

**НАЦИОНАЛНА СПОРТНА АКАДЕМИЯ  
„ВАСИЛ ЛЕВСКИ”**

**КАТЕДРА „ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ”**

**ЯСИН ЕРОГЛУ**

**ВЛИЯНИЕ НА ФИЗИЧЕСКАТА РАБОТОСПОСОБНОСТ  
ВЪРХУ ОКСИДАТИВНИЯ СТАТУС**

**ДИСЕРТАЦИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертационен труд за присъждане на образователна научна степен „ДОКТОР”

**София 2016**

**НАЦИОНАЛНА СПОРТНА АКАДЕМИЯ „ВАСИЛ ЛЕВСКИ”**  
**КАТЕДРА „ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ”**

---

**ЯСИН ЕРОГЛУ**

**ВЛИЯНИЕ НА ФИЗИЧЕСКАТА РАБОТОСПОСОБНОСТ ВЪРХУ**  
**ОКСИДАТИВНИЯ СТАТУС**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**на дисертационен труд за присъждане на образователна научна степен**  
**„ДОКТОР”**

по научна специалност „Теория и методика на физическото възпитание и спортната тренировка (вкл. МЛФ)”, професионално направление 7.6. Спорт

**Научен ръководител:**

**Доц. Албена Александрова, доктор**

**Научен консултант:**

**Доц. Юндер Даглиоглу**

**Официални рецензенти:**

**Доц. Д-р Милена Георгиева Николова, доктор**

**Проф. Д-р Константин Александров Бичев, дн**

**София 2016**

Дисертационният труд съдържа 153 стандартни машинописни страници. Онагледен е с 10 таблици и 26 фигури. Библиографията включва 256 литературни източници.

Дисертационният труд е апробиран, обсъден и насочен за официална защита на заседание на катедра „Физиология и биохимия“ при НСА „Васил Левски“.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 29.11.2016 г. от 14:00 часа в зала А3 на НСА „Васил Левски“, София.

## УВОД

В аеробните организми непрекъснато се генерират активни форми на кислорода (АФК), основно като странични продукти на клетъчното дишане. Те са високо реактивоспособни и могат окислително да модифицират всички биомолекули: липиди, протеини и нуклеинови киселини. Това предизвиква увреждане на субклетъчните структури, което променя техните функции и в крайна сметка може да доведе до клетъчна смърт. Еволюционно организмите са изградили ефективна антиоксидантната защитна система, която елиминира АФК и предпазва клетките от увреждане. Така, при нормални физиологични условия, съществува равновесие между процесите, водещи до образуване на АФК (прооксидантни процеси) и процесите, водещи до тяхното обезвреждане (антиоксидантни процеси). Установено е, че при редица патологични състояния прооксидантните процеси се интензифицират и антиоксидантният капацитет на биологичната система може да се окаже недостатъчен, за да елиминира тяхната действие. Това състояние на организма, при което има свръхпродукция на АФК и/или понижена антиоксидантна защита, т.е. появява се при дисбаланс между про- и антиоксидантните процеси се означава като оксидативен стрес (ОС).

Многобройни изследвания през последните години регистрират увеличено генериране на АФК по време на и след физически натоварвания. Ранните теории за ОС създават убеждението, че генерирането на АФК има предимно негативен ефект върху човешкия организъм. При спортистите, тя се изразява основно в промяна на съкратителната функция на мускулите и/или увеличаване на мускулно увреждане, ускорено достигане до състояние на умора, свързано не само с прякото действие на АФК, но и вторично, свързано с окислително увреждане на контрактилните и/или митохондриалните ензими. Понастоящем се установява, че АФК оказват ключова роля в регулирането на много вътреклетъчни механизми и допринасят за активиране на различни пътища на клетъчната сигнализация. АФК индуцира митохондриалната биогенезата, ангиогенезата, хипертрофията на скелетните мускули, активиране на антиоксидантните ензими и на имунната система. Така възниква парадоксът, че повишеният ОС, предизвикан от физическа активност, води до положителни ефекти. Въпреки това, полезните ефекти изглежда зависят от продължителността на натоварването. Предполага се, че еднократните физически натоварвания водят до ограничен адаптивен отговор, докато редовните тренировки водят до постепенно

повишаване на нивото на адаптация от повтарящото се активиране на експресията на антиоксидантни гени и активността на антиоксидантните ензими.

Така целта на настоящата работа е да се установи зависимост между нивото на физическата работоспособност на спортистите и промените в про/антиоксидантния статус. Наличието или липсата на такива могат да служат като индикатор за процесите на адаптиране, настъпващи в организма в резултат на тренировъчния процес. Измерванията на про/антиоксидантните маркери в кръв могат да дадат информация за текущия толеранс на организма към физическите усилия и, по този начин, за регулиране на тренировъчния процес, което ще доведе до постигане на по-високи спортни резултати.

## **РАБОТНА ХИПОТЕЗА, ЦЕЛ, ЗАДАЧИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕ**

### ***Работна хипотеза***

Физическите натоварвания водят до промени в про/антиоксидантния баланс на организма. От една страна многократно увеличената консумацията на кислород в сравнение с потреблението в покой, е придружено със свръх генериране на АФК. От друга страна редовните занимания със спорт подобряват функционирането на ендогенните антиоксиданти системи и способността им да неутрализират образуваните АФК, предотвратявайки индуцирането и развитието на оксидативен стрес. Вероятно добре тренираните спортисти с по-висока работоспособност са по-добре адаптирани към физическите натоварвания и при тях няма да се наблюдават съществени промени в оксидативния статус.

### ***Цел на дисертационния труд***

Целта на настоящата работа е установяване на зависимост между нивото на физическата работоспособност на спортистите и промените в клетъчния оксидативен баланс.

### ***Задачи на изследването***

1. Определяне на нивото на физическа работоспособност на изследваните спортисти;
2. Установяване на промените в оксидативния статус на спортистите след физическо натоварване чрез регистриране на:

#### ***в кръвна плазма***

- нива на TBARS като показател на ЛПО;
- нива на общ глутатион;
- общ антиоксидантен капацитет.

#### ***в еритроцити***

- нива на TBARS;
- нива на общ глутатион;
- активност на антиоксидантните ензими CAT, SOD и GPX.

### ***Методика на изследването***

***Обект на изследването:*** оксидативният статус на организма на състезатели след изпълнение на физическа работа.

***Предмет на изследването:*** биохимични маркери на оксидативния стрес, отразяващи прооксидантната активност и нивото на антиоксидантна защита в изследваните системи, а именно нива на ЛПО, промени в основния ендегенен антиоксидант глутатион; промени в активността на антиоксидантните ензими (SOD, GPX, CAT).

***Субект на изследването:*** В настоящето изследване взеха участие общо 44 човека, от които: 32 студента от Газиантепския университет в Турция (16 мъже джудисти и 16 мъже, водещи заседнал начин на живот) и 12 студента от НСА - София, България (9 мъже и 3 жени от отбора по борба).

### ***Биологичен материал***

От състезателите се вземаха проби от венозна кръв от квалифицирано медицинско лице. От нея бяха получавани плазма и еритроцити чрез центрофугиране на 600xg за 10 min при 4°C. Получената плазма беше отделяна от еритроцитите. Еритроцитите бяха двукратно промивани с 1 mL 0.9% NaCl и центрофугирани при описаните условия, а получената супернатанта – отпипетирана. Суспензията от еритроцити и отделената след първото центрофугиране плазма, бяха замразявани при -80°C и съхранявани при тази температура до шест месеца. При провеждане на изследването размразяване на пробите и повторно замразяване не беше допускано.

### ***Изследване на функционалното състояние на спортистите***

#### ***Максимална кислородна консумация***

Максимална консумация на кислород ( $VO_{2max}$ ) на спортистите от Газиантепския университет беше определена индиректно посредством модифицирания тест на Роберт Бруст (Robert Bruce test) по време на единично натоварване на бягаща пътека (Noonan & Dean, 2000).

Спортистите, изследвани в ЦНПДС при НСА бяха подложени на спироергометричен тест със стъпаловидно натоварване до отказ по протокол на проф. Илиев. Натоварването беше проведено на бягаща пътека H/P/Cosmos (Германия).

Спироергометричните показатели и резултатите от газовия анализ бяха регистрирани с метаболитен анализатор Jaeger-Pro (Германия).

### ***Субмаксимално аеробно натоварване***

Изследваните лица от Газиентепския университет бяха подлагани на 20 минутно субмаксимално аеробно натоварване при 75% от  $\text{VO}_2\text{max}$  на бягаща пътека. Наклонът и скоростта се изчисляваха за всеки участник на базата на индивидуалните показания за  $\text{VO}_2\text{max}$ . Натоварванията, свързани с определяне на  $\text{VO}_2\text{max}$  и субмаксималното аеробно натоварване на всеки участник бяха проведени в различни дни. За верифициране на аеробното натоварване беше използвана формулата на Karvonen (Fox et al., 1988).

### ***Сърдечна честота***

Сърдечната честота на изследваните лица беше следена с телеметрична система за наблюдение Polar ® RS800sd RUN.

### ***Антропометрични изследвания***

Ръстът на изследваните лица беше измерван с ръстомер, а теглото с електронна везна с точност  $\pm 50$  g. Измерванията бяха извършвани сутрин преди закуска, като изследваните лица бяха боси и по гащета.

Изчислен беше индексът на телесната маса (ИТМ) по формулата:

$$\text{ИТМ (kg/m}^2\text{)} = \text{телесно тегло (kg)} / \text{ръст (m)}^2$$

### ***Телесен състав***

Телесният състав беше анализиран чрез използване на апарат Tanita BC-418 (Япония). Измерванията бяха извършвани сутрин преди закуска, като изследваните лица бяха боси.

### ***Биохимични методи***

Определяне на концентрацията на белтък по метода на Lowry et al. (1951).

Определяне на количеството хемоглобин чрез „Меркотест”, кат. N 3317. При калибрирането се прилага „Мерк – стандарт”, кат. N 3298.

Определяне на нивата на общия глутатион по метода на Tietze (1969).

Определяне на нивата на прекисно окисление на липиди в кръвна плазма по метода на Hunter et al. (1963).



Определяне на нивото на прекисно окисление на липиди в еритроцити по метода на Gilbert et al. (1984).

Определяне на активност на супероксиддисмутаза по метода на Beauchamp & Fridovich (1971).

Определяне на активност на каталаза по метода на Aebi (1970).

Определяне на активност на глутатион пероксидаза по метода на Gunzler et al. (1972)

Определяне на общия антиоксидантен капацитет по метода на Koracevic et al. (2001).

Определяне на нивата на Zn и Cu в кръвната плазма бяха измерени чрез атомно-абсорбционна спектрофотометрия, използвайки Perkin-Elmer Zeeman 5100PC снабден с HGA 600 програматор на графитната пещ.

#### ***Статистическата обработка на резултатите***

Използван е статистически пакет SPSS19. Приложени са вариационен и корелационен анализ, а за проверка на статистическата достоверност на получените разлики в средните стойности t-критерия на Student за зависими извадки. Дисперсията на средните стойности е представена със стандартната грешка ( $\pm$  SE).

## ПОЛУЧЕНИ РЕЗУЛТАТИ И АНАЛИЗИ

*Промени в оксидативния статус на неспортуща и спортисти в извън състезателен период, подложени на субмаксимален аеробен тест*

### Показатели, характеризиращи участниците в проучването

За изследването, двете групи участници (джудисти и лица, водещи заседнал начин на живот, означени като контроли) бяха подбрани така, че да бъдат сравними по между си и те не се различаваха по брой лица в група, средна възраст, тегло и височина ( $p > 0.05$ ) (Таблица 4.1).

