

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEKSANDER MOHORČIČ

**DOLOČANJE OKSIDATIVNEGA STRESA PRI
VRHUNSKIH ŠPORTNIKI NEPOSREDNO PO
INTENZIVNI OBREMENITVI**

**DETERMINATION OF OXIDATIVE STRESS IN TOP ATHLETES DIRECTLY
AFTER STRENOUS EXERCISE**

DIPLOMSKA NALOGA

LJUBLJANA, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja. Meritve, elementne analize in druga merjenja pa sem opravil v laboratoriju za fiziologijo športa na Fakulteti za šport, pod somentorstvom dr. Radoja Milića.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja in somentorstvom dr. Radoja Milića.

Podpis:

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju, da me je sprejel pod svoje mentorstvo ter somentorju dr. Radoju Miliću, za pomoč pri izvedbi raziskovalnega dela diplome.

Iskreno se zahvaljujem tudi prof. dr. Slavku Pečarju, za izčrpen pregled diplomskega dela ter prof. dr. Mirjani Gašperlin, za njene koristne nasvete in spodbudne besede.

Posebna zahvala pa velja tudi Savini, za njeno izjemno pripravljenost pri oblikovanju končnega izgleda diplome.

Ne nazadnje pa bi se želel zahvaliti mojim staršem ter bratu Samotu, za njihovo potrpežljivost in podporo tekom celotnega študija. Zahvaljujem pa se tudi vsem prijateljem, ki so me kakorkoli spodbujali pri nastajanju tega diplomskega dela.

*Znanost je treba imenovati le skupek receptov, ki vedno delujejo. Vse drugo je literatura.
(Valéry, Paul, 1871-1945)*

KAZALO

KAZALO	III
POVZETEK	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1.UVOD	1
1.1 OKSIDATIVNI STRES	2
1.2 REAKTIVNE KISIKOVE VRSTE.....	3
1.2.1 Neradikalske vrste kisika.....	3
1.2.2 Radikalske vrste kisika	4
1.2.3 Nastanek radikalov	5
1.2.4 Reakcije radikalov	6
1.2.5 Nastanek ROS v fizioloških procesih.....	8
1.2.6 Nastanek ROS v patoloških procesih	11
1.3 POVEČANJE OKSIDATIVNEGA STRESA	16
1.3.1 Dejavniki okolja	16
1.3.2 Spremembe metabolizma	17
1.3.3 Zmanjšanje antioksidantne zaščite	19
1.4 OKSIDATIVNI STRES PRI POVEČANI ŠPORTNI AKTIVNOSTI.....	19
1.4.1. Mitochondriji.....	20
1.4.2. Ksantinska oksidaza	21
1.4.3. Hemoglobin in mioglobin.....	21
1.4.4. Mikrosomi in peroksisomi.....	22
1.4.5. Polimorfonuklearni levkociti (PML).....	22
1.5 POSLEDICE POVEČANEGA OKSIDATIVNEGA STRESA.....	23
1.5.1 Pospešeno staranje.....	23
1.5.2 Srčno-žilne bolezni	24
1.5.3 Sladkorna bolezen	25
1.5.4 Kancerogene bolezni	26
1.6 Uravnavanje oksidativnega stresa	27
1.6.1 Vrste antioksidativnih sistemov	27
1.6.2 Antioksidanti (AO).....	27
1.6.3 Prilagoditev antioksidativnega sistema pri športni aktivnosti	33
1.7 DOLOČANJE OKSIDATIVNEGA STRESA.....	36
1.7.1 Metode, ki se uporabljajo za določanje oksidativnega stresa.....	36
1.7.3 Celokupni nivo oksidativnega stresa	41
2. NAMEN DELA	43

3. EKSPERIMENTALNO DELO	44
3.1 UDELEŽENCI RAZISKAVE.....	44
3.2 VZOREC MERJENCEV.....	45
3.3 POTEK FIZIČNE OBREMENTITVE	45
3.3.1 Kolesarji	46
3.3.2 Veslači	47
3.4 VZOREC	47
3.4.1 Potek jemanja vzorca krvi:	48
3.5 MATERIALI	48
3.6 APARATURE	49
3.7 METODE	49
3.7.1 Meritve na aparatu FRAS 4 (Free Radical Analytical System).....	49
3.7.2 Spremljajoče meritve.....	52
4. REZULTATI	55
4.1 REZULTATI BAP TESTA	55
4.1.1 Skupina kolesarjev.....	56
4.1.2 Skupina veslačev	56
4.1.3 Primerjava obeh skupin športnikov	56
4.1.4 Primerjava z normalno populacijo.....	57
4.2 REZULTATI D-ROMS - TESTA.....	57
4.2.1 Skupina kolesarjev.....	58
4.2.2 Skupina veslačev	59
4.2.3 Primerjava obeh skupin športnikov	60
4.2.4 Primerjava z normalno populacijo.....	60
4.3 REZULTATI VZPOREDNIH MERITEV	61
4.4 ZDRUŽITEV REZULTATOV OBEH SKUPIN	64
4.4.1 Vrednosti BAP testa	64
4.4.2 Vrednosti d-ROMs testa	65
4.4.3 Primerjava rezultatov športnikov z normalno populacijo.....	65
4.5 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV	67
4.5.1 Korelacija med BAP in d-ROMs testom	68
4.5.2 Korelacija med BAP testom in ostalimi parametri.....	68
4.5.3 Korelacija med d-ROMs testom in ostalimi parametri.....	68
5. RAZPRAVA	70

6. SKLEPI 78

LITERATURA: 79

POVZETEK

Diplomsko delo obsega spektrofotometrično določanje nivoja oksidativnega stresa v venski krvi vrhunskih športnikov, ki so bili neposredno izpostavljeni učinku intenzivne fizične obremenitve.

Intenzivna športna aktivnost predstavlja določeno stopnjo stresa, na katero se telo specifično odziva tudi preko nastajanja reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Povečana energijska presnova med vadbo namreč terja ustrezno povečan privzem kisika, kar se odraža preko večje tvorbe ROS. Tako lahko zlasti ekstremna fizična aktivnost, zaradi prekomernega nastajanja ROS poruši ravnovesje v organizmu in botruje nastanku patološkega stanja, ki ga imenujemo oksidativni stres.

Zato smo z našo raziskavo želeli ugotoviti, v kolikšni meri je oksidativni stres prisoten pri vrhunskih športnikih, pri katerih je intenzivna fizična obremenitev del njihovega vsakdanjega treninga. Pri tem nas je natančneje zanimala učinkovitost njihovega antioksidantnega obrambnega sistema ter nivo radikalov v krvi, pred in neposredno po intenzivni obremenitvi. Tako smo z našo raziskavo želeli zajeti oba faktorja, tako pro- kot anti-oksidativnega, ki skupaj odražata dejansko oksidativno stanje organizma.

S tem namenom smo izvajali meritve na skupini 63 vrhunskih športnikov, in sicer pri 21 kolesarjih in 42 veslačih, ki so bili neposredno izpostavljeni intenzivni obremenitvi. Pri tem smo z uporabo naprave FRAS 4, v venski krvi najprej določali biološki antioksidantni potencial po dodatku oksidacijskega reagenta (BAP test) in nato še količino reaktivnih kisikovih zvrsti, pred in po obremenitvi (d-ROMs test).

Rezultati meritev BAP testa so potrdili naša predvidevanja o visoko učinkovitem sistemu antioksidantov, kar je tudi v skladu z izsledki podobnih raziskav. Tega pa ne moremo povsem trditi za meritve d-ROMs testa, kjer smo ugotovili nizko koncentracijo ROS, ki se tudi po vadbi ni bistveno spremenila. K temu bi lahko pripomogla visoka učinkovitost antioksidantov, česar pa ne moremo trditi le na podlagi visokih vrednosti BAP testa, temveč bi morali upoštevati še dodatne parametre. Vseeno pa lahko zaključimo, da je izmerjeni celokupni nivo oksidativnega stresa na skupini vrhunskih športnikov nizek, in da so tako športniki dobro prilagojeni na oksidativni stres.

ABSTRACT

The diploma thesis consists of spectrophotometric determination of the level of oxidative stress in the venous blood of top athletes which were exposed to direct effects of intensive physical loading.

The intensive sport activity represents a certain level of stress to which the body responds also through production of reactive oxygen species (ROS). An increased energy metabolism during exercise namely demands suitably elevated oxygen uptake, which is reflected in the elevated level of ROS formation. Particularly extreme physical activity can due to excessive ROS formation in this manner compromise the equilibrium in the organism, and is thus responsible for the formation of a pathological condition, called oxidative stress.

We therefore tried to establish in what degree the oxidative stress is present in top athletes, for who the intensive physical loading is a part of their everyday training. We were interested specifically in effectiveness of their antioxidant defense system and the level of radicals in the blood before and immediately after intensive loading. In this manner we tried to capture both factors, – pro- and anti-oxidative one, who commonly reflect the actual oxidative state of the whole organism.

For this purpose, we performed measurements on a group of 63 top athletes, which included 21 bicyclists and 42 rowers, which were directly exposed to intensive loading. We used the FRAS 4 device to primarily determine the biological antioxidative potential after addition of oxidation agents (BAP test) and to secondarily also determine the quantity of reactive oxygen species before and after loading (d-ROMs test).

The results of BAP test measurements confirmed our suspicions of a highly effective system of antioxidants, which was in accordance with findings of similar research works. The same however can not be claimed for d-ROMs test measurements, where a low concentration of ROS was observed which also did not increase significantly even after the exercise. This could be aided by high effectiveness of antioxidants, but the latter can not be claimed solely on the basis of high BAP values, since additional parameters must also be taken into consideration. We can nonetheless conclude, that the measured total level of oxidative stress in a group of top athletes is low, and that the athletes are thus well adapted to the oxidative stress.

SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozin difosfat
AO	antioksidanti
AT	amonijev tiocianat
ATP	adenozin trifosfat
BAP	biološki antioksidantni potencial
BMI	delež telesne maščobe
CAT	katalaza
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
ESR	elektronska spinska resonanca
FRAS	(angl. free radical analytical system)
GPx	glutation peroksidaza
GSH	glutation
HR	frekvenca srčnega utripa
HSP	proteini toplotnega šoka (angl. heat shock proteins)
KKOS	kovinsko kataliziran oksidativni sistem
LDL	lipoproteini majhne gostote
MM	maksimalna moč
MPx	mieloperoksidaza
MV	minutni volumen srca
NAD ⁺	oksidirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NADH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
OS	oksidativni stres
p	vrednost signifikance
PF	maksimalni pretok zraka
PML	polimorfonuklearni levkociti
R	koeficient korelacije po Pearsonu
ROS	reaktivne kisikove vrste (angl. reactive oxygen species)
SA	superoksidni anion
SOD	superoksid dismutaza
TM	telesna masa
TV	telesna višina
UQ	ubikinon (koencim Q ₁₀)
VC	vitalna kapaciteta

1.UVOD

Človeški organizem je izpostavljen vplivom različnih oblik stresa, tako fizičnemu, psihičnemu ali kemičnemu, vsem pa je skupno, da lahko negativno vplivajo na naš organizem. Določena količina stresa je vedno prisotna in nekako usmerja, pospešuje ali zavira delovanje človeškega telesa. Žal pa smo dandanes preveč in prepogosto izpostavljeni prekomernemu stresu, kar ima zagotovo škodljive posledice.

To še posebej velja za posebno vrsto stresa, ki jo imenujemo oksidativni stres. Tej obliki stresa so zaradi pridobivanja energije s pomočjo kisika, izpostavljeni vsi aerobni organizmi. Za oksidativni stres bi lahko rekli, da je prav nevidno vpleten v naše življenje, saj opozori nase, šele ob izbruhu določenih bolezni. Škodljivega vpliva radikalov, katerih presežek predstavlja glavni razlog za tovrstni stres, se danes že dobro zavedamo. Vendar pa pri tem ostaja ključni problem zaznavanja oksidativnega stresa, kar bi nam omogočilo pravočasno ukrepanje in preprečilo izbruh mnogokaterih bolezni današnjega časa.

Dejavnikov, ki pospešujejo oksidativni stres je namreč veliko, mednje prav gotovo sodi hiter življenjski slog in onesnaženost okolja. Povečanje oksidativnega stresa pa lahko sproži tudi intenzivna fizična aktivnost, ki je neposredno povezana z večjim vnosom kisika v telo in posledično povečano tvorbo radikalov.

Morda se zdi to dejstvo ob splošnem zagovarjanju gibanja na prvi pogled protislovno, vendar to potrjujejo različne raziskave pri aktivnih športnikih. Training vrhunškega športnika namreč vsakodnevno vključuje izjemen fizični napor, kar se odraža tudi na oksidativnem stanju organizma. Vendar pa je pri tem potrebno upoštevati, da imajo vrhunski športniki v primerjavi z običajnimi posamezniki drugačen obrambni sistem, ki lahko ustrezno uravnava negativne posledice oksidativnega stresa. Ravno nasprotno pa velja za neredno ali pretirano telesno aktivnost, na katero telo ni prilagojeno.

1.1 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je vrsta "kemičnega stresa", ki je prisoten v živih organizmih zaradi povečane količine potencialno škodljivih agensov, t.i. reaktivnih kisikovih vrst - ROS (angl. reactive oxygen species). Po definiciji je oksidativni stres neposredna posledica škodljivega delovanja povečane količine teh visoko reaktivnih zvrsti na celice in tkiva (1). Gre za patološko stanje, ki se v organizmu pojavi zaradi prevelike produkcije radikalov in/ali zmanjšane učinkovitosti antioksidativnih sistemov.

Majhne količine ROS nastajajo tudi v normalnih okoliščinah, tekom fiziološke presnove celic. Sinteza določenih hormonov prav tako vključuje tvorbo radikalov. Nadalje proizvajajo radikale nekatere vrste levkocitov, kot orožje za uničenje bakterij, kar zagotavlja pomemben obrambni mehanizem pred okužbami. S tega vidika so radikali nenadomestljivi spremljevalci celične presnove. Vendar pa v določenih okoliščinah postane proizvodnja teh agensov prevelika, kar za celice pomeni smrtno grožnjo. Povečano količino radikalov lahko sprožijo številni zunanji dejavniki kot npr. različne vrste sevanja, nekatere kemikalije kot so pesticidi ali določena zdravila ter virusi in bakterije. Med notranje dejavnike pa lahko štejemo povečano stopnjo celične presnove, ki nastane pri določenih obolenjih (debelost, sladkorna bolezen, rak...) ali zaradi intenzivne fizične obremenitve pri neprilagojenem obrambnem sistemu antioksidantov (1).

Oksidativni stres je odgovoren za zgodnje staranje ter za vrsto pomembnih bolezni, kot npr. ateroskleroza, srčni infarkt, možganska kap, Alzheimerjeva bolezen, sladkorna bolezen, kronični bronhitis, siva mrena, nekatere vrste raka in drugo. V nasprotju s temi obolenji, oksidativni stres ne kaže simptomov oz. nima tipične klinične slike, ki bi opredelila njegovo prisotnost v organizmu (1). Vendar pa je pomembno, da se njegove prisotnosti zavedamo ter jo poskušamo nadzorovati zlasti v rizičnih primerih.

Pojav oksidativnega stresa je neobhodno povezan s prisotnostjo kisika v našem ozračju, ki pa je hkrati nujen za naš obstoj. Nesporno je kisik ena izmed tistih anorganskih molekul, brez katerih naše življenje v obstoječi obliki ne bi bilo mogoče. A vendar si je moč predstavljati visoko reaktivnost kisika, ki zmore spreminjati železo v rjo. Prav gotovo tudi v organizmu potekajo oksidacijski procesi, čeprav tega ne opazimo neposredno, to potrjujejo različni kisikovi presnovki.

1.2 REAKTIVNE KISIKOVE VRSTE

Kisik je nujno potreben za življenje in prehaja v telo s procesom dihanja, hkrati pa pri tem nastajajo mnoge reaktivne kisikove vrste. Mednje ne sodijo samo prosti kisikovi radikali kot sta hidroksilni in superoksidni radikal, temveč tudi druge spojine npr. vodikov peroksid in ozon (1). Vsem reaktivnim kisikovim spojinam pa je skupno, da so visoko reaktivne in lahko oksidirajo katerokoli organsko molekulo v organizmu od ogljikovih hidratov, maščob ali amino kislin. Spodnja preglednica prikazuje pomembne reaktivne vrste kisika, ki jih lahko razdelimo na radikalske in neradikalske vrste.

Preglednica I: Reaktivne kisikove vrste

Reaktivne kisikove vrste			
Radikalske vrste		Neradikalske vrste	
Superoksidni anion	$O_2^{\cdot -}$	Tripletni kisik	3O_2
Hidroksilni radikal	OH^{\cdot}	Singletni kisik	1O_2
Hidroperoksilni rad.	O_2H^{\cdot}	Ozon	O_3
Alkoksilni radikal	RO^{\cdot}	Vodikov peroksid	H_2O_2
Peroksilni radikal	ROO^{\cdot}	Hidroperoksid	ROOH
Aroksilni radikal	ArO^{\cdot}	Peroksidi	ROOR'
Semikinonski radikal	UQ^{\cdot}	Hipoklorna kislina	HClO

Reaktivnost kisika izvira iz elektronske strukture molekule kisika, pri čemer sta na zunanji orbitali prisotna dva neparjena elektrona. Zato lahko molekulo kisika označimo kot biradikal. Ključno pri tem je, da imata ločena elektrona enako usmerjena spina, kar opredeljuje tripletno osnovno stanje molekule. Zaradi takšne usmeritve spinov pride do izraza tudi efektivni magnetni moment, posledica česar je paramagnetnost. Tako v naravi najdemo kisikove molekule predvsem v tripletnem stanju, ki je v tem primeru energetsko najnižje. To pa je ravno obratno kot pri večini ostalih spojin, kjer je osnovno stanje z najnižjo energijo singletno (2, 3).

1.2.1 Neradikalske vrste kisika

Tripletni kisik (3O_2) je molekularni kisik, ki se nahaja v našem ozračju. Načeloma je slabo reaktiven, saj mora zaradi paralelnih spinov obeh neparjenih elektronov v oksidacijskih procesih pridobiti manjkajoča elektrona postopoma. Proces se pospeši ob prisotnosti reaktivnih molekul, radikalov ali prehodnih elementov in lahko sproži verižne

reakcije, ki vodijo do nastanka novih radikalov. Reaktivnost molekule kisika pa lahko naraste, tudi če se spremeni smer enega od spinov nesparjenih elektronov, kot je to v primeru singletnega kisika (2, 4).

Singletni kisik ($^1\text{O}_2$) poznamo v osnovnem in vzbujenem stanju. Slednji je zelo kratkoživ in s tem je njegov vpliv zanemarljiv. Kisikov singlet v osnovnem stanju nastane iz tripletne oblike, pri čemer se nesparjeni elektron pomakne v orbitalo višje energije, tako da se tvori elektronski par z nasprotno usmerjenima spinoma. Je zelo reaktiven, saj na preostalo prosto orbitalo z lahkoto sprejme nov elektron ali kar elektronski par (4). Nastane pri nekaterih kemičnih reakcijah in fotokemično, nadalje pa sproži reakcije, ki vodijo do nastanka endoperoksidov. V organizmu ponavadi nastaja pri fotodermatozah, osvetlitvah riboflavina in bilirubina. Temu primerno so tudi morebitne patološke spremembe omejene le na osvetljene dele kože (5).

Ozon (O_3) je tri-atomska molekula, sestavljena iz treh atomov kisika. Običajno nastaja preko fotodisociacije molekularnega kisika, kjer najprej nastane atomski kisik, le-ta pa nadalje reagira z molekularnim kisikom, da nastane ozon. Ozon je kisikov alotrop, ki je veliko manj stabilen od običajnega kisika. Čeprav ni radikal, je močan oksidant, veliko boljši od kisika. V organizmu lahko sproži nastanek radikalov, bodisi preko reakcij s polinasičenimi maščobnimi kislinami ali avtooksidacije lipidov. Hkrati pa lahko v vodnih raztopinah sproži tudi tvorbo hidroksilnega radikala (2).

1.2.2 Radikalske vrste kisika

Radikali so posamezni atomi, ioni in molekule ali njihovi deli, ki imajo na vsaj eni orbitali nesparjen elektron (1,2,3). Število elektronov je lahko sodo ali liho, pri tem je v primeru sodega števila elektronov, vsak elektron v svoji π razvezni orbitali. Čeprav so radikali sposobni obstajati samostojno, so zaradi primanjkljaja elektronov, ki je odgovoren za kemijsko nestabilnost, večinoma zelo kratkoživi in zato visoko reaktivni. Reagirajo z molekulami v svoji soseščini z namenom pridobiti manjkajoči elektron, ki mora imeti nasprotno smer spina kot nesparjeni elektron (2). Med radikale z lihim številom elektronov prištevamo: alkoksilni radikal (RO^\cdot), hidroksilni radikal (OH^\cdot), alkilni radikal (R^\cdot) ter druge. Biološko pomembni so predvsem kisikovi, ogljikovi, dušikovi in klorovi radikali (4).

1.2.3 Nastanek radikalov

Radikali nastajajo v naravi preko različnih mehanizmov, nato se lahko nadalje tvorijo novi radikali ali pa pride do njihove inaktivacije.

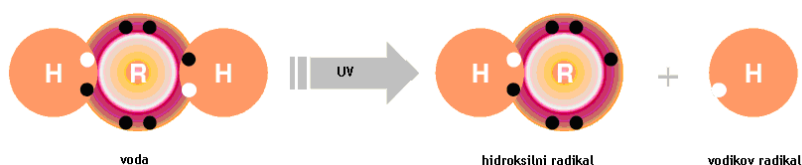
a) HOMOLITSKA CEPITEV

Ustrezna količina energije lahko povzroči cepitev kovalentnih vezi tarčne molekule in s tem nastanek dveh različnih vrst radikalov, od katerih ima vsak po en nesparjen elektron. Proces razgradnje se imenuje fotoliza, če vir energije prihaja v obliki sevanja in piroliza, ko je energija v obliki toplote (2).



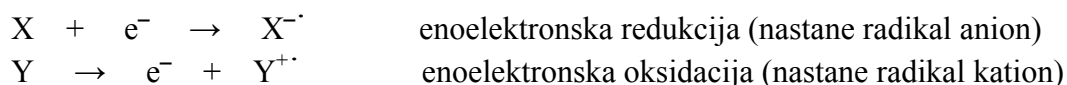
SLIKA 1: Homolitska cepitev

Analogna reakcija v organizmu: primer homolitske cepitve lahko predstavlja razpad molekule vode s pomočjo UV-žarkov (fotoliza). Kot je razvidno iz slike 2, je rezultat cepitve radikal vodika in hidroksilni radikal (1).



SLIKA 2: Fotoliza vode

b) ENOELEKTRONSKA REDOKS REAKCIJA



Analogna reakcija v organizmu: pri enoelektronski redukciji nastaja superoksidni anion (SA), ki ima pomembno vlogo pri številnih poškodbah celic in tkiv (2).



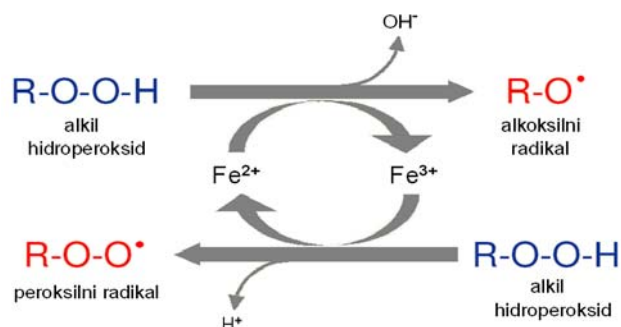
c) IONIZACIJA

Je reakcija pri kateri ionizirajoči žarki neposredno izbijejo elektron iz molekule (2,4).



d) REAKCIJE Z IONI PREHODNIH KOVIN

So reakcije nastanka radikalov, ki jih katalizirajo predvsem železovi in bakrovi ioni. Zaradi specifične razporeditve elektronov v d-orbitali, ki vsebuje nesparjene elektrone, lahko prehodne kovine sprejmejo ali oddajo posamezen elektron. Takšen prenos elektronov je pomemben del različnih encimskih sistemov, kjer kot katalizatorji sodelujejo ioni prehodnih kovin. V primeru nenadzorovanega sproščanja kovinskih ionov pa lahko pride do katalize reakcij, kjer nastajajo radikali (6).



SLIKA 3: Primer katalitskega delovanja železovih ionov pri cepitvi hidroperoksidov

Zgornja reakcija prikazuje razpad hidroperoksidov, ki ga katalizirajo železovi ioni, pri tem nastanejo alkoksilini ($RO\cdot$) in peroksilni radikali ($ROO\cdot$) (1).

Analogna reakcija v organizmu: Primer reakcije s prehodnimi kovinami je Fentonova reakcija, katero bomo natančneje opisali v nadaljevanju.

1.2.4 Reakcije radikalov

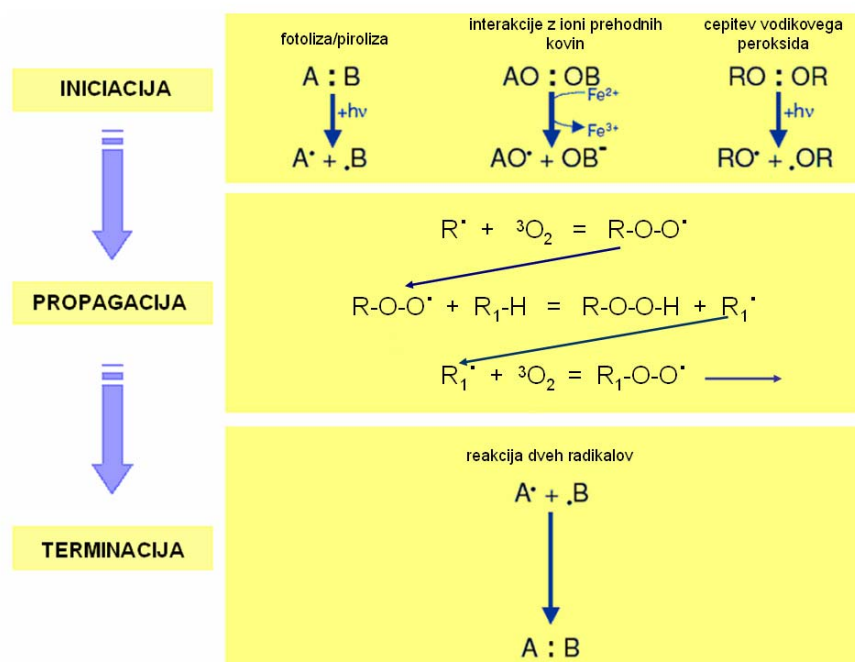
Zaradi izjemne reaktivnosti in težnje po zapolnitvi vrzeli na eni izmed orbital, radikali zelo hitro reagirajo z bližnjimi molekulami in sicer najpogosteje na tri načine:

- Odvzem vodikovega atoma
- Adicija na dvojno vez
- Reakcija dveh radikalov
-

Pomembne so predvsem reakcije med radikali in neradikali. Pri reakciji med dvema radikaloma se prosta elektrona združita v kovalentno vez, pri reakciji med radikalom in neradikalom pa vedno nastane nov radikal. Ker je v telesu večina molekul neradikalnih, lahko na ta način že en sam radikal sproži obsežno **verižno reakcijo** (3).

a) INICIACIJA

Je prva stopnja verižne reakcije, pri kateri pride do nastanka radikalov po enem izmed naštetih mehanizmov v poglavju 1.2.3. Pri tem so najpogostejši mehanizmi začetka verižne radikalske reakcije: homolitska cepitev, interakcije z ioni prehodnih kovin in cepitev vodikovega peroksida (slika 4) (2,5).



