

OKSIDACIJSKI STRES U UVJETIMA INTENZIVNOG FIZIČKOG NAPORA U LJUDI I ŽIVOTINJA

**Ida Parčetić - Kostelac, Bešlo D., Marcela Šperanda, Kopačin T.,
Jozinović A., Jović T., Đidara M.**

Sažetak

Poremećaj ravnoteže u organizmu između proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala (ROS) i antioksidansa nazivamo oksidacijskim stresom. Do pomaka ravnoteže dolazi ukoliko je smanjena antioksidacijska obrana organizma ili ako je povećano stvaranje slobodnih radikala. Antioksidansi su sve one tvari koje u maloj količini u kratkome vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidansa. Oni nastaju u stanici ili se u organizam unose hranom ili u obliku dodataka. Antioksidansi onemogućuju stvaranje slobodnih radikala u organizmu, uništavaju stvorene slobodne radikale ili popravljaju oštećenja u stanici nastala djelovanjem slobodnih radikala. U radu su prikazani biomarkeri oksidacijskog stresa u ljudi i životinja, prema podjeli na enzimске, neenzimске, te ostale biomarkere s naglaskom na biomarkere umora perifernih mišića. Biomarkeri umora perifernih mišića u ljudi i životinja su markeri staničnog mišićnog oštećenja i pokazatelji mišićnog stresa, a koriste se za uvid u mehanizme iscrpljenosti tijekom vježbanja kako bi se otkrio povećani umor ili se otkrili manjkavi metabolički putevi. Utvrđivanje oksidacijskog stresa važno je zbog mogućnosti pravovremenog uključivanja antioksidacijskih tvari koji povećavaju antioksidacijski kapacitet ljudskog i životinjskog organizma.

Ključne riječi: oksidacijski stres, antioksidansi, biomarkeri, fizička aktivnost, mišićni umor

Uvod

Oksidacijski stres označava poremećaj ravnoteže prooksidacijskog i antioksidacijskog sustava (Sies, 1997; Fisher-Wellman i Bloomer, 2009) u korist prooksidacijskog sustava. Maršić (2005) smatra da je oksidacijski stres, ako se ne kompenzira, jedan od najvažnijih razloga oštećenja funkcija svih stanica, pa i stanica imunskog sustava. Antioksidansi su sve one tvari koje u maloj količini u kratkome vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidansa (Bradamante, 2002). Stanković i Radovanović (2012) smatraju da fizička aktivnost dovodi do povećanja stvaranja reaktivnih oblika kisika što može dovesti do oštećenja stanica, ali točna povezanost fizičke aktivnosti, stresnih proteina i reaktivnih oblika kisika još uvijek je nepoznata.

Netrenirane osobe, za razliku od utreniranih, podložnije su većim promjenama u organizmu, uzrokovanim oksidacijskim stresom pri fizičkoj aktivnosti (Stanković i Radovanović, 2012). Hinchcliff i sur. (2003) u svojoj studiji zaključuju da natjecanje nordijskih pasa u dugim utrckama saonicama, uključujući produljenu i ponovljenu submaksimalnu vježbu, rezultira smanjenjem enzimске antioksidacijske aktivnosti u krvi trkaćih pasa i povećanjem stupnja oštećenja mišićnog tkiva skeletnih mišića.

Mr. Ida Parčetić-Kostelac, dr.med., stručni magistar infektologije, Zavod za hitnu medicinu Osječko-baranjske županije, Huttlerova 2, 31000 Osijek (idadarcetic@gmail.com); izv. prof.dr.sc. Drago Bešlo, prof. dr.sc. Marcela Šperanda, Tihomir Jović, mag.ing.agr., doc.dr.sc. Mislav Đidara, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Petra Svačića 1d, 31000 Osijek; Tomislav Kopačin, mag. medicinske biokemije, Medicinsko biokemijski laboratorij, Prolaz Josipa Leovića 4, 31000 Osijek; dr.sc. Antun Jozinović, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Stanković i Radovanović (2012) navode da se u prehrani sportaša često koriste dodaci antioksidansa u hrani kako bi djelovali protiv povećanog oksidacijskog stresa koji se javlja pri fizičkim naporima. Često se koriste dodaci antioksidansa u hrani kao što su karnitin, vitamin E, kombinacija vitamina C i E i selen, te dodaci antioksidansa u tekućini za piće kao što je koncentrirani voćno-povrtni sok s vitaminima E i C i sok sa vitaminima E i C, cinkovim glukonatom i selenom.

Oksidacijski stres i antioksidansi

Stanice stalno proizvode slobodne radikale i reaktivne oblike kisika (ROS) kao dio metaboličkih procesa. Slobodni radikali su molekule ili dijelovi molekule koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskom elektronskom omotaču. Osnovne osobine ovih molekula su vrlo kratak poluživot, niska specifičnost za reaktante i izuzetno velika reaktivnost. Velika kemijska reaktivnost, odnosno štetno djelovanje slobodnih radikala, potječe iz potrebe da postignu elektronsku stabilnost i zato reagiraju s prvom susjednom stabilnom molekulom, uzimajući njezin elektron stvarajući novi slobodni radikal. Tako susjedne molekule postaju nestabilne i dalje ulaze u reakcije s drugim molekulama iz okruženja što rezultira oštećenjem staničnih komponenti. Slobodni radikali se, stoga, mogu brzo i nepredvidivo spajati s bilo kojim prostorno bliskom molekulom proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinske kiseline i pokrenuti nastajanje novih spojeva, također sa svojstvima radikala i mogućnošću pokretanja novog niza neenzimskih lančanih reakcija. Slobodni radikali se stvaraju prvenstveno tijekom procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijima. Najveći broj slobodnih radikala koji se javljaju *in vitro*, nastaju ili od reaktivnih oblika kisika (engl. reactive oxygen species, ROS) ili od reaktivnih oblika dušika (engl. reactive nitrogen species, RNS) (Stanković i Radovanović, 2012). Reaktivni oblici kisika (ROS) zajednički su naziv za radikale kisika i njegove reaktivne neradikalne derivate: superoksidni anion (O_2^-), perhidroksilni radikal ($HOO\cdot$), hidroksilni radikal ($OH\cdot$), vodikov peroksid (H_2O_2), hipokloritna kiselina ($HClO$) i dr. U reaktivne oblike dušika (RNS) ubrajaju se dušikov (II) oksid ($NO\cdot$) i dušikov (IV) oksid ($NO_2\cdot$) te nitrozilni kation (NO^+) i peroksinitrit ($ONOO\cdot$) (Bradamante, 2002). Valko i sur. (2007) navode da ROS i RNS npr. $NO\cdot$ imaju dvostruku ulogu, kao štetni i kao korisni oblici. U stanjima oksidacijskog stresa dolazi do porasta ROS-a u organizmu ili tkivima, te dolazi do oštećenja nukleinskih kiselina (DNA), proteina i lipida stanične membrane. Oštećenje nukleinskih kiselina (DNA) uzrokuje mutacije, oksidacijom proteini gube svoju funkciju, a lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji čiji su konačni produkti reaktivni aldehidi. U istraživanju učinaka oksidacijskog stresa koriste se različiti *in vitro* i *in vivo* modeli. Dalle-Donne i sur. (2006) utvrdili su da je oksidacijski/nitrozativni stres, stanje povećanih količina kisika/dušika, važnim uzrokom mnogih akutnih i kroničnih bolesti i čak normalnog procesa starenja. Međutim, siguran dokaz za ovu povezanost često je nedostajao zbog nedostatnih podataka u svezi s biomarkerima i/ili metodama dostupnim za procjenu stanja oksidacijskog stresa u ljudi.

Maršić (2005) smatra da u oksidacijskom stresu dolazi do prekomjerne ekspresije citokina, pojavljuju se protutijela navlastite bjelančevine i oštećuje se tkivo inducirano citokinima.

Antioksidansi su sve one tvari koje u maloj količini u kratkome vremenu neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidansa. Oni nastaju u stanici ili se u organizam najčešće unose hranom ili u obliku dodataka antioksidansa u hrani ili tekućini za piće, a djeluju na nekoliko načina: onemogućuju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu, uništavaju u organizmu stvorene radikale (engl. *scavengers* – “čistači”), ili popravljaju oštećenja u stanici nastala djelovanjem radikala (Bradamante, 2002). Među brojnim podjelama antioksidansa, najjednostavnija je ona na antioksidacijske enzime i malene molekule antioksidansa (tvari dobro topive u lipidima i tvari topive u vodi). U antioksidacijske enzime ubrajamo one koji nastaju u stanicama (superoksid dismutaza, katalaza, glutationperoksidaza) te razgrađuju manje aktivne oblike kisikovih radikala u nenabijene neaktivne molekule i veliku grupu enzima koji obnavljaju slobodnim radikalima oštećene molekule nukleinskih kiselina (DNA) i proteina. U ovaj, enzimski dio sustava prirodne antioksidacijske obrane u ljudi i životinja ubrajaju se enzimi superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutationperoksidaza (GPx), glutation-reduktaza (GRx) i glutation-oksidaža (GOx).

Drugu skupinu antioksidansa čine brojne jednostavne ili složene molekule koje pretvaraju nezasićene, vrlo aktivne molekule slobodnih radikala u nove, kemijski zasićene, inaktivne oblike koji nisu opasni za normalnu aktivnost organizma i koji djeluju kao “čistači” slobodnih radikala. Ova skupina antioksidansa veže potencijalno opasne metalne ione i onemogućava njihovo sudjelovanje u produkciji slobodnih radikala. U ovaj, neenzimski dio sustava prirodne antioksidacijske obrane u ljudi i životinja ubrajaju se vitamin A (retinol), vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin E (alfa-tokoferol), te beta-karoten (provitamin A), bilirubin, mokraćna kiselina, glutation, reducirani glutation (GSH), oksidirani glutation (GSSG), tioli, koenzim Q10, stresni proteini, albumin, transportni proteini i proteini odgovorni za deponiranje iona željeza (Fe^{2+}) i bakra (Cu^{2+}) a to su transferin (transportni protein željeza u plazmi) i feritin (deponira željezo unutar stanice u topljivom i netoksičnom obliku), te ceruloplazmin (CER), cistein, cistamin, glukoza, kao i elementi u tragovima bakar (Cu), cink (Zn), selen(Se) i mangan (Mn) koji imaju važnu ulogu za katalitičko enzimsku aktivnost enzima GPx (Se) i SOD (Zn, Mn, Cu).