**Таблица 1.** Антропометрични и физиологични параметри на тестваните групи

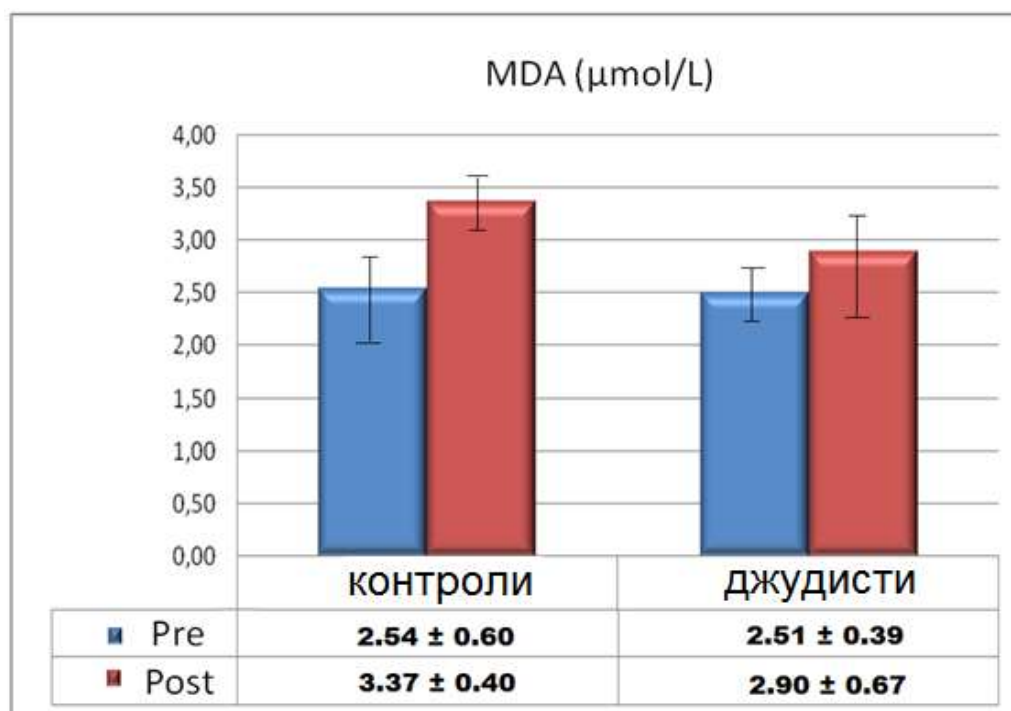
	Джудисти ( n = 16 )		Контроли ( n = 16 )	
	Mean $\pm$ SD	Min-Max	Mean $\pm$ SD	Min-Max
<b>Възраст</b> (години)	20 $\pm$ 1.93	18 - 23	20 $\pm$ 1.2	18- 23
<b>Височина</b> (cm)	172 $\pm$ 4.26	165 - 182	175 $\pm$ 7.14	163 - 186
<b>Тегло</b> (kg)	74.84 $\pm$ 14.06	60.4 - 95	70 $\pm$ 11.8	53 - 94.3
<b>ИТМ</b> (kg/cm)	25.05 $\pm$ 3.77	20.6 - 28.7	22.9 $\pm$ 2.92	19.6 - 27.1
<b>Телесни мазнини</b> (%)	12.18 $\pm$ 6.92	4.70 - 20.70	13.23 $\pm$ 6.05	5.3 - 23.8
<b>Максимална сърдечна честота</b> (bpm)	194.25 $\pm$ 5.99	180 - 200	193.5 $\pm$ 7.19	184 - 204
<b>VO<sub>2</sub>max</b> (mL/kg/min)	52.66 $\pm$ 13.22	35.74 - 71.62	43,21 $\pm$ 7.88	34.11 - 60.18
<b>Аеробна мощност</b> (W)	114.94 $\pm$ 18.74	98.39 – 161.86	106.58 $\pm$ 17.42	86.21 – 147.60

Двете групи не се различаваха по процента телесни мазнини и по индекса за телесна маса (ИТМ), които бяха в норма. Независимо от това, ИТМ при студентите, занимаващи се регулярно със спорт като цяло беше по-висок, което се дължи на по-добре развитата мускулатура; при тях се наблюдаваше по-нисък процент телесна мазнина в сравнение с лицата, водещи заседнал начин на живот (Таблица 1).

### Показатели на оксидативния статус

Бяха измерени промените в нивата на липидна пероксидация като показател за прооксидантните промени, настъпили в следствие на прилагането

на субмаксимално аеробно натоварване с интензивност 75% от  $\text{VO}_2\text{max}$  и продължителност 20 min (Фигура 1).



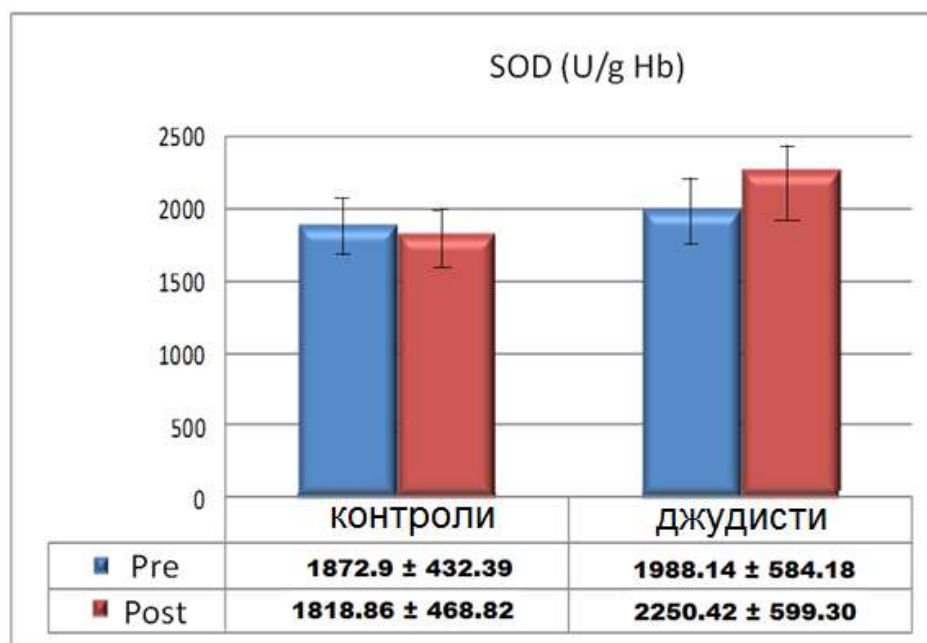
**Фигура 1.** Нива на липидна пероксидация преди и след натоварване при джудисти и при лицата, водещи заседнал начин на живот.

Изходните нива на ЛПО бяха еднакви за двете групи ( $2.54 \pm 0.60 \mu\text{mol/L}$  за неспортуващите контроли и  $2.51 \pm 0.39 \mu\text{mol/L}$  за джудистите). След провеждане на натоварването нивата на MDA се увеличават достоверно при неспортуващите контроли (с 30 % по-високи спрямо началните:  $2.54 \pm 0.60 \mu\text{mol/L}$  vs  $3.37 \pm 0.40 \mu\text{mol/L}$ ), докато при джудистите повишението не е достоверно ( $2.51 \pm 0.39 \mu\text{mol/L}$  vs  $2.90 \pm 0.67 \mu\text{mol/L}$ ).

На Фигура 2 са представени промените в активността на SOD при изследваните групи. В групата на активно спортуващите активността на ензима беше по-висока в сравнение с тази на неспортуващите в изходно състояние на покой. Непосредствено след прилагане на натоварването беше регистрирано значително увеличение на активността на SOD в групата на джудистите ( $1988.14 \pm 584 \text{ U/g Hb}$  vs  $2250.42 \pm 599 \text{ U/g Hb}$ ), докато в групата на водещите заседнал начин на живот нямаше промяна ( $1872.9 \pm 432 \text{ U/g Hb}$  vs  $1818.86 \pm 468 \text{ U/g Hb}$ ).

Сравнявайки двете групи може да се отбележи, че активността на SOD в групата на спортистите е по-висока независимо от състоянието, в което те се намират (покой или физическа работа).

Сравнителният анализ на данните за промените в нивото на липидна пероксидация, измерено чрез концентрацията на MDA и активността на SOD при студентите, водещи заседнал начин на живот преди и след натоварване са показани в таблица 2. Отчетени са достоверни разлики ( $p < 0.05$ ) в нивото на липидната пероксидация.



**Фигура 2.** Активност на SOD преди и след натоварване при джудисти и при лицата, водещи заседнал начин на живот.

**Таблица 2.** Сравнение на стойностите на изследваните параметри преди и след натоварване при неспортуващи; \*за достоверни се приемат разлики при  $p < 0.05$

Показател	Средна стойност ± SD	t	p
MDA (μmol/L) Преди натоварване	2.54 ± 0.60	-6.535	0.000*
MDA (μmol/L) След натоварване	3.37 ± 0.40		
SOD (U/g Hb) Преди натоварване	1872.90 ± 432.39	0.483	0.636
SOD (U/g Hb) След натоварване	1818.86 ± 468.82		

Сравнителният анализ на данните за промените в концентрацията на MDA и активността на SOD при джудисти преди и след натоварване са показани в таблица 3. Отчетени са достоверни разлики ( $p < 0.05$ ) само по отношение на активността на SOD.

**Таблица 3.** Сравнение на стойностите на изследваните параметри преди и след натоварване при джудисти; \*за достоверни се приемат разлики при  $p < 0.05$

Показател	Средна стойност $\pm$ SD	t	p
<b>MDA (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b> <b>Преди натоварване</b>	$2.51 \pm 0.39$	-2.233	0.061
<b>MDA (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b> <b>След натоварване</b>	$2.90 \pm 0.67$		
<b>SOD (U/g Hb)</b> <b>Преди натоварване</b>	$1988.14 \pm 584.18$	-2.723	0.016*
<b>SOD (U/g Hb)</b> <b>След натоварване</b>	$2250.42 \pm 599.30$		

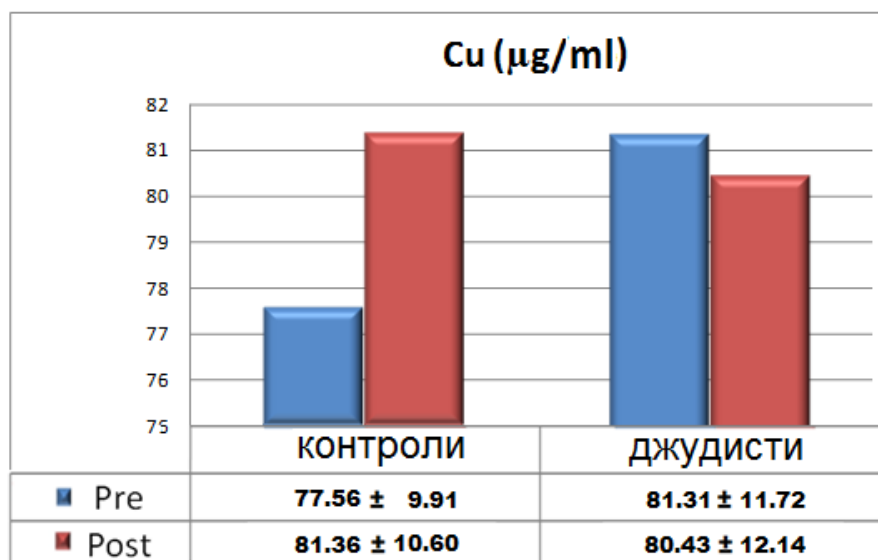
Изчислените разликите в стойностите на измерваните показатели при двете групи (контроли и джудисти) преди и след изпълнение на субмаксималния аеробен тест са представени в Таблица 4. И в двете групи се наблюдават достоверни разлики.

**Таблица 4.** Разлики в стойностите на измерваните показатели при двете групи (контроли и джудисти) преди и след изпълнение на субмаксималния аеробен тест; \* $p < 0.05$

Показател	Група	Разлика в средните стойности $\pm$ SD	t	p
<b>MDA</b>	Контроли	$-0.83 \pm 0.51$	-2.052	0.049*
	Джудисти	$-0.39 \pm 0.70$		
<b>SOD</b>	Контроли	$54.04 \pm 447.57$	-2.142	0.040*
	Джудисти	$-262.27 \pm 385.31$		

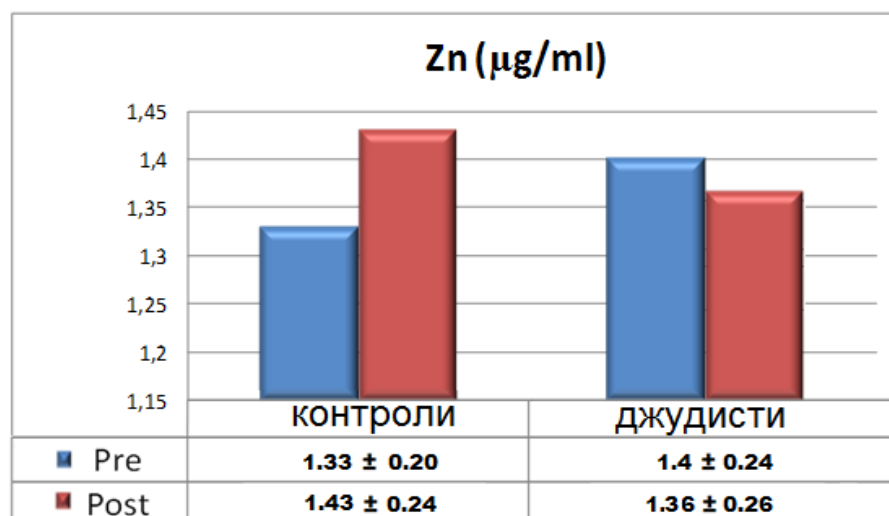
В настоящето изследване бяха измерени и концентрациите на мед и цинк в кръвната плазма. Тези два метала са кофактори на SOD и наличието им може да има лимитиращ ефект за активността на ензима.

