

АНТИОКСИДАЦИОНО ДЕЈСТВО ВИТАМИНА Ц У ОКСИДАЦИОНОМ СТРЕСУ ИЗАЗВАНОМ ИНТЕНЗИВНОМ ФИЗИЧКОМ АКТИВНОШЋУ

Поповић Љ.¹, Митић Р. Н.¹, Радић И.¹, Мирић Д.², Крчић Б.³

¹Институт за патолошку физиологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

²Институт за биохемију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

³Интерна клиника, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

ANTIOXIDANT ROLE OF ASCORBIC ACID IN OXIDATIVE STRESS INDUCED BY STRENUOUS EXERCISE

Поповић Љ.¹, Митић Р. Н.¹, Радић И.¹, Мирић Д.², Крчић Б.³

¹Institute of pathophysiology, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

²Institute of biochemistry, Medical faculty Priština, Kosovska Mitrovica

³Internal clinic, 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 is reduced to H₂O and ATP, but smaller part (2-5%) results in an increased leakage of electrons from the mitochondrial respiratory chain, forming various reactive oxygen species ROS (O₂^{-•}, H₂O₂, i OH[•]). These free radicals are capable of triggering a chain of damaging biochemical and physiological reactions (oxidative stress, lipid peroxidation), as a base for skeletal muscles damage after exercise. MDA (malondialdehyde) is a marker of exercise induced lipid peroxidation process. L-ascorbic acid is a major aqueous-phase antioxidant. To estimate antioxidant role of ascorbic acid we use rate between dehydroascorbate and ascorbate. In this paper those markers of lipid peroxidation (MDA, MDA ind, % ind MDA), and ascorbic acid status (ascorbic acid Asc, ascorbat A, dehidroascorbat DHA, DHA/A) were determined in 30 students, in rest and after treadmill running protocol (Bruce Treadmill Protocol). It was found that after the treadmill test, plasma MDA level had increased from 3,04 to 4,39 μM/L (p<0,0001) and % ind MDA decreased significantly from 35% to 24,7% (p=0,0003). Plasma ascorbic acid was also found to be higher after the treadmill test comparing to rest level (from 55,4 to 67,6 μM/L). DHA/A level in rest was 1,62 and after treadmill test it increased to 2,05 (p=0,0014). These results suggests that strenuous exercise increased process of lipid peroxidation (MDA, % ind MDA), but in the same time increased ascorbic acid level in plasma and DHA/A rate indicates stronger activation of nonenzymatic antioxidant defense system.

Key words: exercise; oxidative stress; free radicals; lipid peroxidation; ascorbic acid

САЖЕТАК

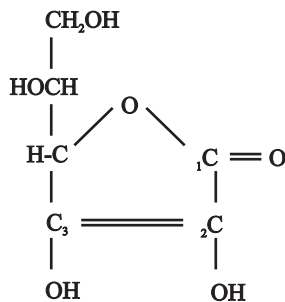
Физичка активност појачаног интензитета праћена је изразитим повећањем потрошње кисеоника у целом организму, а посебно од стране скелетних мишића. Већи део тог кисеоника се у митохондријама трансформише у АТФ и H₂O, док се мањи део (2-5%), као последица губитка електрона из електронског транспортног ланца, конвертује у реактивна кисеоничка једињења-ROS (O₂^{-•}, H₂O₂, i OH[•]). Сматра се да је стварање слободних радикала (ROS) основа за почетак серије биохемијских и физиолошких промена (липидна пероксидација), које се налазе у основи општења скелетних мишића насталих након интензивног физичког напора. Липидну пероксидацију утврђујемо мерењем маркера липидне пероксидације познатог као малондиалдехид (MDA). Л-аскорбинска киселина (витамин Ц) представља најефикаснији хидросолубилни антиоксидант. Када се жели процена антиоксидантне улоге аскорбинске киселине, најчешће коришћена варијабла је однос дехидроаскорбат/аскорбат (DHA/A). У презентованом раду одређивани су параметри липидне пероксидације (MDA, % индукције MDA) као и статус аскорбинске киселине (Asc, DHA, аскорбат - А, DHA/A) код 30 студената, пре и након теста интензивног физичког оптерећења на тредмилу (Bruce Treadmill Protocol). Након интензивног физичког напора ниво MDA у плазми расте са 3,04 μM/L на 4,39 μM/L (p < 0,0001), док % индукције MDA значајно пада са 35% на 24,7% (p=0,0003). Primeћено је повећање концентрације аскорбинске киселине у плазми (од 55,4 μM/L на 67,6 μM/L; p < 0,0001), као и односа DHA/A у плазми (1,62 пре теста на 2,05 након теста; p = 0,0014). Добијени резултати указују да интензиван физички напор доводи до интензивирања процеса липидне пероксидације (MDA, % индукције MDA) који настају као резултат индукованог оксидационог стреса. Током овог процеса дошло је до повећаног ангажовања аскорбинске киселине (Asc) и њеног директног укључења у процес антиоксидационе заштите (DHA/A).