Ostale antioksidanse u ljudi i životinja čine reaktivne tvari tiobarbituratne kiseline (TBARS), kapacitet apsorpcije radikala kisika (ORAC), ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) i gama-tokoferol (Bradamante, 2002; Stanković i Radovanović, 2012). Antioksidacijski enzimi su endogeni i njihovo nastajanje može biti izmijenjeno određenim čimbenicima. Poznati potencijalni čimbenici povećane produkcije enzimskih antioksidansa su fizička aktivnost i vježbanje (Stanković i Radovanović, 2012).

Biomarkeri oksidacijskog stresa

Brojni autori opisali su biomarkere oksidacijskog stresu ljudi i životinja koji uključuju F_2 alfa-izoprostan ($F_{2\alpha}$ -izoprostan), ukupni izoprostan (isoP), malondialdehid (MDA), proteinske karbonile (PC), kompletnu krvnu sliku (KKS) i 8 – hidroksi – 29-deoksigvanozin (8-OHdG). Mishra i sur. (2005) su utvrdili povećanje koncentracije MDA i $F_{2\alpha}$ -izoprostana u plazmi kod umrlih bolesnikazbog multiple organske disfunkcije (MOD) i sepse, kao i smanjenje koncentracije MDA i $F_{2\alpha}$ -izoprostana u plazmi i nepromijenjenu koncentraciju TAC, vitamina C, GPx i SOD u plazmi u vrijeme prijema, unutar 24 sata od prijema i svaki treći dan tijekom boravka u bolnici u teško oboljelih bolesnika sa kirurškim i nekirurškim bolestima koji su imali MOD i sepsu. Ova studija zaključuje da je povećani oksidacijski stres povezan s lošim ishodom bolesti u teško oboljelih bolesnika i može se koristiti kao prognostički pokazatelj lošijeg ishoda bolesti. Biomarkeri oksidacijskog oštećenja korisniji su prognostički pokazatelji lošijeg ishoda bolesti nego biomarkeri antioksidacijske obrane. Walker i sur. (2007) su određivali biomarkere oksidacijskog stresa i antioksidacijski status u pasa sa želučanim proširenjem - volvulusom kroz 48 sati. Oni su uočili smanjenje koncentracije vitamina C i E, ORAC i MDA u plazmi, a ne promijenjena je bila koncentracija GPx i $F_{2\alpha}$ -izoprostana u plazmi pasa s prirodnom želučanom dilatacijom - volvulusom u vrijeme prijema, 24 sata i 48 sati nakon prijema u bolnicu i tijekom bolničkog liječenja u Jedinici za intenzivno liječenje. Ova studija dokazuje da se oksidacijski stres i antioksidacijski kapacitet u pasa s prirodnom želučanom dilatacijom - volvulusom povremeno mijenjaju. Daljnje studije mjerenja biomarkera oksidacijskog stresa u teže bolesnih pasa i mjerenje u ranom tijeku bolesti, može biti korisno u određivanju vremena kada je oksidacijski stres najteži tijekom medicinskog zbrinjavanja želučane dilatacije – volvulusa. Winter i sur. (2009) istraživali su mogućnost da bi oksidacijski stres mogao imati ulogu u karcinogenezi i utjecati na smrtnost životinja oboljelih od karcinoma. Autori su utvrdili da je prije liječenja kemoterapijom vidljivo smanjenje koncentracije vitamina E i gama-tokoferola u plazmi i povećanje koncentracije GPx, ORAC i iso P u plazmi, a nakon liječenja kemoterapijom, u fazi remisije, povećanje koncentracije vitamina E i smanjenje koncentracije vitamina Cu plazmi pasa sa limfomom. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da psi s limfomom imaju promjene u koncentracijama oksidansa i antioksidansa i da se koncentracija nekih od ovih biomarkera normalizira nakon liječenja kemoterapijom u fazi remisije. Suhail i sur. (2008) proučavali su korisnost praćenja prooksidacijskih i antioksidacijskih biomarkera u krvi, kao i osmotsku rezistenciju eritrocita kod trudnica s preeklampsijom. Preeklampsija je složen višestruki sustavni poremećaj koji se povezuje s hipertenzijom, edemom i proteinurijom tijekom trudnoće. Pretpostavlja se da je smanjena koncentracija GSH u eritrocitima u trudnica sa preeklampsijom povezana sa smanjenom osmotskom rezistencijom koja dovodi do gubitka integriteta stanične membrane i skraćenog životnog vijeka eritrocita. Lipidni peroksidi mogli bi biti dio citotoksičnog mehanizma koji uzrokuje oštećenja endotela krvnih žila i arterijsku hipertenziju u preeklampsiji. Autori su uočili povećanje koncentracije MDA, GSSG, CAT i mokraćne kiseline u plazmi,

smanjenje koncentracije SOD, GPx, GRx, GSH u plazmi i smanjenje osmotske rezistencije eritrocita u trudnica s preeklampsijom. Rezultati istraživanja ukazali su na to da prooksidansi prevladavaju nad antioksidansima te da se ravnoteža pomiče i na kraju narušava u korist oksidacijskog stresa koji ima za posljedicu razvoj preeklampsije. Dakle, ova studija ukazuje na nazočnost oksidacijskog stresa u patogenezi preeklampsije, kao i to da smanjena osmotska rezistencija eritrocita u preeklampsiji upućuje na gubitak integriteta stanične membrane, što rezultira kraćim životnim vijekom eritrocita. Tat i Chow (1996) u svojoj studiji istraživali su jesu li razlike antioksidacijskog statusa eritrocita (RBC) kod bolesnika s anemijom srpastih stanica i u zdravih ispitanika odgovorne za različite odgovore na hemolizu induciranu oksidacijskim i osmotskim stresom. Srpasti eritrociti pokazali su manji stupanj hemolize i bili su otporniji na hemolizu induciranu oksidacijskim i osmotskim stresom. Autori su utvrdili povećanje broja eritrocita (RBC) u plazmi, povećanje koncentracije vitamina E i lipida u eritrocitima; smanjenje koncentracije GSH u eritrocitima, te lipida i beta-karotena u plazmi; nepromijenjena je koncentracija vitamina A, C i E, MDA i konjugiranih diena u plazmi kao i nepromijenjena koncentracija MDA i konjugiranih diena u eritrocitima bolesnika sa anemijom srpastih stanica. Ovo istraživanje ukazuje da razlike oksidacijskog statusa između srpastih eritrocita u bolesnika sa anemijom srpastih stanica i eritrocita u zdravih ispitanika nisu odgovorne za njihovu različitu osjetljivost na hemolizu induciranu oksidacijskim i osmotskim stresom. Bloomer i sur. (2005) proučavali su utjecaj akutnog aerobnog i anaerobnog vježbanja u kojima su korištene slične skupine mišića na biomarkere oksidacijskog stresa u krvi mlađih utreniranih ispitanika. Autori su uočili povećanje koncentracije PC i GOx u plazmi 24 sata nakon vježbi, smanjenje koncentracije GRx u plazmi neposredno nakon vježbi, kao i nepromijenjenu koncentraciju MDA i 8-OHdG u plazmi 24 sata nakon izvođenja aerobnih i anaerobnih vježbi kod mlađih utreniranih ispitanika. U ovoj studiji zaključeno je da aerobno ili anaerobno vježbanje različito utječe na biomarkere oksidacijskog stresa u krvi mlađih utreniranih ispitanika te rezultiraju različitom snagom oksidacije na makromolekularnoj razini. Buranakar i sur. (2009) proučavali su odnose između biomarkera oksidacijskog stresa i karakteristike eritrocita u pasa sa zatajenjem bubrega. Oni su utvrdili smanjenje prosječnog volumena eritrocita (MCV) i hematokrita (HCT) u plazmi, povećanje prosječne koncentracije hemoglobina u eritrocitu (MCHC), povećanje koncentracije natrija u eritrocitu (RBC-Na), povećanje omjera malondialdehid/kreatinin u mokraći (U-MDA/Cr), a nepromijenjenu aktivnost CAT eritrocita, te nepromijenjenu koncentraciju glutationa i MDA u plazmi pasa sa zatajenjem bubrega. Rezultati ove studije ukazuju na neke promjene u karakteristikama eritrocita i biomarkera oksidacijskog stresa u urinu pasa sa zatajenjem bubrega. Osim toga, U-MDA/Cr u urinu je osjetljiv biokemijski parametar koji se povećava usporedno sa stupnjem zatajenja bubrega.

Biomarkeri antioksidacijske obrane

Biomarkeri prirodne antioksidacijske obrane u ljudi i životinja nastaju kao protuteža nastajanju slobodnih radikala u organizmu, tj. postoji prirodni antioksidacijski mehanizam obrane ili sustav antioksidacijske zaštite (Stanković i Radovanović, 2012).

Biomarkeri enzimskog dijela prirodne antioksidacijske obrane u ljudi i životinja su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutationperoksidaza (GPx), glutation-reduktaza (GRx) i glutation-oksidaža (GOx). Biomarkeri neenzimskog dijela prirodne antioksidacijske obrane u ljudi i životinja sačinjavaju vitamin A (retinol), vitamin C (askorbinska kiselina), vitamin E (alfa-tokoferol), te beta-karoten (provitamin A), bilirubin, mokraćna kiselina, glutation, reducirani glutation (GSH), oksidirani glutation (GSSG), tioli, koenzim Q10, stresni proteini, albumin, transferin, feritin, ceruloplazmin (CER), cistein, cistamin, glukoza, kao i minerali bakar, cink i selen. Ostali biomarkeri antioksidacijske obrane u ljudi i životinja su reaktivne tvari tiobarbituratne kiseline (TBARS), kapacitet apsorpcije radikala kisika (ORAC), ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) (engl. TAC-*total antioxidant capacity*) i gama-tokoferol.

