

## STRESULUI OXIDATIV ÎN EFORTUL FIZIC INTENS

Şef lucr.dr. **Nicoleta Taus<sup>1</sup>**, dr. **Laurian Taus<sup>2</sup>**, as.univ.dr. **Mirela Donea<sup>1</sup>**,  
dr. **Monica Potrovița<sup>3</sup>**, as.univ.dr. **Daniela Marinescu<sup>1</sup>**, şef lucr.dr. **Ligia Neica<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universitatea "Transilvania" din Braşov- Facultatea de Medicină

<sup>2</sup>Spitalul Clinic de Urgență Braşov

<sup>3</sup> Direcția Sanitară Veterinară și pentru siguranța alimentelor Braşov

### Abstract:

Evidence of oxidative stress in horses has been described in reports dealing with intense and endurance exercise. Oxidation provides energy for maintenance of cellular integrity and functions. Most of the consumed oxygen forms carbon dioxide and water; however, 1 to 2% of the oxygen is not completely reduced and forms reactive oxygen species.

In thoroughbred race horses, as in other species subjected to physical activity, there is a rise in the imbalance between free radical production and antioxidant agents which leads to oxidative stress. This stress may produce damage in several bio-molecules creating metabolic alterations affecting physical performance. The aim of this study was to find possible relationships between physical exercise and oxidative stress in trained horses.

**Keywords:** oxidative stress, physical exercise

### Introducere

Stresul oxidativ este o consecință a ruperii echilibrului dintre substanțele prooxidante (radicalii liberi) și cele antioxidante. Un radical liber este un atom sau o grupare de atomi, dintre care unul conține un electron impar, pe stratul extern al învelișului de electroni.

Fiind o configurație extrem de instabilă, radicalii liberi reacționează rapid cu alte molecule sau cu alți radicali, pentru a realiza o configurație stabilă de patru perechi de electroni pe învelișul extern (o pereche pentru hidrogen).

Când un atom are electroni mai puțini, atunci protonii, cu o încărcătură electrică pozitivă vor fi în exces, față de încărcătura negativă, și atomul va atrage orice electron disponibil.

Radicalul liber „duce lipsă” de un electron, și are tendința de a fura un electron de la un alt atom, care astfel va deveni la rândul lui un radical liber secundar. Radicalii liberi secundari sunt capabili să modifice orice moleculă de proteine, glucide, acizi grași sau acizi nucleici.

Deși există o multitudine de radicali liberi, cei derivați din oxigen sau azot reprezintă clasa celor mai importanți radicali produși în organismele vii.

Modificările induse de radicalii liberi afectează biomoleculele cu durată de viață lungă, precum colagenul, elastină, mucopolizaharidele, lipidele din structura membranelor celulare, organitele celulare, (mitocondrii, lizozomi) și componente ale pereților vaselor sanguine.

În acest mod, se configurează o reacție în lanț, necontrolată, ce poate provoca pagube biologice substanțiale în organism.

Sistemul antioxidant de apărare a organismului are rolul de a proteja celulele de excesul de ROS și este format dintr-o componentă endogenă (bilirubină, acid uric, superoxid dismutaze, catalaze, glutatation peroxidază etc.) și una exogenă (carotenoizi, tocoferoli, ascorbat, bioflavonoizi etc.).

### Stresul oxidativ în efortul fizic

Începând cu descoperirile lui Dillard în 1978, referitoare la peroxidarea lipidelor în urma unui efort aerob acut, cercetările legate de stresul oxidativ în efort s-au extins mult în următorii 30 de ani. În 1982, Davies și colaboratorii au raportat creșterea unor radicali liberi (semiquinone) în omogenatul de mușchi de șoarece, după supunerea acestuia la un efort extenuant. Kumur și colaboratorii au arătat creșterea radicalilor liberi în miocardul de șoarece, după o expunere la efort de câteva zile. Folosind diclorofluoresceina (DCFH), Bejma și Ji au demonstrat o importantă creștere a producției de ROS în cvadricepsul unor șoareci bătrâni supuși la efort prelungit [7, 10].