Кључне речи: вежбање; оксидациони стрес; слободни радикали; липидна пероксидација; аскорбинска киселина

УВОД

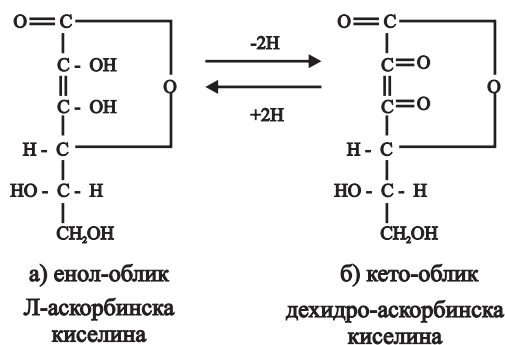
Откриће витамина Ц (аскорбинске киселине) везује се за име мађарског научника Albert Szent Gyorgy-a (1927) који је из коре надбубрежне жлезде изоловао кристалну супстанцу са антискорбутичним дејством. Годину дана касније исту супстанцу изоловао је и из поморанџе и купуса и дао јој име хексуронска киселина (1). Аскорбинска киселина представља безбојну или слабо жуту кристалну супстанцу растворљиву у води. Може се наћи у 4 стереоизомерне форме (ЛЛ, ЛД, ДЛ, ДД) односно 4 молекула састављена од истих атома који су међусобно повезани на исти начин али се разликују у односу на распоред у простору. Л - аскорбинска киселина или витамин Ц је заправо Л-Л-стереоизомер, док облик Д-Д одговара његовој слици у огледалу. Антискорбутично дејство има само Л-Л облик али је важно истаћи да су сва 4 стереоизомера подједнако активна у оксидоредукционим реакцијама (2).

Л-аскорбинска киселина у биохемијском смислу представља алфа-кето-лактон са формулом $C_6H_8O_6$ (Слика 1), молекулском тежином од 176,13 и душлом везом између С-2 (алфа) и С-3 (бета) атома (3).



Слика 1. Л-аскорбинска киселина

Аскорбинска киселина се у раствору брзо оксидише и тада испољава своје јако редукујуће својство. Када се оксидише она губи 2 атома водоника и тада настаје дехидроаскорбинска киселина (Слика 2). Ова реакција је реверзибилна. Ако оксидација иде даље онда се аскорбинска киселина претвара у кетонску киселину (1). Захваљујући овој својој особини аскорбинска киселина у организму има значајну улогу у оксидоредукционим процесима.



Слика 2. Оксидација аскорбинске киселине

Концентрација аскорбинске киселине у ткивима и течностима организма варира на индивидуалној бази. Концентрација у ткивима превазилази ону у течностима за 3-10 пута. Надбубрежне жлезде, хипофиза и очно сочиво имају највећи садржај витамина Ц ($140\mu\text{M}/100$ гр ткива) за разлику од плувачке или плазме који имају најнижу концентрацију аскорбинске киселине. Својство витамина Ц да је растворљив у води спречава његово нагомилавање и задржавање у масном ткиву (4). Неспособност човека да синтетише аскорбинску киселину објашњава се као последица мутације гена и недостатка ензима Л-гулонолактон оксидазе, који је неопходан за конверзију Л-гулонолактона у Л-аскорбинску киселину (5). У патолошким стањима, која укључују прооксидациони ефект, нагомилавање дехидроаскорбата и разградња аскорбата представљају доминантни процес (6, 7).