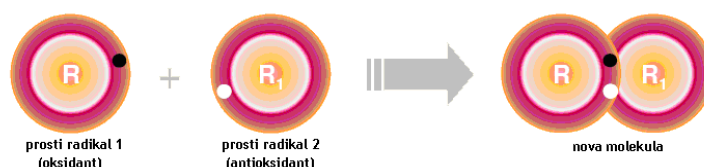
SLIKA 4: Verižna radikalska reakcija v treh stopnjah

b) PROPAGACIJA

Propagacija pomeni razširitev verižne reakcije, pri čemer nastali radikal odvzame elektron novi tarčni molekuli (običajno v obliki vodikovega atoma), ki tako postane radikal. Preko te poti se torej radikalska oblika verižno razširi na nove molekule. Na sliki 4 je kot primer propagacije prikazana reakcija radikala s tripletnim kisikom, kjer nastali peroksilni radikal pritegne proton iz nove molekule in povzroči nastanek novega radikala. Le-ta pa ponovno reagira s kisikom in proces nastajanja radikalov se nadaljuje, vse dokler se verižna reakcija ne ustavi (3).

c) TERMINACIJA

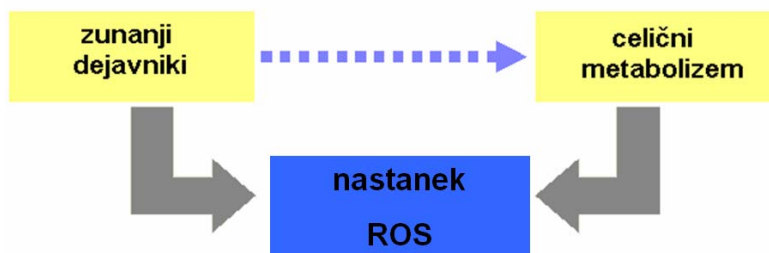
Verižna radikalska reakcija se lahko konča z reakcijo dveh radikalov, ki je obratna reakcija homolitske cepitve. Pri tem reagirata dva radikala ter tvorita spojino brez nesparjenih elektronov (slika 5). S pomočjo tega mehanizma se verižna reakcija ustavi (1).



SLIKA 5: Reakcija dveh radikalov

1.2.5 Nastanek ROS v fizioloških procesih

V živih organizmih nastajajo ROS tekom normalne presnovne aktivnosti celic. Vendar pa lahko na to vplivajo tudi zunanji dejavniki, nekateri celo neposredno (slika 6). Njihov vpliv na oksidativni stres bomo obravnavali kasneje, sedaj pa si podrobneje oglejmo nastanek ROS pri normalni celični presnovi.



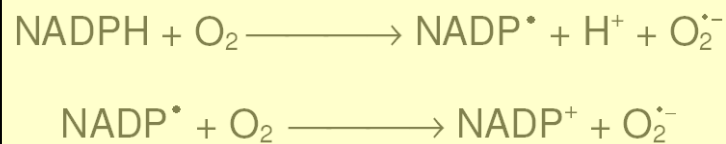
SLIKA 6: Splošna shema nastanka ROS

V celici obstaja pet primarnih metabolnih mest za sintezo ROS: celična membrana, mitohondriji, peroksisomi, mikrosomi (endoplazemski retikulum) in ostali viri citosola (1).

a) PLAZMALEMA

Celična membrana je močno vpletena v sintezo reaktivnih vrst, predvsem zaradi lipofilnosti tripletnega kisika, ki lahko sproži radikalske reakcije v lipidnem sloju membrane. Poleg tega pa je pomembno tudi nastajanje radikalov v polimorfonuklearnih levkocitih (PML). Te celice imajo namreč v svoji plazemski membrani določene encimske sisteme kot sta NADPH-oksidaza in lipooksigenaza, ki povzročijo nastanek superoksidnih anionov in peroksidov.

NADPH-oksidaza se aktivira ob specifični aktivaciji PML, katero lahko povzročijo endotoksini, bakterije ali protitelesa. Reakcija, ki poteče v dveh stopnjah, je mogoča zaradi povečane razpoložljivosti $\text{NADPH}(\text{H}^+)$, ki nastaja pri izgorevanju glukoze, ter zaradi prisotnosti molekularnega kisika (1).



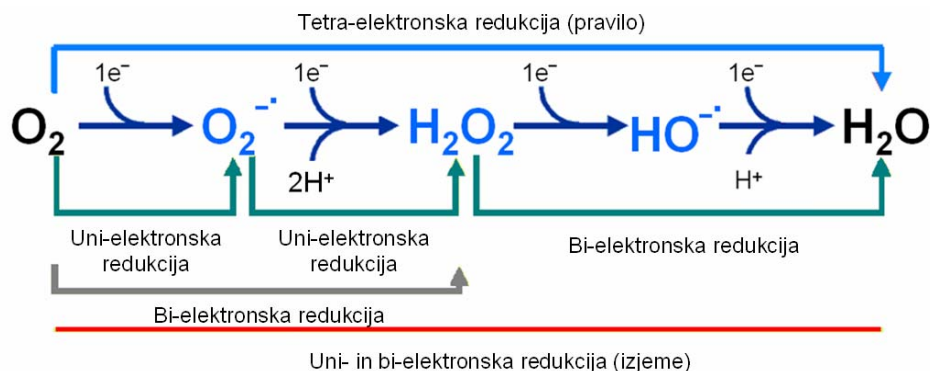
SLIKA 7: Nastanek superoksidnega aniona pri redukciji kisika z NADPH oksidazo

Lipooksigenazni sistem pa obsega 3 membranske encime (5-, 12- in 15-lipooksigenaza), ki katalizirajo nastanek 5-, 12- in 15-HPETE (5-, 12-, 15-hidroperoksiieikozatetraenojska kislina) iz arahidonske kisline. Te spojine so kemijsko kisli hidroperoksidi in jih tudi uvrščamo med ROS (1).

V obeh primerih gre za tvorbo ROS v membrani polimorfonuklearnih levkocitov, kot odgovor na aktivacijo NADPH-oksidadz ali lipooksigenaz, ki jo povzročijo različni reaktivni procesi v organizmu (infekcijske bolezni, patološke imunske reakcije, vnetja) (1).

b) MITOHONDRIJI

Mitohondriji so primarni vir ROS, zato ker se tu nahaja respiratorni verižni encimski sistem, ki je odgovoren za oksidativno fosforilacijo. Pravzaprav prihaja do idealnega prenosa elektronov samo pri nastanku molekule vode, kjer poteče tetra elektronska redukcija molekularnega kisika. V realnosti pa ta proces ni popoln, saj se majhna vendar pomembna količina elektronov (1-2%) premesti iz respiratorne verige encimov in koencimov (flavoproteini, ubikinon, citokromi...) neposredno na molekularni kisik, kar ima za posledico nastanek superoksidnega aniona in/ali hidroksilnega radikala (eno elektronska redukcija) in/ali vodikovega peroksida (dvo elektronska redukcija) (1). Donacija elektronov tekom tega procesa poteka postopno (slika 8). Najprej nastane superoksidni anion, ko kisik sprejme prvi elektron. Donacija drugega elektrona povzroči tvorbo peroksida, kjer preko protonacije nastane vodikov peroksid. Vstop tretjega elektrona ima za posledica nastanek visoko reaktivnega hidroksilnega radikala in končno četrti elektron z nastankom vode zaključi redukcijo (7). Fenomen eno in dvo elektronske redukcije molekularnega kisika se zgodi v mitohondrijih brez sodelovanja encimov, medtem ko so pri drugih celičnih organelih za to potrebni katalizatorji.



SLIKA 8: Redukcijska pot molekularnega kisika

Z drugimi besedami, s kemijskega stališča je nastajanje radikalov tekom oksidativne fosforilacije ne-encimski proces. Drugače pa je primarni in biološko najpomembnejši ne-encimski proces tvorbe ROS kataliza s pomočjo reduciranih oblik ionov prehodnih kovin. Le-te proizvajajo encimi kovinsko kataliziranega oksidativnega sistema (KKOS), ki vključuje: ksantin oksidazo, NADPH, NADPH-oksidozo, citokrom P₄₅₀, NADH-reduktazo, sukcinat reduktazo in nekatere železo-žveplove ne-hem proteine (1). Prostetične skupine teh encimov imajo glavno vlogo pri redukciji ionov prehodnih kovin, ki neposredno katalizirajo redukcijo molekularnega kisika v mitohondrijih do hidroksilnega radikala in/ali vodikovega peroksida (1).

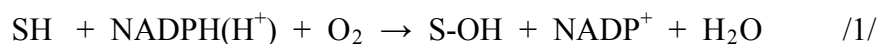
c) PEROKSISOMI

Znotraj teh organelov poteka delna oksidacija maščobnih kislin, ki se razlikuje od t.i. β -oksidacije. V prvi stopnji tega procesa flavoproteini odvzamejo par vodikov iz aktivirane maščobne kisline (acil-CoA). Oba vodika se neposredno preneseta na molekulo kisika, ki se nato reducira v vodikov peroksid (1).

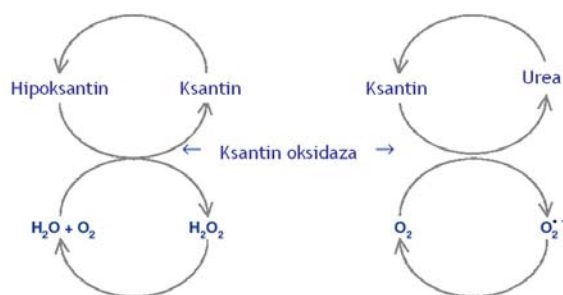
d) MIKROSOMI

V gladkem endoplazemskem retikulumu poteka proizvodnja ROS preko encimskega sistema citokrom P₄₅₀. Encimski sistem deluje kot hitri donor elektronov v mnogih reakcijah hidroksilacije, kot npr. v hepatocitih za inaktivacijo hormonov ali eksogenih substanc (ksenobiotiki, toksini, hidrofobne učinkovine...). Citokrom P₄₅₀ spada med hemske beljakovine, ki se ne nahaja izključno v endoplazemskem retikulumu jeter, temveč tudi v mitohondrijih nadledvičnih žlez. Ta encim s pomočjo kompleksa deluje med NADPH(H⁺) kot virom elektronov in substratom za hidroksiliranje. V tej kompleksni reakciji se hidroksilira substrat (SH), ki reagira z NADPH(H⁺) in kisikom, pri čemer

nastane ustrezna hidroksilirana spojina (S-OH), NADP^+ in voda. Tekom procesa lahko prihaja do nastanka ROS v obliki superoksidnega aniona ali vodikovega peroksida, če katalitični cikel ni zaključen in je kisik le delno reduciran (1).



Znatne količine ROS nastanejo tudi pri številnih drugih bioloških reakcijah, kot npr. pri zadnji stopnji purinskega katabolizma ($\text{ATP} \rightarrow \text{AMP} \rightarrow \text{ADENOSIN} \rightarrow \text{INOZIN} \rightarrow \text{HIPOKSANTIN} \rightarrow \text{KSANTIN} \rightarrow \text{SEČNA KISLINA}$). Obe reakciji katalizira ksantin dehidrogenaza, ki je encim z molibdenom. V določenih pogojih kot je ishemija se encim pretvori v ksantin oksidazo (s pomočjo od kalcija odvisne proteolitske cepitve). Ksantin oksidaza pa neposredno uporabi končnega sprejemnika, to je molekularni kisik in povzroči nastanek ne samo vodikovega peroksida, temveč preko hipoksantina in ksantina tudi nastanek superoksidnega aniona (slika 9) (1).



SLIKA 9: Proizvodnja ROS v procesu razgradnje purinov.

1.2.6 Nastanek ROS v patoloških procesih

Ne glede na nastanek reaktivnih kisikovih vrst lahko presežek le-teh povzroči vrsto strukturnih in funkcijskih poškodb v sami celici, zlasti pri nezadostnem antioksidantnem obrambnem mehanizmu. Poškodbe so lahko epigenetične (poškodbe strukturnih in funkcijskih molekul celice) ali genotoksične (posredne ali neposredne poškodbe dedne snovi) (5). Povečana prisotnost ROS ima za posledico interakcije s številnimi substrati, pri katerih pride do odvzema elektrona, kar vodi do verižne reakcije vse dokler ni dosežena stabilnost oz. je proces ustavljen. Pri nadaljnji razširitvi poškodb na tkivni nivo so pomembni oksidativni mehanizmi, kot tudi navzkrižno povezovanje in agregacija proteinov, depolimerizacija hialuronske kisline, cepitev DNK in drugo. Pri tem radikali večinoma predstavljajo vzrok teh poškodb, včasih pa nastajajo tudi posledično (1).

Neposredne posledice učinkovanja ROS v različnih delih celice so:

- POVEČANJE PREPUSTNOSTI CELIČNE MEMBRANE
- PEROKSIDACIJA BIOMOLEKUL
- GSH OKSIDACIJA
- POŠKODBE DNA
- TIOLNA OKSIDACIJA PROTEINOV
- OKSIDACIJA PIRIDINSKIH NUKLEOTIDOV
- NEPRAVILNOSTI PRI PRENOSU DRAŽLJAJEV
- MODIFIKACIJA CITOSKELETNE RAZPOREDITVE
- NEPRAVILNOSTI HOMEOSTAZE IONOV
- INHIBICIJA GLIKOLIZE
- IZČRPANJE NAD⁺ IN ATP-ja
- KOLAPS MITOHODRIJSKEGA MEMBRANSKEGA POTENCIALA

V spodnji preglednici, so navedeni nekateri najpogostejši produkti, ki nastanejo pri reakciji posameznih radikalov s pomembnimi tarčnimi molekulami v organizmu.

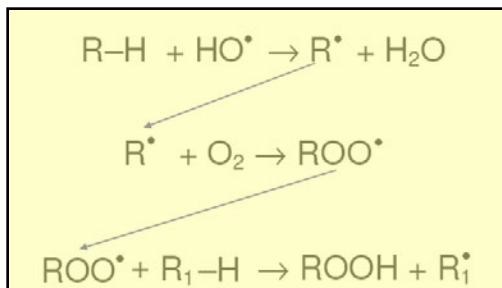
Preglednica II: Tarče ROS in pripadajoči oksidativni produkti

Reaktivne zvrsti	Tarčna molekula	Produkti oksidacije
Hidroksilni radikal Hidroperoksilni radikal	Lipidi	Lipidni peroksidi, aldehidi, ketoni, alkili
Hidroksilni radikal Hidroperoksilni radikal	Proteini	Hidroperoksidi, prečno povezane molekule
Hidroksilni radikal Hidroperoksilni radikal	Hialuronska kislina	Glikozidi, hidroperoksidi
Hidroksilni radikal	DNK/RNK	8-hidroksigvanin, cepitev, hidroksiliranje, deaminacija

Škodljivi učinki hidroperoksidov

Zelo pogost in pomemben mehanizem, povezan s poškodbami celic in tkiv je povezan z nastankom hidroperoksidov (R-O-O-H). Hidroperoksidi nastajajo v celici in so za razliko od radikalov bolj stabilni, vendar pa v celičnem miljeju vseeno posedujejo veliko oksidacijsko aktivnost. Tako se ob prisotnosti bakrovih ali železovih ionov zlahka tvorijo alkoksilni in/ali hidroperoksilni radikali. Zaradi toksičnosti jih celice izločajo v biološke tekočine oz. v krvno plazmo. Prisotnost hidroperoksidov v krvni plazmi pa lahko že nakazuje poškodbe tkiva. Hidroperoksidi namreč še vedno izkazujejo dobro oksidacijsko sposobnost, zaradi katere lahko aktivirajo stransko reakcijo, ob prisotnosti katalizatorjev v obliki ionov prehodnih kovin kot je npr. železo. Tako lahko železovi ioni katalizirajo Fentonovo reakcijo nastanka radikalov enako kot v celici. Nastali alkoksilni in/ali hidroperoksilni radikali lahko napadejo lipoproteine kot je LDL ali endotelijske celice in povzročijo oksidativne poškodbe (1).

Slika 10 prikazuje primer nastanka hidroperoksidov in hidroperoksilnih radikalov tekom verižne radikalske reakcije, ki jo sproži hidroksilni radikal. Reakcija poteka vse dokler je prisoten molekularni kisik in hkrati ni prisotnih dovolj antioksidantov, ki lahko prekinejo produkcijsko linijo radikalov in tako ustavijo verižno reakcijo (1).



SLIKA 10: Nastanek hidroperoksidov med verižno radikalsko reakcijo

Najbolj znani hidroperoksid je vodikov peroksid, ki nastaja predvsem kot posledica encimskega odstranjevanja superoksidnega aniona. Ker je zelo podoben vodi, z lahkoto prehaja skozi membrane. Njegova toksičnost se kaže v tem, da je sposoben inaktivirati določene encime, hkrati pa ob prisotnosti sledov ionov železa ali bakra razpade na hidroksilni radikal, ki je zmožen sprožiti plaz radikalskih reakcij v celici (1).

Škodljivi učinki hidroksilnega radikala

Hidroksilni radikal (OH^\bullet) je v telesu vedno škodljiv in deluje predvsem epigenetično, zlasti če nastane v citoplazmi. V primeru, da pride do njegovega nastanka v mitohondriju ali jedru pa je lahko tudi genotoksičen (5). Zaradi nezmožnosti potovanja in izjemne reaktivnosti deluje le lokalno. Njegova škodljivost pa postane pomembna zlasti v primeru kopičenja železovih ionov v organizmu, ki povečajo nastajanje hidroksilnih radikalov.

Hidroksilni radikal je znan kot eden izmed najreaktivnejših radikalov in lahko nastane pod vplivom ionizirajočega sevanja, ultrazvoka, ozona ali pa pri reakcijah, kataliziranih s kovinami (4,5).

Fentonova reakcija je pomemben način tvorbe hidroksilnega radikala v organizmu. Gre za reakcijo razpada vodikovega peroksida, ki jo katalizirajo železovi ioni (1,2,5). Kot je prikazano na spodnji reakciji so tukaj pomembni Fe^{2+} ioni, ki preko vmesnega kompleksa povzročijo cepitev vodikovega peroksida na hidroksilni radikal in hidroksilni anion.



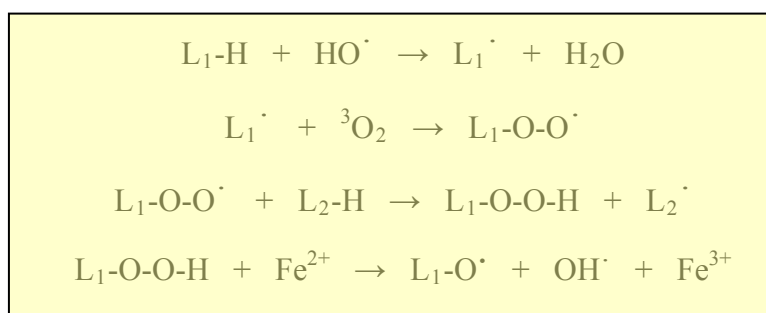
Novonastali hidroksilni radikal ponavadi nadalje reagira tako, da pritegne vodikov atom, pri čemer nastaneta nov radikal in voda (4). Če ta atom vodika izvira npr. iz molekule maščobne kisline je to lahko začetek peroksidacije fosfolipidov in nenasičenih maščobnih kislin (5).

Peroksidacija biomolekul

Peroksidacija je reakcija, ki ne poteka samo na maščobah, temveč tudi na ostalih organskih molekulah kot so ogljikovi hidrati, amino kisline, proteini in nukleotidi. Vendar pa so tarčne molekule za napad ROS predvsem membranske polinenasičene maščobne kisline, ki imajo številne razpoložljive protone. Poleg hidroksilnih radikalov lahko peroksidacijo sprožijo tudi alkoksilni in peroksilni radikali (1).

Lipidna peroksidacija poteka po splošni poti radikalske verižne reakcije, ko poljubni radikal reagira z nenasičeno maščobno kislino. Bolj ko je maščobna kislina nenasičena, bolj je dovzetna za reakcije z radikali. Namreč prisotne dvojne vezi v molekuli zmanjšajo energijo vodikove vezi na ogljiku, zato se vodik lažje odcepi.

Vse se prične s tem, ko npr. hidroksilni radikal odtegne atom vodika fosfolipidni molekuli $L_1\text{-H}$ (metilenska skupina med dvema dvojnima vezema v nenasičenem fosfolipidu), pri čemer nastane voda in nekoliko bolj stabilen C-radikal na fosfolipidni molekuli ($L_1\cdot$) (slika 11). Zaradi velike vsebnosti tripletne oblike kisika ($^3\text{O}_2$) v membrani, le-ta zlahka reagira z novonastalim radikalom, kar vodi do nastanka novega radikala ($L_1\text{-O-O}\cdot$). Slednji pritegne vodikov atom iz sosednje alkilne verige fosfolipidne molekule in tako nastaneta nov C-radikal ($L_2\cdot$) ter hidroperoksid. Radikalska reakcija se nato lahko širi še na nove molekule, pri čemer nastajajo vedno novi hidroperoksidi ($L_i\text{-O-O-H}$). Zaradi bolj polarne narave teh hidroperoksidov pa posledično prihaja do rušitve membranske strukture (2,4).



SLIKA 11: Nekatere reakcije lipidne peroksidacije

V primeru, da so prisotni sledovi ionov železa, lahko poteče reakcija, pri kateri nastanejo novi hidroksilni radikali, kar še prispeva k širitvi lipidne peroksidacije. Reakcijo, pri kateri se peroksidira več tisoč verig maščobnih kislin, lahko sproži že en sam hidroksilni radikal (4).

Lipidna peroksidacija povzroči poškodbe lipidnega dvosloja celične membrane, kar lahko povzroči spremembo njene prepustnosti, izpad funkcije membranskih encimov, motnje prenosa signalov preko transmembranskih receptorskih sistemov in nazadnje propad celične membrane (8).

Škodljivi učinki superoksidnega aniona

Superoksidni anion ($O_2^{\cdot -}$) nastaja endogeno pri celičnih procesih, kjer se porablja kisik. Sem spadajo reakcije porabe kisika v dihalni verigi, fagocitoza, encimske oksidacije, avtooksidacija substratov ter reakcije mikrosomskega elektronskega transporta (5). Sam SA je slabo reaktiven, je pa zato bolj reaktivna protonirana oblika, ki lahko med drugim povzroči tudi peroksidacijo lipidov (5).

Celica ga ponavadi nemudoma pretvori s pomočjo superoksid dismutaze (SOD), pri čemer nastane vodikov peroksid in kisik. Kot vemo je vodikov peroksid bolj stabilen, vendar ob prisotnosti ionov prehodnih kovin vseeno predstavlja nevarnost za celico (4).

Škodljivi učinki kloroaminov

Eni izmed bolj pomembnih stranskih oksidativnih produktov so tudi kloroamini. Številne študije so pokazale, da respiratorni izbruh aktiviranih fagocitov povzroči *in vivo* in *in vitro* nastanek vodikovega peroksida. Hkrati te celice izločajo hemeski encim mieloperoksidazo, ki katalizira reakcijo vodikovega peroksida s fiziološko koncentracijo klorovih ionov. Pri tem pa nastane hipoklorna kislina (HClO), ki je močen oksidant. Hipoklorna kislina ima pri sesalcih pomembno vlogo v boju proti invazivnim mikrobom, saj deluje močno baktericidno. Vendar pa lahko pretirana tvorba HClO povzroči tudi poškodbe tkiv sesalcev, kar je lahko pomembno v povezavi z nekaterimi obolenji kot je ateroskleroza, kronične vnetne bolezni in nekatere vrste raka. Številne raziskave so pokazale, da so tarčne molekule HClO proteini, čeprav reagira tudi s številnimi drugimi molekulami, vključno z DNK, lipidi, holesterolom, NADH, prostimi tioli in sulfidi. S pomočjo

elektronske spinske resonance so dokazali, da hipoklorna kislina reagira z amino skupinami proteinov, kjer nastanejo kloroamini. Kloroamini pa se lahko nadalje pretvorijo in tvorijo radikale kot so alkoksilni in/ali peroksilni radikal, katere lahko nato zaznamo z omenjeno metodo (1).

1.3 POVEČANJE OKSIDATIVNEGA STRESA

1.3.1 Dejavniki okolja

V nekaterih primerih so dejavniki okolja primarni vzrok povečane tvorbe ROS. Tako lahko nastopi stanje oksidativnega stresa v neustreznem življenjskem okolju (povečano sevanje, in onesnaženost) ali pri neprimernem načinu življenja (slabo prehranjevanje, pitje alkohola, kajenje, pretirana telesna aktivnost). K temu dodatno pripomorejo tudi psihološki faktorji (psiho-emocionalni stres), morebitne bolezni (poškodbe, infekcije, krvo-žilne bolezni, maligna obolenja) ter iatrogeni faktorji (zdravila, radioterapija, rentgenski in UV-žarki).

a) FIZIKALNI DEJAVNIKI

Fizikalni dejavniki vključujejo ionizirajoče in UV sevanje, ki povzročita cepitev molekul vode, odnosno preko radiolize ali fotolize. Posledica je nastanek dveh radikalov, hidroksilnega in vodikovega. Človeški organizem se večinoma sestoji iz vode, hkrati pa smo ves čas bolj ali manj izpostavljeni določeni količini sevanja, zato si lahko predstavljamo, da ta pojav tvorbe ROS ni zanemarljiv (1).

b) KEMIJSKI DEJAVNIKI

Kemijski dejavnik, ki je sposoben aktivirati proizvodnjo radikalov je lahko ozon, ki preko delovanja na fenolove derivate neposredno tvori peroksilne radikale. Medtem ko imata sevanje in ozon direkten učinek na nastajanje radikalov, nekatere kemikalije delujejo posredno, kot npr. aromatski policiklični ogljikovodiki ter nekatere učinkovine, ki stimulirajo citokrom P₄₅₀ (1).

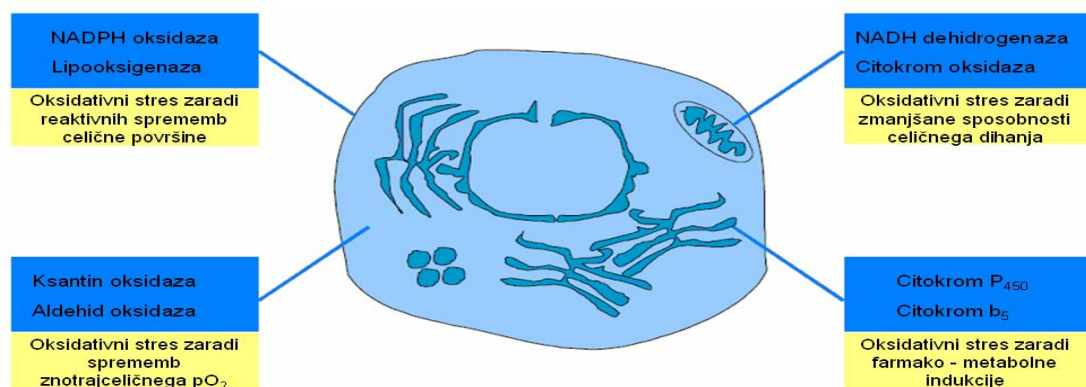
c) BIOLOŠKI DEJAVNIKI

Biološki dejavniki, ki večajo tvorbo ROS, so bakterije in ostali infektivni agensi, in sicer preko fizioloških obrambnih mehanizmov pred infekcijami ter preko protiteles v imunološkem odgovoru (1). V teh primerih gre za neposredno delovanje že prej omenjenih

polimorfonuklearnih levkocitov (PML) v celični membrani. PML namreč vsebujejo številne encimske sisteme, ki so neposredno povezani s tvorbo ter delno tudi z deaktivacijo ROS. Nenazadnje je bilo ugotovljeno, da lahko pride do povečane tvorbe radikalov v določenih fizioloških primerih, kot npr. pri nosečnosti, intenzivnem mišičnem naporu ali tekom številnih bolezni (1).