Промените в нивата на Cu са отразени на Фигура 3. Направените измервания показаха, че концентрацията на мед в кръвната плазма на спортистите е значително по-висока в покой отколкото концентрацията, измерена при неспортуващите ( $81,31 \pm 11.72 \mu\text{g/mL}$  vs  $77.56 \pm 9.91 \mu\text{g/mL}$ ). Докато в групата на джудистите не се наблюдаваше статистически достоверна промяна в концентрацията на Cu ( $81,31 \pm 11.72 \mu\text{g/mL}$  vs  $80.43 \pm 12.14 \mu\text{g/mL}$ ) след изпълнение на субмаксималния аеробен тест, то в групата на водещите заседнал начин на живот беше отчетено значително повишение ( $77.56 \pm 9.91 \mu\text{g/mL}$  vs  $81.36 \pm 10.60 \mu\text{g/mL}$ ).



**Фигура 3.** Концентрация на Cu в кръвна плазма преди и след натоварване.

На Фигура 4 са представени промените в нивата на Zn.



**Фигура 4.** Концентрация на Zn в кръвна плазма.

Концентрацията на цинк в кръвната плазма на водещите заседял начин на живот е по-ниска отколкото концентрацията, измерена при джудистите ( $1.33 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$  vs  $1.4 \pm 0.24 \mu\text{g/mL}$ ) в покой. Докато в групата на джудистите не беше регистрирано намаление в концентрацията на Zn ( $1.4 \pm 0.24 \mu\text{g/mL}$  vs  $1.36 \pm 0.24 \mu\text{g/mL}$ ) след изпълнение на субмаксималния аеробен тест, то в контролната група беше отчетено статистически достоверно повишение ( $1.33 \pm 0.20 \mu\text{g/mL}$  vs  $1.43 \pm 0.24 \mu\text{g/mL}$ ).

При сравнението по групи по отношение на изследваните метали се вижда, че при спортистите не се отчитат достоверни разлики нито в концентрацията на Cu, нито в концентрацията на Zn преди и след приложеното натоварване (таблица 5). За разлика от тях, при неспортуващите студенти беше регистрирано увеличение на концентрациите и на двата метала (Таблица 6).

**Таблица 5.** Сравнение на стойностите на концентрацията на Cu и Zn преди и след натоварване при джудисти; \*за достоверни се приемат разлики при  $p < 0.05$

Показател	Средна стойност $\pm$ SD	t	p
<b>Cu (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> <b>Преди натоварване</b>	$81.31 \pm 11.72$	0.618	0.546
<b>Cu (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> <b>След натоварване</b>	$80.43 \pm 12.14$		
<b>Zn (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> <b>Преди натоварване</b>	$1.40 \pm 0.24$	1.683	0.113
<b>Zn (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> <b>След натоварване</b>	$1.36 \pm 0.24$		

**Таблица 6.** Сравнение на стойностите на концентрацията на Cu и Zn преди и след натоварване при неспортуващи; \*за достоверни се приемат разлики при  $p < 0.05$

Показател	Средна стойност $\pm$ SD	t	p
<b>Cu (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> <b>Преди натоварване</b>	$77.56 \pm 9.91$	-2.705	<b>0.016*</b>
<b>Cu (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> <b>След натоварване</b>	$81.36 \pm 10.60$		
<b>Zn (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> <b>Преди натоварване</b>	$1.33 \pm 0.20$	-2.295	<b>0.037*</b>
<b>Zn (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> <b>След натоварване</b>	$1.43 \pm 0.24$		

Изчислени бяха разликите в стойностите на концентрациите на Cu и разликите в стойностите на концентрациите Zn в групата на джудистите и контролната група преди и след изпълнение на субмаксималния аеробен тест (Таблица 7). Сравнението на тези показатели показаха статистически достоверни промени в нивата на металите, индуцирани от физическото натоварване, между двете изследвани групи. При спортистите няма промяна в нивата на изследваните метали за разлика от неспортуващите, където се установява нарастване на концентрацията и на Cu и на Zn след изпълнение на субмаксималния аеробен тест.

**Таблица 7.** Разлики в стойностите на концентрацията на Cu и Zn при двете групи (джудисти и контроли) преди и след изпълнение на субмаксималния аеробен тест; \* $p < 0.05$

Показател	Група	Разлика в средните стойности $\pm$ SD	t	p
<b>Cu</b>	Контроли	$-3.8 \pm 5.62$	2.510	<b>0.018*</b>
	Джудисти	$0.87 \pm 5.66$		
<b>Zn</b>	Контроли	$-0.09 \pm 0.16$	2.343	<b>0.026*</b>
	Джудисти	$0.04 \pm 0.33$		

***Промени в оксидативния статус на спортисти (борци) в предсъстезателен период, подложени на максимален аеробен тест до отказ***

Бяха изследвани 12 състезателя от отбора по борба на НСА „Васил Левски” преди отговорно състезание. Усреднените данни за възрастта, антропометричните характеристики, както и телесния състав на спортистите са представени в таблица 8.

**Таблица 8.** Обобщени данни за възраст, антропометрични характеристики и телесен състав на изследваните лица

	Средни стойности	SD	Min	Max
<b>Възраст (години)</b>	21,0	0,85	20,0	22,0
<b>Тегло (kg)</b>	74,0	11,29	55,0	88,9



<b>Височина (cm)</b>	169,5	7,42	153,5	181,0
<b>ИТМ (kg/m<sup>2</sup>)</b>	25,6	2,53	21,9	30,8
<b>Мазнини (%)</b>	12,9	3,85	8,4	18,9
<b>Хидратация (%)</b>	63,3	3,17	59,0	67,0

От таблицата се виждат значителни разлики в теглата на изследваните лица (min=55.0 кг; max=88.9 кг). Това се дължи на обстоятелството, че те се състезават в различни теглови категории. Изчислената средна стойност на ИТМ на спортистите беше  $25.6 \pm 2.53 \text{ kg/m}^2$  с отклонения от 21.9 до  $30.8 \text{ kg/m}^2$ . Сравнявайки индивидуалните данни (Приложение №2), макар отчетеният ИТМ при някои от мъжете да беше над общоприетата норма, те нямаха завишен %ТМ. В групата на жените бяха установени по-високи %ТМ (15.3, 18.2, 18.9%). Всички изследвани лица бяха добре хидратирани.

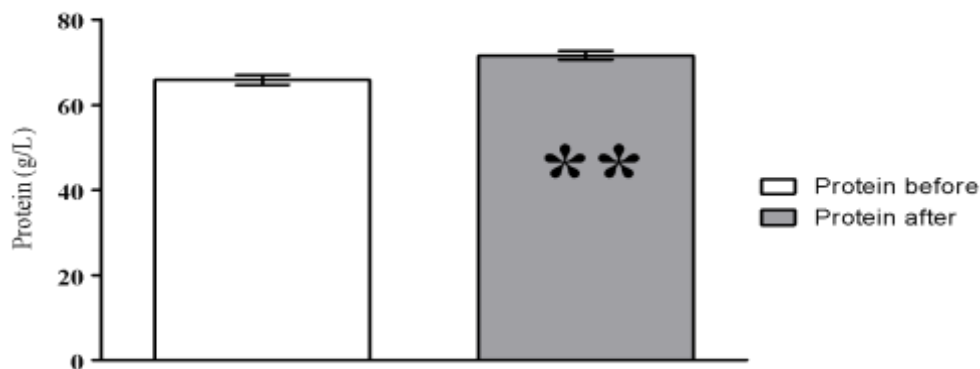
Усреднените резултати на спортистите от проведения аеробен тест са представени в Таблица 9. Достигнатото средно време на натоварване беше 12:07 мин, а средната скорост -  $14.8 \text{ km/h}$ . Максималната кислородна консумация на изследваните лица варира от 45,8 до 58,9 mL/kg/min, като това определя функционалната им годност между средна и добра. Всичко жени показаха добра функционална годност с  $\text{VO}_{2\text{max}}$  съответно 46.8, 47.7 и 45.8 mL/kg/min (Приложение 2, изследвани лица 10,11,12). Опитно лице 10 постигна много добри резултати за жена: времето на натоварване беше 10:59 мин (колкото и на опитно лице 6, мъж) и достигнатата ѝ максимална мощност беше  $3.7 \text{ W/kg}$ .

**Таблица 9.** Усреднени резултати от проведения максимален аеробен тест до отказ

	Средна стойност	SD	Min	Max
<b>Време (mm:ss)</b>	12:07	$\pm 01:27$	09:55	14:55
<b>Скорост (km/h)</b>	14,8	$\pm 1,07$	13,2	16,8
<b><math>\text{VO}_{2\text{max}}</math> (mL/kg/min)</b>	51,4	$\pm 4,30$	45,8	58,9
<b>HRmax (bpm)</b>	191,0	$\pm 3,22$	184	196

### Промени в кръвната плазма

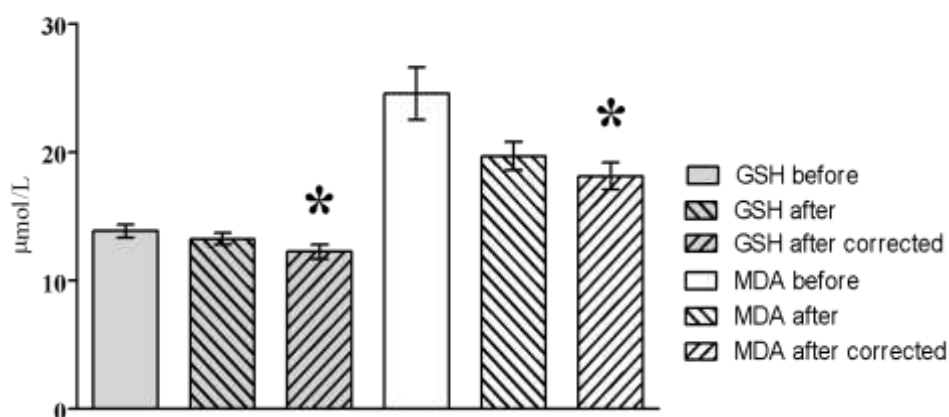
Промените в концентрацията на плазмените белтъци са показани на Фигура. 5.



**Фигура 5.** Белтъчна концентрация в плазма преди и след максимално аеробно натоварване до отказ

Получените резултати показаха, че непосредствено след изпълнение на аеробния тест концентрацията на плазмените белтъци беше увеличена с 8.74% ( $65.80 \pm 4.20$  g/L преди теста спрямо  $71.55 \pm 3.46$  g/L след теста). Имайки предвид изходните и крайните данни беше изчислен индивидуалният коефициент на хемоконцентрация за всяко изследвано лице. Тези коефициенти бяха използвани за коригиране на концентрациите на GSH и TBARS.

Промените в нивата на общия GSH и концентрацията на TBARS в кръвната плазма бяха измерени като показатели за оксидативния стрес, индуциран от аеробното натоварване (Фигура. 6).

