

МЕХАНИЗМИ НАСТАНКА ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА ИЗАЗВАНОГ ИНТЕНЗИВНОМ ФИЗИЧКОМ АКТИВНОШЋУ

Поповић М.Љ., Митић Н.Р., Мирић М., Радић И.

Институт за патолошку физиологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

PHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF EXERCISE INDUCED OXIDATIVE STRESS

Поповић М.Љ., Митић Н.Р., Мирић М., Радић И.

Institute of pathophysiology, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

SUMMARY

Strenuous exercises greatly increase oxygen consumption in the whole body, especially in skeletal muscles. Large part of oxygen consumption by the body is reduced to H₂O and ATP, but smaller part (2-5%) of these tremendous increase oxygen consumption results in an increased leakage of electrons from the mitochondrial respiratory chain, forming various reactive oxygen species-ROS (O₂^{•-}, H₂O₂ i OH[•]). These ROS are capable of triggering a chain of damaging biochemical and physiological reactions such as oxidative stress and lipid peroxidation. There is a growing number of informations pointing on important role of free radicals as mediators in inflammation and damage of skeletal muscles after strenuous exercise. The mechanism of exercise induced oxidative stress are not well understood. The mitochondrial electron transport chain, polymorphonuclear and xanthine oxidase have been identified as major source of intracellular free radical generation during and after exercise. Also the interaction of metmyoglobin and methaemoglobin with peroxides may be also an important source of oxidative stress during exercise.

Key words: Exercise, Oxidative stress, Free radicals, Lipid peroxidation.

САЖЕТАК

Физичка активност појачаног интензитета праћена је изразитим повећањем потрошње кисеоника у целом организму, а посебно од стране скелетних мишића. Већи део тог кисеоника се у митохондријама трансформише у ATP и H₂O, док се мањи део (2-5%), као последица губитка електрона из електронског транспортног ланца, конвертује у реактивна кисеоничка једињења-ROS (O₂^{•-}, H₂O₂ и OH[•]). Сматра се да је стварање ROS основа за почетак серије биохемијских и физиолошких промена које настају током појачане физичке активности и познате су као оксидативни стрес. Све је већи број информација које указују на значајну улогу ових једињења као медијатора у процесу запаљења и оштећења скелетних мишића насталих након интензивног физичког напора. Механизми стварања слободних радикала током интензивног физичког напора нису до краја разјашњени. Електронски транспортни ланац у митохондријама, полиморфнофонуклеари и деловање ксантин оксидазе су идентификовани као главни извори интрацелуларне продукције слободних радикала током и након вежбања. Такође оксидација мет-хемоглобина и миоглобина може да представља важан извор слободних радикала у вежбањем индукованом оксидативном стресу.

Кључне речи: Вежбање, оксидативни стрес, Слободни радикали, Липидна пероксидација.

УВОД

Кисеоник, хемијски елемент неопходан за очување функције целокупног аеробног света, појавио се у слободном стању у атмосфери пре око 2 милијарде година. У то време настао је вероватно као последица еволуције фотосинтетичких организама, при чему је његово ослобађање представљало неизбежан споредни продукт фотосинтетичког процеса (1).

Позитиван ефект кисеоника на људско здравље није се доводио у питање све до открића слободних радикала и процеса липидне пероксидације. Међутим, данас су научници чак склонили да дуг живот људи који

живе у планинама Анда, Кашмира или Абхазије доведу у директну везу са ниским процентом кисеоника у ваздуху који они удишу. Оваква размишљања, на први поглед апсурдна, заснивају се на чињеници да се процес старења доводи у директну везу са процесом липидне пероксидације и деловањем слободних радикала.

