickova D, Minic R, Dikic N, Andjelkovic M, Kostic-Vucicevic M, Stojmenovic T, Nikolic I, **Djordjevic B**. Lactobacillus helveticus Lafti L10 supplementation reduces respiratory infection duration in a cohort of elite athletes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*. 2016;41(7):782-9.
3. Dodevska MS, Sobajic SS, Djordjevic PB, Dimitrijevic-Sreckovic, VS, Spasojevic-Kalimanovska VV, **Djordjevic BI**. Effects of total fibre or resistant starch-rich diets within lifestyle intervention in obese prediabetic adults. *European journal of nutrition*. 2015;55(1):127–137
4. Baralic I, Andjelkovic M, **Djordjevic B**, Dikic N, Radivojevic N, Suzin-Zivkovic V, Pejic S. Effect of Astaxanthin Supplementation on Salivary IgA, Oxidative Stress, and Inflammation in Young Soccer Players. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015; 1–9.
5. Baralic I, **Djordjevic B**, Dikic N, Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Jelic-Ivanovic Z, Radivojevic N, Andjelkovic M, Pejic S. Effect of Astaxanthin Supplementation on Paraoxonase 1 Activities and Oxidative Stress Status in Young Soccer Players. *Phytother. Res*. 2013; 27:1536–1542

Др сци. Forsdahl Guro - редовни професор, Катедра за фармацију, Универзитет у Тромсоу, Арктички универзитет Норвешке
professor, Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Tromsø (UiT), The Arctic University of Norway

1. Göschl L, Gmeiner G, Gärtner P, Steinacher M, **Forsdahl G**. Detection of DHCMT long-term metabolite glucuronides with LC-MSMS as an alternative approach to conventional GC-MSMS analysis. *Steroids*. 2022;180.
2. **Forsdahl G**, Zanitzer K, Erceg D, and Gmeiner G. Quantification of endogenous steroid sulfates and glucuronides in human urine after intramuscular administration of testosterone esters. *Steroids*, 2020.
3. **Forsdahl G**, Jančić-Stojanović B, Anđelković M, Dikić N, Geisendorfer T, Jeitler V, and Gmeiner G. Urinary excretion studies of meldonium after multidose parenteral application. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018. 161: p. 289-295.DOI:
4. **Forsdahl G.**, Erceg D, Geisendorfer T, Turkalj M, Plavec D, Thevis M, Tretzel L, and Gmeiner G. Detection of testosterone esters in blood. *Drug Testing and Analysis*, 2015. 7(11-12): p. 983-989.
5. **Forsdahl G**, Johnsgaard T, Geisendorfer T, Kainzbauer J, and Gmeiner G. Evaluation of the influence of grapefruit juice on the endogenous urinary steroid profile, in *Recent Advances in Doping Analysis (23)*, W. Schänzer, et al., Editors. 2015, Sport und Buch Strauß: Cologne, Germany. ISBN: ISBN 978-3-86884-041-4.

Д. Закључак и предлог / Conclusions and recommendation

На основу приложене документације и на основу увида у досадашњи рад кандидаткиње, комисија закључује да кандидаткиња Јелена Ожеговић испуњава све услове за израду докторске дисертације и да је предложена тема научно заснована, оригинална и актуелна. Циљеви предложеног истраживања су јасно дефинисани и остварљиви, док су методе рада савремене и одговарајуће.

Чланови Комисије предлажу Наставно-научном већу Фармацеутског факултета и Већу научних области медицинских наука Универзитета у Београду да прихвати мишљење Комисије и кандидату одобри израду докторске дисертације под насловом: *Утицај суплементације хигенамином на физичке перформансе, кардио-метаболичке параметре, дијетарне навике и биохемијске маркере код жена које се рекреативно баве спортом.*

Based on the attached documentation and on the basis of an insight into the candidate's previous work, the committee concludes that the candidate Jelena Ožegović meets all the requirements for the preparation of a doctoral thesis and that the proposed subject is scientifically based, original and current. The goals of the proposed research are clearly defined and achievable, while the work methods are modern and appropriate.

The members of the Commission propose to the Academic Council of the University of Belgrade - Faculty of Pharmacy and the Council of Scientific Fields of Medical Sciences of the University of Belgrade to accept the Commission's opinion and approve the candidate's doctoral thesis entitled: The influence of higenamine supplementation on physical performance, cardio-metabolic parameters, dietary habits and biochemical markers in physically active females.

У Београду / In Belgrade
25.04.2024.