Од појаве скорбута, прве истражене и доказане хиповитаминозе витамина Ц, па до данас, готово да не постоји патолошко стање које није праћено падом вредности овог витамина у плазми. Објашњење оваквих налаза стигло је са истраживањем деловања слободних радикала и процеса липидне пероксидације. Нека клиничка стања су проузрокована директно оксидационим стресом, међутим чешћи је случај да оксидациони стрес настаје као последица самог обољења, при чему даје свој значајни допринос даљем току болести (8, 9). Немогућност синтезе аскорбинске киселине за човека представља фундаментални стрес, који сам по себи може да утиче и мења адаптивни одговор на дејство разних других стресора. Повезаност аскорбинске киселине и стресних стања уочен је на основу следећих промена:

- Различити стресови доводе до пада нивоа аскорбинске киселине у крви и органима;
- Као значајан антиоксидант аскорбинска киселина има важну улогу у превенцији и ублажавању последица оксидационог стреса;
- Надокнада аскорбинске киселине је корисна за активирање одговарајућег адаптивног одговора.

Прва опажања која повезују физичку активност са оксидационим стресом и повећаном липидном пероксидацијом, објављена су 1978 године од стране Dillard и сар. (10). Од тада се увећао број доказа који подржавају хипотезу да физичка активност може да интензивира стварање слободних радикала и води ка настанку оксидационог стреса. 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 трансформира у АТФ и H_2O , док се мањи део (2-5%), као последица губитка електрона из електронског транспортног ланца, конвертује у реактивна кисеоничка једињења - ROS ($\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot}). Сматра се да је стварање слободних радикала основа за почетак серије биохемијских и физиолошких промена које настају током појачане физичке активности и познате су као оксидациони

стрес (11). Када се стварање слободних радикала интензивира (продужено аеробно вежбање) или када је антиоксидативна одбрана ослабљена (нутритивни дефицит), долази до ремећења постојеће равнотеже у организму и стварања услова за ћелијска и ткивна оштећења. Директно мерење слободних радикала је отежано због њиховог кратког времена полуживота, због чега се највећи број студија које су се бавиле изучавањем ефекта вежбања на оксидациони стрес, ослањају на идентификовање и мерење маркера ткивних оштећења изазваних слободним радикалима.

ЦИЉ РАДА

Из свега наведеног јасни су разлози који интензивну физичку активност (вежбање) чине погодним моделом за проучавање динамичког баланса између оксидационог изазова и антиоксидационе одбране у биолошким системима. Имајући у виду наведене податке, постављени циљ овог истраживања је:

1. Испитати природни фон липидне пероксидације код неутренираних особа пре и након излагања интензивном физичком напору;
2. Испитати протективно (антиоксидационо) ангажовање аскорбинске киселине у условима интензивног физичког оптерећења неутренираних особа.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

Учесници у испитивању

У испитивању је учествовало 30 студената медицине и стоматологије Медицинског факултета у Приштини, од чега је 21 био мушког пола (70%), а 9 (30%) женског пола. Просечна старост групе износила је 22,5 година и кретала се у распону од 22 до 24 године. Просечна висина испитаника износила је 175,6 цм, а просечна тежина 70,6 кг. На основу анамнестичких података и физикалног налаза искључено је присуство акутних и хроничних обољења. Испитаници су негирално употребу лекова, дрога, алкохола и додатног уноса витаминских препарата.

Експериментални протокол

Пре почетка теста оптерећења на тредмилу испитаницима је венепункцијом кубиталне вене узимана венска крв и одређивана базална вредност MDA, индукованог MDA, % индукције MDA, аскорбинска киселина (Asc), дехидроаскорбинска киселина (DHA), аскорбат (A) и однос DHA/A. За одређивање оптерећења на тредмилу коришћен је Bruce Treadmill Protocol (12, 13). Пет минута након завршетка физичког оптерећења понављана је процедура узимања венске крви и одређивање тражених параметара. Биохемијска испитивања обављена су на Институту за биохемију медицинског факултета у Приштини.