1.3.2 Spremembe metabolizma

Oksidativni stres lahko torej nastane tudi kot posledica spremenjenega metabolizma, ki se lahko pojavi pri različnih bolezenskih stanjih. Pri tem pa je težko opredeliti, ali so ROS vzrok ali posledica določenih bolezni. Tako lahko na primer radikali povzročijo primarno poškodbo, katere posledice so vidne v spremenjeni celični presnovi, kar pa lahko povzroči nadaljnje sproščanje sekundarnih radikalov. Glede na primarno mesto nastajanja ROS v celici lahko natančneje opredelimo vrsto oksidativnega stresa (1).



SLIKA 12: Celični viri oksidativnega stresa

Shema prikazana na sliki 12 predstavlja poenostavljeno stanje. Biokemična situacija v celicah in tkivih je mnogo bolj kompleksna, saj so mnogi mehanizmi hkrati vključeni v oksidativne tkivne poškodbe. Zato je pomembno, da poudarimo vzrok oksidativnega stresa, saj le-ta pogojuje različne vrste ROS glede na njihovo mesto nastanka. Prav tako pa njihovi učinki izkazujejo različne značilnosti, kar je odvisno od specifičnega dražljaja. Na splošno velja, da vnetni dražljaj aktivira predvsem plazmalemo, medtem ko vztrajnostna vadba stimulira metabolno aktivnost mišičnih mitohondrijev (1).

Oksidativni stres povezan z reaktivnimi spremembami celične površine nastane zaradi aktivacije plazmaleme, kjer se nahajajo številni encimski sistemi, ki so sposobni tvorbe

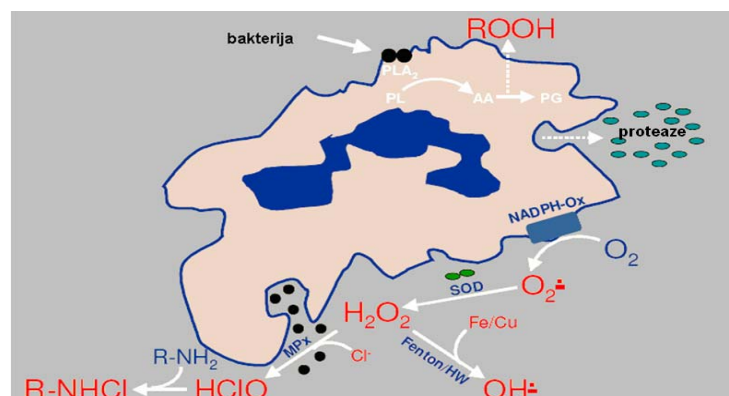
ROS (1). Aktivacija poteka preko PML in jo lahko izzovejo bakterije, endotoksini in imunski kompleksi. Ti dejavniki so se sposobni povezati s površino celične membrane in povzročiti aktivacijo NADPH-oksidge, kar ima za posledico tvorbo superoksidnega aniona. Aktivacija PML-membransko lipooksigenaznega sistema pa je sposobna tvorbe ROS preko produkcije hidroperoksidov (1).

Oksidativni stres zaradi zmanjšane sposobnosti celičnega dihanja nastane zaradi napake v delovanju mitohondrijev, kar ima za posledico presežno tvorbo ROS. To stanje je povezano s povečano metabolno aktivnostjo, ki lahko nastane po naporni fizični aktivnosti ali pri povečanemu hranjenju, in sicer preko povečane tvorbe superoksidnih anionov.

Presežna količina ROS lahko nastane zaradi primarne poškodbe mitohondrijev ali zaradi aktivacije "začaranega kroga" (metabolna aktivacija → proizvodnja ROS zaradi elektronskega premika → disfunkcija mitohondrijev → nadaljnja proizvodnja ROS zaradi elektronskega premika).

Oksidativni stres zaradi farmako-metabolne indukcije je povezan z aktivacijo citokrom P₄₅₀ hidroksilacijskega sistema, ki ima funkcijo razstrupljanja. Ta vrsta stresa je primarno povezana z zlorabo alkohola in povečanim izpostavljanjem ksenobiotikom. V teh pogojih lahko opazujemo različne reaktivne vrste kot npr. radikal acetaminofena (paracetamola), ki je pogosta sestavina analgetikov (1).

Oksidativni stres zaradi sprememb v znotrajceličnem tlaku kisika (pO₂) je povezan z ishemično-reperfuzijskimi poškodbami, kar je opazno pri srčnem infarktu, med operacijo srčnega obkoda ter po transplantaciji. V teh pogojih ima pomembno vlogo aktivacija ksantin oksidge, ki je odgovorna za nastanek vodikovega peroksida in superoksidnega aniona (1).



SLIKA 13: Produkcija ROS v različnih delih celice

Zgornja slika prikazuje nastajanje različnih reaktivnih kisikovih vrst (označenih z rdečo) v različnih delih celice. Pri tem je razvidno, da so reakcije nastanka ROS med seboj povezane.

1.3.3 Zmanjšanje antioksidantne zaščite

Pomemben vzrok za povečanje oksidativnega stresa je lahko tudi neustrezno delovanje antioksidativnega sistema. Zmanjšanje antioksidantne zaščite je lahko posledica zmanjšane vnosa, sinteze ali biološke razpoložljivosti antioksidantov (AO). V tem kontekstu lahko nekatere bolezni kot npr. celiakija povzročijo povečanje oksidativnega stresa zaradi zmanjšane razpoložljivosti zaužitih antioksidantov. Prav lahko pa so vzroki tudi sledeči:

- zmanjšan vnos AO: hipovitaminoza, monotona prehrana
- zmanjšana absorpcija AO: malabsorpcija, celiakija
- zmanjšana biološka uporabnost AO: nezadosten privzem ali transport
- oslabitev antioksidativnih encimov: genetski in iatrogeni faktorji
- pretirano uživanje AO: pro-oksidativni učinek antioksidantov
- povečano uživanje zdravil: preobremenitev mikrosomalnega sistema (1).

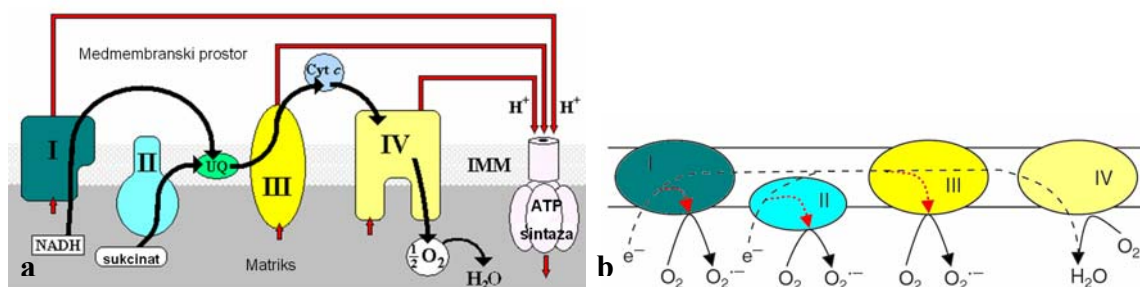
1.4 OKSIDATIVNI STRES PRI POVEČANI ŠPORTNI AKTIVNOSTI

Med intenzivno telesno vadbo se poveča privzem kisika v aktivne mišice, ki med intenzivno vadbo naraste za 20-krat. Pretok kisika v aktivnih mišicah pa se lahko poveča do 100-krat v primerjavi s stanjem v mirovanju. Posledično lahko pričakujemo tudi povečano nastajanje ROS med vadbo, kar so prvič potrdili že leta 1978. Takrat je Dillard v raziskavi s sodelavci ugotovil, da fizična aktivnost vodi do povečane lipidne peroksidacije, kar so potrdili posredno preko zvečane količine pentana v izdihanem zraku po naporu (9). Povsem natančen mehanizem nastanka ROS med telesno aktivnostjo ni znan, nekateri izsledki raziskav pa si tudi nasprotujejo. Obstajajo dokazi, da se ob fizični aktivnosti poveča proizvodnja radikalov predvsem na račun izgub elektronskega transporta v

mitohondrijih. Doprinos ostalih virov radikalov seveda ne gre povsem zanemariti. V primeru, oksidativnih poškodb se lahko aktivira imunski sistem, pri čemer dodatno grožnjo s proizvodnjo ROS predstavljajo polimorfounuklearni nevtrofilci (10).

1.4.1. Mitohondriji

Večina izsledkov raziskav potrjuje, da so mitohondriji najpomembnejši vir nastanka ROS med vadbo. Namreč visoke energijske potrebe terjajo ustrezno povečan pretok kisika. Zato lahko tekom transporta v respiratorni verigi prihaja tudi do večjega uhajanja elektronov, ki predčasno reagirajo s kisikom in povzročijo nastanek superoksidnega aniona (10). Sicer organizacija respiratone verige omogoča, da je skoraj ves kisik privzet s citokrom-C oksidazo, ki v respiratorni verigi predstavlja kompleks IV, vendar le-ta ne prispeva bistveno k nastanku superoksidnega aniona. Struktura tega kompleksa namreč onemogoča kakršnokoli uhajanje elektronov. Nasprotno pa velja za kompleks I (NADH dehidrogenaza) in II (sukcinat dehidrogenaza), kjer lahko prihaja do uhajanja elektronov in posledičnega nastanka superoksidnega aniona (slika 14). Pri tem je pomembna stranska reakcija z ubisemikinonom (UQ), kjer poteka vmesni prenos elektronov in je možna redukcija kisika v superoksidni anion, s pomočjo ubisemikinonskega radikalom (UQH[•]) (9,11).



Slika 14: (a) Shematski prikaz elektronske transportne verige. (b) V elektronski transportni verigi se elektroni prenašajo preko kompleksov I, II, III in IV (črna črtkana črta) do terminalnega elektronskega akceptorja, kisika. Zaradi nepravilnosti pri prenosu elektronov lahko na kompleksih I, II in III pride do uhajanja elektronov (rdeče puščice), ki tako predčasno reagirajo s kisikom in pri tem tvorijo superoksidni anion.

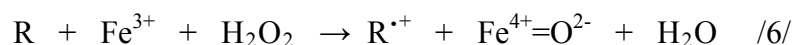
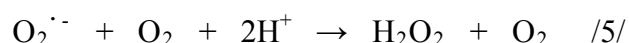
Tako naj bi se v mirovanju približno 2 odstotka celotnega privzetega kisika pretvorilo v superoksidni anion. Med intenzivno telesno aktivnostjo, ko je tok elektronov povečan pa naj bi bil ta odstotek še višji, kar velja zlasti za netrenirane osebe (1).

1.4.2. Ksantinska oksidaza

Reakcije, katere katalizira encim ksantinska oksidaza, predstavljajo enega izmed poglavitnih virov radikalov, predvsem v primeru pojava ishemije in reperfuzije. Do takšnega procesa lahko pride pri zmanjšani razpoložljivosti kisika glede na povečane potrebe med aktivnostjo, kar privede do stanja podobnega ishemiji. Zaradi nezadostne oskrbe s kisikom prihaja do povečane razgradnje ATP-ja preko ADP in AMP vse do hipoksantina. Takšno stanje, ki je delno anareobno botruje tudi povečani pretvorbi ksantinske dehidogenaze v ksantinsko oksidazo. Ko je nato krvni obtok sposoben zadostiti potrebam po kisiku (reperfuzija), hkratna aktivacija ksantin oksidaze povzroči pretvorbo hipoksantina v ksantin in nadalje v sečno kislino. Pri tem po principu eno-elektronske redukcije kisika, kot stranski produkt nastane superoskidni anion (9, 10). Nastanek ROS po tej poti, vodi do nastanka oksidativnega stresa šele več ur po intenzivni vadbi in ne med samo vadbo. Prav tako pa oksidativni stres ni omejen samo na skeletne mišice. Po nekaterih navedbah naj bi bila ksantinska oksidaza celo pomembnejša pri nastanku ROS kot mitohondriji (11).

1.4.3. Hemoglobin in mioglobin

Hemski proteini prav tako vplivajo na povečano nastajanje ROS med vadbo. Hemoglobin in mioglobin imata sposobnost, da povečata koncentracijo ROS predvsem zaradi vsebujočega železovega iona, ki je redoks aktiven prehodni element, njegovo vlogo pri nastanku ROS pa smo omenili že v Fentonovi reakciji. Alternativno pot nastajanja radikalov predstavlja avto-oksidacija oksihemoglobina in oksimioglobina, ki povzroči nastanek superoskidnega aniona (reakcija 4) in vodikovega peroksida (reakcija 5). Peroksidi pa lahko nadalje reagirajo s feri obliko hem proteinov, pri čemer nastaneta dva močna oksidanta, in sicer feril oblika železa ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}^{2-}$) ter proteinsko vezani radikal ($\text{R}^{\bullet+}$) (reakcija 6), ki imata podobno reaktivnost kot hidroksilni radikal (9, 11).



Med intenzivno vadbo narašča oskrba s kisikom v aktivnih mišicah, medtem ko oksigenacija hemoglobina v venski krvi enakomerno pada. Pri tem se lahko iz hemoglobina sprost skoraj ves kisik. S povečanimi potrebami tkiva po kisiku pa narašča tudi nastajanje superoksidnega aniona v kapilarni in venski krvi (9).

1.4.4. Mikrosomi in peroksisomi

Pri fizioloških pogojih prihaja do nastanka radikalov v jetrnih mikrosomih primarno preko sistema citokrom P₄₅₀, pri čemer se tvori superoksidni anion, ki se nadalje pretvori v vodikov peroksid. Intenzivna telesna vadba pa naj bi zaradi povečanega privzema kisika vplivala na povečano nastajanje vodikovega peroksida. Vendar pri tem ni znano ali edino ta pot pripomore k celotnemu nastanku ROS v mikrosomih (10).

V peroksisomih pa postane nastanek ROS pomemben zlasti pri dolgotrajnem stradanju, ko prihaja do povečane oksidacije maščobnih kislin kot še razpoložljivim virom energije. Pri tem pa se hkrati poveča tudi nastanek vodikovega peroksida. Do podobnega procesa prihaja tudi pri dolgotrajni vadbi, ko poidejo običajne zaloge energije in predstavljajo maščobne kisline primarni vir energije za srce in skeletne mišice (10).

1.4.5. Polimorfonuklearni levkociti (PML)

Preobsežna ali prekomerna telesna vadba lahko vodi do poškodb skeletnih mišic. Največje poškodbe mišice nastanejo med njenim podaljševanjem. Na začetku so vidne predvsem mehanske mikroskopske poškodbe na nivoju miofibrinskega povezovanja. Največje, sekundarne spremembe pa se pojavijo po dveh do štirih dnevih. Te vključujejo invazijo fagocitnih celic in izrazito degeneracijo celičnih struktur. Območje poškodbe naselijo makrofagi, ki so nujno potrebni, da se tkivo lahko obnovi. Vendar pri tem fagocitne celice sproščajo znatne količine kisikovih radikalov, da lahko pospešijo degeneracijo nekrotizirajočega tkiva (12). Za to so odgovorni predvsem polimorfonuklearni levkociti (PML), ki migrirajo na mesto poškodbe in sproščajo dva potencialna faktorja za fagocitozo, to so lizocimi in superoksidni anion. Lizocimi pospešijo propad poškodovanih tkivnih celic. Superoksidni anion pa aktivira kemotaktični faktor, ki privlači levkocite, da migrirajo do poškodovanih celic kot akutna faza imunskega odziva. Vnetni odgovor je pomemben pri odstranjevanju poškodovanih proteinov in preprečuje bakterijske in virusne

okužbe. Vendar pa lahko ROS, ki se sprostijo iz levkocitov, povzročijo tudi sekundarne poškodbe, kot je npr. lipidna peroksidacija, oksidacija celičnega glutationa ali tiolnih skupin proteinov (10).

Regeneracija mišic se običajno začne štiri do šest dni po vadbi in vključuje aktivacijo mišičnih satelitskih celic, le-te migrirajo na poškodovana območja, kjer se diferencirajo in tvorijo mioblaste. Nadalje se združijo v večjedrna mišična vlakna, iz katerih nastanejo odrasle skeletne mišice (12).

Nastajanje ROS po tej poti ni najpomembnejše, vendar prav lahko prispeva h koncentraciji le-teh, po intenzivni vadbi. Lahko pa tudi povzroči naknadno poškodbo tkiva pri prekomerno trajajočem naporu, kot je na primer maraton (10).

1.5 POSLEDICE POVEČANEGA OKSIDATIVNEGA STRESA

Posledice povečanega oksidativnega stresa v človeškem organizmu imajo lahko izjemne razsežnosti. Pri tem je ključni problem, da postanejo vidne šele ob izbruhu različnih bolezni, katere imajo vzrok ali posledice v nastajanju radikalov. Izkazalo se je, da so le-ti vpleteni v patogenezo velikega števila različnih obolenj. Čeprav je ponekod prisotnost ROS šele drugotnega pomena, to vsekakor ni zanemarljivo, saj ko enkrat nastanejo, lahko povzročijo številne verižne reakcije, ki poškodujejo celice in tkiva. Natančno število bolezni povezanih z oksidativnim stresom je težko določljivo, mednje pa prav gotovo sodijo današnje civilizacijske bolezni kot so srčno-žilna obolenja, presnovne bolezni, rak, neuro-degenerativne bolezni in ne nazadnje tudi pospešeno staranje.

1.5.1 Pospešeno staranje

Glede procesa staranja so bile razvite že mnoge hipoteze, ki naj bi razjasnile ta zapleten fiziološki proces. Ena izmed teh je tudi hipoteza o spremembi proteinov (nenormalna sinteza, post-translacijske spremembe...) ter hipoteza o spremembi DNK, ki onemogoča celici, da si opomore po oksidativnih poškodbah in tako pospeši proces staranja. V vsakem primeru ima pri tem genetska zasnova zelo pomembno vlogo, pri tem pa je potrebno upoštevati še druge kofaktorje, kot npr. prekomerna telesna teža, prevelik vnos hrane in

neredna telesna aktivnost. Po drugi strani pa so vsi ti faktorji nekako povezani z nastajanjem radikalov.

Za prekomerno telesno težo se je izkazalo, da spremeni redoks ravnovesje v organizmu, medtem ko zmanjšan kalorični vnos in redna telesna vadba uravnava nivo ROS. Poskusi na laboratorijskih živalih so pokazali, da zmanjšanje kaloričnega vnosa podaljšuje življenjsko dobo in zmanjšuje smrtnost, zlasti tisto, ki je posledica srčno-žilnih obolenj ter raka. Ta fenomen je verjetno povezan z zmanjšano produkcijo radikalov v mitohondrijih ter povečanim antioksidativnim obrambnim sistemom. Po drugi strani pa so pri debelosti opazili povečane vrednosti serumskih hidroperoksidov (1).

Za starejše ljudi je značilna zmanjšana celokupna energijska poraba, predvsem zaradi zmanjšane telesne aktivnosti in znižane stopnje bazalne presnove. Vendar pa ni opaziti zmanjšanja termičnega učinka hranjenja, ki je neposredno povezano s porabo kisika in nastankom radikalov. Hkrati je pri starejših opazno zmanjšanje čiste telesne mase na račun povečanja maščobne mase. Za ta pojav sta predvsem odgovorna manjša telesna aktivnost in zmanjšano izločanje ravnega hormona. Zato lahko starejši s povečanjem telesne aktivnosti normalizirajo telesno maso in pripomorejo k zmanjšanju umrljivosti povezane s srčno-žilnimi obolenji (1).

Zaključimo lahko, da s kontrolo telesne teže, ustreznostjo telesne aktivnosti in zmernim kaloričnim vnosom neposredno vplivamo na oksidacijsko stanje v organizmu, posredno pa tudi na hitrost staranja in življenjsko dobo.

1.5.2 Srčno-žilne bolezni

Znano je, da so srčno-žilne bolezni poglaviti vzrok smrti v zahodnem svetu. Pomembno vlogo ima pri tem zlasti ateroskleroza, zaradi neposredne povezave s patogenezo kapi in srčnega infarkta. Gre za sistemsko bolezen, ki vpliva na debeljenje notranje stene arterij, pri čemer imajo preko oksidacije lipoproteinov majhne gostote (LDL) pomembno vlogo predvsem radikali. Proces se sproži v endoteliju arterijske stene, v gladkih mišičnih vlaknih in v makrofagih. Oksidacija LDL vodi do cepitve polinenasičenih maščobnih kislin ter konjugacije njihovih komponent s fosfolipidi in apo-proteinom B. Fragmentacija in strukturne spremembe tega proteina povzročita prepoznavanje receptorjev makrofagov oz.

monocitov, ki ga nato fagocitirajo. Na žalost pa izražanje teh receptorjev nima regulacijskega mehanizma, zato lahko prihaja do pospešenega kopičenja oksidirane LDL v makrofagih, ki se nato spremenijo v penaste celice (1). Te pa lahko povzročijo poškodbe endotelija, preko agregacije trombocitov in sproščanja potencialnih mitogenov. Poleg tega je oksidirani LDL bolj aterogen kot normalen LDL (4). Oksidirani LDL ima namreč citotoksične lastnosti, inducira izražanje adhezivnih molekul, pospeši tvorbo kemotoksičnih sestavin, inhibira endotelijsko odvisne sproščujoče faktorje (kot je dušikov oksid), poveča izražanje tkivnih faktorjev, aktivira trombocite in T-celice, stimulira rast gladkih mišičnih celic ter inhibitorja plazminogeneskega aktivatorja ter na splošno poveča imunski odziv.

1.5.3 Sladkorna bolezen

Sladkorna bolezen tipa 2 predstavlja samo vrh ledene gore številnih drugih kroničnih presnovnih bolezni, ki lahko povzročijo različne poškodbe na tkivih in organih. Pravočasna diagnoza skupaj z ustreznim zdravljenjem lahko prepreči bolniku nadaljnje zdravstvene zaplete in mu omogoči normalno življenje.

Vloga radikalov je bila dokazana v patogenezi sladkorne bolezni tipa 2, kroničnem in progresivnem sindromu, značilnem za odrasle in starejše ter sekundarno pri kombinaciji inzulinske rezistence skupaj z odpovedjo beta-celic pankreasa, v povezavi z genetskimi in pridobljenimi faktorji (1). Sladkorna bolezen tipa 2, je klasično stanje, ki nastane zaradi nesorazmerja med pro- in anti-oksidantnimi dejavniki. Pravzaprav je takšno stanje posledica hiperglikemije in inzulinske rezistence in jasno ponazarja stanje oksidativnega stresa. Radikali onemogočajo delovanje inzulina, kar vodi v hiperglikemijo. Hiperglikemija in inzulinska rezistenca pa neposredno vplivata na oksidativni stres, najprej preko zmanjšanja učinkovitosti antioksidativne obrambe organizma in nato še s povečanjem krvnih vrednosti radikalov.

Hiperglikemija vpliva na povečanje radikalov preko treh mehanizmov: ne-encimske glikacije, glukozne avtooksidacije ter poliolne aktivacije v celici (1). Avtooksidacija glukoze ima za posledico neposreden nastanek radikalov in drugih oksidantov. Poleg tega lahko glukoza reagira s prehodnimi kovinami tudi v neznatnih količinah, kar zopet sproži nastanek ROS. Ne-encimska glikacija glukoze z različnimi molekulami ima za posledico

številske stranske glikacijske produkte, katerih nastanek pospešujejo radikali, njihovo kopičenje pa je povezano z mikrovaskularnimi poškodbami v kritičnih organih. Poliolna aktivacija pa nastane zaradi povečane koncentracije glukoze v celici, ker je zaradi pomanjkanja inzulina zmanjšana razgradnja glukoze preko glikolize. Tako v celici pride do aktivacije ustreznih encimov, ki pretvorijo glukozo v sorbitol in nadalje v fruktozo. Posledica tega je povečana razpoložljivost NADH, ki aktivira encim prostaglandin hidroperoksidazo in povzroči nastanek superoksidnega aniona.

Inzulinska rezistenca naj bi bila striktno povezana z lipidno peroksidacijo vsaj pri živalskih modelih. To lahko prizadene nekatere organe, zlasti jetra in skeletne mišice. Tako je na primer v kulturah adipocitov inzulin sposoben povečati tvorbo vodikovega peroksida, le-ta pa naj bi posnemal delovanje inzulina. Prav tako je dodatek vanadija povzročil inzulinu podobno delovanje, kar je bilo opazno tudi preko povečanega nastajanja radikalov v celicah. Po drugi strani pa hiperinzulinemija *in vivo* povzroči tudi znižanje koncentracije vitamina E, ki je pomemben antioksidant. Ti izsledki nakazujejo, da povišan nivo inzulina, ki je tipičen za inzulinsko rezistenco lahko poveča oksidativni stres v organizmu (1).

1.5.4 Kancerogene bolezni

Reaktivne kisikove zvrsti so neposredno povezane s kancerogenezo in zlasti z rakavimi obolenji, ki so posledica ionizirajočega sevanja, izpostavljanja ksenobiotikom in škodljivim kemikalijam. Karcinogene dejavnike delimo v grobem na endogene (dedni material, spol, starost...) in eksogene (organske in anorganske snovi, ter ionizirajoče in neionizirajoče sevanje) (4). Večina karcinogenih kemikalij učinkujejo preko tvorbe radikalov, medtem ko nekatere alkilirajoče snovi povzročajo neposredne mutacije dednega materiala. Kot vemo sta UV in ionizirajoče sevanje odgovorna za fotolizo oz. radiolizo vode, pri čemer nastaja škodljivi hidroksilni radikal (1,4). Skupaj z ostalimi ROS lahko ta izjemno škodljivi radikal povzroči cepitev dvojne vijačnice DNK ali oksidacijo njenih nukleotidov. To vodi do nastanka hidroksigvanozina, ki je pomemben pokazatelj oksidativnega stresa.

1.6 URAVNAVANJE OKSIDATIVNEGA STRESA

1.6.1 Vrste antioksidativnih sistemov

Zdrav organizem je sposoben preprečiti škodljivo delovanje radikalov. V telesu namreč obstaja naravni obrambni sistem, ki ga sestavljajo različni encimski sistemi in ostale snovi pod skupnim imenom antioksidanti (1).

Poznamo več obrambnih mehanizmov: primarni, sekundarni in terciarni. Pri primarnem obrambnem mehanizmu gre za preprečevanje nastanka radikalov. Sekundarni mehanizmi nevtralizirajo radikale, terciarni pa poskrbijo za popravilo morebitnih poškodb zaradi delovanja radikalov.

V antioksidativni obrambni sistem prištevamo vse molekule in spojine, ki so sposobne nevtralizirati radikale, preprečiti njihov nastanek ali jih katalitično odstraniti. Sam sistem je običajno porazdeljen znotraj organizma na znotraj- ali zunaj-celičnem nivoju. V zunaj-celičnem prostoru in v krvni plazmi predstavljajo antioksidantno plazemsko bariero vse snovi, ki imajo redukcijske sposobnosti za nasičenje elektronskega primanjkljaja. Sem spadajo glutation, tioli, albumini, bilirubin, sečna kislina, holesterol ter eksogene snovi kot so askorbinska kislina, tokoferoli, polifenoli, bioflavonoidi. V tem kontekstu imajo pomembno vlogo tiolove spojine, ki predstavljajo dobre "ponudnike" vodika (1).