Под слободним радикалима подразумевамо термодинамички нестабилне атоме или фрагменте молекула који у свом саставу поседују један или више неспарених електрона (2, 3, 4). Они настају током нормалног аеробног метаболизма у свим ћелијама како у

ензимски катализованом реакцијама, тако и неензимским путем. Генерално гледано стварање слободних радикала се дешава током следећих процеса (5):

- Током апсорпције радијације (зрачење)
- У процесу оксидативне фосфорилације у

митохондријама

- У процесу фагоцитозе
- У процесу биотрансформације егзогенних и ендогених супстрата у ендоплазматском ретикулуму
- У процесу метаболизма етанола
- У ензимским реакцијама које катализују

оксидазе

- У процесу синтезе еикосаноида
- У реакцијама оксидоредукције у присуству

кајона метала променљиве валенце

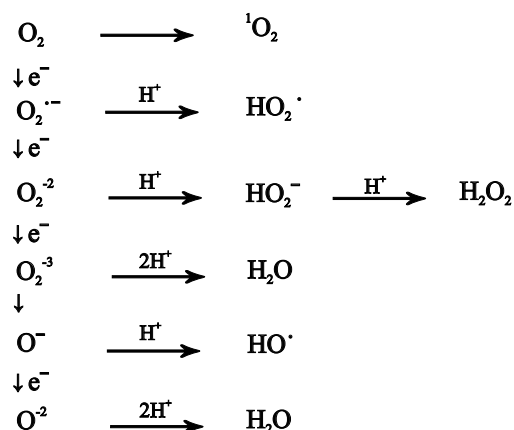
- У процесу липидне пероксидације

незасићених масних киселина

У физиолошким условима створени слободни радикали се неутралишу деловањем антиоксидативног система који по својој природи може бити ензимски и неензимски. Нарушавањем равнотеже између стварања и уклањања слободних радикала настаје стање познато као оксидативни стрес.

Постојање неспареног електрона значи да је хемијска веза отворена а то радикал чини високо реактивном супстанцом. Процес ткивног дисања представља главни метаболички догађај у ћелији који захтева присуство кисеоника. На крају овог процеса у митохондријама се молекулски кисеоник примањем 4 електрона редукује до воде (H_2O). Током одвијања овог процеса као главни продукти јављају се оксидовани супстрати, вода и главнина метаболички генерисане енергије. Кисеоник је током процеса чврсто везан за ензимски комплекс *cytochrome-c oxidaze*, тако да не долази до отпуштања делимично редукованих форми кисеоника. Међутим, та веза није тако чврста на преносиоцима електрона који се налазе у респираторном ланцу испред *cytochrome-c oxidaze*, па су онда то места где може доћи до ослобађања слободних радикала било у митохондријама или микрозомалној фракцији (6, 7).

Редуковани облици кисеоника настају постепеном редукацијом молекулског кисеоника (Сл. 1).



Од наведених редукованих облика кисеоника токсичне особине имају $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 и NO^{\cdot} .

Као последицу своје хемијске природе која се карактерише неспареним електронима у последњој орбитали, слободни радикали кисеоничког порекла испољавају велики степен реактивности. Који ће део ћелије (протеини, нуклеинске киселине, мембрански липиди, цитосолни молекули) (8, 9, 10, 11) или екстрацелуларне компоненте (хијалуронска киселина, колаген) реаговати са слободним радикалима, зависи најпре од природе самог радикала а затим и од његовог извора и места стварања (цитосолне компоненте, митохондрије, ендоплазматски ретикулум, ћелијска мембрана).

Ћелијска мембрана је примарно место контроле ћелијског раста, деобе, диференцијације и смрти ћелије. У грађи ћелијске мембране учествују протеини (60%), липиди (39%) и угљени хидрати (1%), при чему садржај протеина директно корелира са сложености функције мембране. Масне киселине у липидима ћелијских мембрана садрже различити број угљеникових атома (14-24), а присутне двогубе везе налазе се у *cis* конфигурацији. Присуство двогубе везе у суседству дестабилизује везу између угљеника и водоника метиленске групе у ланцу полинезасићене масне киселине, па одузимањем водоника из такве метиленске групе реактивно способним оксидансом започиње процес оксидативне модификације масних киселина познат као липидна пероксидација (12). Процес пероксидације липида смањује хидрофобност липидног двослоја, што мења афинитет и интеракцију протеина са липидима и утиче на процесе неопходне за одвијање великог броја функција мембранских протеина као што су: дељење, диференцијација, фагоцитоза, пријем и пренос сигнала, транспорт јона и материја и др.

