



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

МОГУЋНОСТИ МОДУЛАЦИЈЕ ФИЗИЧКОМ АКТИВНОШЋУ ИНДУКОВАНОГ ИНФЛАМАТОРНОГ ОДГОВОРА И ОКСИДАТИВНОГ СТРЕСА У ТОКУ ПРОГРАМИРАНОГ ТРЕНАЖНОГ ПРОЦЕСА: ОД ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ МОДЕЛА ДО ПРИМЕЊЕНИХ ИСТРАЖИВАЊА

Кључне речи :

физичка активност, телесни састав, адолесценти, максимална потрошња кисеоника, оксидативни стрес, инфламација, масне киселине, пацови.

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Превенција и третман инфламације и нарушавања редокс равнотеже насталих услед физичке активности код деце и адолесцената спортиста представља врло комплексан проблем недовољно истражен у физиологији напора, посебно због све ранијег укључивања у свакодневне, професионалне тренажне активности. Циљ истраживања је евалуација промена морфофункционалних карактеристика, медијатора инфламације и параметара редокс равнотеже изазваних једнократним вежбањем, шестомесечним тренажним програмом и дугогодишњим бављењем спортом, као и утицаја суплементације омега-3 масним киселинама на све испитиване параметре. Први део истраживања односиће се на постављање експерименталног модела за одређивање системских и локалних ефеката програмираног физичког оптерећења на оксидациони стрес и инфламаторни одговор, док ће други део истраживања бити спроведен на младим спортистима старости од 12 до 19 година, док ће контролну групу чинити деца узраста који одговара групи испитиваних спортиста, која немају редовну физичку активност. Испитаници ће бити подвргнути процени телесног састава методом биоимпеданце, мерењу максималне потрошње кисеоника директном методом приликом максималног теста оптерећења на покретној траци, и узимању узорака крви у базалним условима и након физичког оптерећења ради одређивања вредности биохемијских параметара повезаних са инфламацијом и оксидативним стресом (Арахидонске киселине, Еикосапентаеноичне киселине, Дихомогаме линоленичне киселине, IL-6 и TNF- α , супероксид анјон радикала (O₂⁻), водоник пероксида (H₂O₂), азот монооксида (NO), индекса липидне пероксидације (TBARS), активности супероксид дисмутазе (SOD), каталазе (CAT), глутатион пероксидазе (GSHPx) и глутатион редуктазе (GR)). Указивање на могуће начине модулације инфламаторног одговора и редокс равнотеже применом програмиране физичке активности, одговарајуће исхране и суплементације имало би значај не само за управљање тренажним процесом спортиста већ и за превенцију и терапију многих обољења.



Циљеви истраживања

- 1) Поставити експериментални модел за одређивање системских и локалних ефеката програмираног физичког оптерећења на оксидациони стрес и инфламаторни одговор, као и модулације овог одговора применом одговарајуће суплементације
- 2) Утврдити разлике у морфофункционалним карактеристикама, вредностима проинфламаторних цитокина, појединих масних киселина фосфолипида плазме и чиниоца редокс равнотеже између адолесцената спортиста и неспортиста, као и између самих спортиста у зависности од старости и дужине тренажног стажа.
- 2) Утврдити утицај једнократног вежбања на медијаторе инфламације и параметре редокс равнотеже, и пронаћи корелацију између ових параметара и морфофункционалних карактеристика испитаника.
- 3) Евалуирати утицај шестомесечног тренажног процеса на све горе поменуте параметре.
- 4) Евалуирати утицај суплементације омега-3 масним киселинама на све горе поменуте параметре.
- 5) Пронаћи корелације између свих горе поменутих параметара.