Znotraj celice je antioksidantni sistem dobro razporejen v številnih delih celice. Vendar pa glavnina radikalov nastane v lipidnih plasteh, kjer se nahajajo encimi, potrebni za katalizo radikalskih reakcij. Zato v bioloških membranah predstavljajo lipofilni antioksidanti prvo obrambno linijo pred delovanjem ROS. Kasnejšo obrambno črto pa zastopajo vodotopni vitamini kot je vitamin C in nekateri vitamini B skupine.

1.6.2 Antioksidanti (AO)

Po definiciji so antioksidanti snovi, ki znatno upočasnijo ali preprečijo oksidacijo pomembnih celičnih sestavin, tako da reagirajo z radikali in zaustavijo veržne radikalske reakcije (3). Lastnost teh snovi je, da imajo v svoji strukturi vsaj en reaktiven vodik, ki se zlahka odcepi in veže na radikal. Pri tem nastane nov radikal, ki je stabilnejši in zato tudi

manj škodljiv. Drugače pa gre pri antioksidantih za zelo heterogeno skupino molekul, ki delujejo preko različnih mehanizmov.

Glede na izvor ločimo endogene antioksidante kot so npr. encimski sistemi superoksidne dismutaze in katalaze ter snovi, katere dodatno vnašamo v organizem z ustrežno prehrano, npr. vitamine (3). Glede na kemijsko strukturo se antioksidanti delijo na encimske ter ne-encimske snovi ter glede na topnost na hidrofilne in hidrofobne. Hidrofilni reagirajo z oksidanti predvsem v citosolu in krvni plazmi, medtem ko hidrofobni preprečujejo lipidno peroksidacijo celičnih membran.

Preglednica III: Najpomembnejši antioksidanti in njihova razdelitev glede na izvor in kemijsko strukturo

	Ne-encimski antioksidanti	Enciskimi antioksidanti
endogeni	Glutation GSH	Superoksidna dismutaza
	Sečna kislina	Glutation peroksidaza
	Ubikinon Q ₁₀	Glutation-S transferaza
	Bilirubin	Glutation reduktaza
	Melatonin	Katalaza
	Melanin	
	Transferin	
	Laktoferin	
eksogeni	Vitamin E (tokoferol)	
	Vitamin C (askorbinska kislina)	
	β-karoten	

Pomembni načini delovanja antioksidantov:

- katalitično odstranjevanje radikalov in drugih ROS (superoksidna dismutaza, katalaza, peroksidaza...)
- glutation, askorbinska kislina, β-karoten in podobne nizko molekularne snovi so t.i. lovilci radikalov. Delujejo tako, da reagirajo z radikali, jih nevtralizirajo, sami pa pri tem pridobijo lastnosti radikalov.
- nekateri proteini (transferini, hemopeksini, haptoglobini) reagirajo s pro-oksidanti (železovi, bakrovi ioni, hem) in s tem zmanjšajo njihovo razpoložljivost ter posledično preprečijo nastanek predvsem hidrokislnega radikala in razgradnjo lipidnih peroksidov.

Preglednica IV: Pomembnejši antioksidanti in njihov mehanizem delovanja

Razred	Antioksidant	Mehanizem delovanja
Sekvestratorji kovin	Transferin, laktoferin	Kelator železa
	Albumini	Kelator bakra
Katalitično odstranjevanje ROS	Superoksid dismutaza	$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
	Katalaza	Disproporcionacija vodikovega peroksida: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
	Glutation peroksidaza	Reducira H_2O_2 in ostale hidroperokside $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GS-SG$
	Glutation S transferaza	Cepi lipidne perokside
Lovilci radikalov	Vitamin E (tokoferol)	Nevtralizira radikale
	Vitamin C (askorbinska k.)	Reagira direktno z $O_2^{\cdot -}$ in OH^{\cdot} , nevtralizira ROS
	β -karoten	Lovilec 1O_2 , reagira tudi s peroksilnimi radikali
	Glutation GSH	Lovilec OH^{\cdot} in 1O_2 , reducira organske perokside

Delovanje antioksidantov lahko tako v grobem ločimo na preventivno in kurativno. Pri prvem, gre predvsem za preprečevanje nastajanja radikalov in oksidativnih poškodb. V primeru, da do poškodb vendarle pride, se vključijo t.i. popravljalni mehanizmi. Ti vključujejo encime, kateri posredujejo šele po nastanku poškodb z ROS. Njihovo delovanje, ki je pogosto zaporedno, najprej vključuje identifikacijo, nato odstranitev oksidirane molekule ter končno sintezo novega dela, ki ga vključijo nazaj v poškodovano molekulo. Sem spadajo hidrolaze (glikozidaze, lipaze, proteaze), transferaze in polimeraze (1,3).

Encimski antioksidanti

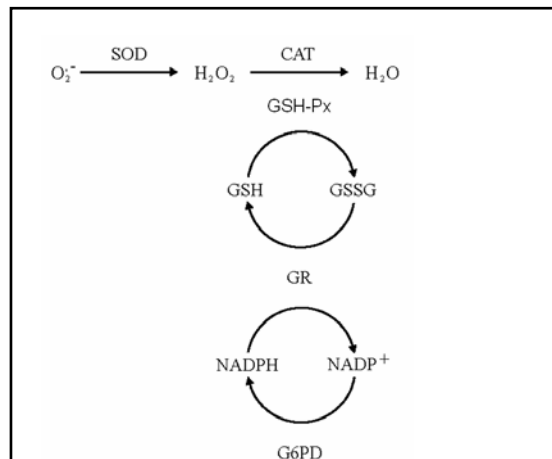
Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid dismutaze spadajo v skupino metalo encimov, ki katalizirajo reakcije dismutacije superoksidnega radikala v molekulo vodikovega peroksida in kisika. Glede na prostetične skupine ločimo tri različne SOD, in sicer imajo prve v aktivnem centru cink in baker, druge železo in spet tretje mangan. Njihova aktivnost se razlikuje od tkiva do tkiva in je največja v jetrih, ledvicah in vranici (10).

Glutation redoks sistem

Sam sistem sestavljata encima glutacion peroksidaza (GSH-Px) in glutacion reduktaza (GR) ter njun substrat, glutacion (GSH) (slika 15). Encima katalizirata redukcijo vodikovega peroksida ali organskih peroksidov do vode pri čemer pride do oksidacije glutaciona, ki se pri tem pretvori v dimerno obliko (GSSG). Sledi regeneracija reducirane oblike glutaciona,

ki jo katalizira glutation reduktaza. Pri tej reakciji kot vir energije služi oksidacija NADPH.



Slika 15: Shema poteka reakcij glutation redoks sistema. Obrazložitev oznak: superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) glutation peroksidaza (GSH-Px), glutation reduktaza (GR), glutation (GSH), oksidirana oblika glutationa (GSSG – dimerna oblika), G6PD (glukoza-6-P-dehidrogenaza).

Glutation peroksidaza je v celičnem citosolu in matriksu mitohondrijev. Poznamo dve različni obliki GSH-Px in sicer od selena odvisne in od selena neodvisne. Prve lahko reducira tako vodikov peroksid kakor tudi organske perokside, slednje pa le vodikov peroksid.

Glutation reduktaza se prav tako nahaja v citosolu, vendar ni neposredno povezana z odstranjevanjem ROS. Ima pa pomembno vlogo pri regeneraciji GSH, s čimer zagotavlja nemoteno katalitično delovanje glutation peroksidaze (10).

Katalaza (CAT):

Katalaze so hemoproteini, ki odstranjujejo vodikov peroksid in s tem preprečujejo nastanek hidroksilnega radikala. Nahajajo se predvsem v peroksisomih. Katalaze najdemo v različnih tkivih, najbolj aktivne pa so v jetrih, eritrocitih in ledvicah (10).

Tioredoxin in tioredoksin reduktaza

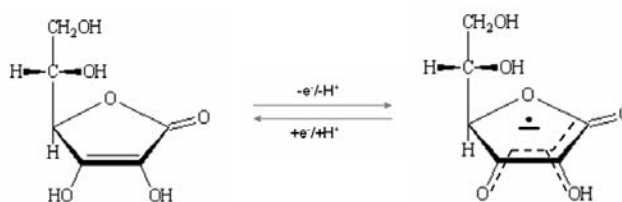
Dodatni encimski antioksidativni in redoks sistem tvorita skupaj tioredoksin in tioredoksin reduktaza, ki sta vključena v številne procese povezane z nastankom ROS. Njuna ključna vloga je predvsem pri regeneraciji mnogih antioksidantnih molekul kot so npr. ubikinon, lipoična ter askorbinska kislina (7).

Antioksidanti, ki niso encimi

V to skupino antioksidantov prištevamo predvsem vitamine z antioksidativnim delovanjem, glutation, ostale tiole ter nekatere druge biološke spojine, ki kažejo antioksidativno delovanje (proteini, ubikinon, lipoična kislina...) (10).

Askorbinska kislina:

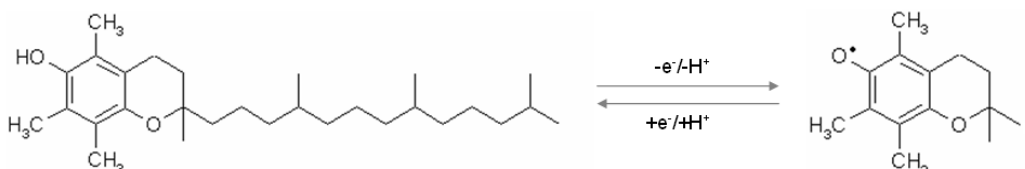
Vitamin C je vodotopen vitamin in eden pomembnejših antioksidantov v ekstracelularni tekočini. Uvrščamo ga med lovilce radikalov, saj mu kemijska struktura omogoča, da neposredno reagira s superoksidom, hidroksilnim radikalom in ostalimi peroksidi ter se pri tem oksidira do stabilnega askorbilnega radikala (slika 16). Najbolj učinkovit je v plazmi, kjer preprečuje nastanek škode na membranah eritrocitov. Regenerira se lahko na dva načina in sicer s pomočjo encimov ali brez. V prvem primeru reakcijo katalizirata encima NADH semidehidroaskorbat reduktaza in dehidroaskorbat reduktaza. Pri neencimski regeneraciji pa imata poglavito vlogo glutation in lipoična kislina. Pri visokih koncentracijah askorbata in ob prisotnosti ionov prehodnih kovin lahko deluje prooksidantno in tvori reaktivne kisikove spojine, tudi hidroksilni radikal (10).



Slika 16: Askorbinska kislina in nastanek askorbilnega radikala

α -tokoferol (vitamin E):

V naravi se vitamin E nahaja v osmih izomernih oblikah, od katerih je najbolj znan in za človeka pomemben prav α -tokoferol. Gre za lipofilni vitamin, ki se na celični ravni nahaja predvsem v membranah organelov (mitohondriji in endoplazmatski retikulum) in v plazmalemi.

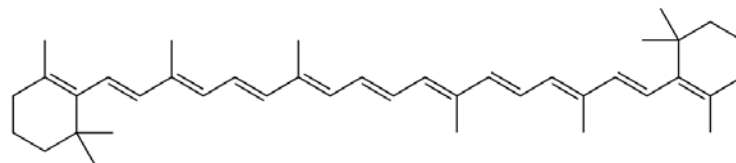


Slika 17: α -tokoferol in nastanek tokoferilnega radikala

E vitamin nudi antioksidativno zaščito predvsem polinenasičenim maščobnim kislinam, tako da reagira z radikali in se oksidira do tokoferilnega radikala. Tak radikal se nato inaktivira, tako da se združi še z enim tokoferilnim radikalom ali pa se reducira s pomočjo askorbinske kisline (8,10).

β-karoten:

Karotenoidi so heterogena skupina barvnih pigmentov, za katere je značilna dolga alifatska veriga konjugiranih dvojnih vezi, zaradi česar so dobri ponudniki vodika in zato dobri antioksidanti. Beta karoten je t.i. lovilec singletnega kisika in je odgovoren predvsem za preprečevanje lipidne peroksidacije.



Slika 18: Skeletna formula β-karotena

Glutation:

Glutation je tripeptid, sestavljen iz cisteina, glicina in glutamata. Skupaj z glutation peroksidazo in glutation reduktazo deluje v okviru prej opisanega glutation redoks sistema. Redoks razmerje med GSH in GSSG je dober pokazatelj oksidativnega stresa (13).

Proteini kot so transferin, laktoferin in feritin vežejo proste ione prehodnih kovin, jih tako naredijo nedostopne za vstop v radikalske reakcije ter preprečijo nastanek radikalov (6).

Transferin:

Transferin je plazemski glikopeptid zadolžen za prenos železovega iona. Vez med transferinom in železom je močna, a reverzibilna. V nepatoloških razmerah je zasedena največ tretjina molekul transferina, v nasprotnem primeru, če je zasedenost prevelika pa pride do prooksidativnega delovanja, saj se pričnejo železovi ioni sproščati.

Feritin:

Sestavljen je iz 24 polipeptidnih molekul in je ključni znotrajcelični protein za skladiščenje železa. Ena molekula feritina lahko veže tudi do 4500 železovih ionov.

Laktoferin:

V nasprotju s feritinom lahko ena molekula laktoferina veže le dva železova iona. Drugače je to globularni protein s protimikrobnim delovanjem. Najdemo ga v mleku, slini, solzah in ostalih sekretornih tekočinah (6).

1.6.3 Prilagoditev antioksidativnega sistema pri športni aktivnosti

Med snovi za prilagoditev obrambnega sistema prištevamo snovi, tehnike ali postopke, ki lahko povečajo fiziološki antioksidativni sistem v živem organizmu. Na primer pravilna in redna telesna vadba ali ustrezna in uravnotežena prehrana lahko vplivata na oksidativni metabolizem preko zmanjšane tvorbe ROS in aktivacije antioksidantnih encimov.

Čeprav so radikali naravni stranski produkti različnih kemičnih procesov, do celičnih in tkivnih poškodb redko pride pri fizioloških pogojih. Tudi športna aktivnost le redko privede do obsežnega oksidativnega stresa pri zdravih posameznikih. Zaradi izjemnega antioksidativnega sistema obseg oksidativnega stresa pri fizičnih naporih ni odvisen le od količine proizvedenih radikalov, ampak tudi od obrambne zmogljivosti antioksidantnih sistemov. Ta zmogljivost se razlikuje od sistema do sistema glede na biokemijske in molekularne mehanizme regulacije, čeprav je natančen mehanizem delovanja še vedno neznan (10).

V splošnem je povečana koncentracija ROS v skeletnih mišicah škodljiva, zato je njeno nastajanje bolje preprečiti. Kljub povečanemu tvorjenju ROS v mišicah pa so le-te razvile tudi različne endogene mehanizme, ki se po naporu hitro prilagodijo na nove razmere. To vključuje številne strukturne in biokemične spremembe, kot so povečana mišična aktivnost antioksidantnih encimov, kot so superoksidna dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza ter povišana koncentracija stresnih proteinov toplotnega šoka (HSP-angl. heat shock proteins). Povečala naj bi se tudi aktivnost ostalih antioksidantov, kot so vitamin C, vitamin E, karotenoidi in glutation. Takšna adaptacija se navezuje na potencialno škodljive učinke naslednje telesne vadbe. Zato je tveganje za nastanek poškodb pri vadbi, kljub povišanemu privzemu kisika in posledično povečani tvorbi ROS, zaradi prilagoditvenih mehanizmov manjše. Kajti ravno te spremembe redoks stanja v mišici, predstavljajo glavni signal za adaptacijo mišic na povečanje oksidativnega stresa (12, 14).

Dokaz, da lahko zmanjšanje tvorbe ROS med vadbo prepreči aktivacijo pomembnih signalnih poti, so prikazali izsledki raziskave na podganah, kjer so z uporabo alopurinola zavrli nastajanje ROS pri ksantinski oksidazi. Izkazalo se je, da je hkrati prišlo tudi do zmanjšane aktivacije mitogensko aktiviranih kinaz v mišicah, ki sodelujejo pri ekspresiji pomembnih zaščitnih encimov, kot je SOD (15).

Povečanje aktivnosti antioksidativnih encimov

Številne raziskave so pokazale, da redna vadba povzroči porast v encimski in neencimski antioksidativni zaščiti. S temi prilagoditvami si organizem olajša obrambo pred ROS. Superoksidna dismutaza (SOD) je prva oblika encimske antioksidativne obrambe. Kot smo že omenili, je glavna naloga superoksidne dismutaze pretvarjanje superoksidnih radikalov v vodikov peroksid, ki je sicer manj reaktiven, vendar pa še vedno škodljiv za celice. Zato se s pomočjo glutacion peroksidaze nadalje pretvori v vodo preko glutacion redoks sistema. Ko količina vodikovega peroksida preseže kapaciteto glutacion peroksidaze, se vključi še katalaza in pretvori vodikov peroksid v vodo brez prisotnosti drugih substratov (16).

Transgene študije na miših so pokazale, da ima povečana ekspresija treh pomembnih antioksidantnih encimov (SOD, CAT in glutacion peroksidaza), vpliv na povečanje tolerance za celične poškodbe, ki nastajajo kot posledica delovanja ROS (17).

Vendar pa se učinkovitost antioksidantov razlikuje glede na različno mesto nastanka ROS. Tako je npr. povečanje obrambnega sistema pri prilagojeni anaerobni aktivnosti omejeno na bližino ksantinske oksidaze. Zato takšna adaptacija ne zagotavlja nujno tudi boljše zaščite mišičnih mitohondrijev pred učinkom ROS, ki nastajajo med elektronsko transportno verigo (18).

Povečanje koncentracije stresnih beljakovin ali proteinov toplotnega šoka (HSP)

Pri adaptaciji mišičnih celic naj bi aktivno sodeloval tudi protein HSP, ki nastaja med stresom in ima zaščitno vlogo. Produkcija superoksidnega aniona med izometrično kontrakcijo, ki ne povzroča poškodb je združena s povečano oksidacijo tiolnih skupin, ki pa se sčasoma normalizira. Poveča se transkripcija HSP proteinov, prav tako pa tudi količina antioksidantnih encimov, kot je že prej omenjena superoksidna dismutaza in katalaza. Tako lahko sklepamo, da predstavljajo radikali signal mišični celici, da mora poskrbeti za svojo zaščito s povečano produkcijo antioksidantov in se tako zaščititi pred

nadaljnimi poškodbami. Oksidacija celičnih proteinov in posledično porast HSP so tako ključni za preoblikovanje mišičnih celic. Vadba torej predstavlja učinkovit način prilagoditve mišičnih vlaken, kar je pomembno pri preprečevanju nadaljnjih poškodb mišic (12, 14).

Hkrati pa so ROS vključeni tudi v molekularni mehanizem, ki vključuje prilagoditev mišic na trening. ROS so namreč odlične signalne molekule, ki predstavljajo povezavo med motnjo homeostaze med vadbo in posledično adaptacijo preko ustrezne genske transkripcije (9). Tako so v eni izmed novejših raziskav ugotovili povečano adaptacijo na stres pri zmerni telesni aktivnosti, ki se izraža preko povečane transkripcije genov za ubikvitin. Ubikvitin sodi v skupino stresnih proteinov in ima pomembne citoprotektivne lastnosti, med drugim sodeluje pri odstranjevanju poškodb DNK ter razgrajevanju poškodovanih in nenormalnih beljakovin (13).

Povečanje koncentracije vitamina E in vitamina C

Neposredno po vadbi se močno poveča tudi nivo tokoferola (vitamin E) v plazmi, do katerega verjetno prihaja zaradi sočasnega sproščanja z maščobnimi kislinami med procesom lipolize iz maščobnega tkiva. Tako so ugotovili povečano sproščanje tokoferola po napornem kolesarjenju in teku maratona, kjer je prišlo do popolnega izčrpanja, koncentracija vitamina pa je naraščala še 48 ur po vadbi (9).

Prav tako se kot odziv na vadbo v plazmi poveča vsebnost askorbinske kisline (vitamin C), vendar se vrednosti kaj kmalu po prenehanju vadbe vrnejo v prvotno stanje. Naslednji dan po vadbi se vrednosti še znižajo in ostanejo nizke še približno tri dni. Pri tem ni povsem jasno, kaj povzroči te spremembe v koncentraciji vitaminov, ki se pojavijo med vadbo. Dvig njihove koncentracije v plazmi prav gotovo zveča antioksidativno obrambo krvi, po drugi strani pa zmanjša učinkovitost ostalih funkcij vitaminov (9).

Vpliv vrste vadbe na antioksidativni odziv

Izčrpavajoča aerobna vadba poveča potrebe po kisiku tudi za deset do petnajst krat v primerjavi s stanjem v mirovanju, kar znatno poveča produkcijo ROS zaradi povečanega elektronskega transporta v mitohondrijih. Nastanek ROS pa je povečan tudi med anaerobno vadbo, vendar po vsej verjetnosti na račun aktivacije ksantinske oksidaze, acidoze in oksidacije kateholaminov. Torej je nastanek določene vrste ROS odvisen tudi

od tipa vadbe. Prav tako pa vrsta vadbe pogojuje različno prilagoditev antioksidantnega sistema (16).

V raziskavi, kjer so primerjali tekače na dolge in kratke proge, so ugotovili, da je pri aerobni vadbi (tek na dolge proge) aktivnost katalaze tudi do trikrat večja kot pri anaerobni aktivnosti. Takšna razlika je verjetno v povezavi z obsežnejšim privzemom kisika, ki mu je telo izpostavljeno med dolgotrajno vadbo. Kot vemo se aktivnost katalaze poveča, ko glutathion peroksidaza ne more odstraniti prekomerno nakopičenega vodikovega peroksida, do česar pa je po vsej verjetnosti prišlo tekom dolgotrajnega teka (16).

1.7 DOLOČANJE OKSIDATIVNEGA STRESA

Dejansko stanje oksidativnega stresa v organizmu, je težko določljivo. Vzrok tega je izjemno kratka življenjska doba radikalov ter njihova velika reaktivnost. Tako pogosto ne moremo neposredno določiti količine primarno nastalih radikalov, temveč le njihove bolj stabilne vmesne presnovke. Seveda ima pri tem veliko vlogo tudi zaščitni sistem antioksidantov, ki nadzira prekomerno nastajanje radikalov. Poleg tega je organizem živ sistem, ki se neprestano spreminja, zato je vsakršna določitev oksidativnega stresa le približna ocena trenutnega stanja. Vendar pa nam tudi ta približek lahko marsikaj pove, ne nazadnje se moramo zavedati škodljivega vpliva povečanega oksidativnega stresa. Zato je določevanje parametrov, ki opredeljujejo oksidativno stanje v organizmu vsekakor koristno.

1.7.1 Metode, ki se uporabljajo za določanje oksidativnega stresa

Merjenje oksidativnega stresa v organizmu ni najbolj preprosto. Reaktivne kisikove zvrsti, ki nastajajo tekom različnih oksidacijskih procesov so namreč zelo raznolike in spremenljive, zato jih težko zaznamo. Različne metode se lahko nanašajo neposredno na določanje posameznih reaktivnih kisikovih vrst ali pa posredno na merjenje različnih produktov oksidacije. Na voljo je kar nekaj metod, pri tem pa ima seveda vsaka metoda svoje prednosti in slabosti. Pogoste metode za določanje t.i. pro-oksidantnega statusa so: ESR (elektronska spinska resonanca), d-ROMs test, TBAR test (določanje presnovkov

tiobarbiturne kisline kot produktov lipidne peroksidacije), določanje vsebnosti lipoperoksidov, določanje nekaterih stranskih produktov oksidacije (npr. izoprostanov) in kemiluminescenca (pospešena z luminolom), ki je uveljavljena pri merjenju sproščanja radikalov iz nevtrofilcev (19).

Vendar pa običajni laboratorijski testi ne zadoščajo za globalno opazovanje oksidativnega stresa niti v normalnih, niti v patoloških okoliščinah. Problem predstavlja predvsem visoka reaktivnost radikalov. Tako nekateri radikali izginejo v nanosekundah po svojem nastanku. Pomembna metoda za potrditev njihovega obstoja je elektronska spinska resonanca, ki predstavlja zlati standard za detekcijo radikalov v živih organizmih. Vendar pa metoda ni primerna za rutinsko klinično uporabo pri nadzoru oksidativnega stresa (1).

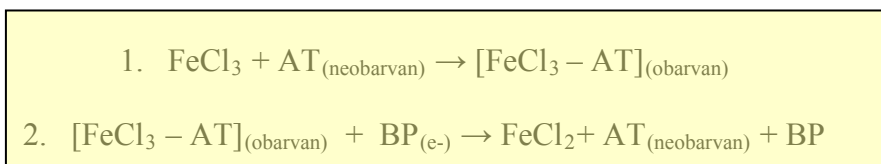
Za globalno opazovanje oksidativnega stresa je potrebno upoštevati tudi antioksidativno stanje v organizmu oz. prisotnost antioksidantov. Pri tem lahko uporabimo nekatere metode, kjer določamo redukcijsko sposobnost antioksidantov. Tako npr. pri OXI – Adsorbent testu določamo celokupno antioksidativno sposobnost plazme ob dodatku oksidanta – hipoklorne kisline (1). Pri SHp testu pa določamo le antioksidativno aktivnost, ki se nanaša na redukcijsko sposobnost tiolne (-SH) skupine različnih sestavin plazme (1).

Dejansko stanje oksidativnega stresa v organizmu je torej težko določljivo, vendar pa lahko z uporabo metod, ki zajemajo tako oksidativni kot tudi antioksidativni status, dobimo mnogo jasnejšo sliko. Zato smo se pri tem raziskovalnem delu odločili za uporabo BAP testa, kot pokazatelja naravne aktivnosti antioksidantov ter d-ROMs testa, za določanje količine reaktivnih kisikovih vrst.

BAP test (biološki antioksidantni potencial)

S to metodo določamo zmožnost naravne plazemske antioksidantne obrambe pri oksidacijskem delovanju radikalov v krvni plazmi, tako da merimo sposobnosti plazemskih antioksidantov za redukcijo Fe^{3+} ionov ob prisotnosti kromogena. V plazmi obstajajo številne snovi, ki so se sposobne zoperstaviti škodljivemu delovanju reaktivnih kisikovih vrst. Učinkovitost te naravne bariere pa lahko ovrednotimo preko določanja sposobnosti za redukcijo določenega substrata, kateremu antioksidant odda enega ali več elektronov (20). Tak substrat, ki je željan elektronov deluje kot detektor, kar zaznamo s pomočjo dodatka kromogena, ki spremeni barvo tekom oksidacijsko-redukcijske reakcije.

BAP test temelji na spremembi barve raztopine Fe^{3+} ionov, ki so adekvatno vezani na specifičen kromogeni substrat in se ob dodatku redukcijskega sistema, katerega predstavlja krvna plazma reducirajo v Fe^{2+} ione (slika 19). Intenziteta spremembe barve raztopine sovпада z reducirajočo sposobnostjo plazme, kar natančno zaznamo s pomočjo spektrofotometra. Količino reduciranih železovih ionov adekvatno preračunamo in tako določimo oksidacijsko sposobnost plazme.