Stanković i Radovanović (2012) utvrdili su da dužina sportskog staža utječe na mogućnost prilagodbe organizma na oksidacijski stres. Autori opisuju jednu studiju u kojoj su odbojkašice bile podijeljene u tri skupine ovisno o duljini sportskog staža: <8 godina, 8 -10,5 godina i >10,5 godina, kako bi se ispitalo utjecaj dugogodišnjeg vježbanja na oksidacijski stres. Utvrđeno je povećanje aktivnosti SOD u plazmi i smanjenje koncentracije superoksidnog aniona u serumu odbojkašica nakon dugogodišnjeg vježbanja (>10,5 godina). Zaključeno je da odbojkašice s dužim sportskim stažom imaju više vrijednosti biomarkera antioksidacijske obrane u krvi tj. bolju prilagodbu na oksidacijski stres kod dugogodišnjeg vježbanja. Još uvijek je malo dostupnih podataka o adaptaciji sustava antioksidacijske obrane uslijed dugogodišnje fizičke aktivnosti kod adolescenata (16 -19 godina) i mladih sportaša. U nekoliko studija utvrđeno je povećanje aktivnosti SOD u plazmi, a smanjenje aktivnosti CAT u plazmi mladih rukometaša koji imaju nisku ili prosječnu aerobnu moć nakon maksimalnog progresivnog fizičkog opterećenja nakon dugogodišnjeg vježbanja. U ovim studijama zaključeno je da su niska ili prosječna aerobna moć i dugogodišnja fizička aktivnost izuzetno važni za poboljšanje „redoks“ statusa mladih i adolescenata, što im omogućuje bolju prilagodbu na oksidacijski stres. SzczubiaŁ i sur. (2004) opisali su neke od parametara oksidacijskog stresa u ženki pasa nakon što su im kirurški odstranjeni tumori mliječnih žlijezda (benigni i maligni tumori). Autori su utvrdili povećanje aktivnosti GPx i SOD u plazmi i nepromijenjenu koncentraciju TBARS u plazmi ženki pasa nakon kirurškog odstranjenja malignih i benignih tumora mliječnih žlijezda. Porast aktivnosti antioksidacijskih enzima u tih životinja može ukazivati na aktiviranje mehanizama antioksidacijske obrane u karcinogenezi mliječnih žlijezda kod pasa. Nadalje, to bi moglo ukazivati na sudjelovanje oksidacijskog stresa u patogenezi nastanka karcinoma u životinja. Potrebni su daljnji pokusi, koji bi uključivali više životinja, s većim izborom uzoraka i uporabom drugih markera oksidacijskog

stresa. Poznato je da vodikov peroksid može izazvati oksidacijsko oštećenje udaljeno od mjesta nastanka i on je značajan molekularni signal koji inducira proizvodnju nekoliko gena koji su povezani s oksidacijskim stresom. Sureda i sur. (2005) proučavali su kapacitet plazme i krvnih stanica u detoksikaciji vodikovog peroksida nakon intenzivne vježbe i njezine povezanosti s oksidacijskim oštećenjem. Utvrđeno je smanjenje aktivnosti CAT i GPx, sniženje koncentracije CAT, te povećanje aktivnosti mijeloperoksidaze (MPO) u neutrofilima, povećanje aktivnosti GPx u limfocitima, povećanje aktivnosti MDA u eritrocitima, hemolizu i limfopeniju u plazmi, nepromijenjenu koncentraciju i aktivnost CAT u plazmi, te povećanje koncentracije MDA u plazmi biciklista 3 sata nakon natjecanja u brdskoj vožnji bicikla. Zaključeno je da intenzivna vježba inducira oksidacijsko oštećenje u krvnim stanicama kao što su eritrociti i limfociti, ali ne i u neutrofilima. Stanković i Radovanović (2012) navode da je u jednom istraživanju utvrđena promjena parametara anaerobnog i aerobnog kapaciteta, kao i biomarkera oksidacijskog stresa u sportaša. U tom istraživanju utvrđeno je povećanje koncentracije MDA u eritrocitima, te povećanje aktivnosti i koncentracije CAT u plazmi kod džudista za vrijeme 12 tjedana vježbanja. Ovo istraživanje pokazalo je da je povećanje parametara anaerobnog kapaciteta bilo praćeno poremećajem ravnoteže između ROS-a i antioksidacijskog sustava u organizmu. U drugoj studiji, autori su se bavili određivanjem nekih markera oksidacijskog stresa i antioksidacijske obrane kod mladih džudista u pripremnom razdoblju. U ovoj studiji utvrđena je nepromijenjena koncentracija MDA, PC, CAT i TAC u plazmi utreniranih džudista prije i 4 tjedna nakon intenzivnog vježbanja. Dobiveni rezultati ukazuju da ova vrsta intenzivnog vježbanja (vježbe snage, tehnike i judo borbe) u pripremnom razdoblju kod dobro utreniranih mladih džudista nema statistički značajan učinak na parametre oksidacijskog stresa. Zaključeno je da je antioksidacijska obrana u organizmu utreniranih sportaša nakon intenzivnog vježbanja dovoljna da se izbori sa nastalim oksidacijskim stresom. U nekoliko dosadašnjih studija praćena je promjena određenih biomarkera oksidacijskog stresa i antioksidacijske obrane u krvi u ispitanica tijekom vježbanja tea-boa i vježbi pilatesa. U tim studijama utvrđeno je povećanje koncentracije TAC u plazmi ispitanica nakon vježbanja tae-boa, kao i povećanje aktivnosti CAT u plazmi ispitanica nakon vježbi pilatesa. Zbog različitih metaboličkih zahtjeva tijekom ovih dviju vrsta vježbanja, povećana potrošnja kisika nije jedini mehanizam koji uzrokuje oksidacijski stres tijekom fizičke aktivnosti.

Steinberg i sur. (2006) ispitivali su odgovor organizma na oksidacijski stres u ispitanika induciran vježbanjem kod protokola vježbi koje se uobičajeno koriste radi ispitivanja funkcije ukupne mišićne snage (maksimalno pojačana vježba vožnje bicikla) i izdržljivosti do zamora odabranih mišića (statičan stisak ruke i adukcija palca). Autori su utvrdili povećanje koncentracije TBARS u plazmi, smanjenje koncentracije vitamina C i TAC u plazmi i smanjenje koncentracije glutaciona u eritrocitima ispitanika 5 minuta nakon izvođenja dinamičke vježbe (maksimalno pojačana vježba vožnje bicikla) koja omogućava rad mišića u aerobnim uvjetima. Utvrđeno je, također, povećanje koncentracije TBARS u plazmi, smanjenje koncentracije vitamina C u plazmi i smanjenje koncentracije glutaciona u eritrocitima, ali nepromijenjena je koncentracija TAC u plazmi

ispitanika 20 minuta nakon izvođenja statičke vježbe (statičan stisak ruke i adukcija palca) koja omogućava rad mišića u anaerobnim uvjetima kod ispitanika. Ova studija ukazuje da promjene u koncentracijama TBARS i vitamina C u plazmi i glutaciona u eritrocitima nastaju kao odgovor na oksidacijski stres induciran i sa dinamičkim i sa statičkim vježbama. Mjerenje TAC u plazmi ne predstavlja pouzdanu metodu za ispitivanje vježbanjem induciranog oksidacijskog stresa tijekom izvođenja statičkih vježbi koji omogućavaju rad mišićima u anaerobnim uvjetima. Cavalca i sur. (2009) su utvrdili smanjenje koncentracije glutacioni gama-tokoferola u plazmi bolesnika, te smanjenje koncentracije vitamina E u plazmi bolesnika sa koronarnom arterijskom bolesti. Ova studija ukazuje da su niske razine antioksidansa u krvi bolesnika oba spola povezane s visokim rizikom za koronarnu arterijsku bolest i na mogućnost uključivanja dodatka antioksidansa u hranu u svrhu liječenja. Sen i sur. (1994) dokazali su da endogeni glutation ima odlučujuću ulogu u onemogućavanju vježbom induciranog oksidacijskog stresa, kao i činjenicu da je on važan čimbenik izvođenja vježbe, a N-acetilcistein (NAC) smanjuje vježbom induciranu glutationsku oksidaciju u plućima i krvi štakora. Autori su uočili, u skupini štakora koji imaju smanjenu koncentraciju glutaciona u plazmi, smanjenje koncentracije GSSG u plućima i plazmi, nepromijenjenu koncentraciju GSH u jetri, mišićima, srcu i plazmi, nepromijenjenu koncentraciju GSSG u mišićima, nepromijenjenu koncentraciju TBARS u mišićima i plazmi, te nepromijenjenu koncentraciju NAC u plazmi nakon izvođenja intenzivne vježbe, a uočeno je i smanjenje izdržljivosti štakora nakon izvođenja te vježbe. Stanković i Radovanović (2012) opisuju jednu studiju u kojoj je utvrđeno povećanje koncentracije transferina i feritina u serumu i CRP u plazmi koje je povezano sa smanjenjem količine biomarkera oksidacijskog stresa u krvi kod sportaša oba spola. Studija zaključuje da su sportašice podložnije oksidacijskom stresu, kao i to da različite koncentracije feritina u krvi mogu doprinijeti različitoj razini oksidacijskog stresa kod sportaša oba spola.

Stanković i Radovanović (2012) navode da su u jednoj studiji ispitivani efekti dugogodišnjeg vježbanja različitih tipova sportova, kao što su biciklizam, veslanje i taekwondo, na parametre oksidacijskog stresa i antioksidacijske obrane u organizmu sportaša. Dobiveni rezultati studije pokazuju smanjenje koncentracije TBARS u plazmi sportaša kod veslanja, nepromijenjena je koncentracija kod taekwonda te povećanje koncentracije kod biciklizma za vrijeme i 10 minuta nakon vježbe maksimalnog opterećenja.

Mehanizam nastanka oksidacijskog stresa i djelovanja antioksidansa

U literaturi se navodi da su mehanizmi nastanka oksidacijskog stresa u ljudi i životinja, kao i njegovog povećanja, mnogostruki. Povećan oksidacijski stres izražen je lipidnom peroksidacijom i oksidacijom proteina. Stvaraju se završni produkti glikozilacije. Oksidacija rezultira stvaranjem vodikovog peroksida koji prelazi u hidroksidni radikal. CAT i drugi antioksidansi smanjuju stvaranje završnih produkata glikozilacije. Stvaraju se promjene u metabolizmu glutaciona.