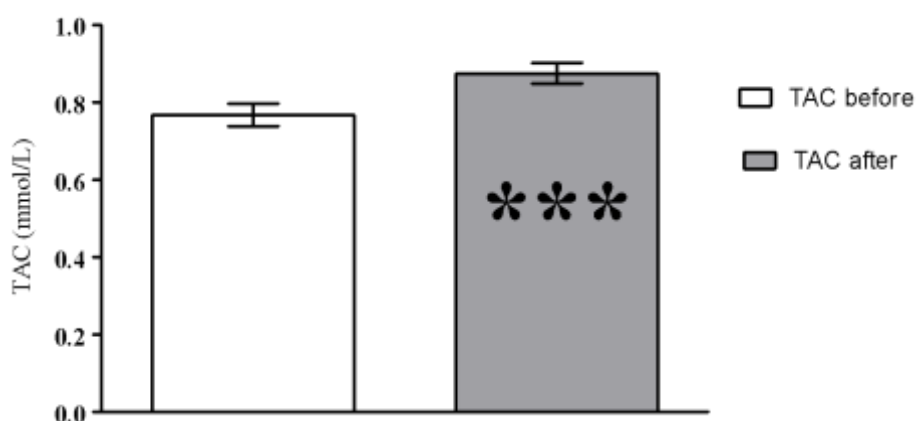


**Фигура 6.** Нива на липидна пероксидация (представени като  $\mu\text{mol}$  MDA/L плазма) и общ глутатион (GSH) в плазма преди и след максимално аеробно натоварване до отказ

Отчетените резултати показаха, че концентрацията на TBARS в плазмата след натоварването ( $19.71 \pm 3.81 \mu\text{mol/L}$ ) намалява в сравнение с изходните нива ( $24.58 \pm 7.05 \mu\text{mol/L}$ ). Статистическият анализ определи това намаление като статистически незначимо, но след преизчисляване на получените стойности според индивидуалните коефициенти за хемоконцентрация беше установена достоверност на резултата ( $24.58 \pm 7.05 \mu\text{mol/L}$  vs  $18.12 \pm 3.66 \mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0.05$ ).

Нивата на GSH намаляваха по подобен начин. Аеробното натоварване не водеше до намаляване на концентрацията на GSH ( $13.85 \pm 1.75 \mu\text{mol/L}$  преди натоварване спрямо  $13.26 \pm 1.61 \mu\text{mol/L}$  след натоварване). Тези стойности след натоварване са отчетени директно, без корекции спрямо коефициента за хемоконцентрация. След преизчисляване на стойностите, обаче намалението на GSH, индуцирано от приложеното физическо натоварване, се оказа достоверно ( $13.85 \pm 1.75 \mu\text{mol/L}$  vs  $12.23 \pm 1.98 \mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0.05$ ).

Фигура 7. представя промяната в общия антиоксидантен капацитет (АОК) на плазмата след изпълнение на максималния аеробен тест до отказ. Получените резултати показват значително увеличение на АОК след натоварване в сравнение с тези преди изпълнение на теста (преди теста:  $0.767 \pm 0.1 \text{ mmol/L}$  vs след теста:  $0.875 \pm 0.092 \text{ mmol/L}$ ). Изчисленото нарастване е приблизително 15%.

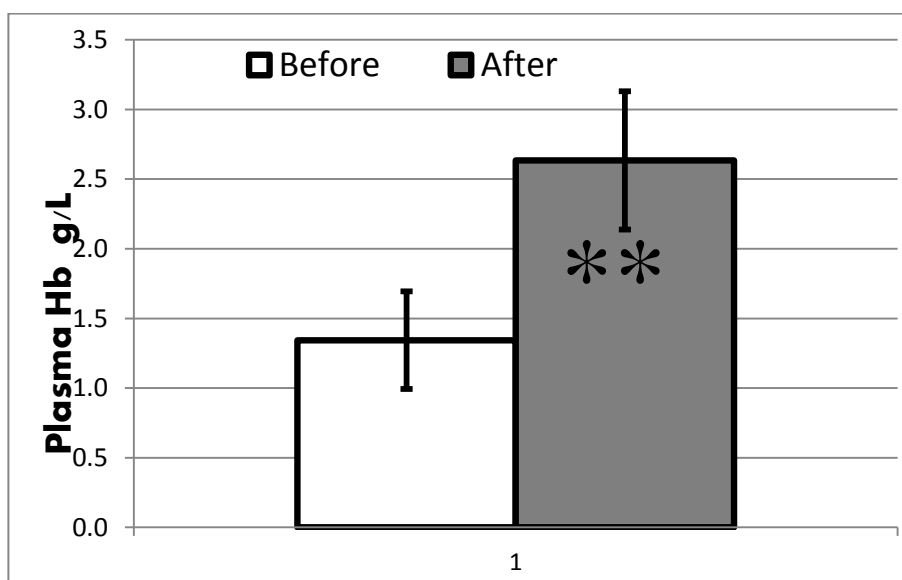


**Фигура 7.** Общ антиоксидантен капацитет (Total Antioxidant Capacity=TAC) на кръвната плазма преди и след максимално аеробно натоварване до отказ

### *Промени в еритроцити*

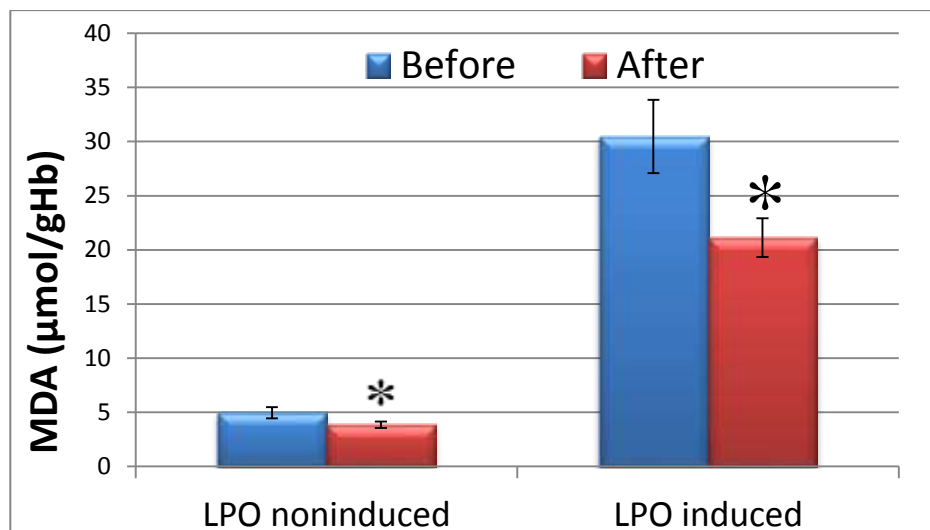
Концентрацията на хемоглобина в кръвта на изследваните лица преди изпълнението на  $\text{VO}_{2\text{max}}$  теста беше  $135.2 \pm 19.15$  g/L. В пробите, взети непосредствено след приключване на натоварването, беше регистрирано увеличение на Hb концентрацията и имаше средна стойност  $146.23 \pm 27.23$  g/L (данните не са показани графично).

Изследването на изолираната след центрофугиране плазма показва наличие на хемоглобин. Концентрацията на хемоглобина в плазмата беше значително повишена в пробите, взети след изпълнение на упражнението ( $1.34 \pm 0.35$  vs.  $2.63 \pm 0.5$  g/L) (Фигура. 8).



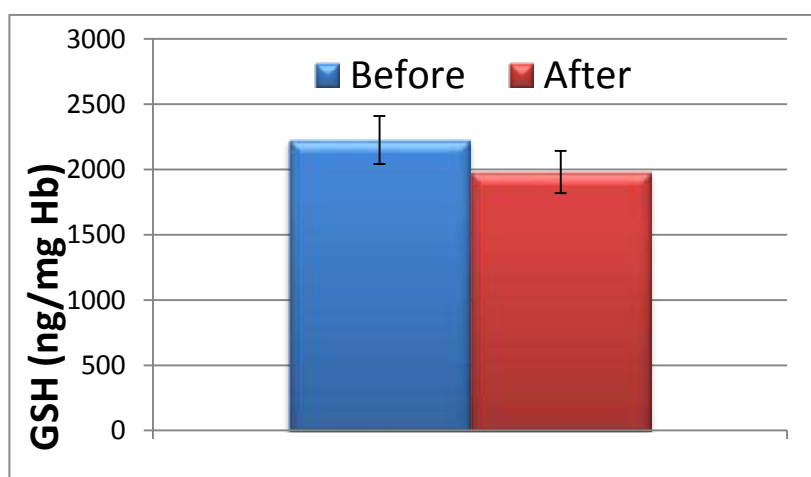
**Фигура 8.** Концентрация на хемоглобин в плазма (представени като g Hb/L) преди и след максимално аеробно натоварване до отказ.(n=12); \*\*p<0.01

Резултатите от изследването на нивото на липидната пероксидация в еритроцити са представени на Фигура 9. Те показват намаление на TBARS, измерени непосредствено след приключване на аеробното натоварване. Това намаление беше статистически достоверно както при спонтанния ( $5.43 \pm 0.57$   $\mu\text{mol/gHb}$  vs  $4.06 \pm 0.30$   $\mu\text{mol/gHb}$ ), така и при индуцирания с  $\text{Fe}^{3+}/\text{asc}$  ( $30.47 \pm 3.39$   $\mu\text{mol/gHb}$  vs  $21.13 \pm 1.78$   $\mu\text{mol/gHb}$ ) процес.

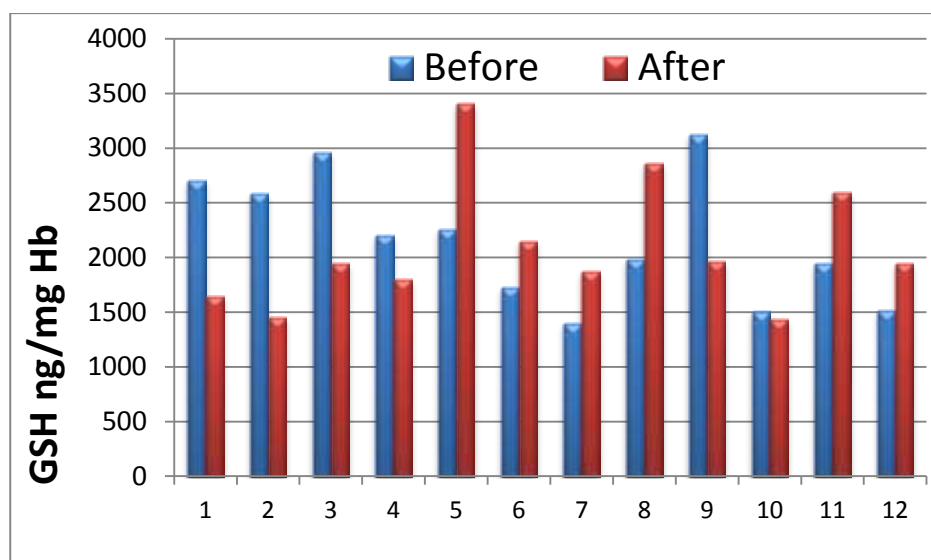


**Фигура 9.** Нива на спонтанна и индуцирана липидна пероксидация в еритроцити (представени като  $\mu\text{mol MDA/g Hb}$ ) преди и след максимално аеробно натоварване до отказ. ( $n=12$ ); \* $p<0.05$  vs Before

Нивата на тоталния глутатион в еритроцитната суспензия не показва достоверни изменения. Установена беше тенденция към намаляване от  $2225.49 \pm 183.76$  ng/mg Hb до  $1980.53 \pm 162.08$  ng/mg Hb (Фигура. 4.10). Индивидуалните изходни стойности за GSH на изследваните спортисти показаха големи вариации (min 1401 ng/mg Hb и max 3122 ng/mg Hb) (Фигура. 4.11), което наред със сравнително малкия брой изследвани лица е причина за липса на достоверност в получените резултати.