Чланови комисије / Committee Members:

Др сци. Ивана Недељковић / Dr sci. Ivana Nedeljković
редовни професор, Универзитет у Београду - Медицински факултет
professor, University of Belgrade - Faculty of Medicine

Др сци. Зоран Максимовић / Dr sci. Zoran Maksimović
редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
professor, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy

Др сци. Данијела Ристић-Медић / Dr sci Danijela Ristić-Medić
научни саветник, Универзитет у Београду - Институт за медицинска истраживања
principal research fellow, University of Belgrade - Institute for Medical Research

Др сци. Неда Милинковић / Dr sci. Neda Milinković
доцент, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
assistant professor, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy

Др сци. Невена Ивановић / Dr sci. Nevena Ivanović
ванредни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
associate professor, University of Belgrade - Faculty of Pharmacy



Етички комитет
Проф. др Слободан Живанић
Проф. др Ненад Дикић
Др.сци Марија Анђелковић, професор

Удружење за медицину спорта Србије
Палмотићева 26, 11000 Београд, Србија

15.03.2019.

Предмет: Студија–„Утицај суплементације хигенамином на физичке перформансе, кардио-метаболичке параметре, дијетарне навике и биохемијске маркере код жена које се рекреативно баве спортом“

Сви чланови етичког комитета су били присутни.

Етички комитет је 15.03.2019. заседао поводом молбе Јелене Рашић главног истраживача наведене студије и донео је следећу одлуку:

ОДЛУКА

Студија: –„Утицај суплементације хигенамином на физичке перформансе, кардио-метаболичке параметре, дијетарне навике и биохемијске маркере код жена које се рекреативно баве спортом“ се одобрава

Етичком комитету су достављени следећи документи:

- План студије
- Информативни пристанак учесника
- Подаци о главном истраживачу, сарадницима и установама у којима ће се студија изводити
- Коришћени упитници



Проф. др Слободан Живанић

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET
03 br. 4/57
13.09.2021. godine

Na osnovu člana 107. Zakona o visokom obrazovanju Republike Srbije, prodekan Fakulteta je dana 13.09.2021. godine, donela

REŠENJE

ODOBRAVA se Jeleni Ožegović, studentu Farmaceutskog fakulteta, indeks br. 9/18, mirovanje prava i obaveza studenta za školsku 2021/22 godinu.

Obrazloženje

Jelena Ožegović, student na studijskom programu DAJ - Bromatolog, podneo je zahtev 03 br. 4/57 od 13.9.21. godine prodekanu za nastavu Fakulteta da mu se odobri mirovanje prava i obaveza za školsku 2021/22 godinu. Uz molbu je priložio odgovarajuću dokumentaciju.

Prodekan Fakulteta je razmatrala zahtev 13.09.2021. godine i ocenila da je zahtev osnovan, te je doneto rešenje kao u dispozitivu.

PRAVNA POUKA: Protiv ovog rešenja imenovani ima pravo prigovora dekanu Fakulteta u roku od 8 (osam) dana od dana prijema istog.

Rešenje dostaviti: Imenovanom, dekanu, prodekanu za nastavu, sekretaru, Odseku za nastavu i studentska pitanja i arhivi.

PRODEKAN ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU
I KONTINUIRANU EDUKACIJU

Prof. dr Sandra Vezmar Kovačević



Београд
11000 Београд
Бр. 072/3
Датум: 25.09.2024.

На основу члана 19. Правилника о раду Етичког комитета за биомедицинска истраживања Фармацеутског факултета у Београду, Етички комитет за биомедицинска истраживања Фармацеутског факултета у Београду на седници одржаној 24.9.2024. године, донео је

ОДЛУКУ

ДАЈЕ СЕ САГЛАСНОСТ за спровођење истраживања под називом: „Утицај суплементације хигенамином на физичке перформансе, кардиометаболичке параметре, дијетарне навике и биохемијске маркере код жена које се рекреативно баве спортом“, у циљу израде докторске дисертације. Ментори ове докторске дисертације су проф. др Брижита Ђорђевић, редовни професор на Катедри за Броматологију Универзитета у Београду - Фармацеутског факултета и проф. др Guro Forsdahl, Professor, Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, University of Tromsø The Arctic University of Norway.

Молбу за давање сагласности поднела је магистар фармације – медицински биохемичар Јелена Ожеговић.

Одлуку доставити: подносиоцу захтева, ментору, председнику Комитета, секретару, шефу Одсека за правне и опште послове, Одсеку за наставу и студентска питања и Архиви.



ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ КОМИТЕТА
ЗА БИОМЕДИЦИНСКА ИСТРАЖИВАЊА
Проф. др Иван Станковић
Ivan Stanekovic' Aleksandra