SLIKA 19: Reakciji BAP testa, pri čemer je FeCl_3 (železov klorid), $\text{AT}_{(\text{brezbarven})}$ (amonijev tiocianat), $[\text{FeCl}_3 - \text{AT}]_{(\text{obarvan})}$ (obarvan kompleks amonijevega tiocianata in železovega klorida), $\text{BP}_{(\text{e}^-)}$ (molekule redukcijskega sistema krvne plazme), BP (oksidirana oblika $\text{BP}_{(\text{e}^-)}$), FeCl_2

Predhodni podatki, ki se nanašajo na zdrave posameznike kažejo, da so optimalne vrednosti BAP testa višje kot 2200 $\mu\text{mol/L}$ (20). Nižje vrednosti pa kažejo oslABLJENO učinkovitost plazemske antioksidativne zaščite in posledično na prisotnost oksidativnega stresa. Prav tako so nižje vrednosti značilne tudi za starejše osebe. Tako lahko s pomočjo tega testa določimo smiselnost posebne terapije z antioksidanti.

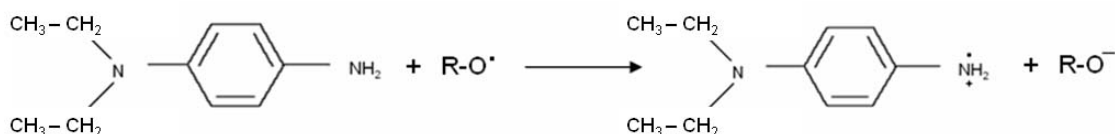
Preglednica V: Nivo oksidativne zaščite – prikazan kot referenčne vrednosti BAP testa

Vrednosti BAP testa ($\mu\text{mol/L}$)	Interpretacija vrednosti
2200 - 4000	optimalne vrednosti
2200 – 2000	mejno območje
2000 – 1800	rahlo zmanjšanje
1800 – 1600	zmerno zmanjšanje
1600 – 1400	močno zmanjšanje
< 1400	zelo močno zmanjšanje

d-ROMs test

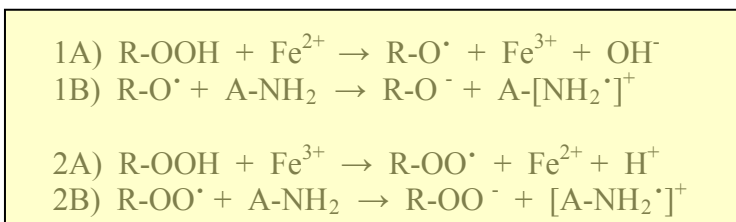
d-ROMs test je fotometrična metoda, ki nam omogoča določanje koncentracije hidroperoksidov (ROOH) v biološkem vzorcu. Le-ti nastajajo v celicah zaradi oksidativnih napadov ROS na različne organske substrate (ogljikovi hidrati, amino kisline, proteini, nukleotidi). Metoda temelji na interakciji s prehodnimi kovinami oz. na že znani Fentonovi reakciji, s katero so najprej dokazali nastanek vodikovega peroksida, kasneje pa sta jo razširila Haber in Weiss. V skladu s to reakcijo ion prehodne kovine (železa ali bakra) katalizira razpad hidroperoksida in povzroči nastanek novih radikalskih vrst v obliki hidroperoksilnih in alkoksilnih radikalov (21).

Če dodamo v sistem hidroperoksida in katalizatorja snov z redukcijskim potencialom (kromogeni substrat), ki omogoča odcepitev potrebnega elektrona za doseg stabilnosti alkoksilnega in peroksilnega radikala, postane takšna spojina nov radikal (slika 20). Pomembno je, da je ta spojina optično aktivna, in da pri oksidaciji spremeni barvo, hkrati pa mora biti v takšni obliki dovolj stabilna, da je možno spektrofotometrično določanje njene koncentracije. Ta koncentracija je namreč neposredno sorazmerna z *in vitro* nastalimi radikali in nadalje s hidroperoksidi, ki so bili prisotni v biološkem vzorcu. Kot kromogeni substrat se uporablja N,N-dietil para fenilen diamin (21).



SLIKA 20: Reakcija N, N-dietil-p-fenilen diamina z alkoksilnim radikalom

Pri samem d-ROMs testu določamo količino reaktivnih kisikovih vrst, ki so prisotni v vzorcu krvi, v obliki hidroperoksidov (ROOH). Ob nakisanju pride do sproščanja železovih ionov, ki so primarno vezani na plazemske beljakovine in katalizirajo reakcijo razpada hidroperoksidov na radikale (slika 21). Tako nastane alkoksilni ($R-O\cdot$) in peroksilni radikal ($R-OO\cdot$). Takšni radikali so sposobni oksidirati alkilno substituiran aromatski amin ($A-NH_2$), ki je raztopljen v kromogeni mešanici in se tekom reakcije pretvori v rožnato obarvan derivat ($[A-NH_2\cdot]^+$).



SLIKA 21: Reakcije d-ROMs testa, pri čemer je R-OOH generičen hidroperoksid, $RO\cdot$ alkoksilni radikal generičnega hidroperoksida, $R-OO\cdot$ hidroperoksilni radikal generičnega hidroperoksida, $A-NH_2$ je N, N-dietil-parafenilendiamin (kromogeni substrat d-ROMs testa), $[A-NH_2\cdot]^+$ obarvan radikalski kation kromogenega substrata

Nastali kation je novi radikal, ki pa je relativno stabilen, zato lahko njegovo količino izmerimo fotometrično pri valovni dolžini 505 do 546 nm, optični poti 1 cm in temperaturi 37°C. Pri tem je jakost razvite barve premo sorazmerna s koncentracijo ROS v skladu z Beer-Lambertovim zakonom.

Zaradi kemijske heterogenosti alkoksilnih in peroksilnih radikalov so uvedene posebne enote po inovatorju metode, italijanskem kemiku Mauru Carratelliju. To so CARR enote, pri čemer ena enota odgovarja 0,08 mg/ 100 mL H₂O₂ (15). Referenčne vrednosti testa, ki izhajajo iz približno 5000 predvidoma zdravih posameznikov so med 250 in 300 enot CARR (preglednica VI), kar ustreza 20,0 do 24,0 mg vodikovega peroksida na dL, ne glede na starost in spol (21).

$$\text{CARR enote} = \Delta\text{Abs}/\text{min} \times F$$

Pri tem so CARR enote merilo za ROS, $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ je povprečna razlika med absorbancami zabeležena v 1, 2 in 3 minutah, F pa predstavlja korekcijski faktor z določeno vrednostjo.

Preglednica VI: Nivo reaktivnih kisikovih vrst – prikazan kot referenčne vrednosti d-ROMs testa

Vrednosti d-ROMs testa (CARR)	Interpretacija vrednosti
250 – 300	normalno območje
300 – 320	mejno območje
321 – 340	nizka stopnja oksidativnega stresa
341 – 400	srednja stopnja oksidativnega stresa
401 – 500	visoka stopnja oksidativnega stresa
> 500	zelo visoka stopnja oksidativnega stresa

Vrednosti nižje od 250 CARR enot brez dokazov o nastajajoči bolezni, na splošno prikazujejo fiziološko stanje športnika ali preveliko uživanje antioksidantov. Drugače so lahko zelo nizke vrednosti posledica kroničnih in izčrpavajočih bolezni, zaradi splošne oslavitve biološke oksidacije kot npr. pri hipotiroidizmu, imunosupresiji ali kaheksiji. Prav tako je to značilno za nekatera rakava obolenja (rak dojke, debelega črevesa, karcinom pankreasa), kjer pride do odtegnitve hidroperoksidov s strani tumornega tkiva. Čeprav nastajajo obilne količine hidroperoksidov so le-ti deaktivirani zaradi reakcije s tiolnimi skupinami številnih snovi, katere sproščajo nekrotične rakave celice. Tudi pri uporabi določenih zdravil lahko pride do prikritja pravih vrednosti ROS, zlasti velik vpliv imajo kortikosteroidi, tudi pri dermalni uporabi (21).

Vrednosti med 250 in 300 CARR enot ponazarjajo normalno stanje, vendar je pri tem potrebno izključiti možnost prikrite bolezni, za kar je potreben natančen pregled bolnika skupaj z njegovo zgodovino obolenj. Kakorkoli, normalne vrednosti ROS ne izločajo

možnosti prikrite bolezni, temveč ponazarjajo, da so izmerjene vrednosti v območju, ki je značilno za navidezno zdrave posameznike brez kliničnih znakov obolenj.

Vrednosti med 301 in 320 CARR enot označujejo mejno območje, kjer je že potrebna večja previdnost. Te vrednosti so relativno pogoste, če ni posredi kakšna bolezen, pri neuravnoteženem prehranjevanju ali pretirani in neredni fizični aktivnosti. V takih primerih je potrebno spremeniti življenjski slog ter ponoviti merjenje po določenem času. V kolikor pri ponovnem merjenju ni vidnih sprememb pri meritvah ROS, lahko sumimo na prikrito bolezen.

Vrednosti med 321 in 400 CARR enot ponazarjajo nizko do srednjo stopnjo oksidativnega stresa, kar že pomeni resno situacijo. Takšne vrednosti lahko pričakujemo po izredno naporni vadbi (npr. kolesarski dirki), pri določenem načinu življenja (npr. kajenje, alkoholizem, prekomerna telesna teža) ali pri nekaterih obolenjih (nezdravljena arterijska hipertenzija, periferna žilna obolenja, degenerativne in kronične bolezni).

Vrednosti nad 400 CARR enot označujejo visoko do zelo visoko stopnjo oksidativnega stresa, ki se lahko pojavi v zadnjih mesecih nosečnosti, pri določenih boleznih (srčno-žilne bolezni, degenerativne bolezni) ter pri kombinirani terapiji estrogenov in progestativov, pri kemoterapiji ali radioterapiji (21).

1.7.2 Celokupni nivo oksidativnega stresa

Dejansko stopnjo oksidativnega stresa bi lahko opredelili kot "seštevek" vrednosti obeh testov. Takšen rezultat lahko predstavlja kombinacija vrednosti BAP in d-ROMs testa. Seveda pri tem obstajajo različne možnosti, kar je odvisno od številnih dejavnikov. Pri tem lahko izpostavimo nekaj značilnih primerov (1):

- Vrednosti obeh testov so nižje od normalnih vrednosti. To lahko ponazarja stanje hiporeaktivnosti, ker gre hkrati za nizek nivo ROS in za zmanjšan odziv antioksidantov. Takšno stanje lahko prikriva kronično in/ali degenerativno bolezen (kot npr. hipotiroidizem brez nenormalnega imunskega odziva, novotvorbe, oslavljen imunski sistem).

- Vrednosti d-ROMs testa so nižje od normalnih, vrednosti BAP testa pa so normalne. To stanje nakazuje razvijajoče se stanje oksidativnega stresa in je značilno za redno trenirane športnike ter pri lokalni rabi kortikosteroidov.
- Vrednosti d-ROMs so normalne, medtem ko so vrednosti BAP testa znižane. Te vrednosti označujejo rizično stanje. Čeprav oseba nima izrazite produkcije ROS, je kljub temu nagnjena k oksidativnemu stresu. Pravzaprav njegov oslabljen obrambni sistem ni zmožen učinkovito presteči morebitnega napada radikalov. Za kar so lahko odgovorni mnogi dejavniki, kot npr. neredno ali pretirano uživanje antioksidantov (neuravnotežena dieta, zmanjšana absorpcija, povečane potrebe po antioksidantih). Ne glede na to, ali gre za zunanji ali notranji faktor, ima le-ta vpliv na oksidativni stres, ki lahko povzroči v tem primeru večje poškodbe tkiva kot pri normalnem stanju.
- Vrednosti obeh testov sta v mejah normale. Tako lahko izključimo možnost napredujočega stanja oksidativnega stresa.
- Vrednosti d-ROMs so višje od normalnih, nasprotno pa so vrednosti BAP testa nižje v primerjavi z zdravimi posamezniki. To ponazarja latentno stanje oksidativnega stresa, razen če ne gre za določeno napredujočo bolezen. Takšno stanje pomeni določeno stopnjo tveganja, saj gre hkrati za povečano tvorbo ROS kot tudi za zmanjšano obrambo antioksidantov.
- Vrednosti d-ROMs so višje od normalnih, medtem ko so vrednosti BAP normalne. To ponazarja kompenzirano stanje oksidativnega stresa. Torej v telesu obstaja vzrok za povečano tvorbo ROS, vendar je endogena obramba dovolj močna, da ga nadzira. V kolikor ne pride do zmanjšanja produkcije ROS v ustreznem času lahko to povzroči oslabitev naravne antioksidativne obrambe in tako pojav oksidativnega stresa.

2. NAMEN DELA

Namen tega raziskovalnega dela je določiti stopnjo oksidativnega stresa pri vrhunskih športnikih neposredno po intenzivni obremenitvi. Želeli bi ugotoviti, v kolikšni meri je športnikovo telo prilagojeno na takšno vrsto stresa in kako hitro se odzove na dražljaje v obliki reaktivnih kisikovih vrst, ki nastajajo med vadbo. Povečana športna aktivnost je namreč povezana z večjim vnosom kisika v telo, kar ima za posledico tudi večjo proizvodnjo ROS. Zato lahko intenzivna športna aktivnost povzroči nastanek oksidativnega stresa, ki ima tudi škodljive posledice. Slednje zlasti velja za občasno povečano fizično aktivnost, na katero telo ni prilagojeno. Pri redni telesni aktivnosti pa telo razvije določeno stopnjo adaptacije na stres, ki se kaže v povečanem antioksidativnem odzivu. Zato lahko pri športnikih pričakujemo bolj učinkovit obrambni sistem za zaščito pred reaktivnimi kisikovimi vrstami. Toda kakšna je dejanska učinkovitost obrambnega sistema športnikov? Nadalje pa nas zanima, v kolikšni meri se spremeni koncentracija ROS, ki je izmerjena neposredno po intenzivni obremenitvi.

Meritve bomo opravljali na dveh skupinah vrhunskih športnikov, to je na skupini veslačev ter na skupini kolesarjev. Obe skupini športnikov bosta izpostavljeni maksimalno intenzivni obremenitvi, kjer bo presežen laktatni prag ter dosežena maksimalna poraba kisika (VO_2 max). Pri tem bomo v venski krvi športnikov določali oba parametra, ki ponazarjata oksidativno stanje v organizmu.

Najprej bomo s pomočjo BAP testa določili biološki antioksidativni potencial, kjer pričakujemo višje vrednosti v primerjavi z normalno populacijo. Nato bomo z uporabo d-ROMs testa določali še količino radikalov, ki se sprostijo med intenzivno aktivnostjo. Pri tem bomo najprej določali prisotnost radikalov pred obremenitvijo, nato pa še tik po končani obremenitvi. Pričakujemo, da bodo vrednosti radikalov zaradi intenzivnosti vadbe in povečanega vnosa kisika narasle, vendar pri tem ne vemo, kako na rezultat vpliva delovanje antioksidativne obrambe. Iz dobljenih rezultatov bomo tako poskušali opredeliti, kakšna je stopnja oksidativnega stresa pri vrhunskih športnikih neposredno po intenzivni obremenitvi.

3. EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 UDELEŽENCI RAZISKAVE

V tej raziskavi sta sodelovali dve skupini vrhunskih športnikov, in sicer kolesarji ter veslači. Na splošno so bili športniki zdravi, z nekaj izjemami, bili so normalne telesne zgradbe, značilne za posamezno vrsto športa. Tako so bili na splošno kolesarji manjši in lažji, z nekoliko podpovprečno vrednostjo telesne maščobe, medtem ko so bili veslači večji in težji.

Vsi kolesarji kakor tudi veslači so bili aktivni člani različnih klubov oz. reprezentanc, ki vsakodnevno trenirajo že vrsto let. Torej je šlo za vrhunske športnike, katerih fiziološke značilnosti se bistveno razlikujejo od značilnosti navadne populacije. Čeprav obstajajo razlike tudi med obema skupinama športnikov, kar izhaja iz različnega tipa vadbe, bomo skupini poskušali opazovati kot celoto, s pomembnimi prilagoditvami organizma na vsakodnevno fizično aktivnost.

Splošno znano je dejstvo, da se tekom vadbenega procesa telo spreminja kjer gre za prilagoditev fizioloških sistemov telesa na impulz vadbe. S spremembo in prilagoditvijo fizioloških sistemov želi telo doseči večjo kapaciteto in učinkovitost, pri vrhunskem športu še toliko bolj, saj vrhunski rezultati zahtevajo optimalne fiziološke prilagoditve. Predvsem gre tukaj za spremembe v respiratornem sistemu, srčno-žilnem sistemu in mišicah, z namenom zagotavljanja ustrezne količine energije in hranil, potrebnih za visoko intenzivno mišično delo. Pri tem bi želeli izpostaviti samo nekatere poglobitve prilagoditve v organizmu športnikov, ki se razvijejo tekom dolgotrajnega treninga in katere je potrebno upoštevati tudi pri naši raziskavi.

Športniki imajo znatno povečan pretok zraka skozi pljuča, kar je bistveno za ustrezno oskrbo s kisikom. Tako lahko minutni pretok zraka med aktivnostjo naraste s 5-6 L v mirovanju, tudi do 180 L, in sicer predvsem na račun globine dihanja, medtem ko se pri normalni populaciji minutni volumen dihanja povečuje zaradi povečane frekvence.

Z redno in dolgotrajno vadbo je opaziti spremembe srčne mišice, ki ima povečan srčni iztis, da ustreza potrebam naporne vadbe. Srce to doseže s povečanjem svoje mase, kar mu omogoča doseči večjo moč in posledično večji volumen iztisa. To je tudi razlog, da imajo

športniki v mirovanju bistveno nižji srčni utrip kot netrenirani ljudje, saj lahko le-ta znaša tudi manj kot 40 utripov na minuto (22).

Značilen je večji krvni volumen in število eritrocitov, za hiter transport kisika v aktivne mišice. Spremembe so vidne tudi v mišicah, kjer je opazno povečanje kapilarne gostote za maksimalno prekrvavljenost aktivnih mišic, k čemur pripomore tudi sama preusmeritev pretoka krvi med vadbo.

Seveda pa je adaptacija športnikovega organizma vidna tudi v spremenjeni presnovi, ki učinkovito dovaja energijo, tako med aerobno kot anaerobno aktivnostjo. V mišičnih celicah se poveča število in velikost mitohondrijev, poveča se količina mioglobina, zaloge energije ter aktivnost in število oksidacijskih encimov. Tako je lahko pri ekstremno hudih obremenitvah raven presnove celo več kot 20-krat višja kot v mirovanju (23).

Tovrstne spremembe je najlažje spremljati na t.i. testiranjih, ki so diagnostični postopek, s katerim ugotavljamo trenutno pripravljenost oziroma sposobnost športnika, ocenimo pretekle dosežke in pridobimo dragocene informacije za nadaljnji potek vadbe.

3.2 VZOREC MERJENCEV

Skupino kolesarjev je sestavljalo 22 udeležencev, od tega je bilo 21 moških ter samo 1 ženska. Starost kolesarjev je bila različna in je znašala od 15 do 30 let s povprečno starostjo 21,09 let .

Skupina veslačev je bila z 42-timi udeleženci skoraj še enkrat večja, sestavljalo jo je 39 moških in 3 ženske. Starost veslačev je bila od 16 do 32 let in je v povprečju znašala 19,26 let.

Vsi preiskovanci so k testu pristopili prostovoljno in na lastno odgovornost. Pred pričetkom testa smo jih seznanili še s samim potekom in okoliščinami testiranja.

3.3 POTEK FIZIČNE OBREMENITVE

Testiranje in meritve smo opravljali na Inštitutu Fakultete za šport v Laboratoriju za fiziologijo športa pod nadzorom usposobljenega medicinskega osebja. Sam potek fizične

obremenitve je sovpadal z naravo treninga kolesarjev oz. veslačev. Pri tem lahko rečemo, da so bili maksimalno fizično obremenjeni.

3.3.1 Kolesarji

Fizično obremenitev smo izvajali na specialnem trenažerju, ki se ponavadi uporablja za meritve modificiranega kolesarskega testa v okviru diagnostičnih testov za oceno telesne pripravljenosti cestnih kolesarjev. Za napravo je značilno, da kar najboljše posnema realne okoliščine vožnje na kolesu. Posebnost naprave je v vgrajeni elektromagnetni zavori, ki omogoča postopno spreminjanje intenzivnosti obremenitve. V trenažer se lahko vpne katerokoli klasično cestno kolo, kateremu se sname sprednje kolo, vilice kolesa pa se namesti v posebno držalo na trenažerju (23).



Slika 22: Slika kolesarja pri opravljanju modificiranega kolesarskega testa

Kolesarji so test opravljali na lastnih kolesih, torej na kolesih, s katerimi trenirajo in tekmujejo. Po predhodnem 15 minutnem ogrevanju je sledil test. Pričeli so pri obremenitvi 150 vatov (W), katero so nato vsako minuto povečali za 20 vatov, vse dokler niso dosegli maksimalne obremenitve. To je pomenilo konec testiranja, saj pri nadaljnji obremenitvi preiskovanec ni več sposoben vrteti pedal. Samo trajanje obremenitve se razlikuje glede na telesno pripravljenost kolesarja, v povprečju pa je daljše kot pri veslačih.

Glede na postopen potek obremenitve, večji del presnove poteka po aerobni poti (80 - 90 %), ki počasi prehaja v anaerobni del, kjer se tudi obremenitev konča. Natančneje lahko obremenitev kolesarjev razdelimo na štiri stopnje. Tako prva faza ogrevanja s 55 - 70 % maksimalnega srčnega utripa poteka povsem aerobno, kjer se večinoma porabljajo maščobne kisline. Sledi druga stopnja (70 – 80 % HR-max.) povečane vzdržljivosti ali vzpon, kar je še vedno aerobna aktivnost, vendar del energije prispeva še glukoza. Stopnjevanje obremenitve v tretji fazi (80 – 90 % HR-max.) zahteva povečanje moči, kjer energijo prispeva predvsem glukoza, vendar je presnova že na meji anaerobne faze. Zadnja

najintenzivnejša stopnja (90 – 100 % HR-max.) je stopnja hitrosti, ki poteka že anaerobno in se zaradi nastajanja laktata tudi hitro konča (24).

3.3.2 Veslači

Po začetnem 15 minutnem nizko-intenzivnem ogrevanju so vsi preiskovanci opravili devet minutni stopnjevalni kontinuirani test (3 min – 3 min – 2 min – 1 min) na veslaškem ergometru, pri čemer so intenzivnost obremenitve določili s predhodnimi testiranjmi (23). Posebnost naprave je v tem, da jo je možno popolnoma prilagoditi posameznikovim sposobnostim. Hkrati je veslače tekom celotnega testiranja s spodbudami in napotki glede hitrosti in intenzitete veslanja spremljal njihov trener.



Slika 23: Veslaški ergometer (simbolična slika)

Potek obremenitve pri veslačih se bistveno razlikuje od kolesarjev tudi zaradi drugačne razporeditve presnove med aktivnostjo. Tako veslači že v samem začetku začnejo zelo intenzivno, kjer porabijo del shranjene energije v mišicah tekom anaerobnega procesa, kjer je že prisotna mlečna kislina. Njihov srčni utrip takoj po startu naraste na 80 do 90 odstotkov maksimalnega srčnega utripa. Sledi srednja faza premagovanja razdalje, kjer se utrip malenkostno umiri (70 – 80 % HR-max.), presnova pa preide na aerobno z veliko porabo glukoze. Zadnja faza "šprinta" poteka povsem anaerobno in dosega maksimalen srčni utrip, sproščajo pa se tudi večje količine laktata (22).

3. 4 VZOREC

Vzorec predstavlja polna kapilarna kri, ki jo vzamemo iz ušesne mečice športnikov. Vsakemu športniku odvzamemo tri vzorce krvi:

1. vzorec za merjenje BAP testa odvzamemo samo na začetku
2. vzorec za merjenje d-ROMs testa pred začetkom vadbe
3. vzorec za merjenje d-ROMs testa po vadbi

3.4.1 Potek jemanja vzorca krvi:

- Najprej rahlo zmasiramo ušesno mečico, da izboljšamo pretok krvi, nato razkužimo kožo z alkoholom. Kot razkužilo ne smemo uporabiti vodikovega peroksida, derivatov amonijevih soli ali oksidirajoči klorovih derivatov, ker lahko vplivajo na rezultate merjenja.
- Sledi pik s sterilno lanceto, prvo kapljo krvi odstranimo, ker lahko vsebuje večjo količino celične tekočine.
- Nato rahlo stiskamo, da priteče druga kaplja krvi, vendar ne premočno, da ne poškodujemo krvnih celic oz. ne vključimo večje količine medceličnine, ki razredči vzorec.
- *Pri BAP testu*, kri napolnimo v posebno mikroepreveto, ki ima na dnu odprtino, skozi katero se kri vsrka v notranjost. Mikroepreveto napolnimo približno do polovice, jo zapremo s priloženim zamaškom in postopamo po navodilih za izvedbo metode.
- *Pri d-ROMs testu* pa kri napolnimo v stekleno kapilaro (20 μ L), pri tem je pomembno, da v kapilaro ne vsrkamo zračnih mehurčkov ali da del krvne kapljice ne visi iz kapilare. Presežno kri obrišemo, vendar pazimo, da ne absorbiramo krvi iz kapilare. Kot antikoagulant za obdelavo kapilar, se lahko uporablja izključno heparin, kajti EDTA ali citrat lahko bistveno vplivata na rezultate testiranja pri d-ROMs testu. Napolnjeno kapilaro damo v pripravljene kivete z reagentom in nadaljujemo z izvedbo testa na aparatu FRAS 4 (23).

3.5 MATERIALI

Reagenti

- železov klorid (FeCl_3)
- amonijev tiocianat (NH_4SCN)
- kromogeni substrat (N, N-dietil-parafenilendiamin)
- acetatni pufer (pH 4,8)

Pribor

- kivete
- steklene kapilare
- igle
- mikrovete
- nastavki za pipete
- avtomatska pipeta (10 μ l)

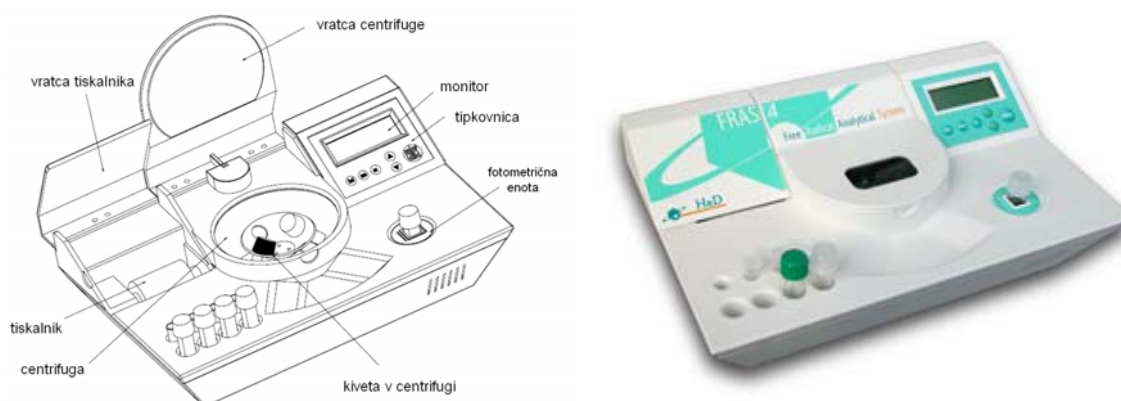
3.6 APARATURE

- FRAS FRAS 4 – aparatura za merjenje BAP in dROMs testa
- Kolesarski trener SpinTrainer, Technogym (Italija)
- Veslaški ergometer

3.7 METODE

3.7.1 Meritve na aparatu FRAS 4 (Free Radical Analytical System)

Naše raziskovalno delo temelji na uporabi sistema FRAS 4, ki je integriran analizni sistem za globalno določanje oksidativnega stresa v organizmu. Prednost sistema FRAS 4 je v tem, da združuje centrifugirni modul in spektrofotometer v eni napravi, ki jo lahko uporabimo za določanje BAP in d-ROMs testa (1). Tako lahko s pomočjo naprave dobimo natančne in zanesljive podatke, ki zajemajo tako nivo oksidativne zaščite, kot tudi nivo prisotnih reaktivnih kisikovih zvrsti.