**Фигура 10.** Нива на общ глутатион (GSH) в еритроцити преди и след максимално аеробно натоварване до отказ. ( $n=12$ )



**Фигура 11.** Индивидуални нива на общ глутатион (tGSH) в еритроцитите на изследваните спортисти преди и след максимално аеробно натоварване до отказ

Данните за промените в активностите на еритроцитната супероксид дисмутаза (SOD) на спортистите непосредствено след изпълнение на аеробния тест в сравнение с изходните са представени на Фигура 4.12. Получените резултати показаха големи различия в ензимната активност между отделните спортисти още преди натоварването. Забелязва се тенденция за липса на промяна в активността на SOD, измерена непосредствено след упражнението при атлетите с най-добър аеробен капацитет. Например, при мъжете:

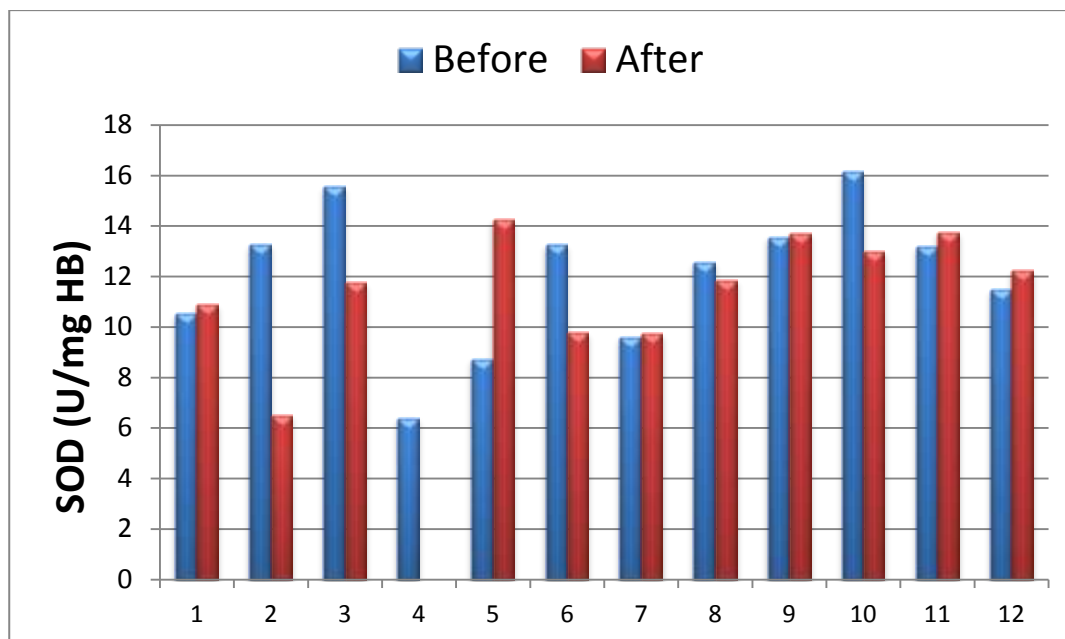
за опитно лице №1 с  $VO_{2max}=55,3$  получените стойности преди и след теста са съответно 10.53 и 10.89 U/mg Hb;

за опитно лице №9 с  $VO_{2max}=55,2$  получените стойности преди и след теста са съответно 13.57 и 13.73 U/mg Hb

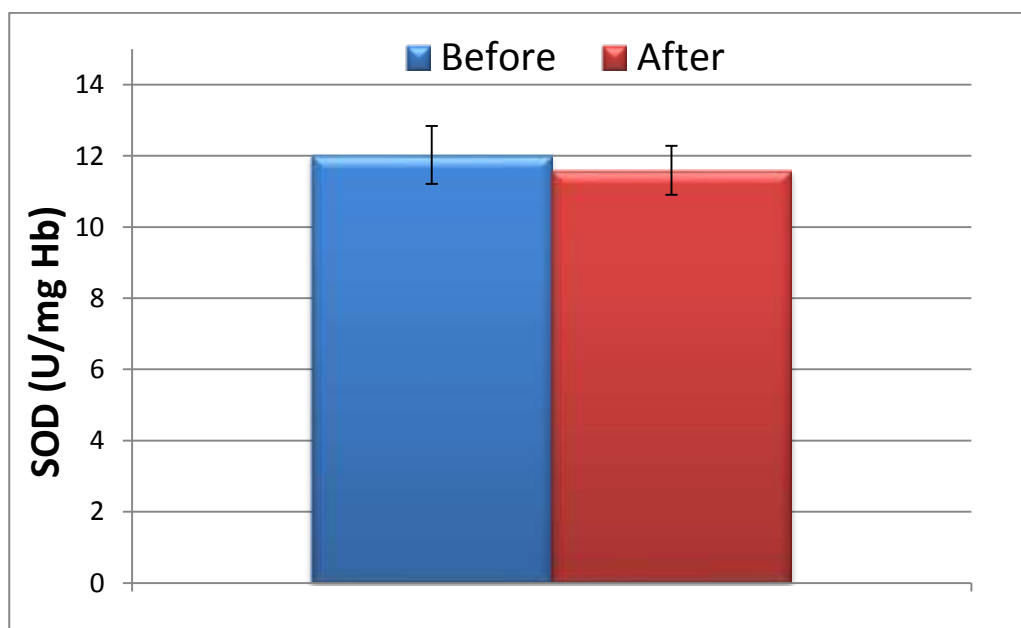
и при жените:

за опитно лице №11 с  $VO_{2max}=47,7$  получените стойности преди и след теста са съответно 13.20 и 13.76 U/mg Hb

Усреднените резултати показват, че непосредствено след изпълнение на максимален аеробен тест до отказ като цяло не се наблюдават достоверни изменения в активността на еритроцитната SOD (Фигура. 4.13).

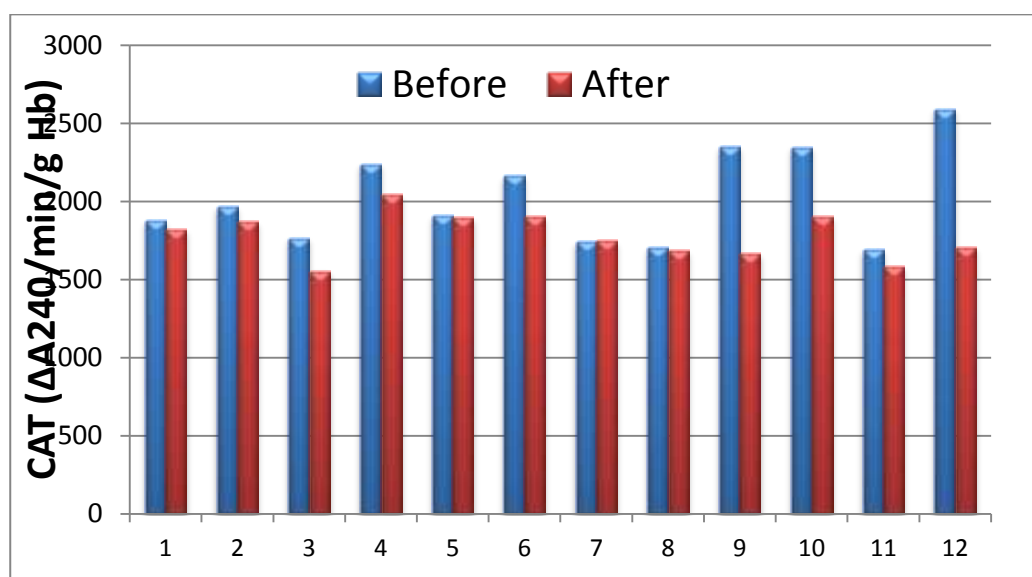


**Фигура 4.12.** Активност на супероксид дисмутаза (SOD) в еритроцити преди и след максимално аеробно натоварване до отказ на изследваните лица.



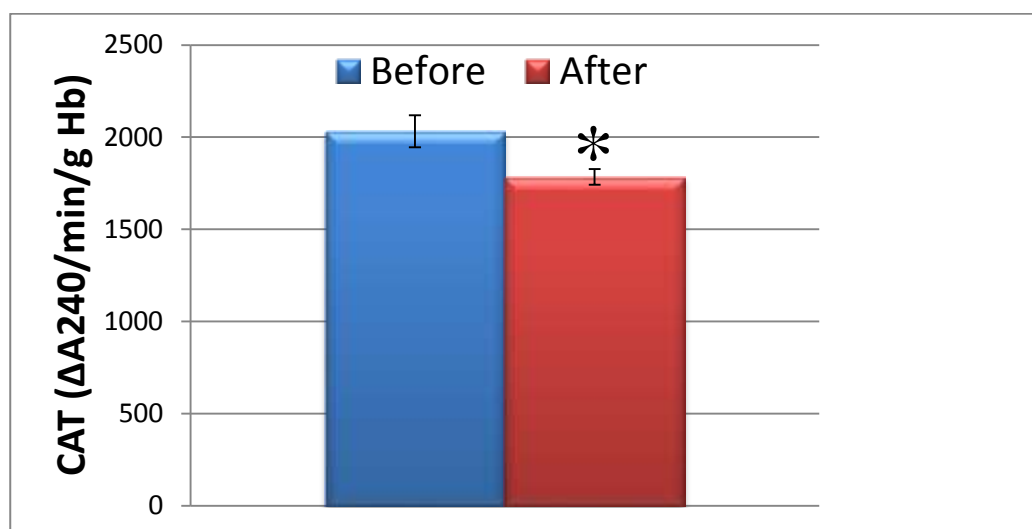
**Фигура 4.13.** Обобщени стойности за активност на супероксид дисмутаза (SOD) в еритроцити преди и след максимално аеробно натоварване до отказ. (n=12)

По отношение на еритроцитната каталаза след прилагане на  $VO_{2max}$  теста при всички спортисти се наблюдава тенденция за намаление на активността ѝ с изключение на трима спортисти (№№ 5, 7 и 8), при които няма промяна (Фигура. 4.14).



**Фигура 4.14.** Активност на каталаза в еритроцити преди и след максимално аеробно натоварване до отказ на изследваните лица.

Обобщените резултати показват намаление на каталазната активност в проби от еритроцити на спортисти-борци, взети непосредствено след изпълнение на максимален аеробен тест до отказ (Фигура. 4.15).



**Фигура 4.15.** Обобщени стойности за активност на каталаза в еритроцити преди и след максимално аеробно натоварване до отказ. (n=12); \*p<0.05

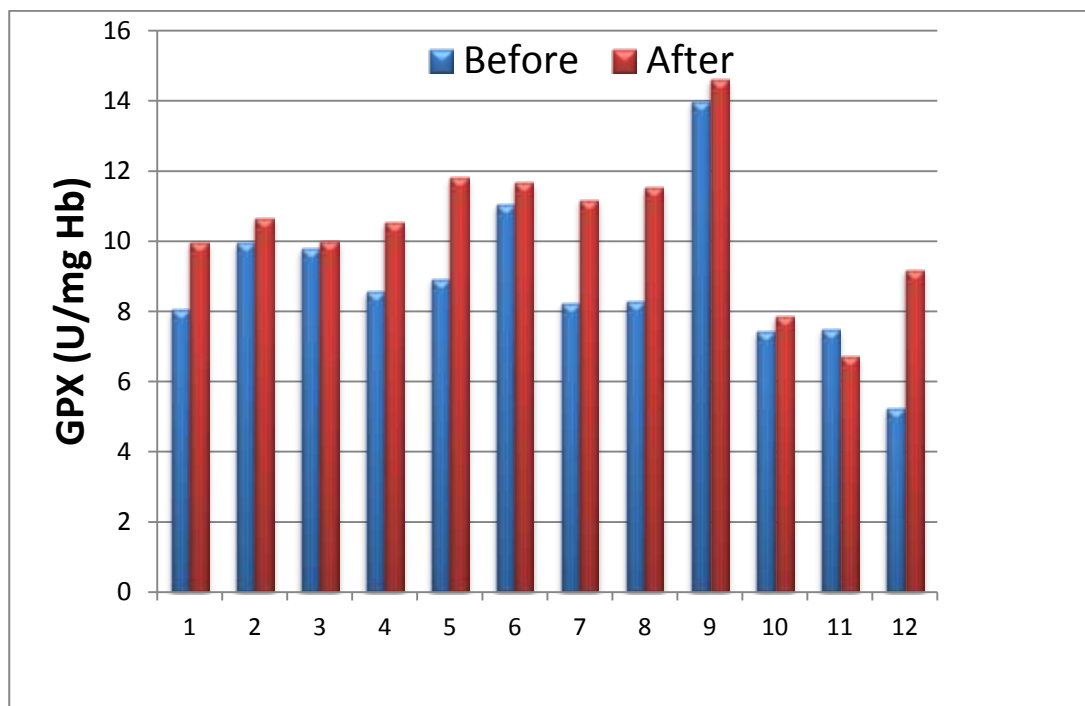
Активността на глутатион пероксидазата в еритроцитите на изследваните борци преди и след максимално аеробно натоварване до отказ са представени на Фигура 4.16.