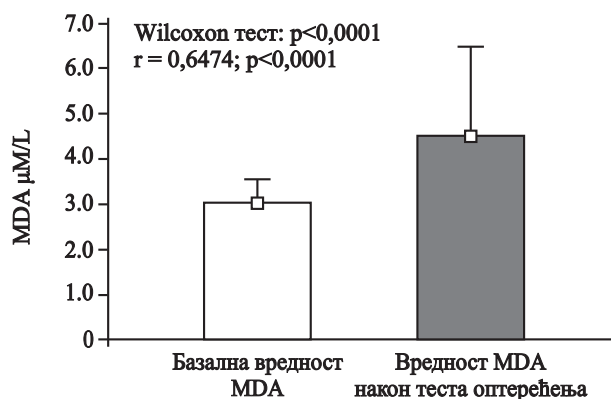
Статистичке методе

Статистичка обрада података извршена је коришћењем SPSS/PC софтверског пакета (вер. 10.0). Од параметара дескриптивне статистике одређивани су: средња вредност (\bar{x} -бар) и стандардна девијација (СД),

а од компаративних статистичких метода коришћен је Студентов Т-тест и Wilcoxon-ов тест (када дистрибуција није одговарала Гаусовом типу). Као статистички значајне узимане су вредности са $p < 0,05$.

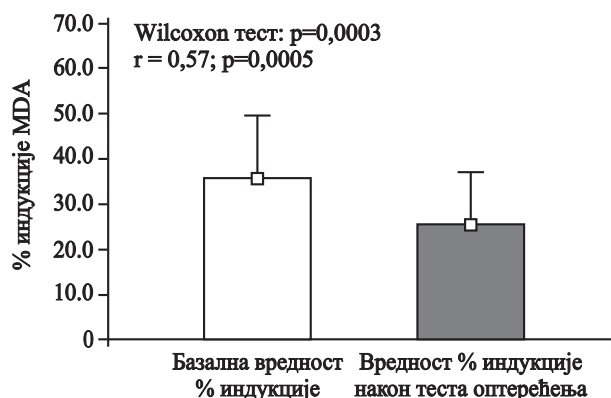
РЕЗУЛТАТИ

На графиконима 1 и 2 приказане су вредности показатеља липидне пероксидације (MDA и % индукције MDA) пре и након теста интензивног физичког оптерећења.



Графикон 1. Упоредни однос концентрације малондиалдехида (MDA) у серуму пре и након теста физичког оптерећења.

У овом раду утврђено је да је вредност MDA у плазми студената пре извођења теста физичког оптерећења (базална вредност) износила 3,04 μM/L, да би након завршеног теста дошло до њеног значајног повећања на 4,4 μM/L. Тај пораст је био статистички изузетно значајан ($p < 0,0001$) и указује да интензивирани процес липидне пероксидације настаје као последица појачане физичке активности.

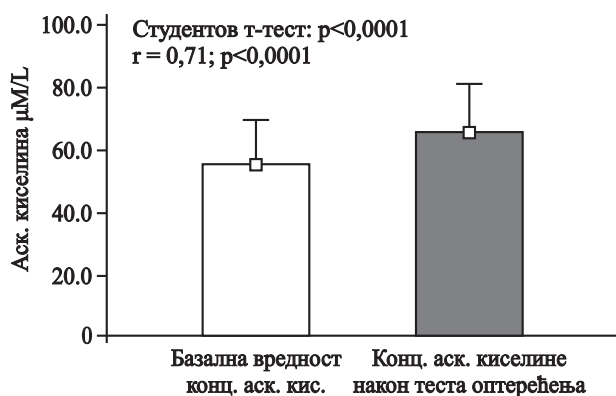


Графикон 2. Упоредни однос % индукције малондиалдехида у серуму пре и након теста физичког оптерећења.

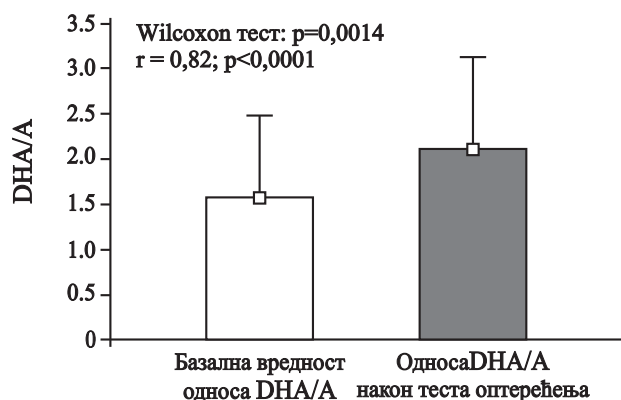
Базална вредност % индукције MDA износила је 35%, да би након теста оптерећења та вредност значајно опала (24,71%, $p = 0,0003$). Ово смањење % индукције након физичког оптерећења указује нам да је напор којем су испитаници били изложени интензивирао про-

цес липидне пероксидације и на тај начин редуковао супстрат на који делују соли гвожђа и додатно стварају MDA.