Током трајања процеса липидне пероксидације општењење биомембрана се остварује уз помоћ следећих механизма:

- променом физичко-хемијских својстава мембранских фосфолипида,
- деловањем на протеинске компоненте ћелијских мембрана,
- нарушавањем баријерне функције мембрана.

O_2	молекулски кисеоник
e^-	електрон
H^+	протон
$O_2^{\cdot -}$	супероксид анјон радикал
O_2^{-2}	пероксидни јон
H_2O_2	водоник пероксид
$O^{\cdot -}$	коњугована база хидроксил радикала
NO^{\cdot}	хидроксил радикал

Слика 1. Производи постепене редукације кисеоника

ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И ФИЗИЧКА АКТИВНОСТ

Појачана физичка активност код савременог човека постала је део животног стила (рекреација), а врло често се користи и као терапијски поступак у циљу лечења различитих обољења. 1978 године Dillard и сар. (13) су били први који су повезали физичку активност са стањем повећане липидне пероксидације. Они су уочили пораст нивоа пентана (продукт оксидативног липидног оштећења) од 1,8 пута у експираторном ваздуху након вожње ергоцикла, са потрошњом 25-75% VO_2 max, у трајању од 60 минута. Од тада се увећао број доказа који подржавају хипотезу да физичка активност може да интензивира стварање слободних радикала и води ка настанку оксидативног стреса.

Директно мерење слободних радикала је отежано због њиховог кратког времена полуживота. Из тог разлога највећи број студија које су се бавиле изучавањем ефекта вежбања на оксидативни стрес, ослањале су се на идентификовање и мерење маркера ткивних оштећења изазваних слободним радикалима. Чињеница да постоје радови (14, 15, 16) у којима није документована повезаност појачане физичке активности са присуством оксидативног стреса објашњава се мањкавошћу стандардизације методологије истраживања. Недостаци испитавања изведених *in vivo* огледају се у томе да се стварање слободних радикала мери у ткивима након појачане физичке активности (вежбања), док прави однос њиховог стварања током вежбања остаје непознат. Насупрот томе, студије *in vitro* мере стварање слободних радикала у неадекватним (контролисаним) условима, тако да имају ограничену примену (17). Фактори као што су године, пол, стање утренираности, различити протоколи такође утичу на контрадикторност резултата. Због свега наведеног дошло се до закључка да само интензивно или дуготрајно вежбање доводи до повећања стварања слободних радикала у мери која превазилази постојећу антиоксидативну одбрану (18).

У радовима Lowlina и сар. (19) показано је да исцрпљујуће трчање на тредмилу повећава ниво малондиалдехида (MDA - индикатор липидне пероксидације), оптерећење умереног интензитета (70% VO_2 max) нема овај ефект, а оптерећење ниског интензитета (40% VO_2 max) чак доводи до смањења новог овог маркера оксидативног стреса.

Неки производи оксидативне реакције могу да достигну свој максимални ниво сатима (20, 21) или чак данима (22) након завршетка вежбања. Из тог разлога непостојање знакова оксидативног стреса непосредно након вежбања не мора да значи да се оксидативно оштећење није и одиграло.

Оштећење мишићна карактерише се болом, разградњом мишићних влакана, ослобађањем мишићних протеина у плазму и имуним одговором у акутној фази, што све заједно доводи до смањења мишићних перформанси (23). На почетку поремећаја јављају се структуралне промене миофибрила, саркоплазматског ретикулума и сарколема. Поремећај мишићног цитоскелета јавља се 15 минута након интензивног вежбања. Сматра се да су овакве промене последица поремећаја хомео-

стазе калцијума. Повећањем интрацелуларног калцијума активирају се протеазе и фосфолипазе што проузрокује даље оштећење органа и ћелија (24).