Alți cercetători au demonstrat, în condiții experimentale controlate, creșterea ROS în timpul contracției musculare in vitro. Reid și colaboratorii, folosind metoda cu DCFH pe un mușchi diafragm izolat, au arătat nu doar creșterea nivelului de ROS ci și faptul că aceștia pot contribui la

oboseala musculară [13,14]. Pe un model *in situ*, de triceps de felină, O'Neill și colaboratorii au raportat creșterea proporțională a ROS cu maximul de tensiune dezvoltată în mușchi [7, 12].

Căile de producere a ROS includ lanțul de transport electronic de la nivel mitocondrial, metabolismul prostanoizilor, autooxidarea catecolaminelor și activitatea enzimatică a oxidazelor (NAD(P)H oxidaza, xantinoxidaza). Creșterea inițială a ROS în timpul efortului, dar și oprirea ulterioară a acestuia duc la formarea secundară de prooxidanți pe calea fagocitelor, a pierderii homeostaziei calciului și/sau distrugerii proteinelor ce conțin fier. Producția de ROS depinde, de asemenea, de tipul efortului (aerob, anaerob), intensitate, durată [1, 7].

### Măsurarea stresului oxidativ

Datorită reactivității crescute și a duratei scurte de viață a ROS (ex.  $10^{-5}$  secunde pentru radicalul superoxid și  $10^{-9}$  pentru radicalul hidroxil), metodele directe de măsurare sunt dificile.

Metodele indirecte de cuantificare a stresului oxidativ implică măsurarea unor produși moleculari mai stabili formați în urma reacției ROS cu diverse biomolecule. Producții moleculari cei mai frecvenți includ: metaboliți stabili (nitrați/ nitriți), concentrația produșilor țintă ai oxidării, inclusiv cei rezultați din peroxidarea lipidelor (izoprostani, malondialdehida MDA), TBARS, hidroperoxizi lipidici LOOH, diene conjugate, lipoproteine oxidate, aminoacizi oxidați, nitrotirozina, acizi nucleici etc. În plus, stresul oxidativ poate fi măsurat, observând alterările sistemului de apărare antioxidant al organismelor. Acest lucru se face prin măsurarea modificărilor potențialului redox de la nivelul glutatationului (glutacionul este principalul antioxidant endogen nonenzimatic), dar și a nivelurilor circulante de vitamina E și C. De asemenea, activitatea unor anumite enzime antioxidante poate servi drept indicator al stresului oxidativ tisular: superoxid dismutaza (SOD), catalaza (CAT), glutation reductaza (GR) [2, 5].

### Studierea stresului oxidativ în efort fizic, la om

Majoritatea studiilor realizate în domeniul stresului oxidativ în efort la om, au utilizat exerciții de durată scurtă sau medie [4, 7].

Cea mai des utilizată metodă de evidențiere a alterărilor provocate de stres oxida-

tiv este măsurarea peroxidării lipidelor prin intermediul malondialdehidei (MDA) și a substanțelor reactive la acid barbituric (TBARS). Malondialdehida este o aldehydă produsă în urma descompunerii unui hidroperoxid lipidic. TBARS măsoară producția aldehydici rezultați în urma descompunerii hidroperoxizilor lipidici. Deoarece acidul barbituric reacționează și cu alte molecule biologice (ex. carbohidrați, acid sialic, prostaglandine), testele cu TBARS nu sunt specifice.

O altă metodă citată în literatura de specialitate, alături de peroxidarea lipidelor, este măsurarea modificărilor redox de la nivelul glutatationului. Glutacionul este cel mai important antioxidant non-enzimatic de natură endogenă. S-a observat o scădere a glutatationului redus (GSH) și o creștere a glutatationului oxidat (GSSG).