На графиконима 3 и 4 приказане су вредности концентрације аскорбинске киселине у плазми пре и након теста физичког оптерећења као и промена односа DHA/A у истим условима.



Графикон 3. Упоредни однос концентрације аскорбинске киселине у серуму пре и након теста физичког оптерећења.



Графикон 4. Упоредни однос DHA/A у серуму пре и након теста физичког оптерећења

Базална вредност аскорбинске киселине у плазми студената износила је 54,4 μM/L, да би пет минута након завршетка теста њена концентрација порасла на 67,37 μM/L. Та промена је показивала статистички изузетну значајност ($p < 0,0001$).

На почетку испитивања однос DHA/A износио је 1,62, да би након теста порастао на 2,05 ($p = 0,0014$). Ово значајно повећање односа DHA/A након завршетка теста показатељ је укључивања редокс-капацитета аскорбинске киселине у процес липидне пероксидације са циљем спречавања деловања слободних радикала насталих током интензивног физичког оптерећења (оксидациони стрес).

ДИСКУСИЈА

Постоје три главна извора одговорна за продукцију слободних радикала током вежбања. То су: електронски транспортни ланац у митохондријама, исхемијско-ре-

перфузионо општећење и активирани фагоцити на месту ћелијског и ткивног општећења (14). Новија истраживања су овим механизмима придодала и аутооксидацију катехоламина као и конверзију слабог супероксида у јачи хидроксил радикал уз помоћ млечне киселине (15, 16). При томе је познато да је интензивна физичка активност последично праћена лактат ацидозом у крви и мишићима, а такође и значајним повећањем нивоа катехоламина у плазми (17).

Највећи број студија и данас користи одређивање MDA као показатеља интензитета липидне пероксидације због чега је и у нашем истраживању коришћен у сврху праћења овог процеса. MDA настаје као крајњи продукт липидне пероксидације арахидонске киселине. Своје штетно дејство малондиалдехид испољава реаговањем са тиолним и аминок групама ензима и тако их потпуно инхибише (18). Малондиалдехид може реаговати и са бочним аминок групама протеина и градити аминокпропенске Шифове базе које представљају прекурсоре пигмента старења или липофусцинских пигмената.

Промена нивоа MDA у крви или испитиваним ткивима, након интензивног физичког оптерећења, примећена је како код људи, тако и у истраживањима изведеним на животињама (19, 20, 21, 22, 23). Резултати које смо ми добили у складу су са истраживањима где је утврђено да је дошло до повећања нивоа MDA у серуму и то у позитивној корелацији са степеном интензитета физичке активности.

Улогу соли двовалентног гвожђа у катализовању процеса формирања хидроксилних радикала (HO*) из водоник пероксида (H₂O₂) приметио је Фентон још 1894 год., па је у даљим изучавањима тај процес по њему и добио име Фентонова реакција. Каталитичко својство соли гвожђа у разградњи даље су проучавали Haber и Weiss (1934 год) и закључили да током ових реакција може да настане цела серија нових различитих радикала (24). Процењено је да се у организму одраслог човека налази 4-5 г гвожђа, од чега је око 70% уграђено у хемоглобин, а 5% у миоглобин. У нормалним околностима у циркулацији нема гвожђа ван комплекса са транспортним протеином.

У презентованом раду Фентонову и Haber-Weiss-ову реакцију изводили смо додавањем соли двовалентног гвожђа у узорке плазме узимане пре и након теста интензивног физичког оптерећења. Ова аналитичка процедура примарно је замишљена као методологија појачања комплекса насталих процесом липидне пероксидације имајући у виду да се нестабилни пероксиди масних киселина убрзано даље деградирају у присуству јона метала са променљивом валенцом. Том приликом одређивана је вредност индукованог MDA која нам је била потребна ради израчунавања његовог процентуалног удела у серуму, као прецизног показатеља интензитета накнадно одиграног процеса липидне пероксидације (25, 26). Смањење процента индукованог MDA након теста физичког оптерећења био је још један од показатеља који је потврдио претпоставку да интензивна физичка активност може да индукује оксидациони стрес тј. да интензивира процес липидне пероксидације.