Slika 24: Shema in slika aparature FRAS 4

Preglednica VII: tehnične karakteristike aparature FRAS 4

Fotometrični sistem	
Vir svetlobe	Žarnica z dolgo življensko dobo
Spekter	505 nm
Foto detektor	Visoka občutljivost
Princip merjenja	Beer-Lambertov zakon
Temperatura	37°C
Centrifuga	
Hitrost	6000 rpm +/- 5%
Prostor/lega	2 mikrokivete, 2 kivete
Temperatura	37°C

Pri sami uporabi aparata je potrebno upoštevati vsa navodila proizvajalca in se posluževati ustreznih garnitur pripomočkov. Še posebej pa je potrebno biti pozoren na pravilno lego kivet in mikrovet v centrifugi ter na ogrevalni čas aparature, ki znaša 10 minut (25). Ostali delovni pogoji aparata pa so navedeni v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Delovni pogoji aparature FRAS 4

Temperatura	15 ÷ 32°C (deluje), 0 ÷ 50 °C (ne deluje)
Relativna vlažnost	20 ÷ 80% (deluje), 0 ÷ 90% (ne deluje)
Nadmorska višina	< 2000m (deluje)
Okoljski koeficient	2
Zvočni pritisk	< 85 dBA

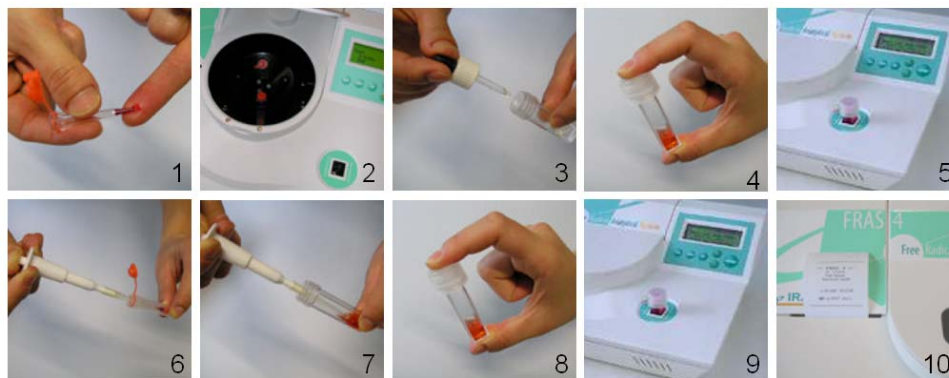
BAP test

Reagenti: Reagent R1 (NH₄SCN), Reagent R2 (FeCl₃)

Delovni pogoji: BAP test lahko izvajamo na polni krvi, plazmi ali serumu pod določenimi delovnimi pogoji: valovna dolžina znaša 505 nm, optična pot je 1 cm ter temperatura merjenja je 37°C.

Princip: Metoda temelji na sposobnosti plazemskih antioksidantov za redukcijo Fe³⁺ ionov ob prisotnosti kromogena. Vzorec plazme, ki je namenjen testiranju dodamo barvni raztopini, katero smo pridobili z mešanjem železovih ionov s posebnim kromogen substratom. Po 5 minutni inkubaciji se mešanica razbarva in intenzivnost spremembe odgovarja reducirajoči sposobnosti plazme za železove ione (25).

Postopek BAP testa:



SLIKA 25: Postopek opravljanja BAP testa na aparaturi FRAS 4

1. Odvzem polne kapilarne krvi s pomočjo igle
2. Centrifugiranje odvzetega vzorca krvi (pazimo na pravilno, uravnoteženo lego mikrovete v centrifugi)
3. Mešanje reagentov R1 (amonijev tiocianat) in R2 (FeCl_3) v kivetki, nastane kompleks in raztopina se obarva rdeče
4. Močno mešanje
5. Izvedemo prvo spektrofotometrično meritev
6. Iz mikrovete, ki smo jo centrifugirali odstranimo samo plazmo
7. $10\mu\text{L}$ plazme dodamo mešanici R1 in R2
8. Premešamo in inkubiramo 5 min pri 37°C
9. Izvedemo drugo meritev
10. Izpis rezultata

d-ROMs test

Reagenti: acetatni pufer (pH 4.8), kromogeni substrat (N,N-dietil-parafenilendiamin)

Delovni pogoji: d-ROMs test lahko izvajamo na polni krvi, na heparinizirani plazmi ali serumu pod določenimi delovnimi pogoji: valovna dolžina znaša 505 nm, optična pot je 1 cm ter temperatura merjenja je 37°C .

Princip: Temelji na pretvorbi plazemskih peroksidov v radikale, ki reagirajo s kromogenom. Kemijsko nestabilni reaktivni kisikovi metaboliti namreč v plazmi in celicah tvorijo derivate z visoko reaktivnostjo in oksidativno kapaciteto. Ti derivati nato v okviru d-ROMs testa reagirajo s kromogenom, pri čemer se tvori barvna raztopina, katere absorbanca je pri 505 nm direktno proporcionalna koncentraciji derivatov v vzrocu, seveda ob upoštevanju Beer-Lambertovega zakona (25).

Postopek d-ROMs testa:



SLIKA 26: Postopek opravljanja d-ROMs testa na aparaturi FRAS 4

1. Odvzem 20 μ L polne kapilarne krvi s pomočjo kapilare in držala
2. Odvzeto kri dodamo že pripravljenemu acetatnemu pufru s pH 4.8 (1.2 μ L)
3. Premešamo
4. Vsebino mikrovete prelijemo v kiveto
5. Dodamo kapljico kromogena
6. Premešamo
7. Centrifugiramo 1 minuto (pazimo na pravilno, uravnoteženo lego kivet v centrifugi)
8. Kiveto vstavimo v celico fotometra (inkubiramo 3 min pri 37°C)
9. Izpis rezultata

Postopek analize

Metodo d-ROMs testa smo izvajali po t.i. standardnem kinetičnem načinu. Pri tem zmešamo 10 μ L vzorca (npr. seruma) z 10 μ L kromogenega substrata (R1) in dodamo 1mL acetatnega pufra s pH 4,8 (R2). Po enakem postopku pripravimo še slepi vzorec in standard, le da namesto seruma uporabimo destilirano vodo oz. serum z znano vrednostjo absorbance. Nato vse tri raztopine (serum, slepi vzorec in standard) inkubiramo 1 minuto pri 37°C. Po koncu inkubacije odčitamo absorbance pri 505 nm takoj in po preteku 1, 2 in 3 minut. Vrednost absorbance za slepi vzorec je potrebno odšteti od vrednosti za vzorec in standard. Količino ROS (večinoma hidroperoksidi) nato izračunamo po formuli:

$CARR\ enote = Abs\ vzorca / Abs\ standarda \times\ konc.\ standarda\ (25).$

3.7.2 Spremljajoče meritve

Naše meritve so potekale vzporedno z meritvami in testiranjem splošne telesne pripravljenosti na istih preiskovancih pod vodstvom ekipe dr. Milića. Gre za obsežen test, katerega vrhunski športniki redno opravljajo, saj lahko na ta način spremljajo svojo telesno pripravljenost in sledijo napredku pri svoji aktivnosti.

Test zajema veliko število spremenljivk, s pomočjo katerih lahko dokaj natančno analiziramo telesno pripravljenost posameznega športnika. Vendar bomo tukaj omenili samo nekatere merjene spremenljivke, ki so pomembne za razumevanje naše raziskave (23, 26).

- TM - telesna masa (kg)

Za vrhunske dosežke je potrebno vzdrževati idealno telesno maso. Kriteriji za določanje le-te pa se razlikujejo že glede na vrsto športa, kaj šele v primerjavi z normalno populacijo. Tako so na splošno kolesarji dosti lažji od veslačev. Razlike v teži se pojavijo predvsem zaradi razlik v količini miškulature, maščevja in seveda telesne višine, kar je povezano z vrsto aktivnosti. Tako je majhna teža pri kolesarjih pomembna za večjo vzdržljivost pri

premagovanju dolgotrajnih razdalj, medtem ko so veslači težji predvsem zaradi višjega odstotka mišičja, ki je pomembno za proizvodnjo moči v zelo kratkem času.

- **TV - telesna višina (cm)**

Telesna višina v nasprotju z maso nima tako neposrednega vpliva na rezultate, čeprav je lahko tudi bistvena za določeno športno panogo. Vendar pa to ne velja izrecno pri kolesarjih in veslačih, kljub temu pa lahko opazimo, da so kolesarji v povprečju nižji od veslačev.

- **BMI - delež telesne maščobe (%)**

Športniki imajo običajno nižji odstotek maščobe kot običajni posamezniki, predvsem zaradi redne telesne aktivnosti. Vzdrževanje minimalnega deleža pa je zlasti pri vzdržljivostnih športnikih zelo pomembno, saj vsaka odvečna teža vpliva na premagovanje dolgotrajnega napora. Zato lahko pri vrhunskih kolesarjih opazimo minimalni delež telesne maščobe, in sicer le od štiri do največ deset odstotkov.

- **VC - vitalna kapaciteta (L)**

Vitalna pljučna kapaciteta je največja količina zraka, ki ga lahko izdihnemo po maksimalnem vdihu. Vitalna kapaciteta se razlikuje med posamezniki glede na telesne razsežnosti, spol, starost ter ukvarjanje s športom. Tako imajo športniki navadno večjo funkcionalno kapaciteto pljuč kot običajni posamezniki, kar je seveda povezano s specifičnimi vadbenimi procesi, ki krepijo prsno miškulaturo.

- **PF - maksimalni pretok zraka (L/s)**

Predstavlja maksimalni pretok zraka, ki lahko steče skozi pljuča. Parameter služi bolj za oceno stanja dihalnega sistema kot za oceno telesne pripravljenosti, saj se med različno telesno pripravljenostjo ne spreminja. V primeru večjih odstopanj v pretoku zraka pa je moč zaznati bolezenska stanja kot je npr. astma.

- **HR - frekvenca srčnega utripa (ud./min)**

Srčna frekvenca je najpogosteje merjen parameter na tovrstnih športnih testiranjih in je dober pokazatelj funkcionalne sposobnosti srčno-žilnega sistema. Športniki imajo navadno nižjo frekvenco srčnega utripa v mirovanju, saj se le-ta s treningom znižuje. Nasprotno pa maksimalna frekvenca srca ni odvisna od stopnje treninga in je individualno pogojena.

- **MV** - minutni volumen srca (l/min)

Minutni volumen srca je zmnožek srčne frekvence in utripnega volumna ter je najpomembnejši pokazatelj funkcionalne moči srčno-žilnega sistema. Zlasti pri vzdržljivostnih športnikih pride do povečanja minutnega volumna srca zlasti na račun večjega utripnega volumna, ki nastane zaradi povečanja srčne mišice tekom treninga. Tako je lahko utripni volumen vzdržljivostnih športnikov 50 – 75 odstotkov večji kot pri običajnih ljudeh.

- **VO₂ max.** - maksimalna poraba kisika (ml/min)

Gre za največji možni privzem kisika v telo, pri katerem smo sposobni izvajati obremenitev pri največji intenzivnosti. Maksimalna poraba kisika opredeljuje največjo količino kisika, katero je posameznik sposoben porabiti v eni minuti in tako predstavlja njegov energetski potencial. Vendar pa je relativna maksimalna poraba kisika - **VO₂ max. rel.** boljši pokazatelj trenutne pripravljenosti športnika, saj vrednosti niso absolutne, temveč so izražene na kilogram telesne teže (ml O₂/kg/min). Z rednim treningom lahko te vrednosti povečamo, tako lahko aerobna kapaciteta vrhunskih športnikov presega 70 ml/kg/min, medtem ko pri normalnem posamezniku znaša pol manj.

- **MM** - maksimalna moč dosežena med obremenitvijo (W)

Maksimalna moč predstavlja zadnjo stopnjo obremenitve, ki jo je merjenec še sposoben neprekinjeno premagovati. Vrednost je v neposredni povezavi z mišično maso, zato je športnik z večjo mišično maso močnejši in lahko proizvede večjo absolutno maksimalno moč. Relativna maksimalna moč - **MM rel.** pa upošteva še maso športnika (W/kg), kar je pomembno zlasti pri premagovanju višinskih razlik, zaradi dodatnega vpliva gravitacije.

- Koncentracija laktata in laktatni prag

Vrednost laktata v krvi je vzdrževana v ravnovesju, do povečanja koncentracije pa prihaja s stopnjevanjem obremenitve, ko se začne kot stranski produkt anaerobne glikolize v mišicah kopičiti mlečna kislina. Tako sčasoma proizvodnja laktata preseže njeno razgrajevanje in takrat govorimo, o t.i. laktatnem pragu. Le-ta lahko pri različnih športnikih varira in nam prikaže njihovo zmogljivost, saj naraščajoča koncentracija laktata omejuje čas vadbe.

4. REZULTATI

4.1 REZULTATI BAP TESTA

V preglednici št. IX so predstavljeni rezultati meritev BAP testa za obe skupini športnikov.

Preglednica IX: rezultati BAP testa za kolesarje in veslače

vrednosti BAP testa (μM)			
Zaporedna št.	Kolesarji	Zap. številka	Veslači
K1	2292	V17	3106
K2	2979	V18	3026
K3	//	V19	2286
K4	2134	V20	2177
K5	2214	V21	2423
K6	2748	V22	2639
K7	2864	V23	2461
K8	2297	V24	2533
K9	2477	V25	2519
K10	3080	V26	2721
K11	2466	V27	2079
K12	2813	V28	2573
K13	2058	V29	3099
K14	2409	V30	2126
K15	2499	V31	2321
K16	2229	V32	2447
K17	2341	V33	2387
K18	1913	V34	2485
K19	2837	V35	2505
K20	2329	V36	2696
K21	2223	V37	2271
K22	2827	V38	2283
		V39	2996
		V40	2249
		V41	2594
		V42	2545

*Vrednosti v označenih poljih so izvzete iz nadaljnje obdelave podatkov.

Po osnovni statistični obdelavi podatkov smo dobili naslednje vrednosti statističnih parametrov, ki so prikazani v sledeči preglednici.

Preglednica X: Vrednosti BAP testa z izračunanimi statističnimi parametri

	N	X-povpr	X _{min}	X _{max}	SO
Kolesarji	20	2478,15	1913,00	3080,00	318,97
Veslači	26	2521,04	2079,00	3106,00	280,56

*Pri čemer je N - število preiskovancev, X-povpr - povprečna vrednost, X_{min} - najmanjša vrednost, X_{max} - največja vrednost, SO - standardni odklon.

4.1.1 Skupina kolesarjev

Izmerjene vrednosti BAP testa se nanašajo na 21 kolesarjev od skupno 22 udeležencev. Vendar smo pri statistični obdelavi upoštevali le vrednosti 20-ih kolesarjev, ker vrednost za kolesarja št. 3 ni bila izmerjena, kolesar pod zaporedno številko 11 pa ni spadal v skupino vrhunskih športnikov. Povprečna vrednost BAP testa izmerjena pri kolesarjih znaša $2478,15 \pm 318,97 \mu\text{M}$, pri tem ima 12 kolesarjev (60 %) podpovprečne vrednosti pri ostalih 8 kolesarjih pa so vrednosti nadpovprečne. Najvišja izmerjena vrednost znaša $3080,00 \mu\text{M}$, medtem ko je najnižja vrednost $1913,00 \mu\text{M}$. Razlika med najvišjo in najnižjo izmerjeno vrednostjo znaša $1167,00 \mu\text{M}$, kar je relativno veliko odstopanje.

4.1.2 Skupina veslačev

Izmerjene vrednosti BAP testa se nanašajo na 26 veslačev (24 moških in 2 ženski) od skupno 42 udeležencev, vrednosti za prvih 16 veslačev namreč niso bile izmerjene. Povprečna vrednost BAP testa izmerjena pri veslačih znaša $2521,04 \pm 280,56 \mu\text{M}$. Pri natančnejšem pregledu ugotovimo, da ima 15 veslačev (57,7 %) nižje vrednosti od povprečja, 11 kolesarjev pa ima nadpovprečne vrednosti. Najvišja izmerjena vrednost je $3106,00 \mu\text{M}$ in najnižja vrednost $2079,00 \mu\text{M}$. Pri tem znaša razlika med najvišjo in najnižjo izmerjeno vrednostjo $1027,00 \mu\text{M}$, kar je prav tako veliko odstopanje.

4.1.3 Primerjava obeh skupin športnikov

Najprej poudarimo, da skupini nista številčno ekvivalentni, test smo namreč opravili pri 21 kolesarjih in 26 veslačih. Če kljub temu primerjamo rezultate obeh skupin športnikov, lahko ugotovimo, da so si vrednosti dokaj podobne. Sicer ima skupina veslačev večjo povprečno vrednost BAP testa, vendar je ta razlika minimalna, saj znaša samo $42,89 \mu\text{M}$. Prav tako imajo veslači izmerjeno višjo maksimalno vrednost, razlika z vrednostjo kolesarjev pa je zopet majhna, in sicer $26,00 \mu\text{M}$. Nekoliko večje odstopanje lahko opazimo le pri najmanjši izmerjeni vrednosti, kjer je vrednost pri kolesarjih nižja za $166,00 \mu\text{M}$ glede na vrednost pri veslačih. Drugače pa je bilo pri obeh skupinah športnikov izmerjeno večje število vrednosti, ki se gibljejo pod določeno povprečno vrednostjo.

4.1.4 Primerjava z normalno populacijo

Pri normalni populaciji, ki se s športom ukvarja le občasno, literaturni podatki navajajo povprečne vrednosti BAP testa 2200 μ M. Tako lahko ugotovimo, da imata obe skupini športnikov višjo povprečno vrednost BAP testa, in sicer kolesarji za 12,6 odstotka ter veslači za 14,6 odstotka. S podrobnejšim pregledom rezultatov vidimo, da so bile nadpovprečne vrednosti izmerjene pri 85,0 % kolesarjev ter kar pri 88,5 % veslačev.

4.2 REZULTATI D-ROMS - TESTA

Rezultati meritev d-ROMs testa za obe skupini športnikov so prikazani v spodnji preglednici, ki zajema začetne vrednosti, izmerjene v mirovanju (d-ROMs-Z), vrednosti določene po obremenitvi (d-ROMs-K) ter nastalo razliko (d-ROMs-R).

Preglednica XI: rezultati dROMs testa v CARR enotah, prikazani za kolesarje in veslače

Št.	d-ROMs-Z	d-ROMs-K	d-ROMs-R	Št.	d-ROMs-Z	d-ROMs-K	d-ROMs-R
K1	239	232	-7	V1	235	172	-63
K2	254	276	22	V2	450	325	175
K3	268	360	92	V3	64	388	327
K4	185	221	36	V4	340	261	-79
K5	199	191	-8	V5	262	293	31
K6	221	217	-4	V6	336	392	56
K7	225	218	-7	V7	333	254	-79
K8	276	275	-1	V8	469	496	27
K9	185	139	-46	V9	302	448	146
K10	247	269	22	V10	228	306	78
K11	//	//	//	V11	218	206	-12
K12	286	286	0	V12	265	240	-25
K13	186	201	15	V13	174	193	19
K14	332	319	-13	V14	212	236	24
K15	308	309	1	V15	219	223	4
K16	176	//	//	V16	218	255	37
K17	442	33	-24	V17	297	281	-16
K18	242	244	2	V18	315	265	-50
K19	212	229	17	V19	227	307	80
K20	242	246	4	V20	241	295	54
K21	204	199	-5	V21	285	299	14
K22	241	239	-1	V22	324	303	-21
				V23	245	232	-13
				V24	246	246	0
				V25	246	245	-1
				V26	240	240	0
				V27	233	236	3
				V28	209	178	-31
				V29	210	226	16
				V30	291	274	-17

Št.	d-ROMs-Z	d-ROMs-K	d-ROMs-R	Št.	d-ROMs-Z	d-ROMs-K	d-ROMs-R
				V31	282	345	63
				V32	260	246	-14
				V33	254	286	32
				V34	183	211	28
				V35	198	228	30
				V36	310	275	-35
				V37	246	254	8
				V38	247	251	4
				V39	363	361	-2
				V40	232	225	-7
				V41	333	308	-25
				V42	271	226	-45

*Vrednosti v označenih poljih so izvzete iz nadaljnje obdelave podatkov.

Po osnovni statistični obdelavi podatkov smo dobili naslednje vrednosti statističnih parametrov, ki so prikazani v spodnji preglednici.

Preglednica XII: vrednosti d-ROMs testa z izračunanimi statističnimi parametri

		X -povpr	X _{min}	X _{max}	SO
Kolesarji N = 19	d-ROMs-Z	239,58	185,00	332,00	16,69
	d-ROMs-K	245,79	139,00	360,00	17,23
	d-ROMs-R	6,26	-46,00	92,00	7,45
Veslači N = 40	d-ROMs-Z	264,97	174,00	469,00	56,83
	d-ROMs-K	270,45	172,00	496,00	63,88
	d-ROMs-R	5,47	-79,00	146,00	42,68

*Pri čemer je N - število preiskovancev, X-povpr – povprečna vrednost, X_{min} – najmanjša vrednost, X_{max} – največja vrednost, SO – standardni odklon.

4.2.1 Skupina kolesarjev

Izmerjene vrednosti d-ROMs testa se nanašajo na 19 moških kolesarjev od skupno 22 udeležencev, izvzeti so rezultati treh kolesarjev. Kot smo že prej omenili, kolesar št. 11 ni ustrezal profilu vrhunskega športnika. Pri kolesarju št. 16, zaradi zdravstvenih težav končna vrednost d-ROMs testa ni bila izmerjena. Rezultate pri kolesarju št. 17 pa smo zavrgli, zaradi prenizkih vrednosti, ki so verjetno posledica napake pri delu.

Povprečna začetna vrednost d-ROMs testa izmerjena pri kolesarjih znaša $239,58 \pm 16,69$ CARR enot, pri tem ima 10 kolesarjev (52,6 %) nadpovprečne vrednosti, pri ostalih 9 kolesarjih pa so vrednosti nižje od izmerjenega povprečja. Maksimalna začetna vrednost znaša 332 CARR enot, minimalna začetna vrednost pa je 185 CARR enot, pri čemer znaša razlika 147 CARR enot.

Vrednosti po obremenitvi so v povprečju narasle na $245,79 \pm 17,23$ CARR enot, sicer pa ima večina kolesarjev (57,9 %) izmerjene nižje vrednosti od povprečja. Najvišja končna

izmerjena vrednost znaša 360 CARR enot, medtem ko je najnižja vrednost samo 139 CARR enot. Razlika med najvišjo in najnižjo izmerjeno vrednostjo po obremenitvi je torej kar 221 CARR enot.

Če podrobneje pogledamo še spremembe med začetnimi in končnimi vrednostmi, ugotovimo da je povprečna razlika $6,26 \pm 7,45$ CARR enot. Nato predpostavimo, da sprememba, ki je manjša od 10 CARR enot ni realna sprememba, temveč je povezana z notranjimi omejitvami metode (1). Pri tem lahko ugotovimo, da pri večini ni bilo sprememb – 11 kolesarjev (55 %), do povečanja je prišlo pri 6 kolesarjih (30 %) ter do zmanjšanja pri 2 kolesarjih (15 %). Največja sprememba med začetno in končno vrednostjo znaša 92 CARR enot, medtem ko je najnižja sprememba negativna – 46 CARR enot.

4.2.2 Skupina veslačev

Izmerjene vrednosti d-ROMs testa se nanašajo na 40 veslačev (37 moških in 3 ženske) od skupno 42 udeležencev, rezultati drugega in tretjega veslača so zavrženi zaradi prenizkih vrednosti, ki so verjetno posledica napake pri delu.

Povprečna začetna vrednost d-ROMs testa izmerjena pri veslačih znaša $264,97 \pm 56,83$ CARR enot, pri tem ima 22 veslačev (55 %) podpovprečne vrednosti, pri ostalih 18 veslačih pa so vrednosti višje od povprečja. Maksimalna začetna vrednost znaša 469 CARR enot, minimalna začetna vrednost pa je 174 CARR enot, pri čemer je razlika opazna, 295 CARR enot.

Vrednosti po obremenitvi so v povprečju narasle na $270,45 \pm 63,88$ CARR enot, sicer pa ima večina veslačev (60 %) izmerjene nižje končne vrednosti od določenega povprečja. Najvišja končna izmerjena vrednost znaša 496 CARR enot, medtem ko je najnižja vrednost le 172 CARR enot. Razlika med najvišjo in najnižjo izmerjeno vrednostjo po obremenitvi je torej kar 324 CARR enot.

Če analiziramo še spremembe med začetnimi in končnimi vrednostmi ugotovimo, da je povprečna razlika $5,47 \pm 42,68$ CARR enot. Nato zopet predpostavimo, da sprememba, ki je manjša od 10 CARR enot ni realna sprememba, temveč je povezana z notranjimi omejitvami metode (1). Pri tem ugotovimo, da je največkrat prišlo do povečanja vrednosti

- 16 veslačev (40 %), sledi zmanjšanje vrednosti pri 15 veslačih (37,5 %), opazne spremembe pa ni bilo zaznati pri 9 veslačih (22,5 %). Največja sprememba med začetno in končno vrednostjo znaša 146 CARR enot, medtem ko je najnižja sprememba negativna – 79 CARR enot.

4.2.3 Primerjava obeh skupin športnikov

Skupini športnikov nista številčno enakovredni, saj smo test opravili pri 22 kolesarjih ter pri skoraj enkrat večji skupini veslačev. Če vseeno primerjamo rezultate obeh skupin športnikov, lahko ugotovimo, da so vrednosti pri veslačih v povprečju višje kot pri kolesarjih. Tako imajo kolesarji za 25,39 CARR enot nižjo začetno povprečno vrednost ter za 24,66 CARR enot nižjo končno povprečno vrednost.

Najnižja izmerjena vrednost je na začetku nižja pri veslačih, in sicer 174 CARR enot ter 185 CARR enot pri kolesarjih. Po koncu obremenitve pa imajo nižjo vrednost kolesarji, saj znaša samo 139 CARR enot.

Večje odstopanje opazimo pri maksimalno izmerjenih vrednostih, kjer so tako začetne kot končne vrednosti višje pri skupini veslačev. Tako znaša na začetku maksimalna vrednost pri kolesarjih 332 CARR enot in pri veslačih 469 CARR enot, na koncu pa 360 CARR pri kolesarjih ter kar 496 CARR enot pri veslačih.

Za povprečno spremembo med začetno in končno vrednostjo d-ROMs lahko ugotovimo, da je pri obeh skupinah majhna. Če podrobneje primerjamo rezultate obeh skupin ugotovimo, da pri večini kolesarjev (55 %) ni bilo znatne spremembe, medtem ko je pri največjem deležu veslačev (40 %) prišlo do povečanja končne vrednosti. Nadalje je bilo pri kolesarjih opazno povečanje pri 30 odstotkih ter zmanjšanje pri 15 odstotkih udeležencev. Pri skupini veslačev je dokaj opazno tudi zmanjšanje vrednosti pri 37,5 % udeležencev, opazne spremembe pa ni bilo pri 22,5 % veslačev.