La nivel de ADN s-a observat apariția unor produși modificați, care nu apar în condițiile unui metabolism nucleotidic normal (ex. 8-hidroxi-2-deoxiguanozina), dar și creșterea activității unor enzime implicate în repararea injuriilor ADN survenite după oxidare [6, 8].

Proteinele sunt principala țintă a ROS, datorită abundenței lor în sistemele biologice. Tot proteinele par a fi capabile să curețe organismul de majoritatea ROS produși (50-75%). Alterările oxidative produse la nivel proteic pot apărea fie direct, prin interacțiunea proteinei cu ROS, fie indirect, prin interacțiunea proteinei cu un produs secundar, rezultat din interacțiunea ROS cu lipide sau glucide. Majoritatea alterărilor proteice sunt ireparabile, iar modificările oxidative ale structurii proteice pot duce la pierderea funcțiilor contractile, enzimatică sau structurale, lăsând proteina mai susceptibilă la degradare proteolitică. Creșterea oxidării proteice s-a putut evidenția prin acumularea de O, O'-ditirozina sau carbonili proteici (PC).

Date epidemiologice din literatura de specialitate sugerează că un efort aerob intens și de durată mare (peste 2 ore) se asociază mai frecvent cu un risc crescut de boli cardiovasculare, legătura dintre cele două fiind tocmai stresul oxidativ.

La prima vedere, această afirmație este în contradictoriu cu recomandările actuale care sugerează că un individ trebuie să facă cel puțin 30 de minute de exerciții fizice, zilnic, pentru a duce o viață sănătoasă. Excesul de ROS provoacă organismul să își activeze sistemul antioxidant.

Există, astfel, un nivel optim de efort, la care organismul se adaptează, crescându-și și activitatea sistemelor antioxidante. Când acestea sunt depășite, apare pericolul instalării unor boli. În efortul intens de lungă durată s-a observat și creșterea CK (creatin kinaza), semnificând distrucție musculară, alături de intensificarea peroxidării lipidelor (MDA, TBARS), creșterea F2-isoprostanilor, oxidarea proteinelor, injurii oxidative la nivelul ADN, modificări ale statusului redox (scăderea glutatationului redus și creșterea nivelului celui oxidat).

Scurtele perioade de ischemie, urmate de reperfuzie, ce apar în contracția musculară intensă, dar și distrucția mecanică a mușchiului pot sta în spatele formării de ROS, prin stimularea activității enzimelor care generează radicalii, dar și prin inițierea migrării celulelor inflamatorii la locul injuriei.

Într-un studiu realizat de Ruiz-Larrea și colaboratorii, s-a arătat că estrogenul are proprietăți antioxidante in vitro, ceea ce ar putea însemna că femeile sunt mai puțin expuse la stresul oxidativ decât bărbații. Experimentele ulterioare pe oameni, dar mai ales cele pe șobolani au arătat acest lucru. Se pare că nivelurile markerilor stresului oxidativ în repaus, la femei, sunt mai mici, datorită unei activități mai intense a enzimelor antioxidante, ceea ce ar putea explica speranța de viață mai mare decât a bărbaților.

Răspunsul la efort este același la ambele sexe [8, 16].

### Stresul oxidativ la cai

Majoritatea studiilor s-au făcut pe animalele de laborator, dar subiectul este în continuare unul de mare interes în medicina veterinară, ca și în cea umană.

Specia animală la care s-au cercetat cel mai intens efectele stresului oxidativ, este cea ecvină. Calul este supus cel mai des unui efort fizic intens, el participând la diverse activități sportive.

Problema efectelor stresului oxidativ în efort la caii de curse s-a pus în urma unor performanțe neobișnuit de slabe și chiar decese ale unor cai în timpul Jocurilor Olimpice din Barcelona din 1992 și a Competiției Mondiale din Jerez din 2002.