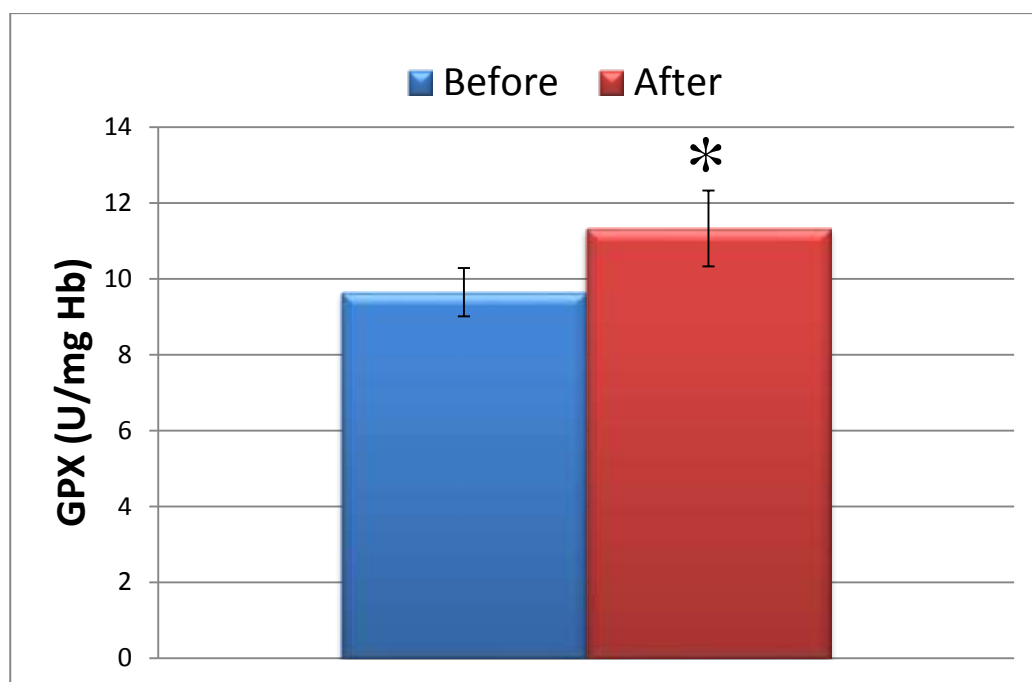
При всички мъже се наблюдава увеличаване на ензимната активност макар и с различен процент (от 1% при опитно лице №3 до 33% опитно лице № 8).

При жените се установява намаление на глутатион пероксидазната активност с изключение на изследвано лице № 10, чийто време на натоварване (10:59 мин) беше еднакво с това на опитно лице №6 (мъж). При опитно лице № 12 бяха отчетени много високи стойности за активността на ензима в пробите, взети в покой, непосредствено преди започването на теста.

Обобщените резултати за активността на глутатион пероксидазата в еритроцити при борци (мъже, №№ 1-9) след максимално аеробно натоварване до отказ показаха статистически достоверно увеличение (Фигура. 4.17) след изпълнение на теста. При жените (№№ 10-12) като цяло тенденцията се запазва, но без достоверност. Тук разликите в индивидуалните стойности (особено на състезателка № 12 спрямо тези на № 10 и № 11), както и малкият брой изследвани лица е причина за липса на достоверност в получените резултати.



**Фигура 4.16.** Активност на глутатион пероксидаза в еритроцити преди и след максимално аеробно натоварване до отказ на изследваните лица



**Фигура 4.17.** Обобщени стойности за активност на глутатион пероксидаза в еритроцити при борци (мъже) преди и след максимално аеробно натоварване до отказ. (n=9); \*p<0.05

## ДИСКУСИЯ

Физическите натоварвания водят до промени в оксидативния статус на организма. Тези промени могат да се проследят в редица органи (най-често черен дроб и сърце на опитни животни) и тъкани (мускули, кръв на опитни животни и хора) чрез измерване на специфичните за оксидативния стрес биомаркери. При човека най-удобният и сравнително неинвазивен начин за диагностика на различни състояния е изследването на кръвта и нейните елементи. По отношение изследване на оксидативния статус, най-често се използват кръвната плазма и еритроцитите. Еритроцитите са едни от първите клетки, които могат да бъдат засегнати от промените в редокс статуса на организма, поради което те са широко като надежден показател за състоянието на организма.

Целта на настоящето изследване беше да се проследи влиянието на нивото на физическа работоспособност на спортисти върху оксидативния статус. Последният беше определян чрез регистриране на нивата на MDA, общия глутатион и общия антиоксидантен капацитет в кръвна плазма, както и нивата на MDA, общия глутатион и активността на CAT, SOD и GPx в еритроцити на изследваните лица. За определяне на функционалния капацитет на изследваните лица беше използван максималният стъпаловиден тест до отказ (VO<sub>2</sub>max тест). Той се счита за "златен стандарт" в

спортната практика, тъй като параметърът максимална кислородна консумация ( $\text{VO}_{2\text{max}}$ ) изразява обективно състоянието на сърдечно-съдовата система, белодробния капацитет и състоянието на скелетната мускулатура, а също така има много добра възпроизводимост.

### **Аеробен капацитет на изследваните лица**

Изследваните борци достигнаха средна  $\text{VO}_{2\text{max}}$   $51.4 \pm 4.3 \text{ mL/kg/min}$  с минимална и максимална стойност  $45.8 \text{ mL/kg/min}$  и  $58.9 \text{ mL/kg/min}$ , съответно (табл. 4.9). По-ниските стойности  $46.8$ ,  $47.7$  и  $45.8 \text{ mL/kg/min}$  са регистрирани при изпълнението на теста от жените, участващи в изследването (Приложение 2). Така тези резултати показват много добра функционална годност както при мъжете, така и при жените. По отношение на резултатите при джудистите – техните показатели са в същия порядък със средна стойност  $52.7 \pm 13.2 \text{ mL/kg/min}$ , но със значително по-големи разброси (табл. 4.1). При тях минимална стойност е за  $\text{VO}_{2\text{max}}$  е  $35.7 \text{ mL/kg/min}$ , което говори за много слаба аеробна работоспособност, съобразено с възрастта и пола на изследваното лице (Приложение 3). Очаквано, при изследваните лица, които не се занимават активно със спорт беше регистрирана по-ниска средна стойност е за  $\text{VO}_{2\text{max}}$  ( $43.21 \pm 7.88 \text{ mL/kg/min}$ ).

### **Максимален аеробен тест до отказ и промени в оксидативния статус**

Максималният аеробен тест до отказ е широко прилаган в спортната практика за проследяване на работоспособността на спортистите и степента им на тренираност. При прилането на този тест, от една страна, консумацията на кислород се увеличава многократно в сравнение с потреблението в покой, което е придружено от увеличено генериране на АФК. От друга страна много научни изследвания показват, че редовните занимания със спорт подобряват функционирането на ендогенните антиоксиданти системи и способността им да неутрализират образуваните АФК като по този начин предотвратяват индуцирането и развитието на оксидативен стрес. Затова промените или липсата на такива в про/антиоксидантния статус на спортистите могат да служат като индикатор за процесите на адаптиране, настъпващи в организма в резултат на тренировъчния процес.

По отношение на промените във физиологичните показатели след изпълнение на  $\text{VO}_{2\text{max}}$  тест, те са добре известни, но малко се знае за промените в оксидативния статус при тези условия. Следователно е необходимо да има налична база за сравнение

не само на физиологичните показатели, но също така и на биохимичните маркери за ОС. Наличието на такива данни биха дали възможност за установяване на зависимости между работоспособността на спортистите и оксидативните изменения.

### **Промени в плазмения оксидативен статус след изпълнение на максимален аеробен тест до отказ**

След изпълнение на максималния аеробен тест до отказ в кръвната плазма на борците беше установена повишена концентрация на плазмените белтъци с 8.73%. Подобен ефект при прилагане на максимално натоварване е регистриран още през 1977 г. от Novosadová (Novosadová, 1977). Тя установява увеличение на протеините в кръвна плазма с 13% и на хематокрита с 7.7% без да има промяна в белтъчното съдържание. Така като причина за това увеличение бива изтъкната хемоконцентрацията. В допълнение това изследване показва възстановяване на гореспоменатите показатели до нормални стойности след 30 минути почивка, без прием на течности. Следователно хемоконцентрацията може да бъде свързана с навлизане на вода от плазмата в мускулите по осмотичен градиент поради значителното увеличение на концентрацията на млечната киселина в мускулите веднага след натоварването (Novosadová, 1977). Увеличаването на градиента на тъканното онкотично налягане, медирано от натрупаните метаболити като лактат може да бъде един от факторите, които водят до намаляване на плазмените и кръвните обеми. В допълнение, загубата на течност чрез потта и дишането, филтрацията към извън съдовото пространство вследствие на увеличаване на артериалното налягане и мускулната контракция по време на тренировка, могат да допринесат за този процес (Schumacher et al., 2002). Тъй като промените в обема на плазмата са значителни, с цел правилното интерпретиране на получените резултати, е редно да бъдат направени корекции при изчисляването на биохимичните и хормоналните параметри в кръв след физическо натоварване. Показано е, че промените в параметрите могат да изменят своето значение при коригирането им спрямо изменението в обема на плазмата (Kargotich et al., 1997). Промените в обема на плазмата са сходни и не зависят от начина на изпълнение на натоварването. Ето защо трябва да се вземат под внимание промените в плазмения обем, когато се анализират получените данни (Kargotich et al., 1997). Имайки предвид тези съображения, в настоящата работа резултатите за оценка на оксидативния статус на спортистите бяха представени като стойности преди и след преизчисляване. Така

първоначално отчетената липса на промяна в концентрацията на MDA (като маркер за ЛПО) се измени до достоверно намаляване на този показател (Фигура. 4.2).

Добре е известно, че увеличава концентрацията на плазмените протеини води до увеличаване на буферния капацитет на кръвта. Това би могло да се приеме като благоприятен ефект при извършване на физическа работа, тъй като много изследователи предполагат, че ацидозата е отговорна за генерирането на АФК и по този начин за инициране на липидната пероксидация. Предполага се, че ацидозата повишава дисоциацията на желязо от транспортните протеини и при взаимодействието на тези желязни йони ( $\text{Fe}^{2+}$ ) с водороден пероксид и/или супероксид (Фентонова реакция) се образуват хидроксилни радикали, които водят до окислително увреждане на биомолекули. Има противоречиви мнения по отношение на произхода на индуцираната от физическа работа ацидоза (Böning et al., 2005; Kemp et al., 2006). Най-често тя се обяснява с дисоциацията на млечната киселина, тъй като повишаването на концентрацията ѝ в мускулите и кръвта, придружено с намаляване на pH е установено по време на интензивни упражнения. В подкрепа на тази хипотеза Lovlin и сътр. (1987) наблюдават корелация между образуването на млечна киселина и установяване на оксидативен стрес, измерен чрез количеството на TBARS. В допълнение, увеличаването на концентрацията на  $\text{H}^+$  ускорява скоростта на  $\text{O}_2^{\cdot -}$  дисмутация до  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Groussard et al., 2000). От друга страна Bloomer & Cole (2009) предполагат, че степента на индуцираната от физическа работа ацидоза в мускулите и в кръвта може да не е достатъчна, за да се предизвика липидната пероксидация и белтъчно окисление, измерени чрез нивата на MDA и белтъчни карбонили (PC, protein carbonyls), съответно. Получените резултати в настоящото изследване също не показаха увеличение на ПОЛ в плазмата в отговор на приложения  $\text{VO}_{2\text{max}}$  тест.