Л-аскорбинска киселина представља најефикаснији хидросолубилни антиоксидант. Ту своју способност базира на могућности да неутралише многе интермедијере и продукте слободнорадикалских процеса, при чему из ових интермедијера настају стабилна једињења. Антиоксидационо дејство витамина Ц у ин vivo условима примећено је у експериментима изведеним на животињама као и у истраживањима на хуманој популацији (27, 28, 29, 30).

Концентрација витамина Ц у плазми показује карактеристичне промене током и након стресних стања индукованих појачаном физичком активношћу. Glesson и сар. (31) су објавили да концентрација аскорбинске киселине у плазми расте од базалних 52,7 $\mu\text{M/L}$ на 67,0 $\mu\text{M/L}$ непосредно након завршетка трке дугачке 21 км. 24 сата након завршетка трке концентрација аскорбинске киселине била је за 20% нижа у односу на базалну вредност и остајала тако ниска наредних 48 сати. Duthie и сар. (32) су такође утврдили да је концентрација аскорбинске киселине у плазми повећана непосредно након завршетка маратона, али се вредност враћала на нормалну за 24 сата. Каснијим испитивањима неке од промена непосредно након трке приписиване су паду волумена плазме за 6%. Повећана вредност концентрације аскорбинске киселине у плазми 5 мин након завршетка теста физичког оптерећења уочена је и у нашем истраживању.

Појачана физичка активност проузрокује ослобађање аскорбинске киселине (заједно са катехоламинима) из надбубрежне жлезде у крв. Повећање концентрације аскорбинске киселине у крви је у позитивној корелацији са истовременим повећањем кортизола у плазми, што је примећено у испитивањима извршеним како на експерименталним животињама тако и код људи. На супрот томе, промена концентрације аскорбинске киселине у надбубрегу била је обрнуто пропорционална промени концентрације аскорбинске киселине у плазми. Концентрације аскорбинске киселине у плазми и надбубрежној жлезди показују значајну негативну корелацију. Промена концентрације аскорбинске киселине у надбубрежној жлезди услед вежбања негативно кореспондира у односу на актуелну промену концентрације аскорбинске киселине у плазми (31, 33, 34).

Када се жели процена антиоксидантне улоге аскорбинске киселине, најчешће коришћена варијабла у ту сврху је однос дехидроаскорбат/аскорбат (DHA/A) у ткивима и телесним течностима (35). Из тог разлога је и у презентованом раду одређиван овај однос. Уочено значајно повећање односа DHA/A након завршетка теста интензивног физичког оптерећења, директни је показатељ укључивања редокс-капацитета аскорбинске киселине у процес липидне пероксидације са циљем спречавања или лимитирања деловања слободних радикала насталих током интензивног физичког оптерећења (оксидациони стрес).

ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

- Интензивна физичка активност доводи до појаве оксидационог стреса чије се деловање огледа у ин-

тензивирању процеса липидне пероксидације и последичног општећења ћелија (MDA, indMDA),

- Током оксидационог стреса изазваног интензивном физичком активношћу долази до мобилизације аскорбинске киселине из ткива и пораста њене концентрације у плазми (Asc),

- У условима оксидационог стреса изазваног интензивном физичком активношћу аскорбинска киселина се укључује у процес његовог лимитирања (долази до испољавања протективног дејства аскорбинске киселине - DHA/A).