МЕХАНИЗМИ СТВАРАЊА СЛОБОДНИХ РАДИКАЛА ТОКОМ ИНТЕНЗИВНЕ ФИЗИЧКЕ АКТИВНОСТИ

Постоји неколико потенцијалних извора у којима током појачане физичке активности долази до стварања слободних радикала. Важност извора варира у зависности од врсте ткива или органа, дужине трајања процеса и типа физичке активности.

Улога митохондрија у стварању слободних радикала

Интензивна физичка активност изразито повећава потребу организма за енергијом. Да би се ово обезбедило долази до повећања потрошње кисеоника која у организму може да порасте и 15 пута, а на нивоу ангажованих мишића то повећање може да буде и до 100 пута у односу на стање у мировању. Већи део тог кисеоника се у митохондријама користи у процесу ћелијског дисања, док мали део кисеоника (2-5%) може да се конвертује унивалентно до неколико интермедијера ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и HO^{\cdot}) (25).

Стварање слободних радикала у митохондријама током процеса ћелијског дисања директно је везано за функцију NADH-ubiquinon редуктазе и ubiquinon-cytochrome-c-редуктазе. Трансфером електрона и њиховим губитком долази до стварања $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 , а ако се у реакцију укључе и метали, Фентоновом реакцијом између $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 долази до стварања HO^{\cdot} .

У новијим радовима (26, 27) се доминантност митохондрија у продукцији слободних радикала током вежбања двоструко оспорава. Прво, количина створеног супероксида је у линеарној зависности са парцијалним притиском кисеоника, што би последично требало да доведе до пада стварања $O_2^{\cdot-}$ са смањењем парцијалног притиска кисеоника (што се дешава када је мишић у покрету). Друго, концентрација UQH[•] не расте аутоматски са порастом протока кисеоника кроз митохондријални електронски ланац. Смањени митохондријални мембрански потенцијал који настаје са повећањем продукције АТФ у митохондријама мишића смањује стварање слободних радикала. Ово се дешава упркос интензивном повећању потрошње кисеоника у организму.

Треба приметити да је највећи број студија које показују повећање нивоа стварања супероксида у митохондријама изведено у *in vitro* условима који нису адекватни онима у активираним мишићу.

Исхемијско-реперфузиона оштећења

Алтернативни механизам помоћу ког вежбање може да допринесе стварању слободних радикала укључује и процес исхемија-реперфузија. Интензивно вежбање је праћено пролазном ткивном хипоксијом у неколико органа (бубрези, спланхична регија) као резултат прерасподеле крви чиме се омогућава задовољење

повећане потребе за крвљу од стране скелетних мишића и коже. Уколико повећана концентрација допремљеног кисеоника не задовољава потребе ангажованих мишића у њима може да настане стање релативне хипоксије. Ре-оксигенација ових ткива настаје након престанка вежбања када и започиње процес стварања слободних радикала. Један од начина којим реперфузија може да доведе до повећања стварања слободних радикала је конверзијом ксантин дехидрогеназе у ксантин оксидазу. Током исхемије АТФ се разграђује на АДФ и АМФ обезбеђујући енергију потребну за контракцију мишића. Уколико је снабдевање кисеоником недовољно АМФ се разграђује у хипоксантин који се затим конвертује до ксантина и мокраћне киселине. Овај процес се обавља уз учешће ензима ксантин оксидазе (ХО), при чему се врши једноелектронска редукција кисеоника и расте концентрација $O_2^{\cdot-}$. Да би се одиграла ова реакција у ткиву мора да постоји довољна количина хипоксантина и ксантина. Такође ензим ксантин оксидаза мора да се конвертује из своје редуктоване форме (ксантин дехидрогеназа) у оксидовану форму уз помоћ интрацелуларних протеаза активираних калцијумом. Такође и кисеоник мора да буде доступан као акцептор електрона. Доказано је да након интензивне мишићне контракције долази до накупљања хипоксантина и мокраћне киселине у мишићима и плазми чиме се сугерише да је дошло до активације ХО (28, 29, 30).