По отношение на плазмената ПОЛ в отговор на единични натоварвания с максимална интензивност в научната литература съществуват противоречиви данни. При изпълнение на максимален аеробен тест на тредмил с продължителност 8-12 минути и достигната  $\text{VO}_{2\text{max}}$   $48.4 \pm 10.42$  мл/мин/кг не е установено увеличение на ПОЛ (Dayan et al., 2005) в кръвен серум на здрави мъже. Авторите на изследването не правят корекции на резултатите и предполагат, че натоварването не е било достатъчно, за да предизвика ПОЛ. При изследване на група студенти по физическо възпитание, изпълнението на максимален многоетапен бегови (20-м) тест (maximal multistage 20-m shuttle run test) с достигната  $\text{VO}_{2\text{max}}$   $42.12 \pm 2.74$  мл/мин/кг, е довело до значително

увеличение на TBARS, което се е запазило 24 часа след приключване на теста (Atashak & Sharafi, 2013). При тренирани спортисти (маратонци с няколкогодишен спортен стаж и редовни седмични тренировки) изпълнението на аеробен тест до отказ с достигната  $VO_{2max}$   $60.1 \pm 4.3$  мл/мин/кг е довело до намаляване на ПОЛ (Rokitzki et al., 1994). Значително намаляване на концентрацията TBARS е отчетена в кръвни проби, взети непосредствено след приключване на стъпаловиден тест до отказ с достигната  $VO_{2max}$   $68.0 \pm 5.4$  мл/мин/кг при ски бегачи на дълги дистанции от националния представителен отбор на Полша (Hubner-Wozniak et al., 1994). Същите тези автори обаче намират значително увеличение на TBARS при изследване на борци, които показват по-ниска  $VO_{2max}$  в сравнение със скиорите при аеробно натоварване на велоергометър (Hubner-Wozniak et al., 1993). Вероятно нивото на ПОЛ зависи от степента на тренираност на спортистите. В настоящето изследване опитните лица бяха добре тренирани и достигнаха  $VO_{2max}$  от  $51.4 \pm 4.3$  мл/мин/кг (табл. 4.9). При анализиране на получените резултати бе установена негативна корелация между степента на тренираност на спортистите оценена по  $VO_{2max}$  и нивото на ПОЛ, оценена по концентрацията TBARS в плазмата след изпълнение на теста ( $R = -0.637$ ,  $p = 0.026$ ), което подкрепя това предложение. Така намаляването на концентрацията MDA беше очакван резултат, който се потвърди след направената корекция. Следователно, за правилна оценка на плазмената ПОЛ след интензивни аеробни упражнения, е необходимо да се преизчислят получените стойности, като се има предвид процента на хемоконцентрация. Някои автори коригират показателите за ОС поради възможен хемоконцентрация като използват промяната в стойностите на хематокрита (Olcina et al., 2006). Според нас, намаляването на обема на плазмата и увеличаването на концентрацията на метаболити в плазмата може да бъде отразено по-точно с повишената концентрация на белтъци. Тъй като промяната в хематокрита е приблизително 2 пъти по-малка от тези на белтъчната концентрация, коригирането на стойностите на маркерите на оксидативния стрес след интензивни физически упражнения е по-правилно да бъде направено спрямо изменението на концентрацията на плазмените протеини. Вероятно наблюдаваното незначително увеличение на TBARS веднага след максимален аеробен тест до отказ на велоергометър (достигайки  $VO_{2max}$ :  $53.0 \pm 1.5$  мл/мин/кг) (Revan, 2011) се дължи на липсата на корекция на получените резултати, имайки предвид хемоконцентрацията.

Наблюдаваното намаление на ПОЛ при добре тренирани спортисти може би се дължи на увеличението на общия антиоксидантен капацитет (ТАС) в кръвната плазма (Фигура. 4.3). Увеличението на ТАС е установено след еднократен остър експеримент с плуване при 70% - 75% от максималната скорост (Nikolaidis et al., 2007), след максимални аеробни и анаеробни изометрични натоварвания (Alessio et al., 2000). Изглежда, че анаеробните и комбинираните натоварвания нямат значителен ефект ( $p < 0.05$ ) върху ТАС, докато аеробните предизвикват увеличение на ТАС непосредствено след изпълнение на упражнението, както и в 5, 10, и 20-та минута на възстановяването (Elabed et al., 2014). Предполага се, че редовните тренировъчни въздействия подобряват действието на антиоксидантните защитни системи (Marin et al., 2013). Съществува голямо разнообразие от антиоксиданти в човешката кръв, което може да намали степента на ОС (Bloomer & Goldfarb, 2004). Антиоксидантите във водната фаза на човешка плазма са церулоплазмин, албумин и вероятно албумин-свързания билирубин, аскорбинова киселина, трансферин, хаптоглобин и хемопексин (Halliwell & Gutteridge, 1990). Увеличаването на ТАС след тренировка може да се дължи на хемоконцентрацията, която води до повишена концентрация на метаболити, които имат скевенджър ефект. В проведеното изследване, повишените концентрации на протеин в плазмата (съответно албумин, които представлява по-голямата част от плазмените протеини) след физическо активност могат да обяснят повишена ТАС и оттам намалената ЛПО.

Друг важен антиоксидант във вътре- и извънклетъчното пространство е глутатионът (GSH). Плазмената концентрация GSH е в микромолярни стойности и представлява приблизително 0.4% от GSH в кръвта (Lochman et al., 2003). Намаляване на нивата на редуцирания глутатион се счита за достоверен маркер за установяване на ОС. Значително намаление на концентрацията на GSH се наблюдава след изпълнение на максимален стъпаловиден тест до отказ (модифициран протокол на Bruce) (Elokda et al., 2005), след остър плувен тест (Nikolaidis et al., 2007) и др. Това намаляване на концентрацията на GSH е съпроводено с увеличаване на концентрацията окислен глутатион (GSSG) и без промяна на концентрация на общия глутатион (Bloomer et al., 2005; Marin et al., 1990). В съответствие с последната констатация в проведеното изследване не бяха наблюдавани промени в нивата на общия GSH в плазмата на борците преди преизчисляване на резултатите в съответствие със степента на хемоконцентрацията. Когато обаче хемоконцентрацията беше взета под внимание се

установени значително намаление на общия GSH. Ето защо, може да се заключи, че изпълнението на максималния аеробен тест до отказ води до индуциране ОС. Оксидативните промени в индикаторните биомолекули се установяват трудно поради наличието на естествени механизми за антиоксидантна защита. За да се проявят тези промени изследваните показатели трябва да се корегират получените данни спрямо промените в плазмения обем. Така, като се вземе предвид хемоконцентрацията, се установява достоверно намаление на нивото на GSH като индекс за оксидативен стрес. Коригирането на стойностите на маркерите за оксидативен стрес би следвало да се направи в съответствие с промяната на белтъчната концентрация в кръвната плазма, като най-чувствителна променлива.

#### **Промени в еритроцитния оксидативен статус след изпълнение на максимален аеробен тест до отказ**

Основната функция на еритроцитите е снабдяването клетките с кислород за осъществяване на аеробния метаболизъм при животните и човека. В тази си роля те се намират в постоянен контакт с кислорода и са подложени на действието на АФК. Основен източник на АФК в червените кръвни клетки е автоокислението на оксигемоглобина до метхемоглобин (Rifkind et al., 2003; Winterbourn, 1983). В допълнение еритроцитите могат да бъдат атакувани от АФК като водороден пероксид ( $H_2O_2$ ) и азотен оксид (NO), генерирани в кръвната плазма. Червените кръвни клетки са задълбочено изследвани както като източник на свободни радикали, така и като мишена за тяхното действие. До голяма степен това се определя от голямото разнообразие от фактори (вкл. лекарства и ксенобиотици), които могат да доведат до разрушаване на еритроцитите и да причинят хемолитична анемия (Winterbourn, 1983). При автоокислението на метхемоглобина се образуват супероксидни анион радикали ( $O_2^{\cdot-}$ ) с последващо образуване на водороден пероксид. Известно е, че скоростта на автоокисление нараства с намаляване на рН на средата и  $PO_2$  (Brown & Mebine, 1969; Rifkind et al., 2003). Скоростта на автоокисление на хемоглобина има необичайна „камбановидна“ зависимост от  $PO_2$ . Така, образуването на АФК от хемоглобина може да нарастне с намаляване на налягането на кислорода в капилярните и вените, свързано с извършване на физическа работа (Cooper et al., 2002). Редукцията на кислорода до супероксид, както и на нитрит до азотен оксид, при което се образува лабилна форма на азотния оксид, стартира каскади от окислителни реакции, които индуцират оксидативен стрес в еритроцитите и водят до тяхното увреждане (Rifkind et al., 2003).



Ин витро и ин vivo проучвания показват, че редица параметри на червените кръвни клетки могат да бъдат засегнати от оксидативния стрес като нарушаване на структурата и функциите на еритроцитната мембрана чрез окислителни модификации на липиди и протеини (Pandey & Rizvi, 2009), включително дезактивация на мембранно-свързаните рецептори и ензими (Halliwell & Gutteridge, 2007), йонен транспорт (Maridonneau et al., 1983) и др.

За справяне с АФК и предпазване от тяхното увреждащо действие червените кръвни клетки са снабдени с добре организирана защитна система. Тя съдържа антиоксидантните ензими: супероксид дисмутаза (Cu,Zn-SOD), каталаза (CAT) и глутатион пероксидаза (GPx). Установено е, че при хората активността на тези ензими в еритроцитите са по-високи, отколкото в повечето други тъкани на организма (Spasic, 1993). В допълнение на ензимните антиоксиданти в червените кръвни клетки действат и неензимни антиоксиданти като токоферол, аскорбат, урати и глутатион (Aguiló et al., 2005). Показано е, че при патологични състояния с ОС етиология, GSH се изчерпва и възстановяването му в еритроцитите има благоприятен терапевтичен ефект (Pace et al., 2003; Foschino Barbaro et al., 2005).

Добре известно е, че в човешките еритроцитите липсва ядро, митохондрии и други органели. Предполага се, че липсата на ядро и митохондрии е адаптивна реакция за намаляване на генерирането на АФК (Zhang et al., 2011). Липсата на ядро от друга страна лишава червените кръвни клетки от възможността за де ново синтез на белтъци, вкл. антиоксидантни ензими. Може хипотетично да се предполага, че продуктите на окислителните реакции активират ензимите, а те от своя страна да са взаимосвързани и да действат координирано. Ензимите обаче, независимо, че изпълняват антиоксидантни функции, могат да бъдат инхибирани от АФК и да изгубят способността си да защитават клетката от оксидативни увреждания.

Получените в настоящата работа резултати показват наличие на значително количество хемоглобин в плазмени проби кръв, взети непосредствено след изпълнение на максималния аеробен тест до отказ (Фигура. 4.8). Установеното двукратно увеличение на плазмения хемоглобинът може да се обясни с вътресъдова хемолиза, настъпила вседствие изпълнението на  $VO_2\max$  теста. Подобна хемолиза при спортисти е описана от редица автори, предимно при продължителни аеробни физически натоварвания със субмаксимална интензивност (O'Toole et al., 1988; Selby & Eichner, 1986; Wolf et al., 1987; Kehat et al., 2003). Според литературните данни този хемолиза

води до повишаване на обмяната на еритроцитите (Smith et al., 1995) и дори се разглежда от някои автори като една от причините за анемия при спортисти (Smith et al., 1995; Selby & Eichner, 1986; Bonilla et al., 2005). Хемолизата може да се дължи на различни фактори като например „shear” стрес (стрес, дължащ се на вътресъдово триене), температура, осмотични промени и промени в рН на средата (Sowemimo-Coker, 2002; Hanzawa et al., 1999). Важен фактор за хемолизата на червените кръвни клетки е оксидативният стрес, причинен от възникване на дисбаланс между тяхната защитна антиоксидантна система и генерирането на свободни радикали (Iuchi, 2012).

Въпреки, че се приема, че липидите са най-уязвими към въздействието на АФК, е установено, че в еритроцитите мембранните липиди не са най-чувствителните към ОС молекули. Има доказателства, че по време на тренировки за издръжливост, молекулите на хемоглобина претърпяват окислителни модификации, които инициират генериране на АФК. Те от своя страна предизвикат последващо белтъчно окисление (Vollaard et al., 2005) в еритроцитните мембрани. Белтъците в скелета на еритроцитите мембрана (наред с актин, ивица 4.1, гликофорин С и някои други минорни протеини) включват спектрин (Takeuchi et al., 1998). Този белтък е основната съставка на мембрания скелет. Представява димер, свързан в мрежа, обхващаща цялата цитоплазмена повърхността на еритроцитите мембрана (Takeuchi et al., 1998). Спектрин е от съществено значение за поддържане на формата и обратимата способност за деформация на еритроцитите, както и структурната цялост на клетката. В допълнение спектин участва в контрола на латералната мобилност на интегралните мембранны белтъци (Goodman & Shiffer, 1983). Показано е, че спектрин е много по-податлив на ОС (Yusof et al., 2007; Beneke et al. 2005) в сравнение с други биомолекули. Следователно увеличеното ниво на окислително модифициран спектрин може да се приеме като подходящ маркер за окислително увреждане на червените кръвни клетки при физически натоварвания. Окисленият спектрин се насочва бързо за разграждане, което води до намаляване на плътността на еритроцитната мембрана и нейната деформируемост. Такива еритроцити на свой ред се подлагат на бързо селективно разграждане. Установена е статистически достоверна отрицателна корелация между наличния в мембраната спектин и чувствителността към осмотична хемолиза (Yusof et al., 2007). Следователно хемолизата, предизвикана от физически упражнения, е свързана с промени в структурата на еритроцитите мембранны белтъци, индуцирани от развитието на ОС.