U organizmu postoji sustav antioksidacijske obrane kao protuteža nastajanju slobodnih radikala (Stanković i Radovanović, 2012). Bradamante (2002) opisuje da antioksidansi mogu djelovati na više mjesta tijekom lipidne peroksidacije, pa tako mogu: a) spriječiti započinjanje lipidne peroksidacije “hvatajući” radikale koji mogu oduzeti vodik na - metilen ugljiku (vitamin E); b) smanjiti lokalnu koncentraciju kisika; c) ukloniti reaktivni kisik koji može reagirati izravno s lipidima stanične membrane i stvarati perokside (likopen); d) vezati ione željeza i bakra (transferin, feritin, ceruloplazmin); e) enzimski ukloniti perokside (GPx, CAT); f) prekinuti lanac lipidne peroksidacije uklanjanjem peroksil i alkoksil radikala (vitamin E). Pojedini antioksidansi obično djeluju putem više mehanizama koji se međusobno nadopunjuju. Ona navodi i da su minerali anorganski kemijski elementi, cijeli se život moraju unositi putem hrane, vode i lijekova. Minerali su značajni u građi enzima, hormona, hemoglobina, strukturnih proteina i proteina odgovornih za ekspresiju gena, vitamina, a preko njih utječu na gotovo sve segmente metabolizma. Među brojnim mineralima koji imaju značajnu ulogu u biološkom sustavu, u antioksidacijskoj obrani se najčešće spominju bakar, cink i selen kao dijelovi proteina, enzima i antioksidansa. Bradamante (2002) navodi da su vitamini organske tvari, koji su u ljudskom organizmu nezamjenjivi biološki katalizatori različitih biokemijskih reakcija. Danas postoje više zanimljivih znanstvenih područja istraživanja učinaka vitamina, rezultati kojih se pokušavaju iskoristiti i u kliničkoj medicini. Jedno od njih su i ispitivanja učinkovitosti vitamina A, C i E, odnosno beta - karotena u oksidacijskom stresu. Bradamante (2002) je utvrdila da u prirodnom antioksidacijskom mehanizmu obrane, osim enzima (SOD, CAT, GPx, GRx), cisteina, cistamina ili glutaciona sudjeluju i određeni vitamini. To su vitamini A, C i E, beta-karoten, a o njihovu antioksidacijskom djelovanju postoje rezultati brojnih bazičnih znanstvenih istraživanja. Vitamin C (askorbinska kiselina) je vitamin topljiv u vodi, koji funkcionira kao koenzim u brojnim reakcijama hidrosiliranja i amidiranja. Vitamin C može antioksidacijski djelovati i kao koantioksidans. *In vitro* je dokazano da vitamin C sudjeluje u procesu obnove vitamina E, kao i to da je jaki reducens koji zaštićuje LDL kolesterol od oksidacije. Vitamin E (alfa-tokoferol) kao antioksidans, zajedno sa selenom iz hrane sprječava oksidaciju višestruko nezasićenih masnih kiselina, štiti nezasićene membranske lipide od oksidacije, reagira sa slobodnim radikalima, koji uzrokuju oksidacijsko oštećenje staničnih membrana i DNA bez formiranja novih slobodnih radikala u procesu. Vitamin E smješten je u membranama i lipoproteinima, gdje može prekinuti lančanu reakciju oksidacije LDL-a i zaštitno djelovati na membrane stanica. Beta-karoten je antioksidans koji u molekulama LDL-a ulazi u obrambene antioksidacijske reakcije, no tek nakon što se iscrpe sve raspoložive količine vitamina E. Vrlo je učinkovit “čistač” slobodnih radikala, a može inhibirati i lipidnu peroksidaciju. Andreis i sur. (2010) navodi da su citokini niskomolekularni glikoproteini, i to uglavnom N-acetilirani proteini koji posreduju međustaničnu komunikaciju. Luče ih mnogobrojne stanice u organizmu, ali većinom imunosne i upalne stanice. U citokine urođene imunosti (proupalni citokini) obično se svrstavaju čimbenik tumorske nekroze (TNF - α), interleukin 1 (IL - 1) i interleukin 8 (IL - 8), zatim interleukin 6 (IL - 6), interleukin 12 (IL - 12), interleukin 18 (IL - 18), interleukin 23 (IL - 23),

interleukin 27 (IL - 27) te interferon α i interferon β (IFN - α i β). Sintezu i lučenje proupalnih citokina lokalno potiču bakterijski toksini, imunokompleksi, fagocitoza, oksidacijski radikali, virusna dvolančana DNA, leukotrijeni, kemokini i drugi citokini. Neki proupalni citokini (TNF - α , IL - 1 i IL - 6) izravno ili neizravno potiču lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH), kortikosteroida koji povratno inhibiraju njihovo lučenje. Također, svi manje ili više djeluju na hipotalamus, gdje uzrokuju porast tjelesne temperature (endogeni pirogeni), te potiču sintezu proteina akutne faze u jetri. Ova sistemna djelovanja proupalnih citokina pospješuju obranu organizma od infekcije. Citokini nadziru gotovo sve aspekte nespecifične i specifične imunosti pa su stoga važni za funkciju organizma. Citokini se luče u kaskadi, luče se različiti inhibitori njihova djelovanja (anticitokini) pa nastaje složena mreža citokina i anticitokina.

Biomarkeri umora perifernih mišića

Biomarkeri umora perifernih mišića u ljudi i životinjasu markeri staničnog mišićnog oštećenja i pokazatelji mišićnog stresa, a koriste se za uvid u mehanizme iscrpljenosti tijekom vježbanja kako bi se otkrio povećani umor ili se otkrili manjkavi metabolički putevi. Klasifikacija biomarkera umora perifernih mišića, prema mehanizmu umora, odnosi se na metabolizam adenozin-trifosfata, acidozu ili oksidacijski metabolizam. Proizvodnja biomarkera umora perifernih mišića uglavnom ovisi o vrsti vježbe. Najpoznatiji biomarkeri umora perifernih mišića u ljudi i životinja su laktat i interleukin-6 (IL-6). Ostali biomarkeri umora perifernih mišića u ljudi i životinja su kompletna krvna slika (KKS), leukociti (WBC), neutrofil, limfociti (LIMF), eritrociti (RBC), hipoksantin, ksantin, kreatinkinaza (CK), mioglobina, mokraćna kiselina, aspartat-aminotransferaza (AST), mijeloperoksidaza (MPO), katalaza (CAT), glutationperoksidaza (GPx), glutation, oksidirani glutation (GSSG), vitamin C (askorbinska kiselina), reaktivne tvari tiobarbituratne kiseline (TBARS), ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC), N-acetilcistein (NAC), imunoglobulin A (IgA), kortizol, interleukin-7 (IL-7), interleukin-15 (IL-15), interleukin-18 (IL-18) i C-reaktivni protein (CRP).

Finsterer (2012) navodi da su biomarkeri umora perifernih mišića u ljudi zapravo biljezi staničnog mišićnog oštećenja tj. pokazatelji mišićnog stresa i koriste se za uvid u mehanizme iscrpljenosti tijekom vježbanja kako bi se otkrio povećani umor ili se otkrili manjkavi metabolički putevi. Klasifikacija biomarkera umora perifernih mišića odnosi se na metabolizam adenozin-trifosfata, acidozu ili oksidacijski metabolizam. Imunološki i genetički odgovor može prouzrokovati osjetljivost mišića na umor, ali ne može izravno uzrokovati mišićni umor. Proizvodnja biomarkera umora perifernih mišića ovisi o vrsti vježbe. Najpoznatiji biomarkeri umora perifernih mišića u serumu su laktat i interleukin-6 (IL-6). Klinički značaj većine ostalih biomarkera umora perifernih mišića često je ovisan o dobi, spolu, fizičkoj aktivnosti, opskrbi energijom tijekom vježbanja, tipu vježbe potrebne za proizvodnju biomarkera umora perifernih mišića te jesu li ispitanici zdrave ili bolesne osobe. Robson-Ansley i sur. (2007) ispitali su u svojoj studiji promjene razine IL-6

u ljudskoj plazmi, izvore i simptome stresa i urođenog imunološkog sustava kao odgovor na akutno razdoblje pojačanog vježbanja visoke izdržljivosti u atletičara. Autori su utvrdili povećanje aktivnosti CK i IL-6 u plazmi, smanjenje funkcije neutrofila, nepromijenjen ukupni broj leukocita i neutrofila i kortizola u plazmi te IgA u slini, kao i povećanje simptoma stresa u atletičara nakon pojačane vježbe visoke izdržljivosti (trčanje). U ovoj studiji zaključeno je da akutno razdoblje pojačanog vježbanja može uzrokovati nedostatan odgovor urođenog imunskog sustava i kronično povišenje IL-6 što je bilo povezano povećanjem umora i nastankom opće slabosti, te bi moglo biti uzrokom tzv. neobjašnjenog sindroma slabijih sportskih rezultata. Speranza i sur. (2007) ispitali su jesu li plazmatski hipoksantin i ksantin korisni biomarkeri umora perifernih mišića kod ljudi prilikom vježbanja i druge fizičke aktivnosti. U toj studiji 20 ispitanika izvodili su dugotrajne izokinetičke vježbe na koncentričan način na različitim zajedničkim izletima. Uočeno je povećanje koncentracije hipoksantina u plazmi odmah nakon vježbanja i još više 45 minuta poslije vježbanja. Mioglobin u plazmi imao je nešto manje povećanje (u odnosu na hipoksantin) odmah nakon vježbanja i još više 45 minuta poslije vježbanja. Povećanje CK u plazmi nije bilo ovisno o tipu vježbe. Nepromijenjena je koncentracija mokraćne kiseline i leukocita u plazmi odmah nakon vježbanja i 45 minuta poslije vježbanja. Ova studija zaključuje da hipoksantin i mioglobin mogu biti korisni biomarkeri umora perifernih mišića kod ljudi prilikom praćenja učinkovitosti opterećenosti radom i praćenja posljedica metaboličkog stresa na mišićno tkivo kod vježbanja ili rehabilitacijskih programa. Karlsson i sur. (2012) opisuju u svom istraživanju piometru, bolest u pasa uzrokovanu bakterijskom infekcijom maternice, a koja rezultira u 50% slučajeva sistemskim upalnim sindrom (SIRS) u pasa. Klinički dijagnostički kriteriji su relativno nespecifični i potrebni su biomarkeri za dijagnozu piometre i SIRS-a u pasa. U ovoj studiji dobiveni podatci ukazuju na veće povećanje koncentracije CRP (C-reaktivni protein), IL-7, IL-15 i IL-18 u serumu u skupini pasa s piometrom i SIRS-om, nešto manje povećanje CRP, IL-7, IL-15 i IL-18 u serumu u skupini pasa sa piometrom bez SIRS-a, a nepromijenjena je koncentracija CRP, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-15, IL-18 i TNF- α u zdravih pasa. Nekoliko pokazatelja imaju dijagnostičku vrijednost u slučaju razvoja piometre koja rezultira SIRS-om u pasa, a to su CRP, IL-7, IL-15 i IL-18 u serumu.