Улога неутрофила у стварању слободних радикала

Неколико студија (31) бавило се испитивањем улоге активираних фагоцита у настанку оксидативног стреса након интензивног вежбања. Испитивана је липидна пероксидација након трчања низ брдо, примера

који се карактерише изразитим општењем скелетних мишића праћеним инфилтрацијом неутрофила и последичном инфламацијом. Концентрација TBARS (тиобарбитуратне реактивне супстанце-неспецифичног маркера липидне пероксидације) у серуму почиње да расте након 45 минута, врх достиже након 6-24 сата од престанка трчања, а након 72 сата враћа се на почетну вредност. Овакви налази наводе на закључак да су слободни радикали створени у леукоцитима који инфилтрирају општењене мишиће одговорни за оксидативно општење настало након вежбања.

Полиморфонуклеарни леукоцити су крвне ћелије које имају одлучујућу улогу у одбрани организма од бактеријских и вирусних проузроковача болести. Активација полиморфонуклеара започиње општењем мишића или ткива. У акутној фази одговора полиморфонуклеари мигрирају ка месту општења привучени хемотаксичним факторима створеним у општењеним ћелијама. На месту деловања долази до ослобађања два основна фактора фагоцитозе: лизозима и $O_2^{\cdot-}$. Лизозими делују на општењене протеине и делове ћелија док се $O_2^{\cdot-}$ ствара уз помоћ мијелопероксидазе и *NADPH* оксидазе (32). Супероксид дисмутаза у цитоплазми може да конвертује $O_2^{\cdot-}$ у H_2O_2 , који даље уз помоћ јона метала може да пређе у HO^{\cdot} или у хипохлорну киселину.



Колико је важна улога *NADPH* оксидазног система у одбрани организма од патогених фактора најбоље се илуструје на примеру хроничне грануломатозе. Код овог генског поремећаја дефицит специфичних компоненти оксидаза смањује продукцију $O_2^{\cdot-}$, при чему се јављају рекурентне бактеријске и гљивичне инфекције (31).



Имајући у виду време потребно за нетрофилну инфилтрацију, овај начин вероватно не представља примарни извор продукције слободних радикала током краткотрајног вежбања. Он може да послужи ка важан секундарни извор стварања слободних радикала током периода опоравка након интензивног вежбања.

Новија истраживања скрећу пажњу на ауто-оксидација катехоламина, миоглобина и хемоглобина која могу представљати потенцијалне изворе стварања слободних радикала током интензивног физичког напора (33).

ЗАКЉУЧАК

На основу обимних истраживања извршених у *in vivo* и *in vitro* условима како на људима тако и на животињама може се закључити да интензивна физичка активност повећава продукцију слободних радикала и доводи до појаве оксидативног стреса (Сл.2). Боље познавање механизма настанка слободних радикала олакшава препознавање и превенцију овог процеса и у средиште пажње нових истраживања уводи антиоксидантну суплементацију.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jenkins R.: Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(2): 670S-674S.
2. Nesmeyanov A.N., Nesmeyanov N.A.: Fundamentals of organic chemistry, MIR Moscow 1981; 4.
3. Halliwell B., Gutteridge J.M.C.: Free radicals in biology and medicine. 1985; CLARENDON PRESS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, NEWYORK.
4. Jovičić A.: Slobodni radikali, lipidni peroksidi i nervni sistem, *Vojno sanitetski pregled* 1991, 48:61-67.
5. Đorđević V., Pavlović D., Kocić G.: Biohemija slobodnih radikala 2000, Medicinski fakultet, Niš.
6. Pederson T.C., Buege J.A., Aust S.D.: Microsomal electron transport. The role of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-cytochrome c reductase in liver microsomal lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1973; 248(20): 7134-41.
7. Boveris A., Chance B.: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973; 134(3): 707-716.
8. Bielski B.H., Arudi R.L., Sutherland M.W.: A study of the reactivity of HO₂/O₂- with unsaturated fatty acids, *J Biol Chem* 1983; 258(8): 4759-4761.
9. Fridovich S.E., Porter N.A.: Oxidation of Arachidonic Acid in Micelles by Superoxide and Hydrogen Peroxide, *J Biol Chem* 1981; 256(1): 260-265.
10. Lotscher H.R., Winterhalter K.H., Carafoli E., Richter C.: Hydroperoxide-induced loss of pyridine nucleotides and release of calcium from rat liver mitochondria, *J Biol Chem* 1980; 255(19): 9325-9330.
11. Sakurai T, Sugioka K, Nakano M: O₂- generation and lipid peroxidation during the oxidation of a glycosylated polypeptide glycosylated polylysine in the presence of iron-ADP, *Biochim Biophys Acta* 1990; 1043(1): 27-33.
12. Mirić D.: Proučavanje slobodnih radikala i antioksidantne zaštite u krvi i likvoru obolelih od meningitisa. *Doktorska Disertacija* 1997; Medicinski fakultet, Priština.
13. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, et al: Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation, *J Appl Physiol* 1978; 45: 927-932.
14. Inoue T., Mu Z., Sumikawa K., et al.: Effect of Physical Exercise on the Content of 8-Hydroxydeoxyguanosine in