Încărcarea cu oxigen în timpul efortului maxim crește, la cal, de 30 de ori, ceea ce face din acest animal un bun model de studiu al stresului oxidativ [17].

Stresul oxidativ apare la caii de curse în timpul antrenamentelor de rezistență, dar și în efort maxim. Metabolismul poate tolera radicalii liberi în cantități moderate, aceștia având și efecte benefice în cadrul apărării imune a organismului. Stresul oxidativ crește și în condiții normale, cum sunt sarcina, creșterea sau lactația, pentru că organismul descompune rapid nutrienții în vederea asigurării unui necesar energetic mai mare, dar și odată cu îmbătrânirea organismului.

Prin ruperea echilibrului dintre substanțele oxidante și antioxidanți, radicalii liberi care vor circula în cantități mari, pot distruge celulele, prin distrugerea proteinelor celulare, a ADN-ului și acizilor grași. Un exces de ROS poate cauza oboseală musculară, dar și paralizii, prin distrugerea țesuturilor nervos și muscular.

Cele mai frecvente boli care apar la caii de competiție sunt: neurologice, respiratorii, articulare, musculare (rabdmioliză), endocrine.

S-a demonstrat în diverse studii că bronșita cronică, hemoragia pulmonară și rabdmioliza induse de efort sunt favorizate de pro-oxidanți.

Stresul oxidativ se pare că joacă un rol important în injuriile produse de ischemie urmată de reperfuzie în timpul sau după anestezie. Rolul stresului oxidativ în apariția bolii neuronului motor este în curs de investigare.

În timpul efortului, în organismul calului crește necesarul de oxigen pentru a asigura energia necesară contracției musculare. Cea mai mare parte a oxigenului (98%) este redus în catena respiratorie mitocondrială și transformat în apă. 2% este eliberat ca ROS. În timpul exercițiului, creșterea ROS este semnificativă, ceea ce înseamnă că și cantitatea de antioxidanți necesară pentru neutralizare trebuie să crească. S-a observat, spre exemplu, că la caii de competiție ce suferă de bronșită cronică, nivelul GSH pulmonar este mai mare față de caii sănătoși (fig. 1):

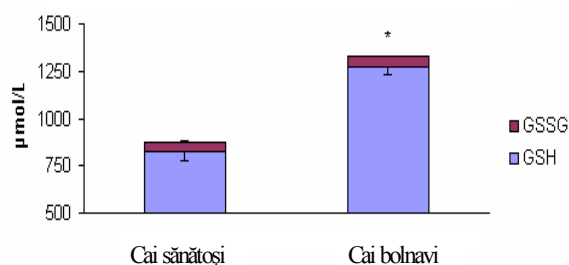
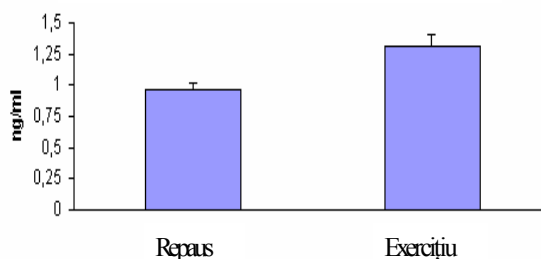


Fig. 1 Concentrația sangvină a GSH și GSSG la caii sănătoși comparativ cu cei bronșitici [11].

Un marker des folosit pentru evidențierea peroxidării lipidice este măsurarea nivelului F2-isoprostanilor. Acesta crește la cai supuși efortului fizic, dovedind existența lipope-



oxidării post-efort (fig. 2) [11].

Fig. 2 Concentrația plasmatică a F2-isoprostanilor la cai sănătoși în repaus și după un efort fizic [15,18,19].

Kronfeld și Williams au observat, supunând un grup de 40 de cai la o cursă de 80 km, modificări ale enzimelor ca urmare a stresului oxidativ.