4.2.4 Primerjava z normalno populacijo

Pri normalni populaciji, ki se vsakodnevno ne ukvarja s športom se normalne vrednosti d-ROMs testa gibljejo v območju 250 – 300 CARR enot. V primerjavi z rezultati naših športnikov lahko ugotovimo, da imajo kolesarji celo nekoliko nižje začetne vrednosti

(239,58 CARR), pri veslačih pa so vrednosti v mirovanju znotraj območja normalne populacije (264,97 CARR).

Večje odstopanje pa lahko opazimo pri meritvah opravljenih po obremenitvi, kjer ima normalna populacija vrednosti večje od 350 CARR enot, torej pride do bistvenega povečanja d-ROMs vrednosti po naporu. Pri naših meritvah pa tega ne moremo povsem trditi, saj je povečanje vrednosti po naporu minimalno. Tako povprečna vrednost pri kolesarjih s 239,58 CARR enot ostaja še izven območja normalne populacije v mirovanju. Pri skupini veslačev pa znaša povprečje po naporu 270,45 CARR enot, kar je še vedno dosti nižje od zvišanja, ki nastane po obremenitvi normalne populacije.

4.3 REZULTATI VZPOREDNIH MERITEV

Kot smo že prej omenili so s testiranjem ugotavljali tudi splošno telesno pripravljenost športnikov. V spodnjih preglednicah so prikazani nekateri merjeni parametri, ki so bili na razpolago tudi pri naši raziskavi.

Preglednica XIII: Vrednosti spremljajočih meritev za kolesarje

Zap. številka	Starost (let)	Čas (min)	TM (kg)	TV (cm)	VO2 max.rel. (ml/kg/min)	BMI (%)	MM (watt)	MM rel. (W/kg)
K1	29	16	70,6	180	67,7	6,6	450	6,37
K2	30	16	74,7	182	70,4	6,4	450	6,02
K3	21	18	82	190	69,1	8,8	490	5,98
K4	19	15,5	72	178	63,7	6	440	6,11
K5	22	16	67,5	182	72,5	5,8	450	6,67
K6	26	16	63,5	174	67,5	3,8	450	7,09
K7	26	18	69,6	181	73,1	4,8	490	7,04
K8	19	14,5	64,7	179	70,2	5	420	6,49
K9	24	17,5	69,3	181	76,9	3,1	480	6,93
K10	23	16	65,3	173	71,7	6,9	450	6,89
K11	15	8,5	61,3	167	50,3	22,6	280	4,57
K12	17	10,5	62,9	170	60,3	6,6	340	5,41
K13	18	14	66,6	183	68,9	5,1	410	6,16
K14	23	15	58,5	178	77,3	2,9	430	7,35
K15	19	18	69,4	188	69,5	3,9	490	7,06
K16	19	13	65,2	175	62,5	5,8	390	5,98
K17	18	12	63,5	174	65,8	5,8	370	5,83
K18	18	18	65,9	178	79,4	9,1	490	7,44
K19	20	15,5	71,8	175	76,9	3,1	440	6,13
K20	19	17	83,1	185	66,7	9,5	470	5,66
K21	18	13	66,7	177	68,1	6,4	390	5,85
K22	21	15	66,1	178	72,6	4,8	430	6,51

*Vrednosti v označenih poljih so izvzete iz nadaljnje obdelave podatkov.

Z osnovno statistično obdelavo podatkov smo dobili naslednje vrednosti statističnih parametrov.

Preglednica XIV: Prikaz statističnih parametrov pri dodatnih meritvah kolesarjev

Statistični parametri	Starost (leta)	Čas (min)	TM (kg)	TV (cm)	VO2 max.rel. (ml/kg/min)	BMI (%)	MM (watt)	MM rel. (W/kg)
N	21	21	21	21	21	21	21	21
Minimalna vrednost	17	10,5	58,5	170	60,3	2,9	340	5,40
Maksimalna vrednost	30	18	83,1	190	79,4	9,5	490	7,44
Povprečna vrednost	21,38	15,45	68,52	179,10	70,04	5,72	439,05	6,43
Standardni odklon	3,67	2,02	5,78	4,81	4,87	1,83	41,46	0,58

Testiranje splošne telesne pripravljenosti je potekalo na manjši skupini športnikov, katero je sestavljalo 21 kolesarjev ter 1 kolesarka, ki pa ni spadala v ekipo vrhunskih športnikov, zato njenih rezultatov pri nadaljnji obdelavi nismo upoštevali. Kolesarji so bili na splošno mlajši športniki, s povprečno starostjo okoli 21 let, med njimi je bilo tudi nekaj mladoletnih oseb ter nekaj izkušenih starejših kolegov. Vrednosti povprečne teže ter indeksa telesne mase nam ponazarjajo, da so bili kolesarji zelo vitki in skoraj popolnoma brez maščobnih zalog. Povprečna BMI vrednost je znašala samo 5,72 odstotkov, kar je resnično malo tudi za kolesarje. Obremenitev je pri kolesarjih trajala različno dolgo, kar je sovpadalo z njihovo telesno pripravljenostjo, enako velja tudi za doseženo moč obremenitve. Tako je obremenitev povprečno trajala dobrih 15 minut, pri tem pa so v povprečju dosegli moč skoraj 440 vatov (W). Visoka relativna vrednost VO₂ max, ki znaša v povprečju 70 ml/kg/min pa odraža status vzdržljivostnih športnikov.

Preglednica XV: Vrednosti spremljajočih meritev za veslače

Zap. številka	Starost (let)	Čas (min)	TM (kg)	TV (cm)	VO ₂ max.rel. (ml/kg/min)	BMI (%)
V1	17	9	89	186	60,2	10,1
V2	18	9	85	179	69,6	13
V3	16	9	85	191	65,2	5,2
V4	18	9	88,9	186	57,3	13,1
V5	25	9	82,3	186	72,9	10,6
V6	23	9	71,9	180	83,2	10,7
V7	20	9	73,4	183	77,4	8,5
V8	25	9	89,4	188	66,7	12,2
V9	17	9	73	182	67,0	10,9
V10	19	9	70,6	181	64,5	6,9
V11	18	9	88,3	184	79,4	12,7
V12	17	9	68,5	173	55,3	19,8
V13	17	9	71,6	180	75,8	10,1
V14	16	9	86,9	187	67,5	11,8
V15	16	9	72,2	175	55,6	11,10
V16	17	9	82	189	56,1	8,4
V17	18	9	69,6	175	58,5	23,6
V18	16	9	89,1	172	58,2	19,9
V19	17	9	78,2	182	65,3	12,2
V20	18	9	72,2	175	55,6	11,10
V21	17	9	77,7	190	63,3	5,1

Zap. številka	Starost (let)	Čas (min)	TM (kg)	TV (cm)	VO ₂ max.rel. (ml/kg/min)	BMI (%)
V22	19	9	71	173	57,1	24
V23	22	9	92,9	193	69,3	10,6
V24	17	9	77,5	185	52,9	10,9
V25	16	9	81	192	60,5	8,1
V26	17	9	74	189	59,3	4,9
V27	21	9	80,5	187	67,7	7,7
V28	21	9	80,5	187	67,7	7,7
V29	18	9	73	182	67,0	10,9
V30	21	9	78	183	64,5	9,60
V31	19	9	85,6	182	69,5	13,5
V32	24	9	85,1	186	71,2	11,9
V33	27	9	82,6	189	80,9	10,4
V34	26	9	89,1	186	69,3	11,3
V35	32	9	83,5	187	71,0	10,6
V36	21	9	69,9	181	76,5	8,2
V37	17	9	90,7	192	65,0	8,2
V38	16	9	85	186	63,8	11,2
V39	18	9	98,5	197	63,8	11,6
V40	17	9	79	191	72,5	7,2
V41	17	9	80,8	183	73,0	9,6
V42	18	9	96,6	195	63,5	18,9

Po osnovni statistični obdelavi podatkov lahko prikažemo spodnje statistične parametre.

Preglednica XVI: Prikaz statističnih parametrov pri dodatnih meritvah veslačev

Statistični parametri	Starost (leta)	Čas (min)	TM (kg)	TV (cm)	VO ₂ max.rel. (ml/kg/min)	BMI (%)
N	42	42	42	42	42	42
Minimalna vrednost	16	9,0	68,5	172	52,9	4,9
Maksimalna vrednost	32	9	98,5	197	83,2	24
Povprečna vrednost	19,26	9,00	80,94	184,45	66,2	11,28
Standardni odklon	3,55	0,00	7,75	5,99	7,4	4,28

Skupina veslačev je bila številčnejšo močnejša, saj je testiranje opravljalo 42 vrhunskih športnikov, ki so bili povprečno stari 19 let. V primerjavi s kolesarji so bili veslači težji, nekoliko višji ter tudi z večjim deležem telesne maščobe. Povprečni BMI indeks je bil tako skoraj enkrat večji kot pri kolesarjih, kar pa je v primerjavi z normalno populacijo še vedno dokaj nizko. Teža veslačev je bila v povprečju za 12 kg večja od kolesarjev, vendar predvsem na račun povečane mišične mase, ki je potrebna za razvoj moči pri kratkotrajni aktivnosti. Tako je bilo trajanje obremenitve krajše kot pri kolesarjih ter enako dolgo za vse veslače. Obremenitev je trajala 9 minut, v tem času pa so veslači navidezno prevozili različno dolge razdalje, za katere pa žal nimamo podatkov. Glede relativnih vrednosti VO₂ max imajo veslači nekoliko nižjo povprečno vrednost kot kolesarji, vendar pa je bila pri veslačih izmerjena maksimalna vrednost kar 83 ml/kg/min, kar je res izjemno.

4.4 ZDRUŽITEV REZULTATOV OBEH SKUPIN

Pri nadaljnji statistični obdelavi podatkov, smo zaradi majhnega števila preiskovancev ter izmerjenih podobnih vrednosti pri kolesarjih in veslačih, rezultate obeh skupin športnikov združili.

Preglednica XVII: Združen prikaz statističnih parametrov za športnike

Statistični parametri	BAP (μM)	d-ROMs (CARR)			Starost (let)	Čas (min)	TM (kg)	TV (cm)	VO ₂ max.rel. (ml/kg/min)	BMI (%)	MM (watt)	MM rel. (W/kg)
		začetek	konec	razlika								
N	46	59	59	59	63	63	63	63	63	63	21	21
Minimalna vrednost	1913	174	139	-79	16	9	58,50	170	52,9	2,9	340	5,41
Maksimalna vrednost	3106	469	496	146	32	18	98,50	197	83,2	24	490	7,44
Povprečna vrednost	2502,39	256,80	262,51	5,73	19,97	11,15	76,80	182,67	67,48	9,43	439,05	6,47
Standardni odklon	305,13	53,51	62,23	39,14	3,72	3,22	9,24	6,17	6,90	4,49	40,46	3,09

Združeno skupino preiskovancev lahko predstavimo kot skupino vrhunskih športnikov, ki so povprečno stari okoli 20 let, merijo preko 180 cm, njihova povprečna telesna teža pa znaša približno 77 kg. Telesno sestavo športnikov odraža tudi nizek indeks telesne maščobe, ki je v povprečju nižji od desetih odstotkov. Da gre za vrhunske športnike, dobre telesne pripravljenosti pa ponazarja visoka relativna vrednost VO₂ max., ki povprečno znaša preko 67 odstotkov. Vsi športniki so bili na testiranju izpostavljeni visoko intenzivni fizični obremenitvi, ki je povprečno trajala 11 minut in je predstavljala osnovo za naše meritve.

4.4.1 Vrednosti BAP testa

Test smo skupno opravili pri 46 športnikih. Povprečna vrednost BAP testa je znašala $2502,39 \pm 305,13 \mu\text{M}$. Pri natančnejšem pregledu rezultatov lahko opazimo, da ima dobra polovica športnikov (54,3 %) vrednosti nekoliko pod povprečjem, pri ostalih merjencih pa so vrednosti nadpovprečne, nekatere med njimi celo visoko nad povprečjem. Tako maksimalno izmerjena vrednost BAP testa znaša kar 3106 μM , medtem ko je bila izmerjena minimalna vrednost 1913 μM , kar je za 1193 enot manj in predstavlja veliko odstopanje.

4.4.2 Vrednosti d-ROMs testa

Test smo izvedli pri nekoliko večji skupini športnikov, katero je sestavljalo 59 preiskovancev. Pred obremenitvijo je povprečna začetna vrednost d-ROMs testa znašala $256,80 \pm 53,51$ CARR enot, pri tem so bile pri več kot polovici športnikov (61 %) izmerjene vrednosti nižje od povprečja. Maksimalna začetna vrednost znaša 469 CARR enot ter minimalna začetna vrednost 174 CARR enot, pri čemer je velika razlika 295 CARR enot.

Vrednosti po obremenitvi so dosegle povprečno vrednost $262,51 \pm 62,23$ CARR enot, ponovno pa ima večina športnikov (59,3 %) izmerjene nižje vrednosti od povprečja. Najvišja končna izmerjena vrednost znaša 496 CARR enot, medtem ko je najnižja vrednost samo 139 CARR enot, kar je še manj kot pri začetnih meritvah. Razlika med najvišjo in najnižjo izmerjeno vrednostjo po obremenitvi je torej kar 357 CARR enot.

Če podrobneje pogledamo še spremembe med začetnimi in končnimi vrednostmi d-ROMs testa, ugotovimo da je povprečna razlika $5,73 \pm 39,14$ CARR enot. Kot že poprej predpostavimo, da sprememba, ki je manjša od 10 CARR enot ni realna sprememba, temveč je povezana z notranjimi omejitvami metode (1). Pri tem ugotovimo, da se je pri večjem delu športnikov vrednost po obremenitvi povečala – 22 športnikov (37,3 %), sledi delež kjer ni bilo opaznih sprememb – 20 športnikov, pri ostalih 17 športnikih pa je končna vrednost celo upadla. Največja sprememba med izmerjeno začetno in končno vrednostjo znaša 146 CARR enot, medtem ko je najnižja zabeležena sprememba negativna – 79 CARR enot.

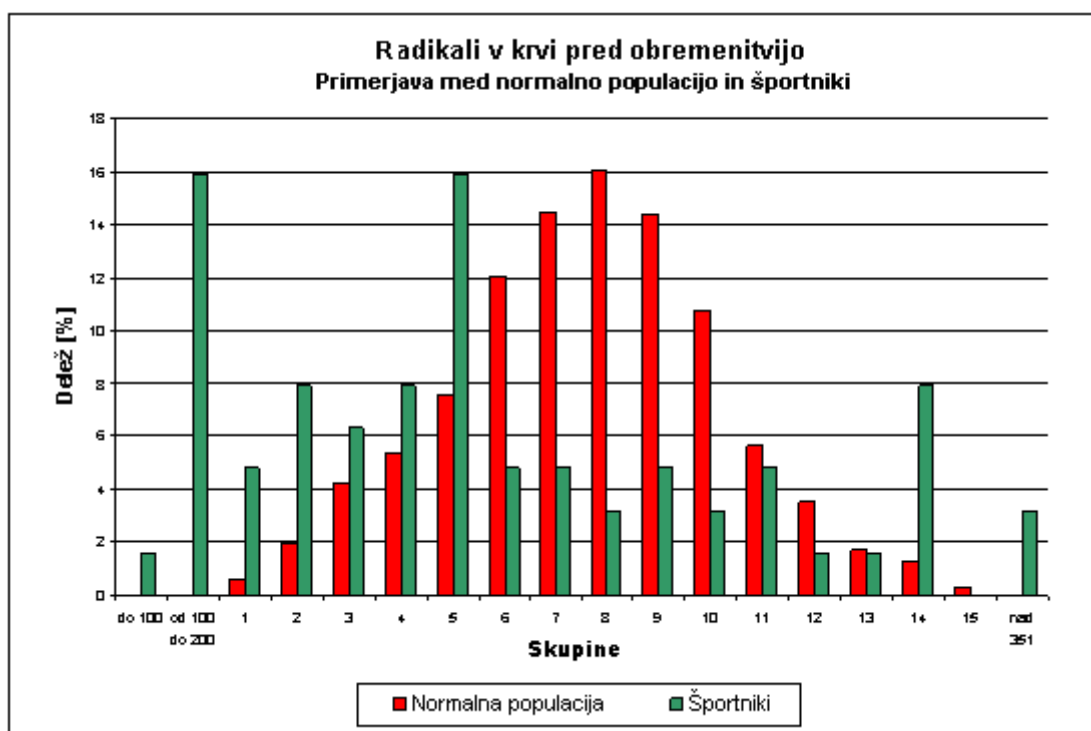
4.4.3 Primerjava rezultatov športnikov z normalno populacijo

Primerjavo smo naredili na podlagi pogostosti dobljenih rezultatov pri športnikih, ki se uvrščajo med vrednosti d-ROMs testa, izmerjene pri 5000 udeležencih.

Preglednica XVIII: Razvrstitev vrednosti d-ROMs po pogostosti pojavljanja pri normalni populaciji in športnikih

	Normalna populacija			Športniki	
	Skupine	Frekvenca	Odstotek	Frekvenca	Odstotek
do 100		0	0,0	1	1,6
od 100 do 200		0	0,0	10	15,9
1	200-210	29	0,6	3	4,8
2	211-220	89	2,0	5	7,9

	Normalna populacija			Športniki	
	Skupine	Frekvenca	Odstotek	Frekvenca	Odstotek
3	221-230	193	4,2	4	6,3
4	231-240	244	5,4	5	7,9
5	241-250	342	7,5	10	15,9
6	251-260	547	12,0	3	4,8
7	261-270	659	14,5	3	4,8
8	271-280	731	16,1	2	3,2
9	281-290	654	14,4	3	4,8
10	291-300	491	10,8	2	3,2
11	300-310	256	5,6	3	4,8
12	311-320	162	3,6	1	1,6
13	321-330	80	1,8	1	1,6
14	331-340	57	1,3	5	7,9
15	341-350	13	0,3	0	0



SLIKA 27: Grafični prikaz primerjave vrednosti ROS med športniki in normalno populacijo

Najvišji delež normalne populacije se nahaja v skupini 8 (271 - 280). Povprečna vrednost števila radikalov pri športnikih pa je 256,80. Če pogledamo graf na sliki 27 vidimo, da se precejšnji delež športnikov nahaja v skupini od 100 do 200. Nasprotno pa lahko pri normalni populaciji opazimo, da se nihče od merjencev ni uvrstil v skupino s tako nizkimi vrednostmi, kljub temu, da je bilo število merjencev 5000. Zaključimo lahko z ugotovitvijo, da so naše izmerjene vrednosti pri športnikih v povprečju nižje kot pri normalni populaciji.

Poudariti moramo, da so bile d-ROMs vrednosti normalne populacije izmerjene samo v normalnem stanju brez obremenitve, zato omenjena primerjava ne vključuje vrednosti športnikov po obremenitvi. Vendar pa literaturni podatki navajajo povprečno d-ROMs vrednost normalne populacije po obremenitvi več kot 350 CARR enot. Tako lahko ponovno ugotovimo, znatno nižjo vrednost pri športnikih, ki v našem primeru znaša 262,51 istoimenskih enot.

4.5 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Z namenom ugotovitve morebitnih povezav med merjenimi spremenljivkami, smo vrednosti naših meritev BAP in d-ROMs testa primerjali tudi z nekaterimi rezultati spremljajočih meritev, ki so pri športnikih potekale vzporedno. Zanimala nas je predvsem povezava med vrednostmi BAP testa in d-ROMs testa, ter povezava vrednosti obeh testov z ostalimi, antropometričnimi in fiziološkimi parametri. Pri tem smo kot statistično metodo za opis korelacije med različnimi spremenljivkami uporabili Pearsonov koeficient. Koeficient korelacije po Pearsonu (R) lahko zavzame vrednosti med -1 in +1. Pri tem vrednost -1 predstavlja maksimalno negativno korelacijo, nasprotno velja za +1, vrednost 0 pa nam pove, da med spremenljivkama ni povezave. Tako lahko sklepamo, kako močna je povezava med statističnimi enotami.

Vse rezultate smo statistično obdelali s pomočjo računalniškega programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) pri 0,05 stopnji tveganja. Rezultati obdelave so podani v obliki statistične značilnosti – signifikance in predstavljajo izračunano verjetnost dane korelacije pri 0,05 stopnji tveganja. Vrednost signifikance (p), ki je manjša od stopnje tveganja 0,05, vodi k sprejetju osnovne domneve, vrednost večja od 0,05 pa k potrditvi ničelne domneve. Le-ta pa je tista, ki si jo v danem primeru želimo, saj pomeni, da povezava med določenima spremenljivkama obstaja.

4.5.1 Korelacija med BAP in d-ROMs testom

Preglednica XIX: Povezava med vrednostmi BAP testa in d-ROMs testom

Spremenljivka	Vrednosti BAP testa Korelacija (Pearsonov koeficient, p)
ROMz	0,294 (p<0.05)
ROMk	nz
Δ ROM	nz

*ROMz (začetna vrednost d-ROMs testa), ROMk (končna vrednost d-ROMs testa), Δ ROM (razlika med začetno in končno vrednostjo d-ROMs testa); Statistično značilna povezava: p<0.05; Statistično neznačilna povezava: nz

V preglednici št. 19 lahko vidimo primerjavo vrednosti BAP z vsemi tremi vrednostmi d-ROMs testa. Očitno je, da gre za statistično pomembno povezavo le v primeru primerjave vrednosti BAP z začetno vrednostjo d-ROMs testa. Pearsonov koeficient znaša 0,320, kar predstavlja šibko do srednje močno premo-sorazmerno povezanost spremenljivk. Iz navedenega bi lahko sklepali, da pri merjenjih z višjo vrednostjo BAP testa obstaja majhna verjetnost za večjo začetno d-ROMs vrednost (ali zaradi povečanih vrednosti ROS v organizmu je aktivnost obrambnega sistema antioksidantov večja).

4.5.2 Korelacija med BAP testom in ostalimi parametri

Preglednica XX: Povezava vrednosti BAP testa z ostalimi parametri

Spremenljivka	Vrednosti BAP testa Korelacija (Pearsonov koeficient, p)
Starost (leta)	nz
Maksimalna poraba kisika (ml/kg/min)	nz
Telesna višina (cm)	nz
Telesna masa (kg)	nz
Obremenitev (W)	nz
Delež maščob v telesu (%)	nz

* Statistično značilna povezava: p<0.05; Statistično neznačilna povezava: nz

Statistična obdelava in primerjava vrednosti BAP testa z ostalimi parametri ne kaže nobenih statistično pomembnih povezav.

4.5.3 Korelacija med d-ROMs testom in ostalimi parametri

Preglednica XXI: Korelacija začetnih vrednosti d-ROMs testa (ROMz) z ostalimi parametri

Spremenljivka	Vrednosti d-ROMs testa (ROMz) Korelacija (Pearsonov koeficient, p)
Starost (leta)	nz
Maksimalna poraba kisika (ml/kg/min)	nz
Telesna višina (cm)	nz
Telesna masa (kg)	nz
Obremenitev (W)	nz
Delež maščob v telesu (%)	0,323 (p<0.01)

*ROMz (začetna vrednost d-ROMs testa); Statistično značilna povezava: $p < 0.05$; Statistično neznačilna povezava: nz

Povezava med začetnimi vrednosti d-ROMs testa in antropometričnimi parametri kot so starost, telesna višina in teža ter fiziološkima parametroma (obremenitev in poraba kisika) ni statistično značilna.

Vendar pa pri primerjavi začetnih vrednosti d-ROMs testa z deležem maščob v telesu znaša Pearsonov koeficient 0,323, kar priča o šibki do srednje močni premo-sorazmerni povezavi. Kar ponazarja, da lahko pri merjenjih z večjim deležem maščob v telesu, pričakujemo večjo vsebnost radikalov v krvi že pred obremenitvijo.

Preglednica XXII: Korelacija končnih vrednosti d-ROMs testa (ROMk) z ostalimi parametri

Spremenljivka	Vrednosti d-ROMs testa (ROMk) Korelacija (Pearsonov koeficient, p)
Starost (leta)	nz
Maksimalna poraba kisika (ml/kg/min)	nz
Telesna višina (cm)	nz
Telesna masa (kg)	nz
Obremenitev (W)	nz
Delež maščob v telesu (%)	nz

*ROMk (končna vrednost d-ROMs testa); Statistično značilna povezava: $p < 0.05$; Statistično neznačilna povezava: nz

Končne vrednosti d-ROMs testa ne korelirajo z nobeno od antropometričnih in fizioloških spremenljivk.

Preglednica XXIII: Korelacija razlike med začetno in končno vrednostjo d-ROMs testa (Δ ROM) z ostalimi parametri

Spremenljivka	Vrednosti d-ROMs testa (Δ ROM) Korelacija (Pearsonov koeficient, p)
Starost (leta)	nz
Maksimalna poraba kisika (ml/kg/min)	nz
Telesna višina (cm)	nz
Telesna masa (kg)	nz
Obremenitev (W)	nz
Delež maščob v telesu (%)	nz

* Δ ROM (razlika med začetno in končno vrednostjo d-ROMs testa); Statistično značilna povezava: $p < 0.05$; Statistično neznačilna povezava: nz

Statistična analiza razlike med začetno in končno vrednostjo d-ROMs testa ni prikazala korelacije z nobeno spremenljivko. Zato ugotavljamo, da spremenljivke med seboj niso povezane.

5. RAZPRAVA

Športna vadba predstavlja izjemen pomen za naše telo, saj pripomore k izboljšanju psihofizičnih sposobnosti, in tako pripomore k ohranjanju zdravja celotnega organizma. Med telesno aktivnostjo se namreč v organizmu pripeti vrsta pomembnih sprememb, ki vključujejo praktično vse organske sisteme ter zahtevajo usklajeno delovanje živčevja in hormonov. Zato se že ob sami misli na vadbo okrepijo živčne pobude možganov, ki pospešijo izločanje stresnih hormonov in tako okrepijo odziv telesa na začetek aktivnosti. V aktivnih mišicah pride do močno povečanega pretoka krvi, za kar je v prvi vrsti pomembno povečano delo srca. Povečan pretok krvi v aktivnih mišicah pa pomeni tudi večji dotok hranil in kisika, kar je nujno za zadostitev zvečanih energijskih potreb med aktivnostjo.

Vendar pa so pozitivni učinki vadbe vidni šele po daljšem obdobju redne telesne aktivnosti, ki lahko privede do pomembnih prilagoditev, katere okrepijo celotno telo. V nasprotnem primeru pa lahko prihaja tudi do mnogih škodljivih in nepredvidenih posledic telesne vadbe. Tako lahko neredna ali prenaporna telesna vadba privede do izčrpanosti organizma, dehidracije, prekomerne utrujenosti in do različnih športnih poškodb. Vzroke za te negativne učinke vadbe pa lahko prav tako poiščemo v spremenjeni presnovi organizma med telesno aktivnostjo. Kot vemo je presnova med aktivnostjo sorazmerno povečana z energijskimi potrebami vadbe, skladno s tem pa je povečan tudi vnos kisika v telo. Pri tem pa ima kisik poleg neobhodne vloge v procesu dihanja tudi dodatno lastnost, ki ima zlasti pri povečani koncentraciji izjemno škodljive učinke za naš organizem. Kisik namreč tekom svoje presnove v organizmu povzroča nastanek visoko reaktivnih kisikovih intermediatov, ki lahko neposredno poškodujejo celice. Takšna nenadzorovana kemična aktivnost kisika ne nastaja samo tekom intenzivne in neprilagojene fizične aktivnosti, temveč tudi zaradi povečane onesnaženosti okolja, izpostavljenosti določenim kemikalijam ali pri nekaterih boleznih. Posledica povečane prisotnosti takšnih reaktivnih kisikovih vrst v organizmu pa je patološko stanje, ki ga imenujemo oksidativni stres.