Актуелност истраживања

Бављење спортом представља процес који се састоји од континуираног излагања спортисте разним врстама стреса са циљем да се изазову структурне и функционалне адаптације и изграђује будуће тренажно стање спортисте. Понављана, интензивна или неправилно дозирана физичка активност може довести до метаболички индукованог мишићног оштећења са последичним развојем запаљенске реакције и повећане продукције реактивних кисеоничних и азотних врста (RONS). Оксидативни стрес и њиме индукована оксидативна оштећења и инфламација играју примарну или секундарну улогу у развоју више од 100 акутних или хроничних обољења (1), а најчешћи негативни ефекти у спорту огледају се у синдрому претренираности који се карактерише слабљењем имуне функције и повећањем умора што доводи до погоршања спортског извођења (2). Стога се посебна пажња најновијих истраживања усмерава на проналажење и разумевање механизма и могућности контроле и модулације инфламаторног одговора и редокс статуса спортиста.

Иако интересовање за истраживања повезаности физичке активности и оксидативног стреса траје већ 30 година, и објављено је више стотина оригиналних радова на ову тему, ова тема је и даље актуелна и постоји читав низ непознаница и недоумица, нарочито када се ради о популацији деце и адолесцената. У раним радовима вежбањем изазвана повећана RONS продукција сматрана је штетном по физиолошке функције, док се данас интензивно истражује улога повећане RONS продукције у вежбањем-изазваним адаптацијама. Наиме, сматра се да основни принцип тренинга, стрес-адаптација, важи и за догађаје изазване оксидативним стресом, односно да понављајуће излагање спортисте повећаној RONS продукцији представља стимулус који изазива усходну регулацију антиоксидативног заштитног система (3). Колики ће оксидативни стрес изазвати појединачни тренинг зависи од низа фактора, између осталог од типа, интензитета и трајања физичке активности, од пола, узраста, навика у исхрани, узимања лекова и суплемената, здравља, нивоа тренираности испитаника... (4).

Данас је познато да инфламаторни одговор преставља кључну фигуру у развоју гојазности, односно липотоксичности, при чему је масна ћелија адипозног ткива примарно место генерисања медијатора запаљенске реакције и последичног ширења тихе инфламације (silent inflammation) на друге органе (срце, мишићи, панкреас) (5). Праћење и евентуална модулација тихе инфламације, евидентно је отежана због непостојања јасних клиничких



знакова. Показано је да однос две масне киселине у крви, арахидонске киселине и еикосапентаеноичне киселине (АА/ЕРА) представља врло селективан маркер тихе инфламације (6). Арахидонска киселина и еикосапентаеноична киселина представљају значајне прекурсоре метаболизма еикосаноида, што индиректно утиче на имуне функције (7) и хомеостазу хемостазе са последичним системским ефектима. Сматра се да правилно дозиране омега-3 масне киселине, еикосапентаеноична (ЕРА, 20:5n-3) и докозахексенска киселина (ДНА, 22:6n-3), могу бити значајан чинилац анти-инфламаторног одговора, смањујући продукцију арахидонске киселине као прекурсора проинфламаторних еикосаноида (8, 9).

Локални одговор на инфекцију или ткивно оштећење укључује продукцију цитокина, ослобођених на месту инфламације. У околностима физичког оптерећења ИЛ-6 обезбеђује антиинфламаторно окружење индукцијом продукције ИЛ-1ra и ИЛ-10, као и инхибицијом продукције TNF- α (10). Показано је да се концентрација ИЛ-6 повећава експоненцијално са прогресијом оптерећења, при чему је значајно повезана са интензитетом, трајањем, масом ангажованих мишића, ако и аеробним капацитетом спортиста (11).

Разумевање и правилан третман инфламаторног одговора насталог физичком активношћу код деце и адолесцената спортиста представља врло комплексан проблем недовољно истражен у физиологији напора, посебно због све ранијег укључивања у свакодневне, професионалне тренажне активности. Резултати наше студије требало би да укажу на значај испитиваних биохемијских параметара као дијагностичко-прогностичких маркера стања кардиоваскуларног и имуног система, као и индикатора програмирања правилног тренинга, исхране и суплементације спортиста.