Probele de sânge au măsurat nivelul: hidroperoxidilor lipidici plasmatici (LPO), tocoferolului, creatin kinazei (CK), aspartatului (AST), celulelor albe și roșii (RBC și WBC), GSH total și al glutatation peroxidazei (GPx). O parte din cai (16) nu au reușit să termine cursa din cauza oboselii, a problemelor metabolice sau din alte cauze. Activitatea CK și AST a fost mai mare ( $P < 0,05$ ) înainte, în timpul și după cursă la cai care nu au reușit să termine [15, 18, 19].

Deficitul în antioxidanți duce la imposibilitatea unui efort susținut, dar măsura în care suplimentele cu antioxidanți îmbunătățesc performanța, este încă un subiect de cercetare. Unele studii au arătat că, la cai, unele suplimente reduc stresul oxidativ. Supradozele însă, cum ar fi cele de vitamina A, vitamina C sau oligoelemente (cupru, magneziu), pot fi pro-oxidante, inducând injurii tisulare.

Kinnunen și colaboratorii au demonstrat într-un studiu că exercițiul prelungit poate duce la distrucție musculară, fatigabilitate și scăderea performanței. Tot ei au arătat că exercițiul acut, de intensitate moderată induce peroxidarea lipidelor și oxidarea proteinelor la caii trăpași. Dintre animalele utilizate în sport, calul are o abilitate unică de a-și crește nivelul de oxigen preluat în timpul exercițiului intens. Acest lucru se întâmplă prin adaptările ce au loc la toate nivelurile metabolismului. Ventilația crește și ea

de 30 de ori. Caii de sport suferă frecvent de diverse probleme ce au legătură cu stresul endogen sau exogen apărut în urma folosirii lor în competiții [11].

Williams și colaboratorii au făcut un experiment în care și-au propus să demonstreze dacă statusul antioxidant este influențat de vârstă și antrenament. Ei au utilizat 8 cai maturi (12 ani) și 5 cai bătrâni (22 ani). S-au măsurat GSH, LPO, GPx, puls și TBARs. La unele animale, eficiența sistemelor antioxidante este în strânsă legătură cu vârsta și speranța de viață. Speciile care au o speranță de viață mai mare, au și un sistem antioxidant mai eficace [16].

Gondim F. Zoppi C. și Pereira-da-Silva L. au făcut un experiment în care își propuneau să evalueze stresul oxidativ, biomarkerii antioxidanți și performanța în timpul unei curse pe mai multe zile, pe o distanță de 210 km. Ei au folosit 9 cai, cărora le-au prelevat probe de sânge la aceeași oră, înainte de începerea cursei și în fiecare zi a competiției. S-au măsurat nivelurile glutatation-reducatei (GR), catalazei (CAT) și TBARs. Patru dintre cei 9 cai nu au reușit să termine cursa din cauza unor probleme de metabolism sau din cauza oboselii. Activitatea GR a crescut progresiv pe perioada cursei, nivelul TBARs a crescut față de cel bazal, după care a rămas constant în cele 3 zile, iar CAT nu a înregistrat modificări semnificative. Concluzia studiului lor a fost că, statusul redox modifică performanța cailor în timpul curselor, dar erau necesare investigații suplimentare pentru determinarea echilibrului optim între prooxidanți și antioxidanți în vederea obținerii performanței dorite [9].

### Concluzii

Capacitatea antioxidantă se pare că se reduce temporar, în timpul sau imediat după efort, după care revine la nivelul bazal sau chiar deasupra lui, în timpul refacerii.

De asemenea, contează și timpul scurs de la încetarea efortului și până la prelevarea serului.

Intensitatea și durata efortului condiționează și ele rezultatele în toate cazurile.

La indivizii antrenați, organismul este adaptat la stres și reușește să facă față mai ușor efectelor ROS. S-a observat că este necesar un anumit nivel al ROS care să stimuleze sistemele antioxidante. Dacă nu este atins acel nivel, sau

dacă este depășit fără să fie stimulat sistemul antioxidant endogen, pot apărea efecte nocive la nivel tisular.