Metode za procjenu oksidacijskog stresa

Iako je poznato da je oksidacijski stres povezan s patofiziologijom nekih bolesti i sa starenjem, on se rutinski ne mjeri kod određivanja kliničkih dijagnoza bolesti. To je djelomice zato što još nisu uvedene standardizirane metode mjerenja oksidacijskog stresa u ljudi. Stoga je jedna od najvećih potreba u području biologije slobodnih radikala, razvijanje sigurnih i pouzdanih metoda za mjerenje statusa oksidacijskog stresa u ljudi (Pryor i Godber, 1991). Bradamante (2002) je utvrdila da se oksidacijski stres kod ljudi može ispitati mjerenjem slobodnih radikala, oštećenja na lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama (DNA molekulama) uzrokovanih djelovanjem slobodnih radikala kao i aktivnosti enzimskih antioksidansa. Biomarkeri služe za dokazivanje oksidacijskog

oštećenja lipida, nukleinskih kiselina (DNA molekula) i proteina. Stanković i Radovanović (2012) utvrdili su da mjerenje slobodnih radikala kod ljudi tj. proizvodnja ROS-a može biti određena izravno pomoću spektroskopske metode. Međutim, ova metoda nije primjenjiva za ispitivanje na ljudima zbog toksičnosti supstanci koje se koriste. Za ispitivanje metodom spektroskopije uzimaju se uzorci krvi koji se najprije izlažu djelovanju stabilizatora ROS-a, a zatim se centrifugiraju i serum se spektroskopski analizira. Problem u primjeni ove metode je i u kratkom vremenu poluživota ROS-a. Koristi se i mjerenje oksidacijskih oštećenja na lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama (DNA molekulama). Lipidna peroksidacija je osnova za mjerenje oksidacijskog stresa, tj. vrši se mjerenje razine peroksidacije lipida u staničnoj membrani. Lipidna peroksidacija uzrokuje razgradnju lipida na veliki broj primarnih oksidacijskih produkata, kao što su konjugirani dieni (lipidne hidroperoksidaze) i sekundarnih oksidacijskih produkata uključujući tu MDA, $F_{2\alpha}$ -izoprostani ili izdahnuti pentan, heksan ili etan. Često se primjenjuje mjerenje konjugiranih diena, kao primarnih produkata lipidne peroksidacije. MDA se također često koristi u istraživanjima. Uobičajeno je da se ona mjeri kroz svoju reakciju s tiobarbituratnom kiselinom. Kao indeks lipidne peroksidacije često se koristi i TBARS. Studije pokazuju da kvantificiranje $F_{2\alpha}$ -izoprostana može biti pouzdana metoda za procjenu endogene lipidne peroksidacije i oksidacijskih oštećenja, kao što to mogu biti i drugi biomarkeri u krvi npr. oksidirani LDL ili protutijela za oksidirani LDL. Povećana količina karbonilnih skupina, tj. proteinskih karbonila (PC) povezana je s oksidacijskim stresom. Zato je mjerenje nastalih PC metoda koja se najčešće koristi za određivanje oksidacijskih oštećenja na proteinima. Za još preciznije određivanje oksidacije proteina koristi se karbonil/proteinski omjer. ROS uzrokuje nekoliko vrsta oštećenja na DNA molekulama, a to su pucanje lanaca, oštećenja na proteinskim vezama i bazične modifikacije. Brojne metode koriste se za kvantificiranje ovih oštećenja, a najčešće korišteni biomarker je 8-OHdG koji nastaje oksidacijom gvanina izazvanog slobodnim radikalima. Ostali neizravni biomarkeri oksidacijskog stresa su CK i mioglobin, a to su biomarkeri staničnog mišićnog oštećenja. Međutim, CK i mioglobin nisu specifični biomarkeri oksidacijskog stresa, osobito kod sportaša koji imaju visoku razinu ovih tvari zbog nekih aktivnosti mišića (npr. udarci, kontakti i sl.) koje izazivaju stanična oštećenja. Uz to, utrenirani sportaši imaju više bazalne vrijednosti obje ove tvari. Lubrano i sur. (2002) u svojoj studiji ukazuju na to da direktno mjerenje oksidacijskog stresa u tjelesnim tekućinama kod ljudi zahtijeva složene laboratorijske instrumente i postupak ekstrakcije. Cilj ove studije bio je analizirati kolorimetrijsku metodu i procijeniti njezinu korist u kliničkom radu. Razine oksidacijskog stresa analizirane su kolorimetrijskim određivanjem slobodnih radikala (vodikov peroksid) u serumu ispitanika pomoću dROMs testa, dok je ukupni antioksidacijski kapacitet (TAC) u serumu određen također kolorimetrijski pomoću OXY-adsorbenta. Razina biomarkera oksidacijskog stresa, $F_{2\alpha}$ -izoprostana u plazmi ispitanika, određena je pomoću ELISA metode (imunoenzimski test). U ovoj studiji uočeno je povećanje koncentracije vodikovog peroksida u serumu i $F_{2\alpha}$ -izoprostana u plazmi, kao i smanjenje koncentracije TAC u serumu ispitanika. Zaključeno je da su razine vodikovog peroksida i $F_{2\alpha}$ -izoprostana, bile u negativnoj korelaciji sa

razinama TAC. Razina F_{2a} -izoprostanabila je u pozitivnoj korelaciji sa vodikovim peroksidom, a u negativnoj korelaciji sa razinom TAC. Ova studija ukazuje na to da je analiza slobodnih radikala u serumu sa dROMs testom brza, jeftina, te ima dobar senzitivitet i reproducibilitet.

Metode za procjenu antioksidacijskog statusa

Enzimski antioksidacijski aktivnost (SOD, CAT, GPX) često se ispituje u istraživanjima. Ova metoda može vrednovati kvalitetu antioksidacijske zaštite organizma u mirovanju, ali također može pokazivati i važnost oksidacijskog stresa, posebice nakon fizičke aktivnosti. Kvantificiranje antioksidacijskih vitamina (A, C i E) u plazmi je uobičajena metoda za procjenu antioksidacijske obrane i utvrđivanja nedostatka istih vitamina. Koncentracija i aktivnost antioksidacijskih enzima i koncentracija antioksidacijskih vitamina mijenja se uslijed oksidacijskog stresa i može se koristiti kao indirektni biljeg oksidacijskog stresa.

Drugi antioksidansi koji se mogu koristiti u metodama određivanja oksidacijskog stresa su tiol-proteini (GSH kao najvažniji tiol-protein), mokraćna kiselina (nedovoljna pouzdanost) i alantoin (kao oksidirani proizvod mokraćne kiseline). Provodi se i mjerenje TAC u plazmi/serumu koje pokazuje veličinu odgovora svih antioksidansa (Stanković i Radovanović, 2012). Pastore i sur. (2003) utvrdili su da je određivanje koncentracije glutationa u ljudi visoko senzitivni pokazatelj funkcioniranja i sposobnosti preživljavanja stanica. Nekoliko metoda je optimizirano kako bi se identificiralo i kvantificiralo oblike glutationa u humanim biološkim uzorcima. One uključuju spektrofotometrijske, fluorometrijske i bioluminometrijske metode. Razvijena je, također, tehnika tekuće kromatografije uz masenu spektrometriju za određivanje glutationa. Ova studija je korisna za analiziranje homeostaze glutatonina, čije smanjenje predstavlja pokazatelj oksidacijskog statusa u ljudskim tkivima.

Metode za procjenu umora perifernih mišića

Najpoznatiji biomarkeri umora perifernih mišića u serumu ljudi su laktat i interleukin-6 (IL-6). Najčešća klinička primjena tj. *skreening* za procjenu umora perifernih mišića u ljudi izvodi se pomoću laktat stres testa. Ovaj test otkriva poremećaj koji nastaje zbog manjkavog oksidacijskog mehanizma mitohondrija u perifernim mišićima. Ostale metode mjerenja biomarkera umora perifernih mišića ovise o dobi, spolu, fizičkoj aktivnosti, opskrbi energijom tijekom vježbanja, tipu vježbe i jesu li ispitanici zdrave ili bolesne osobe. Biomarkeri umora perifernih mišića moraju biti promjenjivi u odnosu na proces koji se prati, bez značajnih dnevnih varijacija, dobro korelirati s intenzitetom vježbanja, biti prisutni u mjerljivim količinama u lako dostupnim biološkim tekućinama. Zato je mjerenje biomarkera umora perifernih mišića tijekom vježbanja i umora u praksi slabo prihvaćena metoda. Ipak, mjerenje biomarkera umora perifernih mišića pod određenim, standardiziranim uvjetima, čini se korisno za procjenu biološkog statusa ili procesa tijekom

vježbanja i umora (Finsterer, 2012). Chamizo i sur. (2001) su utvrdili da citokini imaju važnu ulogu u reguliranju imunološkog sustava, ali stanice koje se nalaze u plazmi čine rutinsko mjerenje teškim. Autori su u svojoj studiji koristili metodu RT-polimeraznu lančanu reakciju (RT-PCR) kako bi odredili ekspresiju multiplikcitokina (TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-18, IL-4, IL-6 i IL-10) koristeći prajmere i protokole koji omogućavaju specifično povećanje mRNA u pasa. Ova metoda je korištena kako bi se analizirao mRNA profil citokina mononuklearnih stanica periferne krvi u zdravih pasa. U studiji je utvrđeno da je ova metoda praćenja mRNA ekspresije citokina jednostavna za uporabu, reproducibilna i može se upotrijebiti za razumijevanje imunološkog odgovora u pasa.