ЛИТЕРАТУРА

1. Pavlović S. Vitamini 1992, Niš.
2. Pauling L. Živeti duže osećati se bolje 1998, Esoteria, Beograd.
3. Bogdanović S.B., Farmakologija: opšti deo specijalni deo receptura, 4. izd. 1981, Naučna knjiga, Beograd.
4. Howald H; Segesser B; Korner WF. Ascorbic acid and athletic performance. *Ann NY Acad Sci.* 1975; 258:458-64.
5. Nishikimi M, Fukuyama R, Minoshima S, Shimizu N, Yagi K., Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Bio Chem* 1994; 269(18):13685-13688.
6. Bode AM, Yavarow CR, Fry DA, Vargas T. Enzymatic basis for altered ascorbic acid and dehydroascorbic acid levels in diabetes. *Biochem Biophys Res Comm* 1993; 191(3):1347-53.
7. Somogyi A, Szaleczky E, Pusztai P, Braun L, Sárman B. Plasma antioxidants in type 2 diabetes. *Magy Belorv Arch* 1997; 50:187-192.
8. Halliwell B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs* 1991; 42:569-605.
9. Sahnoun Z, Jamoussi K, Zeghal KM. Free radicals and antioxidants, human physiology pathology and therapeutic aspects (Article in French). *Therapie* 1997; 52(4):251-70.
10. Dillard C.J., Litov R.E., Savin W.M., Dumelin E.E., Tappel A.L. Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *J Appl Physiol* 1978; 45:927-932.
11. Ji LL. Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radic Biol Med* 1995; 18(6):1079-1086(8).
12. American College of Sports Medicine's Guidelines for Exercise Testing and Prescription 6th ed 1995; Pa: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
13. Powers SK, Howley ET. *Exercise Physiology: Theory and Application to Fitness and Performance* (4th Ed.) 2001; Dubuque, IA: McGraw-Hill.
14. Baskin CR, Hinchcliff KW, DiSilvestro RA, Reinhart GA, Hayer MG, Chew BP, Burr JR, Swenson RA. Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage and resistance to oxidative damage during prolonged exercise in sled dogs. *Am J Vet Res* 2000; 61(8):886-891.
15. Ramel A, Wagner KH, Elmadfa I. Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. *Eur J Nutr* 2004; 43(1):2-6.
16. Popović Lj, Mitić R.N, Mirić M, Radić I. Mehanizmi nastanka oksidativnog stresa izazvanog intenzivnom fizičkom aktivnošću. *Praxis Medica* 2008; 36(1-2):89-93.
17. Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, Chevanne M, Vincent S, Sergent O, Cillard J, Gratas-Delamarche A. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after

- a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003; 89(1):14-20.
18. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222(1):1-15.
 19. Alessio H.M, Goldfarb A.H, Cutler R.G. MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 1988; 255(6): C874-C877.
 20. Venditti P, Di Meo S. Antioxidants, Tissue Damage, and Endurance in Trained and Untrained Young Male Rats. *Arch Biochem Biophys* 1996; 331(1):63-68(6).
 21. Koska J, Blazicek P, Marko M, Grna JD, Kvetnansky R, Vigas M. Insulin; catecholamines; glucose and antioxidant enzymes in oxidative damage during different loads in healthy humans. *Physiol Res* 2000; 49 Suppl 1:S95-100.
 22. Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, Haga S, Ji LL, Ohno H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 2001; 84(1-2):1-6.
 23. Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Comm* 1982; 107(4):1198-1205.
 24. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246(2):501-14.
 25. Mirić D. Proučavanje slobodnih radikala i antioksidantne zaštite u krvi i likvoru obolelih od meningitisa. Doktorska Disertacija 1997; Medicinski fakultet, Priština.
 26. Popović Lj. Uticaj askorbinske kiseline na antioksidantni status u indukovanim stresnim stanjima. Doktorska Disertacija 2006; Medicinski fakultet, Univerzitet u Prištini.
 27. Carr CA, Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr* 1999; 69(6):1086-1107.
 28. Kaminski M, Boal R. An effect of ascorbic acid on delayed-onset muscle soreness. *Pain* 1992; 50(3): 317-21.
 29. Khassaf M, McArdle A, Esanu C, Vasilaki A, McArdle F, Griffiths R.D, Brodie D.A, Jackson M.J. Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *Physiol* 2003; 549(2): 645-652.
 30. Tauler P, Aguiló A, Gimeno I, Noguera A, Agustí A, Tur JA, Pons A. Differential Response of Lymphocytes and Neutrophils to High Intensity Physical Activity and to Vitamin C Diet Supplementation. *Free Radic Res* 2003; 37(9):931-938.
 31. Gleeson M, Robertson JD, Maughan RJ. Influence of exercise on ascorbic acid status in man. *Clinical Science* 1987; 73:501-505.
 32. Duthie GG, Robertson JD, Maughan RJ, Morrice PC. Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Arch Biochem Biophys* 1990; 282(1): 78-83.
 33. Rokitzki L, Logemann E, Sagredos AN, Murphy M, Wetzel-Roth W, Keul J. Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress. *Acta Physiol Scand* 1994; 151(2):149-58.
 34. Mastaloudis A, Morrow JD, Hopkins DW, Devaraj S, Traber MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radic Biol Med* 2004; 36(10):1329-41.
 35. Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berenshtein E, Stadtman ER, Epstein Y. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *PNAS* 2003; 100(9):5119-5123.