- Nuclear DNA Prepared from Human Lymphocytes. *Cancer Science* 1993; 84: 720-725.
15. Margaritis I., Tessier F., Richard M.J., Marconnet P.: No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors, *Int J Sports Med* 1997; 18(3): 186-90.
16. Witt EH, Reznick AZ, Viguie CA, et al: Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation.. *Review J Nutr* 1992; 122(3 Suppl): 766-73.
17. Ji Li Li.: Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1999, 222:283-292.
18. Cooper C.E., Vollaard N.B.J., Choueiri T., Wilson M.T.: Exercise, free radicals and oxidative stress, *Biochem Soc Trans* 2001; 30(5): 280-285.
19. Lovlin R., Cottle W., Pyke I., et al.: Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol* 1987; 56(3): 313 -316.
20. Koyama K., Kaya M., Ishigaki T., et al.: Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise, *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1999; 80(1): 28 -33.
21. Maughan R.J., Donnelly A.E., Gleeson M., et al: Delayed-onset muscle damage and lipid peroxidation in man after a downhill run., *Muscle Nerve* 1989; 12(4): 332-6.
22. Hartmann A., Pfueller S., Dennog C., et al.: Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or induction of micronuclei. *Free Radic Biol Med* 1998; 24(2): 245-51.
23. Stupka N., Lowther S., Chorneyko K., et al.: Gender differences in muscle inflammation after eccentric exercise. *J Appl Physiol* 2000; 89: 2325-2332.
24. Evans W.J.: Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(2): 647s-652s.
25. Ji L.L.: Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med* 1995; 18(6): 1079-1086(8).
26. Zhang L., Yu L., Yu C.: Generation of Superoxide Anion by Succinate-Cytochrome c Reductase from Bovine Heart Mitochondria. *J Biol Chem* 1998; 273(51): 33972-33976.
27. Demin O.V., Kholodenko B.N., Skulachev V.P.: A model of O₂⁻ generation in the complex III of the electron transport chain, *Molecular and Cellular Bioch.* 1998; 184(1-2): 21 - 33.
28. Sahlin K., Ekberg K., Cizinsky: Changes in plasma hypoxanthine and free radical markers during exercise in man. *Acta Physiol Scand* 1991; 142(2): 275-81.
29. Radak Z., Asano K., Inoue M., et al.: Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 1995; 79: 129-135.
30. Rasanen L.A., Wiitanen P.A.S., Lilius E.M., et al.: Accumulation of Uric Acid in Plasma after Repeated Bouts of Exercise in the Horse, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 1996; 114(2): 139-144(6).
31. Leeuwenburgh C., Fiebig R., Chandwaney R., Ji L. L.: Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1994; 267(2): R439-R445.
32. Petrone W.F., English D.K., Wong K., McCord J.M.: Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma, *Proc Natl Acad Sci USA Medical Sciences* 1980; 77(2): 1159-1163.
33. Pincemail J., Camus G., Roesgen A., et al.: Exercise induces pentane production and neutrophil activation in humans. Effect of propranolol. *Eur J Appl Physiol* 1990; 61(3-4): 319-322.