Velik problem oksidativnega stresa predstavlja njegovo določanje v organizmu, saj stanje povečane prisotnosti ROS ne izkazuje navzven nobenih posebnih simptomov. Tako lahko opazimo samo posledice prisotnosti oksidativnega stresa, ki se pokažejo s pojavom različnih obolenj. Vsekakor bi bilo bolj smiselno, če bi z ustreznim ugotavljanjem

oksidativnega stanja organizma, pravočasno ukrepali in bolezni preprečili. Pri tem bi za merjenje oksidativnega stresa prav lahko uporabili metodo FRAS, katere smo se poslužili tudi pri naši raziskavi. Zlasti bi bilo pomembno ugotavljanje oksidativnega stresa pri rizičnih osebah, za katere obstaja velika verjetnost, da so prekomerno izpostavljeni delovanju radikalov. Morda bi mednje lahko vključili tudi aktivne športnike, pri katerih zaradi izjemnih obremenitev tudi lahko prihaja do povečanega oksidativnega stresa. Vendar je pri tem potrebno upoštevati njihov prilagojen organski sistem, ki se je postopno razvijal tekom redne telesne aktivnosti in prav gotovo izkazuje drugačne obrambne sposobnosti pred radikali kot pri običajnih posameznikih.

Prav s tem namenom smo se lotili našega raziskovalnega dela, kjer smo želeli ugotoviti, v kolikšni meri je oksidativni stres vključen v presnovo vrhunskih športnikov. Različni literaturni viri navajajo povečano nastajanje ROS med intenzivno vadbo. Največji delež naj bi prispevali mitohondriji, predvsem zaradi izgub v elektronskem transportu celičnega dihanja, med povečanim vnosom kisika tekom aktivnosti. Pri tem, k večanju koncentracije ROS prispeva predvsem superoksidni anion, posledično pa se poveča tudi nivo vodikovega peroksida. Pomemben del k večanju oksidativnega stresa med vadbo pa prispevajo tudi drugi mehanizmi. Zlasti pomemben je encimski sistem ksantinske oksidaze, ki se vključi med anaerobno vadbo zaradi povečanega nastajanja hipoksantina. Preko pretvorbe le-tega v ksantin in sečno kislino se namreč poveča tudi tvorba superoksidnega aniona, tudi več ur po končani vadbi. Ne smemo pa pozabiti niti na mikro-poškodbe, do katerih prav tako prihaja zlasti med intenzivno aktivnostjo. Tukaj pa se preko procesa regeneracije vključijo polimorfni levkociti, ki za odstranjevanje odmrlega tkiva uporabljajo zelo učinkovite kisikove radikale. Iz navedenega je torej razvidno, da lahko zlasti intenzivna telesna aktivnost bistveno pripomore k nastanku oksidativnega stresa.

Vendar pa moramo pri tem upoštevati še dodaten učinek vadbe, ki zajema prilagoditev številnih obrambnih sistemov, sposobnih učinkovite obrambe pred napadom ROS. Seveda je potrebno poudariti, da se antioksidativni sistemi uspešno prilagodijo le pri redni in dolgotrajni vadbi, kar zagotovo lahko pričakujemo pri aktivnih športnikih. Tako so številne raziskave potrdile učinek redne vadbe na porast encimske in ne-encimske antioksidativne zaščite. Hkrati pa so ugotovili tudi samo adaptacijo mišičnih celic, ki se sproži preko sproščanja posebnih zaščitnih proteinov HSP, kot odziv na nastajanje radikalov. Vsekakor v organizmu obstajajo tudi drugi mehanizmi adaptacije, ki nam niso še docela poznani.

Tovrstno raziskovanje namreč ni ravno enostavno, kar potrjujejo maloštevilne raziskave na športni populaciji, katerih izsledki si pogosto nasprotujejo.

Tako smo se tudi naše raziskave lotili dokaj velikopotezno, misleč da nam bo z uporabo enostavne metode uspelo vsaj približno ugotoviti, kakšno je trenutno oksidativno stanje v organizmu vrhunškega športnika. Posebnost naše raziskave je predvsem v tem, da smo želeli upoštevati oba faktorja, tako pro- kot anti-oksidativnega, ki skupaj odražata dejanski oksidativni status organizma. Zanimalo nas je, kakšna je koncentracija prisotnih radikalov v telesu, ki je vsakodnevno izpostavljeno visokim naporom? Kako se to neposredno odraža na sposobnosti obrambnega sistema antioksidantov? Nadalje, kako učinkovit in odziven je takšen obrambni sistem? In nenazadnje, v kolikšni meri se lahko poveča koncentracija ROS, če jo izmerimo neposredno po visoki obremenitvi športnikov?

Vsekakor zanimiv nabor vprašanj, katerih morebitne odgovore pa nismo dobili povsem enostavno.

Pri izbiri športne populacije smo imeli srečo, saj smo pri naši raziskavi testirali skupini vrhunskih kolesarjev in veslačev, ki so hkrati opravljali preizkus telesne pripravljenosti, za oceno njihovega napredka ter nadaljnjih smernic pri povečanju športnih dosežkov. Zato lahko rečemo, da so bili športniki dobro pripravljeni tako na testiranje, kot na sodelovanje pri naši raziskavi. Nekoliko manj ugodno pa je bilo število naših testirancev, vsaj kar se tiče ustrezne statistične obdelave, katere zaključke bi lahko pri večji populaciji podali širše. Tako je naš vzorec športne populacije sestavljala skupina 22-ih oz. 21-ih moških kolesarjev, saj smo edino kolesarko izločili iz naše raziskave, ker se ni uvrščala v skupino vrhunskih kolesarjev. Druga skupina je bila številčnejša in jo je sestavljalo 42 vrhunskih veslačev, med njimi so bile tudi 3 ženske članice. Skupno število naših preiskovancev je bilo torej 63. Športniki so bili na splošno zdravi, približne starosti 20 let, s tipičnimi morfološkimi lastnostmi, ki so značilne za posamezno skupino športnikov. Čeprav zaradi različne vrste vadbe obstajajo tudi druge razlike med skupinama, smo se pri naši raziskavi poskušali osredotočiti na skupino vrhunskih športnikov, ki se kot celota razlikuje predvsem v primerjavi z normalno populacijo.

Pri tem smo se poslužili ene izmed novejših metod za določanje oksidativnega stresa, ki pa v osnovi temelji na dobro znanem in vsesplošno uporabnem spektrofotometru. Gre za aparat FRAS 4, ki hkrati združuje spektrofotometer in centrifugo ter je prirejen izvajanju

dveh metod za določanje oksidativnega stresa. Tako je aparaturna namenjena merjenju BAP testa, kot pokazatelja naravne aktivnosti antioksidantov ter d-ROMs testa, za določanje količine reaktivnih kisikovih vrst. Na ta način nam uspe določiti bolj celovito stanje organizma, saj z uporabo obeh metod, hkrati zajamemo tako oksidativni kot antioksidativni status. BAP metoda temelji na naravni sposobnosti plazemskih antioksidantov za redukcijo Fe^{3+} , kar zaznamo spektrofotometrično zaradi spremembe barve kromogena. Druga metoda d-ROMs test pa je osnovana na pretvorbi plazemskih peroksidov v radikale, ki reagirajo s kromogenom, kar prav tako zaznamo spektrofotometrično. Obe metodi sta popolnoma avtomatizirani in vsebujeta tudi ves potreben pribor in reagente, tako da lahko preko določenih korakov posamezne metode zelo hitro in enostavno pridemo do rezultatov.

Za določanje oksidativnega stresa pri obeh metodah smo uporabili polno kapilarno kri, ki smo jo odvzeli iz ušesne mečice športnikov. Pri tem je potrebno poudariti, da takšno vzorčenje ni povsem enostavno in poleg natančnosti zahteva tudi nekaj prakse. Tako smo imeli pri nekaterih športnikih tudi nekaj težav pri odvzemu krvi, saj kri zaradi prerazporeditve v aktivnih mišicah ni vedno zlahka pritekla. Odvzem vzorca je pri vsakem športniku potekal trikrat, in sicer smo v stanju mirovanja odvzeli vzorec za BAP test ter za začetno vrednost d-ROMs testa. Tretji vzorec pa smo odvzeli takoj po končani obremenitvi, še za potrebe določanja končne vrednosti d-ROMs testa. Obremenitev športnikov je potekala različno glede na skupino kolesarjev ali veslačev, in sicer v skladu z običajnim potekom treninga posamezne skupine. Vendar pa je bila jakost obremenitve dosti večja kot pri običajnem treningu, saj so športniki hkrati opravljali test splošne telesne pripravljenosti.

Glede dobljenih rezultatov naših meritev bi se težko opredelili. Morda lahko rečemo, da so bili rezultati raznoliki, nekateri so bili v skladu z našimi pričakovanji, medtem ko so nas drugi kar malo presenetili, zaslediti pa je tudi izstopajoče vrednosti, ki so verjetno posledica eksperimentalnih napak.

Rezultati meritev BAP testa so upravičili naša predvidevanja, da je pri športnikih moč zaslediti visoko aktivni biološki sistem antioksidantov. Drugače pa test žal ni bil opravljen na celotni skupini športnikov, temveč le pri 42 preiskovancih, in sicer pri 20 kolesarjih in 26 veslačih. Na začetku namreč dobavitelju naše merilne naprave ni uspelo dostaviti ustreznega reagenta za tovrstno izvedbo metode. Zato pri 16 veslačih, ki so bili prisotni na začetku naše raziskave nismo opravili BAP testa. Kljub temu menimo, da so dobljeni

rezultati relevantni in odražajo lastnosti celotne skupine preiskovancev. Prav tako ni bilo moč zaznati posebnega odstopanja pri meritvah kolesarjev in veslačev. Izmerjena povprečna vrednost BAP testa je bila dokaj visoka, saj je znašala 2502,39 μM . Ta vrednost se glede na referenčno lestvico rezultatov BAP testa uvršča v skupino, ki dosega optimalne vrednosti (2200 – 4000 μM). Pri tem je potrebno poudariti, da je bilo celo pri dobri polovici športnikov moč zaslediti tudi vrednosti nad izmerjenim povprečjem. Dobili smo celo nekaj zelo visokih rezultatov, tako je najvišja vrednost znašala kar 3106 μM . To je predstavljalo veliko razliko v primerjavi z vrednostjo 1913 μM , ki je najnižje izmerjeni rezultat BAP testa. Vzrokov za tako nizko vrednost nismo ugotovili, preiskovanec je bil na splošno zdrav, ne moremo pa izključiti morebitne pretreniranosti ali katerih drugih vplivov. Vendar pa so bile nizke vrednosti naših meritev prej izjema kot pravilo, saj smo zabeležili le 5 vrednosti, ki so bile nižje od 2200 μM . To pa je tudi vrednost, ki jo lahko izmerimo pri običajnih posameznikih, ki se vsakodnevno ne ukvarjajo s športom. Naše ugotovitve so tudi v skladu z raziskavo Petersena in sodelavcev o povečanju koncentracije antioksidantov (predvsem vitamina C) po obremenitvi športnikov, medtem ko pri kontrolni skupini to ni bilo izraženo, kar nakazuje določeno stopnjo adaptacije (22). Zaključimo lahko, da izmerjene vrednosti BAP testa sovpadajo z večino literaturnih navedb o visoko aktivnem antioksidatnem obrambnem sistemu.

Glede rezultatov d-ROMs testa pa lahko rečemo, da so bili le-ti mnogo bolj raznovrstni in ne povsem v skladu z našimi pričakovanji. Pri testu so sodelovali skoraj vsi športniki z nekaterimi izjemami, tako da je skupno število preiskovancev znašalo 59 športnikov, od tega je bilo 19 kolesarjev in 40 veslačev. Na splošno lahko rečemo, da so bili rezultati dokaj nizki, pri večini so bile vrednosti nižje od 250 CARR enot, kar je nižje od povprečja normalne populacije. Zlasti nekoliko nižje vrednosti smo opazili pri kolesarjih. Sicer je povprečna vrednost d-ROMs testa na začetku znašala 256,80 CARR, vendar je bilo kar pri 61 odstotkih športnikov moč zabeležiti nižje vrednosti. Literaturni podatki sicer navajajo, da lahko nižje vrednosti d-ROMs testa izmerimo ravno pri športnikih ter npr. pri osebah, ki pretirano uživajo antioksidante (1). Če podrobneje pogledamo še nekatere dodatno izstopajoče vrednosti ugotovimo, da je znašala maksimalna vrednost 469 CARR enot. Pri tem je zanimiv podatek, da je bil športnik, na katerega se nanaša meritev zelo bolan in se je udeležil testiranja kljub temu, da je ravno preboleval gripo. Kot vemo prihaja tekom različnih infekcij prav tako, do povišane prisotnosti ROS. Glede vzroka za najnižjo

izmerjeno vrednost, ki znaša samo 174 CARR enot pa težko podamo komentar. Po navedbah proizvajalca naprave FRAS naj bi bile vrednosti pod 200 CARR enot nerealne in naj bi bile posledica napak pri delu. Vendar pa moramo poudariti, da smo pri nekaterih nizkih rezultatih meritve ponovili, pa se vrednost pri tem ni bistveno spremenila.

Še zlasti pa so nas presenetili rezultati meritev d-ROMs testa po obremenitvi. Glede na visoko intenzivnost napora, ki je v nekaterih primerih povzročila skoraj onesveščanje športnikov ter glede na literaturne podatke o številnih mehanizmih nastajanja ROS med vadbo, smo pričakovali opazno povečanje vrednosti d-ROMs. Zato smo bili sprva kar malo razočarani, saj so se vrednosti po obremenitvi le minimalno spremenile. V nekaterih primerih sploh ni prišlo do sprememb, včasih pa smo celo zabeležili nižjo vrednost d-ROMs, kot smo jo izmerili pred obremenitvijo. Seveda smo najprej poskušali najti morebitne napake, ki bi lahko izvirale iz eksperimentalnega dela. Tako bi lahko rekli, da smo "validirali" vsak korak meritve, od jemanja vzorca krvi, do izjemno natančne izvedbe merjenja na napravi FRAS, v skladu z navodili. Za dodatna pojasnila pa smo zaprosili tudi proizvajalca. Nekatero izstopajočo meritve smo tudi ponovili, kar pa običajno ni spremenilo rezultata. Zato menimo, da so rezultati realni, saj smo v veliki meri izključili možnost napak, ki bi lahko bile posledice našega dela. Kljub temu so vrednosti v povprečju dosegle 262,51 CARR enot, vendar je bilo ponovno pri večjem delu športnikov (59, 3%) moč opaziti še nižje vrednosti. Najvišja končna vrednost je bila 496 CARR enot in je pripadala istemu merjencu kot prej, zato lahko glede vzrokov navedemo enake ugotovitve. Zanimivo pa je, da je izmerjena najnižja vrednost po obremenitvi še nižja kot pred obremenitvijo in znaša samo 139 CARR enot, čemur bi lahko pripisali možnost eksperimentalne napake. Na splošno so se vrednosti po obremenitvi zelo malo spremenile, čeprav so v povprečju narasle za 5,73 enot. Po navedbah proizvajalca naprave FRAS gre v tem primeru za neopazno spremembo, le-ta naj bi po priporočilih znašala vsaj 10 enot. Pri upoštevanju te predpostavke lahko ugotovimo, da se je vrednost po obremenitvi povečala pri 37,3 % športnikov, pri 33,9 % športnikov ni bilo opaznih sprememb, pri ostalih pa je končna vrednost celo upadla.

Za primerjavo pa lahko navedemo podatek o povečanju vrednosti d-ROMs testa po obremenitvi normalne populacije, ki znaša preko 350 CARR enot (1).

Vzrokov za izmerjene rezultate d-ROMs testa ne moremo povsem razložiti. Res je, da intenzivna vadba poveča nastanek ROS v organizmu, kar pa se v našem primeru ni povsem jasno izrazilo. Teoretično obstaja možnost, da stopnja fizične obremenitve ni bila dovolj intenzivna, kar pa se zdi malo verjetno. Vzrok bi lahko bil tudi v večji obrambni sposobnosti antioksidantov, kar so potrdili tudi naši rezultati BAP testa. Iz česar bi lahko sklepali, da so nizke vrednosti d-ROMs testa posledica visoko učinkovite obrambe. Vendar pa so to samo predvidevanja, kajti teh zaključkov ne moremo neposredno pridobiti iz naših rezultatov, zlasti zaradi premajhnega števila merjencev. Prav tako pa bi bile potrebne še natančnejše analize športnikov, ki bi vključevale večjo frekvenco vzorčenja, kakor tudi dodatne faktorje kot je npr. zdravstveno stanje, pogostost treninga, način prehranjevanja, uživanje antioksidantov in drugo. Čeprav se pri večini raziskav oksidativni stres po vadbi poveča, obstajajo tudi takšne, ki tega ne potrjujejo neposredno. Tako npr. Kelle s sodelavci pri obremenitvi športnikov ni opazil sprememb v aktivnosti antioksidantnih encimov (SOD in CAT), kakor tudi ne znatne lipidne peroksidacije (24). Do nasprotnih ugotovitev pa je prišla Chevionova skupina, kjer so bili po obremenitvi telesno pripravljenih vojakov povečani številni pokazatelji oksidativnega stresa (13).

Vsekakor smo dodatne zaključke želeli pridobiti tudi z ustrezno statistično analizo naših podatkov ter podatkov, pridobljenih na sočasnih meritvah testiranja telesne pripravljenosti športnikov (starost, maksimalna poraba kisika, telesna višina, telesna masa, obremenitev, delež maščob v telesu). Pri tem smo s pomočjo uporabe Pearsonovega koeficienta ugotavljali morebitno povezavo med danimi spremenljivkami. Žal statistična obdelava razen dveh primerov ni prikazala posebnih korelacij, ki bi bile statistično pomembne. Omenimo lahko le šibko do srednje močno povezavo med vrednostmi BAP testa in začetnimi vrednostmi d-ROMs testa, ki ponazarja verjetnost, da imajo športniki z večjo vrednostjo BAP tudi večjo začetno vrednost d-ROMs. To omogoča razlago, da je zaradi povečane vsebnosti ROS tudi obrambni sistem bolj učinkovit. Prav tako je bilo moč opaziti šibko do srednje močno povezavo med začetnimi vrednostmi d-ROMs testa ter vsebnostjo maščob v telesu. Ta povezava tudi sovpada z literaturnimi podatki o večji prisotnosti radikalov pri posameznikih z večjim deležem telesne maščobe. Med merjenimi spremenljivkami dodatnih meritev je potrebno omeniti še maksimalno porabo kisika, ki je prav gotovo povezana s stanjem oksidativnega stresa. Zanimivo je, da pri naši raziskavi nismo zasledili pomembne povezave glede porabe kisika med vadbo. Morda bi se izkazalo

drugače, če bi namesto vrednosti VO_2 max za primerjavo vzeli kumulativne količine kisika (VO_2 cumm). Tako bi namreč dobili pravo sliko o velikosti oksidativnih procesov, ki nastajajo tekom intenzivne vadbe. Ocenjujemo, da bi povprečne vrednosti pri veslačih znašale od 45 do 55 litrov ter pri kolesarjih približno 65 litrov. Višje vrednosti pri kolesarjih so odraz dolgotrajnejše aktivnosti, zato bi pri njih potemtakem lahko pričakovali tudi večji odklon v smeri produkcije ROS. Česar pa prav tako nismo zasledili pri naših meritvah, saj se vrednosti med obema skupinama športnikov niso bistveno razlikovale.

Kljub vsemu lahko zaključimo, da smo z uporabljenima metodama BAP in d-ROMs testa pridobili splošno oceno o zapletenem oksidativnem dogajanju v organizmu aktivnih športnikov. Kar lahko še zlasti rečemo glede na majhno število preiskovancev in omejena sredstva, ki smo jih imeli na voljo. Od tukaj naprej pa bi morale slediti še dodatne meritve, s pomočjo katerih bi lahko oksidativni stres še natančneje opredelili. Predvsem bi bilo potrebno športnike spremljati skozi daljše obdobje, najbolje tekom celotne sezone. Meritve pa bi morali izvajati v različnih časovnih presledkih, tako med vadbo kot tudi v mirovanju. Tako bi namreč dobili natančnejši podatek o stanju njihovega bazalnega nivoja oksidativnega stresa, kakor tudi o nastajanju reaktivnih kisikovih vrst med samo vadbo. Seveda pa bi morali v raziskavo hkrati vključiti še druge pomembne faktorje, ki lahko posredno ali neposredno vplivajo na oksidativno stanje organizma. Prav gotovo bi tako pridobili zanimiv nabor rezultatov, s pomočjo katerih bi lahko z večjo gotovostjo opredelili nivo oksidativnega stresa pri vrhunskih športnikih.

6. SKLEPI

Glede stanja oksidativnega stresa pri vrhunskih športnikih, ki so bili neposredno izpostavljeni intenzivni fizični obremenitvi, lahko na podlagi rezultatov, katere smo pridobili s pomočjo meritev BAP in d-ROMs testa zaključimo naslednje:

- Predstavljena raziskava opredeljuje oksidativno stanje vrhunskih športnikov preko specifične primerjave vrednosti BAP in d-ROMs testa
- Vrhunski športniki imajo visoko odziven in učinkovit antioksidativni obrambni sistem, kar potrjujejo rezultati BAP testa, katerih vrednosti so znatno nad povprečjem značilnim za običajno populacijo.
- Prisotnost reaktivnih kisikovih vrst v organizmu vrhunskih športnikov ne odstopa oziroma je celo nižja od povprečnih vrednosti normalne populacije. To so potrdili rezultati naših meritev d-ROMs testa, ki so v skladu s primerljivimi literaturnimi viri.
- Koncentracija reaktivnih kisikovih vrst se neposredno po obremenitvi vrhunskih športnikov znatno ne spremeni. Te vrednosti pa se v primerjavi z obremenitvijo običajnih posameznikov bistveno razlikujejo. Pri tem rezultati naših meritev niso povsem skladni z nekaterimi izsledki podobnih raziskav.
- Celokupni nivo oksidativnega stresa pri vrhunskih športnikih je nizek, kar lahko zaključimo na podlagi visokih vrednosti BAP testa, ki potrjujejo dober antioksidativni odziv ter dodatno na podlagi relativno nizkih vrednosti d-ROMs testa, ki odražajo nivo reaktivnih kisikovih vrst v krvi.

Tako lahko na podlagi rezultatov naših meritev ter znanih literaturnih navedb podamo splošno oceno o dobri prilagojenosti športnikov na oksidativni stres, ki nastaja kot posledica intenzivne fizične aktivnosti. Za natančnejšo opredelitev oksidativnih procesov v organizmu vrhunškega športnika pa bi bile potrebne dodatne raziskave.

LITERATURA:

1. Eugenio Luigi Iorio, MD, PhD.; FRAS 4 and global assessment of oxidative stress; Presentation of FRAS4 system, Diacron International s.a.s, Grosseto , Italy.10.11.2003
2. Šuput D, Kamarič L. Izvor in reakcije radikalov. In: Ribarič S eds. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9th ed. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2001: 15-24.
3. Pečar S. Antioksidanti. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, Prehranska dopolnila – zdravila ali hrana, Podiplomsko strokovno izobraževanje 2001/2002: 97-10497-104
4. Kreft S, Pečar S. Vloga radikalov pri obolenjih. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani Farm vestn 1998; 49: 469-481
5. Šuput D. Reaktivne kisikove spojine v patofizioloških procesih. In: Ribarič S eds Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9th ed. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2001: 25-36.
6. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 4rd ed. Oxford University Press, Oxford, 2007
7. Giordano FJ: Oxygen, oxidative stress, hypoxia and hearth failure. The Journal of Clinical Investigation 2005; 115 (3): 500-508
8. Viitala P, Newhouse IJ, LaVoie N, Gottardo C: The effects of antioxidant vitamin supplementation on resistance exercise induced lipid peroxidation in trained and untrained participants. Lipids in Health and Disease 2004; 3 (14)
9. Vollaard NBJ., Shearman JP., Cooper CE: Exercise-Induced Oxidative Stress: Myths, Realities and Physiological Relevance. Sports Med 2005; 36 (12): 1045-1062
10. Ji LL, Leichtweis S.: Exercise and oxidative stress: sources of free radicals an their impact on antioxidant systems. Age 1997; 20: 91-106
11. Cooper CE., Vollaard NBJ., Choueiri T, Wilson MT: Exercise, free radicals and oxidative stress. Biochemical Society Transactions 2002; 30 (2): 280-285
12. McArdle A, Jackson MJ: Exercise, oxidative stress and ageing. Department of Medicine, University of Liverpool, UK, J. Anat. 2000; 197:539-541
13. Sonnenborn JS, Barbee SA: Exercise-induced stress response as an adaptive tolerance strategy. Environmental Health Perspectives 1998; 106 (1): 325-330
14. McArdle A, Patwell D, Vasilaki A, Griffiths RD, Jackson J: Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280:621-627

15. Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardó FV, Sastre J, Ji LL, Viña: Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 2005; 567 (1): 113-120
16. Kostaropoulos IA, Nikolaidis MG, Jamurtas AZ et al: Comparison of the blood redox status between long distance and short distance runners. *Physiol Res*. 2006; 55: 611-616
17. Ho YS, Magnenat JL, Gargano M, Cao J: The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106 (5): 1219-1228
18. Tonkonogi M, Walsh B, Svensson M, Sahlin K: Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress. *Journal of Physiology* 2000; 528 (2):379-388
19. Chance B, Gao G: *In vivo* detection of radicals in biological reactions. *Environmental health perspectives* 1994; 102 (10): 29-32
20. Eugenio Luigi Iorio, MD, PhD: BAP test and global assessment of oxidative stress, Diacron International s.a.s, Grosseto, Italy, April 2004
21. Eugenio Luigi Iorio, MD, PhD: dROMs test and global assessment of oxidative stress in human and animals according to the panel of Diacron International, Diacron International s.a.s, Grosseto, Italy, January 2005
22. Nilsen Thor S., Nolte Volker: Basic Rowing Physiology, The FISA Coaching Development Course 1988
23. Žele Luka: Značilnosti izmerjenih fizioloških parametrov kolesarjev na modificiranem kolesarskem testu, diplomska naloga, Fakulteta za šport, Ljubljana 2003
24. John Forester: The Physiology and Technique of Hard Riding, Excerpted from *Effective Cycling*, 6th ed, 1993
25. FRAS4 User manual Software version 2.0, Health and Diagnostics Limited, 26.7.2004
26. Zupet Petra: Značilnosti nekaterih parametrov srčno-žilnega in dihalnega sistema veslačev z različnim stažem treninga, diplomska naloga, Fakulteta za šport, Ljubljana 2005
27. Petersen EW, Ostrowski K, Ibfelt T et al: Effect of vitamin supplementation on cytokine response and muscle damage after strenuous exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 208: 1570-1575
28. Kelle M, Diken H, Sermet A., Atmaca M., Kocyigit Y.: Changes in blood antioxidant status and lipid peroxidation following distance running. *Tr. J. of Medical Sciences* 1998; 28: 643-647
29. Chevion S, Moran DS, Heled Y et al.: Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *PNAS* 2003; 100 (9): 5119-5123