Oksidacijski stres i fizička aktivnost

Fisher-Wellman i Bloomer (2009) proučavali su da li povećana potrošnja kisika kod akutnog vježbanja može rezultirati oksidacijskim stresom. Slobodni radikali stvaraju se ovisno o načinu vježbe (aerobna, aerobno-anaerobna, anaerobna), intenzitetu i trajanju vježbe, kao i kod različitih vrsta vježbi, zbog povećanih zahtjeva za energijom i potrošnjom kisika, kao i mogućim mehaničkim ozljedama tkiva. Poznato je da vježbanje dovoljnog opsega, intenziteta i trajanja može dovesti do povećane proizvodnje slobodnih radikala, što može dovesti do oksidacije lipida, proteina, nukleinskih kiselina. Smatra se da do smanjene učinkovitosti vježbanja dolazi zbog mogućeg poremećaja u neuronima, smanjuje se kontraktilna funkcija i/ili ubrzava oštećenje mišića, dolazi do umora zbog sekundarne oksidacije kontraktilnih i/ili mitohondrijskih enzima te dolazi do oštećenja fiziološke funkcije skeletnih mišića. U skladu s načelom homeostaze u organizmu, kod vježbanja je potreban oksidacijski stres niskog stupnja zbog fiziološke prilagodbe organizma. Kod dugoročnog vježbanja dolazi do reguliranja antioksidacijskog obrambenog sustava na višu razinu u tijelu i time pomak „redoks“ ravnoteže u korist smanjenja oksidacijskog stresa. Stanković i Radovanović (2012) navode da je u mnogim istraživanjima proučavana povezanost oksidacijskog stresa i fizičke aktivnosti. Oni smatraju da fizička aktivnost dovodi do povećanja stvaranja ROS-a što može dovesti do oštećenja stanica. Točan mehanizam povezanosti fizičke aktivnosti, stresnih proteina i ROS-a još je uvijek nedovoljno ispitan. Studija izvedena *in vitro*, ukazuje na mogućnost da mitohondriji u mišićima imaju manju ulogu u stvaranju slobodnih radikala, a sve se više prihvaća važnost hem-proteina u izazivanju oksidacijskog stresa. Interakcija metmioglobina i methmioglobina s peroksidima može biti važan izvor oksidacijskog stresa tijekom fizičke aktivnosti. Proteine odgovorne za transport i deponiranje željeza (transferin i feritin) trebalo bi detaljnije ispitati u kontekstu praćenja nastanka i adaptacije organizma na oksidacijski stres. Intenzivna fizička aktivnost uzrokuje oksidacijski stres. Aerobna fizička aktivnost kod ljudi (trčanje, plivanje, biciklizam) povezana je s povećanjem potrošnje kisika VO_2 (VO_2 - potrošnja kisika) što utječe na povećanje proizvodnje i aktivnosti slobodnih radikala. Međutim, uočeno je da se ovaj fenomen ne javlja kod fizičke aktivnosti niskog intenziteta ($<50\% VO_2max$), ($VO_2 max$ - maksimalna potrošnja kisika). U tom slučaju se ne nadmašuje antioksidacijski kapacitet i ne

pojavljuju se oštećenja uzrokovana slobodnim radikalima. Zaključuje se, stoga, da se proizvodnja slobodnih radikala i oksidacijski stres povećavaju proporcionalno sa primjenom intenzivnije aerobne fizičke aktivnosti, ali ne i kod fizičke aktivnosti niskog intenziteta, te da je povećani aerobni metabolizam tijekom fizičke aktivnosti potencijalni izvor oksidacijskog stresa. Povećana proizvodnja ROS-a i dušika, kao i oksidacijski stres, javljaju se i kod vrhunskih sportaša uslijed maksimalnih opterećenja bez obzira na tip energetskog zahtjeva samog sporta (aerobni, aerobno-anaerobni, anaerobni). Ispitivani su efekti dugogodišnjeg vježbanja različitih tipova sportova kao što su biciklizam, veslanje i taekwondo na parametre oksidacijskog stresa. Dobiveni rezultati pokazuju smanjenje koncentracije TBARS u plazmi kod veslanja, nepromijenjena je koncentracija kod taekwonda te povećanje koncentracije kod biciklizma za vrijeme i 10 minuta nakon vježbe maksimalnog opterećenja. Veliki broj znanstvenih istraživanja dokazuje da su dugotrajna i intenzivna anaerobna fizička aktivnost i oksidacijski stres međusobno povezani jer intenzivna anaerobna fizička aktivnost povećava oksidacijski stres u organizmu koji vodi ka oštećenju proteina, lipida i nukleinskih kiselina u mišićnim stanicama i krvi. Stalna anaerobna fizička aktivnost utječe na povećanje proizvodnje ROS-a, tako da antioksidansi koji su nazočni u tijelu, nisu dovoljni za sprečavanje oksidacijskog stresa koji izaziva mutacije u stanicama te oštećenje tkiva i imunološkog sustava. U brojnim studijama proučavan je oksidacijski stres pri fizičkoj aktivnosti zdravih treniranih osoba. Proizvodnja ROS-a povezana je s mišićnom aktivnošću i pod utjecajem je gena. Pretpostavlja se da su navedeni medijatori važni u regulaciji mišićne prilagodbe na fizičku aktivnost. Mišići se prilagođavaju na fizičku aktivnost povećanjem ekspresija gena za regulaciju antioksidacijskih enzima SOD, CAT i GPx. Netrenirane osobe, za razliku od utreniranih, podložnije su većim promjenama u organizmu, uzrokovanim oksidacijskim stresom pri fizičkoj aktivnosti. Različita istraživanja dokazuju da su žene sportaši podložnije oksidacijskom stresu u odnosu na muškarce sportaše, kao i to da žene imaju višu razinu antioksidansa u mirovanju u odnosu na muškarce. Stariji organizmi su podložniji oksidacijskom stresu tijekom fizičke aktivnosti uslijed strukturalnih i biokemijskih promjena u organizmu koje nastaju sa starenjem i time olakšavaju nastajanje ROS-a. Zanimljivo je da se povećani oksidacijski stres javlja nakon obroka, a fizička aktivnost prije ili poslije obroka ne može mnogo na to utjecati, posebno kod ljudi s narušenim zdravstvenim stanjem, zaključuju u svojoj studiji Stanković i Radovanović (2012).

Poznato je da je sindrom prekomjernog treniranja (engl. *Over training syndrom*) stanje dugotrajnog osjećaja iscrpljenosti i nemogućnosti obavljanja vježbanja na razini do koje je sportaš došao prije nego se „pretrenirao“, a nastaje zbog neravnoteže između obavljanja fizičkih aktivnosti i odmora između njih, odnosno, kratkog odmora organizma između dvije fizičke aktivnosti. Izgradnja i oporavak mišićnog tkiva nakon vježbe oporavlja se samo onda kada je tijelo u potpunom stanju odmora. Simptomi sindroma prekomjernog treniranja su povećana frekvencija rada srca u mirovanju, ozljede mišićno-koštanog sustava, iscrpljenost i bolovi u mišićima, krutost mišića, kronični umor, nesаница, gubitak teka, česte upale gornjih dišnih putova, smanjena koncentracija,

depresija, fizički i psihički nemir, razdražljivost, težak osjećaj u nogama, kao i smanjena sposobnost vježbanja ili rekreacije. Ovaj sindrom može se javljati kod sportaša prilikom vježbanja aerobnih sportova (trčanje, plivanje, vožnja bicikla, planinarenje) i anaerobnih sportova (rad s utezima u teretanama, sprinterske discipline u atletici i težak fizički rad) i aerobno- anaerobnih sportova. Margonis i sur. (2007) utvrdili su da su za sindrom prekomjernog treniranja karakteristični slabiji rezultati vježbanja (snaga, jačina, sposobnost skakanja) i prolazna upala ili ozbiljne zdravstvene tegobe kod atletičara nakon razdoblja intenzivnog vježbanja. Trenutačno nema ni jednog dijagnostičkog biomarkera za dokazivanje sindroma pretjeranog treniranja. U ovoj studiji autori su ispitali odgovore biomarkera oksidacijskog stresa u sportaša kod povećanog ili smanjenog opsega vježbanja. Utvrđeno je povećanje broja WBC, povećanje koncentracije TBARS, PC, CAT, GPx i GOx u plazmi, povećanje koncentracije $F_{2\alpha}$ -izoprostana u mokraći, te smanjenje koncentracije glutationa, GSH/GSSG omjera i TAC u plazmi atletičara na početku i 96 sati nakon intenzivnog vježbanja koje je trajalo ukupno 12 tjedana. Autori zaključuju da prekomjerno treniranje uzrokuje značajan odgovor biomarkera oksidacijskog stresa koji je, u nekim slučajevima, proporcionalan opterećenju vježbe. Biomarkeri oksidacijskog stresa mogu, dakle, poslužiti kao sredstvo za dijagnozu sindroma prekomjernog treniranja. Hinchcliff i sur. (2000) dokazali su da je ponovljena vježba izdržljivosti u nordijskih pasa povezana s lipidnom peroksidacijom, smanjenjem koncentracije antioksidansa u plazmi i oštećenjem skeletnih mišića. Oni su utvrdili povećanje koncentracije $F_{2\alpha}$ -izoprostana u plazmi i CK u serumu poslije prve i treće vježbe trčanja, smanjenje vitamina E u serumu i TAC u plazmi nakon prve vježbe, te nepromijenjenu koncentraciju E vitamina u serumu i TAC u plazmi nakon treće vježbe trčanja utreniranih nordijska pasau utrci trčanja na 58km koja je trajala 3 dana. Ova studija ukazuje, stoga, na to kako antioksidacijski mehanizmi u minimalno treniranih pasa, u nekim slučajevima, mogu biti neodgovarajući za ispunjavanje zahtijeva ponovljenih vježbi izdržljivosti. Hinchcliff i sur. (2003) proučavali su povezanost vježbanja pasa s povećanjem proizvodnje oksidansa koji mogu imati veliku ulogu u nastanku oštećenja mišićnog tkiva skeletnih mišića (rabdomiolize). Pretpostavlja se da sudjelovanje pasa u dugim utrkama saonicama može promijeniti antioksidacijski kapacitet plazme i povezan je sa povećanjem stupnja oštećenja mišićnog tkiva skeletnih mišića tj. povećanje indeksa rabdomiolize. Autori su u ovoj studiji proučavali natjecanje Aljaških nordijskih pasa u dugim utrkama saonicama na 1 600 km. Autori su utvrdili povećanje koncentracije CK i AST te sniženje koncentracije CER i GPx u plazmi nakon utrke, kao i nepromijenjenu koncentraciju vitamina E, RBC i SOD u plazmi kod navedenih trkaćih pasa nakon duge utrke saonicama. Zaključuje se da natjecanje pasa u dugim utrkama saonicama, uključujući produljenu i ponovljenu submaksimalnu vježbu, rezultira smanjenjem enzimске antioksidacijske aktivnosti u krvi trkaćih pasa i povećanjem stupnja oštećenja mišićnog tkiva skeletnih mišića. Yamada i Tokuriki (2000) proučavali su spontane aktivnosti 10 bigl pasa smještenih u zasebnim kavezima koje su snimane videokamerom kontinuirano tijekom dva sata, brzinomjerom pričvršćenim na pse. Odgovori brzinomjera uspoređivani su s identičnim pokretima pasa na video vrpčama. Utvrđeno je da je razlikovanje ukupnih kvantitativnih spontanih

aktivnosti moglo bilo moguće uporabom samo brzinomjera ako je prag brzinomjera i količina ubrzanja postavljena na odgovarajući način, tj. odgovori brzinometra s pragom od 0.10 G s brzinomjerskim brojem 251 ili većim, otkrili su samo pokrete cijelog tijela, a oni s pragom od 0.02 G sve pokrete uključujući i promjene dijelova tijela.