Предмет и опис истраживања

Предмет нашег истраживања је евалуација промена инфламаторних медијатора и редокс равнотеже изазваних: 1) програмираним физичким оптерећењем на експерименталним животињама, 2) једнократним вежбањем, 3) шестомесечним програмираним тренажним процесом и 4) дугогодишњим бављењем спортом, 5) суплементацијом омега-3 масним киселинама.

Ово истраживање је мултидисциплинарно и обухвата опште прихваћене методе биохемије, физиологије и спортске антропометрије и ергометрије.

Први део истраживања би био спроведен на експерименталним животињама, које би се излагале програмираном физичком оптерећењу трчањем на покретној траци. У току физичког оптерећења би им били одређивани параметри функције кардиоваскуларног система (ЕКГ, максимална потрошња кисеоника), а параметри оксидационог стреса и инфламације би били одређивани пре и након физичког оптерећења.

Други део истраживања, који се односи на утврђивање разлика у параметрима од интереса (морфофункционалним карактеристикама, параметрима редокс равнотеже, инфламаторним медијаторима) између испитаника који се баве и не баве спортом, дизајниран је као студија пресека, док су делови истраживања који се односе на утврђивање утицаја једнократне физичке активности, шестомесечног програмираног тренажног процеса и суплементације омега-3 масним киселинама на поменуте параметре експерименталног карактера.

Испитаници у студији били би млади спортисти, фудбалери и рукометаши, старости од 12 до 19 година, а контролну групу чинила би деца, узраста који одговара групи испитиваних спортиста, која немају редовну физичку активност. За све испитанике важали би следећи услови за учешће у студији: 1) морају бити апсолутно здрави без обољења у анамнези, 2) без посебних навика у исхрани, 3) без употребе било каквих лекова и суплемената, 4) да су непушачи.

Испитаници би, након стандардног спортско-медицинског прегледа, били подвргнути морфофункционалном тестирању (анализи телесног састава и мерењу потрошње кисеоника) и



узимању узорка крви пре и након теста оптерећења. Из крви би се издвојили еритроцити и у њима одредила активност ензима заштите од оксидационих оштећења (супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GSHPx) и глутатион редуктаза (GR)), а из плазме изоловали параметри оксидативног стреса и ендотелне функције (супероксид анјон радикал (O_2^-), водоник пероксид (H_2O_2), азот моноксид (NO), индекс липидне пероксидације (TBARS)). Из узорка плазме изоловале би се и масне киселине фосфолипида (Арахидонска киселина, Еикосапентаеноична киселина,) и цитокини (IL-6 и TNF- α).

Анализа телесног састава била би вршена методом биоимпеданце, док би се потрошња кисеоника мерила директним методом на покретној траци током континуираног теста прогресивно растућег оптерећења. Нивои параметара оксидативног стреса одређивали би се спектрофотометријски након припреме узорка по признатим методама (12-19). IL-6, TNF- α , и ниво арахидонске киселине одређивали ни се уз помоћ комерцијалних ELISA есеј китова.

За статистичку анализу података биће коришћен *SPSS 15.0 for Windows*. За опис параметара од значаја, у зависности од њихове природе, биће коришћене методе дескриптивне статистике, графичко и табеларно приказивање. У зависности од расподеле, за анализу података користићемо одговарајуће параметријске или непараметријске тестове: за тестирање значајности статистичке разлике између група - т-тест или *Mann Whitney* тест, за тестирање разлике између два мерења - упарени т-тест или *Willcoxon*-ов тест, за упоређивање аритметичке средине неког обележја више од две популације - ANOVA или *Kruskal Wallis* тест, за анализу међусобне корелације параметара - методе линеарне регресије и корелације, а за мерење јачине линеарне везе између обележја користиће се *Pearson*-ов или *Spearman*-ов коефицијент корелације.