Antioxidanții enzimatici și non-enzimatici joacă un rol vital în protejarea țesuturilor împotriva excesului oxidativ apărut în timpul efortului fizic.

### Bibliografie

1. Aguilo A., Tauler P., Fuentespina E., Tur J.A., Cordova A., Pons A. – Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 2005;84(1):1-7.
2. Akova B., Surmen-Gur E., Gur. H., Dirican M., Sarandol E., Kucukoglu S. – Exercise-induced oxidative stress and muscle performance in healthy women: role of vitamin E supplementation and endogenous oestradiol. *Eur J Appl Physiol* 2001, 84(1–2):141-147.
3. Bejma J. et al. – Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise. *Acta Physiol Scand.* 169:343-51, 2000.
4. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. – *Biochemistry, International Edition.* 5th Ed. New York: WH Freeman and Co. 2001
5. Bloomer R.J., Fry A.C., Falvo M.J., Moore C.A. – Protein carbonyls are acutely elevated following single set anaerobic exercise in resistance trained men. *J Sci Med Sport* 2007, 10(6):411-417.
6. Brooks S.V., Vasilaki A., Larkin L., McArdle A., Jackson M. – Repeated bouts of aerobic exercise lead to reductions in skeletal muscle free radical generation and nuclear factor  $\kappa$ B activation, *Physiol*, 2008, Volume 586, Number 16, 3979-3990
7. Fisher-Wellman K., Bloomer R. – Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history, *Dynamic Medicine* 2009, 8:1 doi:10.1186/1476-5918-8-1.
8. Gladney L., Lucy J., Williams C. A. – The effects of supplemental superoxide dismutase on performance and oxidative stress in exercising horses, *J Anim Sci* 2008.86:576-583.
9. Gondim F., Zoppi C., dos Reis Silveira L., Pereira-da-Silva L., Vaz de Macedo D. – Possible Relationship Between Performance and Oxidative Stress in Endurance Horses *Journal of Equine Veterinary Science*, Volume 29, Issue 4, Pages 206-212
10. Ji L.L. - Exercise at old age: does it increase or alleviate oxidative stress? *Ann N y Acad Sci.* 928:236-47, 2001.
11. Kinnunen S., Atalay M., Hyypa S., Lehmuskero A. – Effects of prolonged exercise on oxidative stress and antioxidant defence in endurance horse. *Journal of Sports Science and Medicine* (2005) 4, 415-421
12. Kronfeld D.S., Custalow S.E., Ferrante P.L., Taylor L.E., Moll H.D., Meacham T.N. and Tiegs W. – Determination of the lactate breakpoint during incremental exercise in horses adapted to dietary corn oil. *AJVR*, 2000, 61(2): 144-151
13. Reid M.B. – Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc.* 33(3):371-376, 2001.
14. Reid M.B., Ferreira L. – Muscle-derived ROS and thiol regulation in muscle fatigue, *J Appl Physiol* 104:853-860, 2008. First published Nov 15, 2007; doi:10.1152/japplphysiol.00953.2007.
15. Williams, C.A. - 2005. Are you ‘Stressing Out’ your horse? Rutgers Cooperative Extension. FS656.
16. Williams C.A., Atherly L. – Antioxidants for horses, Rutgers 2008.
17. Williams C.A., Gordon M., Betros C., McKeever K. – Apoptosis and antioxidant status are influenced by age and exercise training in horses, *J Anim Sci* 2008.86:576-583.
18. Williams C.A., Kronfeldt D.S., Hess T.M., Saker K.E., Waldron J.N., Crandell K.M., Hoffman R.M. and Harris P.A. - (2004) Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *J Anim Sci* 82, 588-594
19. Williams C.A., Lamprecht E: – The efficacy of some commonly supplemented herbs in equine nutrition; *J. Anim. Sci.* 2004. 82:588-594, 2004