Poznato je daradne životinje i sportaši izvode u svojem programu vježbanja brojne vježbe izdržljivosti različitog intenziteta. Radne životinje najčešće čine psi, a to su zaprežni psi, psi za pronalaženje i spašavanje (vatrogasni psi), policijski psi, lovački psi, trkaći psi sprinteri, te konji i sportaši elitni sprinteri. Huntingford i sur. (2014) opisuju kako ekstremna aktivnost visokog intenziteta izdržljivosti, koja u svojem programu vježbanja ima učestale iscrpljujuće vježbe, postoji kod ekstremnih sportova kao što su ljudski ultramaraton, utrke saonicama sa polarnim psima i utrke trčanja sa trkaćim psima sprinterima. Clero i sur. (2015) navode kako aktivnost srednjeg intenziteta izdržljivosti postoji kod izvođenja umjerenih vježbi izdržljivosti u pasa za pronalaženje i spašavanje kod vatrogasne pseće brigade u Odjelu za traženje i spašavanje. Ti psi, inače belgijski ovčari, prolaze vježbi izdržljivosti srednjeg intenziteta u svakodnevnom programu vježbanja koji traje po 14 dana. Shadia (2009) navodi da umjerene vježbe izdržljivosti izvode njemački ovčari iz policijskih psećih odjela koji služe za pronalaženje kriminalaca, otkrivanje i zadržavanje osumnjičenika, te za otkrivanje narkotika i eksploziva zahvaljujući svojem izrazito osjetljivom njuhu. Huntingford i sur. (2014) zaključuje da je aktivnost niskog intenziteta izdržljivosti nazočna kod vježbi izdržljivosti pasa koji učestvuju u sportovima, a koji nisu utrenirani i vježbe izvode povremeno ovisno o godišnjim dobima ili samo vikendima. U ovu skupinu spadaju vojni psi, psi tragači, psi spasitelji, rekreacijski lovački psi, sportski psi, kao i kućni ljubimci koji su uključeni u sportove kao npr. trčanje, plivanje, vožnja biciklom i hodanje na skijama.

Antioksidansi kao nutritivni dodatci

Do sad su provedena brojna epidemiološka ispitivanja i klinički pokusi u ljudi koji su pokazali kako dugotrajni povećani unos vitamina C i E te beta-karotena hranom ili u obliku dodatka vitamina u hrani ili tekućini za piće može imati zaštitni učinak za neke bolesti. Ipak, svi ti klinički pokusi i ispitivanja nisu do sada dali čvrste dokaze o korisnim antioksidacijskim učincima dodatka vitamina u hrani. Provedena su mnoga istraživanja u ljudi o antioksidacijskim učincima nekih vitamina. Većina tih istraživanja ukazala su na povezanost između dugotrajnog povećanog unosa vitamina E i beta-karotena hranom koja obiluje voćem i povrćem ili u obliku dodatka vitamina u hrani ili tekućini za piće i smanjene smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti. Jedno istraživanje u ljudi dalo je preporuku prema kojoj bi hranom trebalo svakodnevno unositi četiri važna antioksidansa, a to su vitamini C i E, beta-karoten te selen koji je esencijalni sastavni dio antioksidacijskih enzima GPx i tioredoksinreduktaze (Bradman et al., 2002). Podaci dobiveni iz različitih istraživanja nedovoljni su da bi se dodatak antioksidansa u hrani ili tekućini za piće preporučivao sportašima ili fizički aktivnijim osobama. U prehrani sportaša često se koriste dodaci antioksidansa kako bi djelovali

protiv povećanog oksidacijskog stresu koji se javlja pri fizičkim naporima. Još uvijek nije u potpunosti poznato da li ova vrsta dodataka antioksidansa u hrani ili tekućini za piće zaista utječe na smanjenje oksidacijskog stresa kod sportaša, mada je dokazano da se na taj način povećava antioksidacijski kapacitet. U jednoj studiji ispitivan je oksidacijski stres pri fizičkoj aktivnosti kod zdravih netreniranih ispitanika. Proučavane su razlike među spolovima u oksidacijskom stresu pri fizičkoj aktivnosti kao i utjecaj dodatka antioksidacijskih vitamina C i E u hrani prije fizičke aktivnosti. Utvrđeno je povećanje koncentracije PC, MDA, GSSG, GSH, vitamina C i E u plazmi nakon fizičke aktivnosti u netreniranih ispitanika obaju spolova uz dodatak antioksidacijskih vitamina C i E u hrani prije fizičke aktivnosti. Rezultati ove studije pokazuju da žene imaju višu razinu antioksidansa u krvi u mirovanju u odnosu na muškarce. Dokazano je i da dodatak antioksidansa u hrani može umanjiti oksidacijski stres uzrokovan fizičkom aktivnošću jednako kod oba spola. U drugoj studiji proučavao se utjecaj fizičke aktivnosti i dodatka antioksidansa karnitina u hrani na oksidacijski stres u ispitanika, koji je nastao kao odgovor na aerobni i anaerobni test snage. U ovoj studiji je utvrđeno smanjenje koncentracije MDA u plazmi u mirovanju, povećanje koncentracije ksantinoksidaze u plazmi i vodikovog peroksida u serumu ispitanika nakon fizičke aktivnosti uz dodatak antioksidansa karnitina u hrani prije fizičke aktivnosti. U jednom istraživanju proučavao se učinak dodatka antioksidacijskih vitamina C i E i selen u hrani uz ekscentričnu fizičku aktivnost s dodatnim opterećenjem mišića fleksora u laktu kod mladih utreniranih ispitanica i utvrdilo se smanjenje koncentracije PC, MDA, GSSG i GSH u plazmi ispitanica. Rezultati ispitivanja ukazuju da primijenjeni program fizičke aktivnosti, kao i dodatak antioksidansa u hrani, utječu na smanjenje koncentracije biomarkera oksidacijskog stresa u plazmi utreniranih ispitanica. U jednoj studiji je ispitan utjecaj dodatka antioksidacijskih vitamina C i E u koncentriranom voćno-povrtnom soku prije fizičke aktivnosti, primjenjivanom kroz 2 tjedna, na oksidacijski stres pri aerobnoj fizičkoj aktivnosti utreniranih ispitanika obaju spolova. U toj studiji je utvrđeno smanjenje koncentracije PC u plazmi, kao i nepromijenjena koncentracija MDA i 8-OHdG u plazmi kod utreniranih ispitanika oba spola 30 minuta nakon aerobne fizičke aktivnosti uz dodatak antioksidacijskih vitamina C i E u voćno-povrtnom soku prije fizičke aktivnosti. U dosadašnjim studijama ispitivan je utjecaj dodatka antioksidansa u tekućini za piće kod odbojkašica tijekom 6 tjedana vježbanja u predtakmičarskoj sezoni. Utvrđeno je smanjenje koncentracije MDA u plazmi kod odbojkašica na početku i 6 tjedana nakon vježbanja uz dodatak vitamina C i E, cinkovog glukonata i selen u soku prije fizičke aktivnosti. Dokazano je i da primijenjeni tretman dodatka antioksidansa u hrani ili tekućini za piće u predtakmičarskoj fazi vježbanja sprečava iscrpljivanje antioksidacijske obrane kod sportašica, što je veoma važno s obzirom da je utvrđeno da sužene sportaši podložnije oksidacijskom stresu u odnosu na muške sportaše. Unatoč brojnim studijama, točno mjesto nastanka oksidacijskog stresa pri fizičkoj aktivnosti u ljudi, još uvijek nije utvrđeno, kao ni kolika je stvarna korist od dodataka antioksidansa u hrani li tekućini za piće u obrani od oksidacijskog stresa (Stanković i Radovanović, 2012). Preiser i sur. (2000) proučavali su da li dodatci antioksidacijskih vitamina A, C i E u prehrani povećavaju koncentraciju biomarkera

oksidacijskog stresa u krvi i utječu li na tijek liječenja teško oboljelih kirurških bolesnika u Jedinici za intenzivno liječenje. U studiji je utvrđeno povećanje koncentracije beta-karotena i vitamina E u plazmi, te povećanje otpornosti eritrocita na oksidacijski stres 7 dana nakon uvođenja dodatka antioksidacijskih vitamina A, C i E u otopinu za parenteralnu prehranu teških kirurških bolesnika. Autori su zaključili da se dodateci antioksidacijskih vitamina u otopine za parenteralnu prehranu dobro apsorbiraju u organizmu, te da se dodavanje vitamina A, C i E u prehranu povezuje sa poboljšanjem antioksidacijske obrane u organizmu. Mastaloudis i sur. (2001) proučavali su jesu li vježbe izdržljivosti povezane s oksidacijskim stresom, tj. uzrokuju li ekstremne vježbe izdržljivosti lipidnu peroksidaciju. Autori su utvrdili u svojoj studiji povećanje koncentracije $F_{2\alpha}$ -izoprostana u plazmi na početku, u sredini i 1 sat nakon utrke, vraćanje na početnu vrijednost 24 sata nakon utrke i nepromijenjenu koncentraciju 30 dana nakon utrke, te smanjenje koncentracije vitamina E u plazmi na početku, u sredini, 1 sat nakon i 24 sata nakon utrke kod atletičara nakon ekstremne vježbe izdržljivosti (utrka ultramaratona) koji su uvečer prije utrke i uvečer 29-og dana nakon utrke popili tabletu vitamina E. Ova studija dokazuje da ekstremne vježbe izdržljivosti sportaša imaju kao posljedicu lipidnu peroksidaciju s popratnim bržim smanjenjem koncentracije vitamina E u plazmi. Prasad i sur. (1996) utvrdili su da je prevencija smanjenja kroničnog volumnog srčanog opterećenja i povećanje srčane miokardijalne kontraktilnosti obje klijetke, uz dodatak vitamina E u hrani, skupine pasa sa mitralnom regurgitacijom, bila povezana sa smanjenjem koncentracije srčanog MDA, smanjenjem aktivnosti SOD i CAT u plazmi i povećanjem aktivnosti GPx u plazmi, kao i povećanjem koncentracije TAC u plazmi. Rezultati ove studije ukazuju da kronično volumno srčano opterećenje u pasa smanjuje kontraktilnost obje klijetke i povezano je s oksidacijskim stresom u obje klijetke. Ovi rezultati podupiru pretpostavku da su slobodni radikali povezani s kroničnom srčanom insuficijencijom izazvanom volumnim opterećenjem.