Очекивани резултати студије огледају се у променама у активности антиоксидантних ензима у крви младих спортиста изазване како акутном излагању интензивној физичкој активности, тако и вишемесечном и вишегодишњем тренажном процесу. Очекују се резултати који ће показати постојање промена у нивоу појединих масних киселина фосфолипида плазме младих спортиста након специфичног тренажног програма, које би индуковале анти инфламаторни одговор активацијом антиинфламаторних еикосаноида са даљим потенцијалним ефектом на морфолошке промене, функционалне способности и редокс равнотежу. Очекују се резултати који ће показати позитивне ефекте полинезасићених масних киселина у смислу смањења нивоа инфламаторног одговора индукованог напором, а самим тим и позитивне ефекте на нивоу развоја морфолошких, функционалних способности и контролу редокс равнотеже младих спортиста.

Значај истраживања

Комплексност и мултидисциплинарност наше студије сврстава је међу најамбициозније студије из области физиологије напора и спортске медицине икад рађених у Србији.

Резултати наше студије требало би да укажу на значај испитиваних биохемијских параметара као дијагностичко-прогностичких маркера стања кардиоваскуларног и имуног система, као и индикатора програмирања правилног тренинга, исхране и суплементације спортиста.

Указивање на могуће начине модулације инфламаторног одговора и редокс равнотеже применом програмиране физичке активности имало би значај не само за управљање тренажним процесом спортиста већ и за превенцију и терапију многих обољења.

Временски оквир

У студији ће учествовати више студената треће године докторских академских студија, који ће у оквиру овог пројекта радити на својим докторским дисертацијама, тако да се извођење студије планира у периоду од наредне 2 године.



Литература

- 1) Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52(4): 601-23.
- 2) Finaud J, Lac, G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 2006; 36(4): 327-358.
- 3) Radak Z, Chung HY, Koltai E, Taylor AW, and Goto S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res Rev* 2008; 7: 34-42.
- 4) Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dyn Med* 2009, 8: 1-25.
- 5) Vachharajani V and Granger DN. Adipose tissue: a motor for the inflammation associated with obesity. *IUBMB life* 2009; 61(4): 424-430.
- 6) Abramson JL and Vaccarino V. Relationship between physical activity and inflammation among apparently healthy middle-aged and older US adults. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1286-1292.
- 7) Kogteva GS, Bezuglov VV . Unsaturated fatty acids as endogenous bioregulators. *Biochemistry* 1998; 63: 4-12.
- 8) Bloomer RJ, Larson DE, Fisher-Wellman KH, Galpin AJ, Schilling BK. Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on resting and exercise-induced inflammatory and oxidative stress biomarkers: a randomized, placebo controlled, cross-over study. *Lipids Health Dis* 2009; 8: 36.
- 9) Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, Jin F, Maxwell KR. n-3 polyunsaturated fatty acids do not alter immune and inflammation measures in endurance athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2009; 19(5): 536-46.
- 10) Mizuhara H, O'Neill E, Seki N, Ogawa T, Kusunoki C, Otsuka K, Satoh S, Niwa M, Senoh H, and Fujiwara H. T cell activation associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *J Exp Med* 1994; 179: 1529-1537.
- 11) Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate. *J Muscle Res Cell Motil* 2003; 24:113-119.
- 12) Auclair C, Voisin E. Handbook of methods for oxygen radical research; Greenvald, R. A, Ed.; Boca Raton, CRC Press: Inc, 1985: 123-132.
- 13) Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38:161-70.
- 14) Green LC, Wagner, DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138.
- 15) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.
- 16) Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide-anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170-3175.
- 17) Beutler E. Catalase. In: Beutler E. Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. New York: Grune and Stratton 1982; p.105-6.
- 18) Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70: 158-696.
- 19) Glatzle D, Vnillenmier JP, Weber F, Decker U. Glutathione reductase test with whole blood, a convenient procedure for the assessment of the riboflavin status in humans. *Experientia* 1974; 30: 665-667.