Zaključak

U današnje vrijeme intenzivno se otkrivaju različiti biomarkeri oksidacijskog stresa. Utvrđivanje oksidacijskog stresa važno je zbog mogućnosti pravovremenog uključivanja antioksidacijskih tvari koji povećavaju antioksidacijski kapacitet ljudskog i životinjskog organizma. Postoje razlike u osjetljivosti na antioksidacijska oštećenja organizma između fizički aktivnih i fizički neaktivnih, odnosno, utreniranih i netreniranih ljudi i životinja. Daljnja istraživanja trebala bi biti usmjerena na utvrđivanje potrebne količine antioksidacijskih dodataka organizmu koje je potrebno uključiti u prehranu kod utreniranih i netreniranih ljudi i životinja.

LITERATURA

1. Andreis, I., Batinić, D., Čulo, F., Grčević, D., Lukinović-Škudar, V., Marušić, M., Taradi, M., Višnjić, D. (2010): Imunologija VII. Medicinska naklada, Zagreb: 122-39, 208-223, 443-445.
2. Bloomer, R.J., Goldfarb, A.H., Wideman, L., McKenzie, M.J., Consitt, L.A. (2005): Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *Journal of Strength and Conditioning Research* 19: 276-285.
3. Bradamante, V. (2002): Mjesto i uloga vitamina u životu suvremenog čovjeka. *Medicus* 11: 101-111.
4. Buranakarl, C., Trisiroj, M., Pondeenana, S., Tungjitpeanpong, T., Jarutakanon, P., Penchome, R. (2009): Relationships between oxidative stress markers and red blood cell characteristics in renal azotemic dogs. *Research in Veterinary Science* 86: 309-313.
5. Cavalca, V., Veglia, F., Squellerio, I., Marenzi, G., Minardi, F., De Metrio, M., Cighetti, G., Boccotti, L., Ravagnani, P., Tremoli, E. (2009): Glutathione, vitamin E and oxidative stress in coronary artery disease: relevance of age and gender. *European Journal of Clinical Investigation* 39: 267-272.
6. Chamizo, C., Rubio, J.M., Moreno, J., Alvar, J. (2001): Semi-quantitative analysis of multiple cytokines in canine peripheral blood mononuclear cells by a single tube RT-PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 83: 191-202.
7. Clero, D., Feugier, A., Driss, F., Grandjean, D. (2015): Influence of Pre and Per-Exercise Nutritional Supplementation on Working Dogs Biological Markers Evolution during a Standardized Exercise. *ECronicon Open Access* 1: 10-25.
8. Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A. (2006): Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry* 52: 601-623.
9. Finsterer, J. (2012): Biomarkers of peripheral muscle fatigue during exercise. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2012, 13:218., accessed 21.02.2014. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/13/218>
10. Fisher-Wellman, K., Bloomer, R.J. (2009): Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine* 8: 1-25.
11. Hinchcliff, K.W., Constable, P.D., DiSilvestro, R.A. (2003): Muscle injury and antioxidant status in sled dogs competing in a long-distance sled dog race. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 1: 81-85.
12. Hinchcliff, K.W., Reinhart, G.A., DiSilvestro, R., Reynolds, A., Blostein-Fujii, A., Swenson, R.A. (2000): Oxidant stress in sled dogs subjected to repetitive endurance exercise. *American Journal of Veterinary Research* 61: 512-517.
13. Huntingford, J. L., Levine, C.B., Mustacich, D.J., Corrigan, D., Downey, R.L., Wakshlag, J.J. (2014): The Effects of Low Intensity Endurance Activity on Various Physiological Parameters and Exercise Induced Oxidative Stress in Dogs. *Open Journal of Veterinary Medicine* 4: 134-144.
14. Karlsson, I., Hagman, R., Johannisson, A., Wang, L., Karlstam, E., Wernersson, S. (2012): Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. *Reproduction in Domestic Animals* 47: 337-341.
15. Komnenović, J. (2014): Oksidativni stres i antioksidansi. www.yumama.com. Dostupna url: <http://www.yumama.com/trudnoca/zdravlje-trudnica/1306-oksidativni-stres-i-antioksidansi.html> (datum pristupanja 21.06.2014.).
16. Lubrano, V., Vassalle, C., L'Abbate, A., Zucchelli, G.C. (2002): A new method to evaluate oxidative stress in humans. *Immuno-analyse and Biologie Spécialisée* 17: 172-175.
17. Margonis, K., Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Douroudos, I., Chatzinikolaou, A., Mitrakou, A., Mastorakos, G., Papassotiropoulos, I., Taxildaris, K., Kouretas, D. (2007): Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: Implications for diagnosis. *Free Radical Biology and Medicine* 43: 901-910.
18. Maršić, N. (2005): Imunološki sustav nije imun na stres. *Vaše zdravlje* 44(10/05). Dostupna url: <http://www.vasezdravlje.com/izdanje/clanak/749/> (datum pristupanja 21.06.2014.).
19. Mastaloudis, A., Leonard, S.W., Traber, M.G. (2001): Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 31: 911-922.
20. Mishra, V., Baines, M., Wenstone, R., Shenkin, A. (2005): Markers of oxidative stress, antioxidant damage and clinical outcome in critically ill patients. *Annals of Clinical Biochemistry*, 42: 269-276.

21. Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., Piemonte, F. (2003): Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 333: 19–39.
22. Prasad, K., Gupta, J.B., Kalra, J., Lee, P., Mantha, S.V., Bharadwaj, B. (1996): Oxidative stress as a mechanism of cardiac failure in chronic volume overload in canine model. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 28: 375–385.
23. Preiser, J.-C., Van Gossum, A., Berré, J., Vincent, J.-L., Carpentier, Y. (2000): Enteral feeding with a solution enriched with antioxidant vitamin A, C, and E enhances the resistance to oxidative stress. *Critical Care Medicine* 28: 3828–3832.
24. Pryor, W.A., Godber, S.S. (1991): Noninvasive measures of oxidative stress status in humans. *Free Radical Biology and Medicine* 10: 177–184.
25. Robson-Ansley, P., Blannin, A., Gleeson, M. (2007): Elevated plasma interleukin-6 levels in trained male triathletes following an acute period of intense interval training. *European Journal of Applied Physiology* 99: 353-360.
26. Sen, C.K., Atalay, M., Hanninen, O. (1994): Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *Journal of Applied Physiology* 77: 2177-2187.
27. Shadia, A. O. (2009): Normal values of some serochemical parameters in male and female German shepherd dogs in Sudan. *Assiut Veterinary Medical Journal* 55: 110-115.
28. Sies, H. (1997): Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 82: 291–295.
29. Speranza, L., Grilli, A., Patruno, A., Franceschelli, S., Felzani, G., Pesce, M., Vinciguerra, I., DéLutiis, M.A., Felaco, M. (2007): Plasmatic markers of muscular stress in isokinetic exercise. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 21: 21-29.
30. Stanković, M., Radovanović, D. (2012): Oksidativni stres i fizička aktivnost. *SportLogia* 8: 1-10.
31. Steinberg, J.G., Delliaux, S., Jammes, Y. (2006): Reliability of different blood indices to explore the oxidative stress in response to maximal cycling and static exercises. *Clinical Physiology and Functional Imaging* 26: 106-112.
32. Suhail, M., Suhail, M.F., Khan, H. (2008): Alterations in antioxidant and prooxidant balance in preeclampsia – impact on erythrocyte osmotic fragility. *Biochemia Medica* 18: 331-341.
33. Sureda, A., Tauler, P., Aguiló, A., Cases, N., Fuentespina, E., Córdova, A., Tur, J.A., Pons, A. (2005): Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defenses during exhaustive exercise. *Free Radical Research* 39: 1317-1324.
34. Szczubiał, M., Kankofer, M., Łopuszyński, W., Dąbrowski, R., Lipiko, J. (2004): Oxidative stress parameters in bitches with mammary gland tumours. *Journal of Veterinary Medicine. Series A: Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 51: 336–340.
35. Tatum, V.L., Chow, C.K. (1996): Antioxidant status and susceptibility of sickle erythrocytes to oxidative and osmotic stress. *Free Radical Research* 25: 133–139.
36. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39: 44–84.
37. Walker, T.G., Chan, D.L., Freeman, L.M., Milbury, P.E., Blumberg, J.B. (2007): Serial determination of biomarkers of oxidative stress and antioxidant status in dogs with naturally occurring gastric dilatation-volvulus. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 17: 250 – 256.
38. Winter, J.L., Barber, L.G., Freeman, L., Griessmayr, P.C., Milbury, P.E., Blumberg, J.B. (2009): Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23: 311–316.
39. Yamada, M., Tokuriki, M. (2000): Spontaneous activities measured continuously by an accelerometer in Beagle dogs housed in a cage. *Journal of Veterinary Medical Science* 62: 443–447.

OXIDATIVE STRESS UNDER INTENSE PHYSICAL EXERTION IN HUMANS AND ANIMALS

Summary

Oxidative stress indicates an imbalance in the body between pro-oxidant and antioxidant in favor of a pro-oxidant. To shift the balance may occur if the reduced antioxidant defense of the body or if the increased production of free radicals. Antioxidants are those substances that in a small amount in a short time can neutralize free radicals and other oxidants. They are produced in the cell or organism in food intake or in the form of dietary antioxidants in food or liquid to drink. Antioxidants prevent the formation of free radicals in the body, destroying free radicals created or repair damage in cells caused the action of free radicals. Paper showed biomarkers of oxidative stress in humans and animals, divided to enzymatic, non-enzymatic and other. Biomarkers of peripheral muscle fatigue in humans and animals are markers of cellular muscle damage and muscle stress indicators, and are used for insight into the mechanisms of fatigue during exercise to detect increased fatigue or found deficient metabolic pathways. The determination of oxidative stress is important because of the possibility of timely inclusion of antioxidant substances that increase the antioxidant capacity of human and animal organism.

Key words: oxidative stress, antioxidants, biomarkers, physical activity, muscle fatigue.

Primljeno: 06.10.2016.