Въпреки, че спектрин са най-чувствителни молекули към ОС в червените кръвни клетки, няколко изследователи установяват развитие на ЛПО след изпълнение на физически упражнения чрез увеличение на концентрацията на MDA, особено при хора, които не се занимават със спорт и водят заседнал начин на живот (Miyazaki et al., 2001). При изследваните в настоящата работа неспортущащи също бяха установени увеличени нива на ЛПО (Фигура.4.1). При активни спортисти обаче, нашите резултати, като и на други учени (Dane et al., 2008), показват, намаляване или липса на промяна в нивата на липидната пероксидация. Това наблюдение изглежда парадоксално, поради увеличеното потребление на кислород по време на физическото натоварване и податливостта на ненаситените мастни киселини към оксидативни модификации. Въпреки това, в активни спортисти, поради ускорената обмяна на еритроцитите (както бе обсъдено по-горе) и засиленото разрушаване на старите и окислително модифицирани еритроцити, в кръвта преобладават млади червени кръвни клетки, които са по-устойчиви на окислителни въздействия.

Устойчивостта на еритроцитната мембрана зависи и от наличните в еритроцитите антиоксидантни ензими. Червените кръвни клетки съдържат сложна антиоксидантна защитна система, която включва ензими като каталаза, супероксид дисмутаза и глутатион пероксидаза и нискомолекулните неензимни антиоксиданти като токофероли, аскорбат, урея и глутатион (Aguiló et al., 2005).

Данните в литературата по отношение на промени в активността на антиоксидантни ензими са различни в зависимост от експерименталния протокол. При бегачи на дълги разстояния изпълнението на остро натоварване (приложено тредмил тест с продължителност до достигане на 80-90% от максималната сърдечна честота на изследваното лице и спиране след 5 мин) не се наблюдават промени в активността на еритроцитните SOD и GPX (Dane et al., 2008). Подобни резултати са получени от Miyazaki и сътр. (2001) при изследване на неспортущащи мъже, включени в 12-седмична тренировъчна програма. При тях, прилагането на единично натоварване до отказ на велоергометър, не променя показанията за активността на GPX, SOD и CAT. Изпълнението на стъпаловиден тест до отказ от елитни състезатели с използване на велоергометър Monark, е довело до значително увеличение на SOD и CAT в еритроцитни хемолізати (Hubner-Wozniak et al., 1993). Нашите резултати показват намаляване на активността на CAT и увеличаване на активността на GPX; SOD активността остава непроменена в еритроцити на борци след изпълнение на единичен

VO<sub>2</sub>max тест. Непроменена активност на SOD е установена също в еритроцити на скоростни къркьори непосредствено след изпълнение на стъпаловиден тест до отказ (Panczenko-Kresowska et al., 1991). Установената увеличена активност на GPX, може да се дължи на индуцирането на този ензим в еритроцити от продуктите от липидна пероксидация, индуцирана от физическото натоварване (Zavodnik et al., 1998). Има данни, че GPX елиминира генерирания H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в еритроцитите много по-ефективно от CAT (Agar et al., 1986). Вероятно ролята на еритроцитната CAT е свързана преди всичко с обезвреждане на високи концентрации екзогенен H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (например, в области на възпаление). Предполага се, че активността на антиоксидантните ензими след изпълнение на физическа работа зависи от активността им в покой (Tauler et al., 2005). Трябва да се има в предвид обаче, че са установени големи различия в стойностите за активността на еритроцитните SOD, GPX и CAT при здрави индивиди (Bogdanska et al., 2003). В допълнение, тренировките за издръжливост могат да променят активностите на еритроцитните антиоксидантни ензими в покой. Като цяло, в еритроцитите на спортисти са установени по-високи стойности за активността на антиоксидантните ензими в сравнение с тези при хора, които не се занимават активно със спорт (Djordjevic et al., 2011). Макар и статистически недостоверно, ние също установяваме по-висока активност на SOD в покои при джудистите ( $1988.14 \pm 432.35$  U/g Hb) в сравнение с неспортуващите контроли ( $1872.9 \pm 584.18$  U/g Hb) (Фигура. 4.2.). Ето защо не би трябвало да се очаква значителна промяна в активността на антиоксидантните ензими при добре тренирани спортисти.

Един от най-важните неензимни антиоксиданти в клетката е глутатион, както поради високата му концентрация в клетката, така и поради голямата му редуцираща силата и функцията му като кофактор на глутатионовите ензими (Kidd, 1997). В нашето проучване не установихме статистически достоверни промени в нивата на GSH. Добре известно е, че изчерпването на редуцирания глутатион в организма е надежден маркер за развитието на ОС. Изпълнението на VO<sub>2</sub>max тест по модифицирания протокол на Bruce от неспортуващи води до значително намаляване в нивата на GSH в сравнение с изходните стойности в покой като отговор на физическото натоварване (Elokda et al., 2005). Но при баскетболисти (състезатели от Полския национален отбор по баскетбол) след провеждане на максимален аеробен тест не е наблюдавано намаление на концентрацията на GSH (Szcześniak et al., 1998). Вероятно, изпълнението на VO<sub>2</sub>max тест с продължителност от около 12 минути (като в това изследване) не е достатъчно за

индуциране на оксидативен стрес при спортисти. Това заключение се основава на двете констатации: намаляване на нивата на TBARS и липса на промяна в нивата на глутатион. Предполага се, че степента на оксидативен стрес, индуциран от аеробни упражнения, може да бъде време-зависима. Според Fisher-Wellman & Bloomer (2009) субмаксималните и максималните аеробни натоварвания трябва да бъдат с времетраене най-малко 30 минути, за да предизвикат значителни АФК-медиирани увреждания (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009). В допълнение на посочените в литературата завишени активности на антиоксидантните ензими в еритроцитите, както и увеличеният общ антиоксидантен капацитет на плазмата (Alexandrova et al., 2016) при спортисти, вероятно също имат значение за бързото неутрализиране на АФК и предотвратява развитието на ОС. Ускореният обмен на еритроцитите, предизвикан от физически натоварвания, също допринася за повишената им устойчивост към окислително увреждане, тъй като старите и окислително модифицирани клетки се елиминират бързо, а остават преимуществено в кръвния поток младите и здравите клетки.

В настоящата работа са изследвани и нивата на мед и цинк в кръвната плазма, тъй като те са кофактори на SOD. И други метални йони имат такава функция, напр. желязото е кофактор на CAT, а селенът е кофактор на GPx. Така, наличието на достатъчни количества от тези метали в организма играе важна роля в антиоксидантната защита, тъй като те влияят на активността на съответните ензими. Въпреки това желязните и медни йони могат да действат като прооксиданти, катализиращи образуването на хидроксилни радикали ( $\cdot\text{OH}$ ) от супероксидни аниони радикали ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) и водороден пероксид ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Halliwell and Gutteridge, 2007).

В молекулата на Cu,Zn-SOD в каталитичната активност участва пряко  $\text{Cu}^{2+}$ , докато  $\text{Zn}^{2+}$  има структурна, стабилизираща роля. SOD се приема като един от най-важните антиоксидантни ензими, но неговото действие трябва да бъде спрегнато с това и на другите два ензима CAT и GPX. SOD катализира превръщането на супероксидните радикали в  $\text{H}_2\text{O}_2$ , чието разграждане до безвредни кислород и вода може да бъде осигурено от каталитичното действие на GPx или CAT. В случай на невъзможност да се премахне  $\text{H}_2\text{O}_2$ , той може да взаимодейства с метални йони и генериране на високо реактивни  $\text{OH}$  радикали. Затова поддържането на баланса на тези микроелементи е от решаващо значение, тъй като и двете състояния дефицит и излишък могат да имат негативни последици.

Резултатите в настоящата работа установяват по-високи изходни нива на изследваните метали при спортистите. След изпълнение на  $\text{VO}_{2\text{max}}$  теста не бяха наблюдавани достоверни промени в концентрацията на мед и цинк в плазма на спортистите; в групата от нетрениращите, обаче беше отчетена увеличена концентрация и на медта и на цинка спрямо нивата в покой.

Медта освен като кофактор на Cu,Zn-SOD участва в състава на редица други ензими и антиоксиданти като по този начин има съществена роля в широк спектър от физиологични функции особено важни за спортистите (Gropper et al., 2003). Така например медта е кофактор на цитохром с оксидазата, крайният ензим в електронтранспортната верига в митохондриите и следователно е от решаващо значение за енергообезпечаването на клетката и организма като цяло. Лизил оксидазата, друг мед-зависим ензим, е необходим за омрежване на еластина и колагена, за предаване на сила на съединителната тъкан, особено в сърдечносъдовата и дихателната системи. Медта оказва влияние върху неврологичните функции като кофактор в няколко ензими, участващи в синтеза на невротрансмитери и хормони, включително норадреналин. Така хранителните добавки със съдържание на мед биват препоръчвани на спортисти за подобряване на общото им състояние и по-добро възстановяване. Това е необходимо, тъй като при спортисти се наблюдава по-бързо освобождаване на този метал, най-вече чрез отделената пот по време на интензивните физически натоварвания. Загубата на мед чрез потта при мъжете по време на тренировка са изчислени на  $7.7 \pm 3.0 \mu\text{mol/L}$  в сравнение с  $0.9 \mu\text{mol/ден}$  за нетрениращи (Johnson et al., 1999).

Вероятно има връзка между вида спорт (аеробен, анаеробен или смесен) и нивата на мед и цинк като биохимични индекси на антиоксидантния статус на атлети. Направено е сравнение между три групи спортисти: 1) триатлонци и бегачи на дълги разстояния с висок аеробен импакт; 2) бегачи на къси разстояния с висок анаеробен импакт и 3) плувци на къси дистанции с нисък анаеробен импакт с проследяване на обема на „пакетираните“ червени кръвни клетки (PCV, packed-cell volume), концентрация на хемоглобина в кръвта; мед и цинк в плазма и еритроцити; церулоплазмин в плазмата; супероксид дисмутазна активност и металотионенин (богат на цистеин протеин, ловител на свободни радикали, свързан с клетъчния цинков метаболизъм и хомеостаза) в еритроцитите; както и осмотична чупливост на еритроцитите (Koury et al., 2004). Бегачите на дълги разстояния с преимуществено

аеробно енергообезпечаване имали по-добри показатели по отношение на индексите на антиоксидантна защита (като по-високи нива на Zn в еритроцитите, по-висока SOD активност, и по-голямо съдържание на металотионеин) в сравнение с тези на бегачите на къси разстояния. Това предполага, наличие на адаптация на антиоксидантния капацит в зависимост от енергетичната специфика на натоварването. Статистически значими корелации са били наблюдавани при всички спортисти между концентрацията на цинк в еритроцитите и активността на супероксид дисмутаза, което е в съответствие със структурната и регулаторна роля на цинка в този ензим. Това подсказва, че един адекватен цинков статус е необходимо условие за гарантиране на протективното действие на еритроцитната SOD спрямо увеличеното генериране на  $O_2^{\cdot-}$  при физически натоварвания. Такава право пропорционална зависимост е наблюдавана и между цинка и металотионеините и съответно способността на последните за неутрализиране на АФК.

Необходими са допълнителни изследвания за връзката между активността на антиоксидантни ензими и нивото на техните метални кофактори, както и тяхното въздействие върху работоспособността на спортистите. Познанията, свързани с определяне на подходящите концентрации на металите за доброто функциониране на организма като цяло и оттам за адекватна намеса при недостиг или излишък може да съдейства за повишаване на функционалните възможности на спортистите и да доведе до постигане на по-високи спортни успехи.

## ИЗВОДИ

1. Хемоконцентрацията, предизвикана от интензивните физически натоварвания оказва влияние върху интерпретацията на биохимичните параметри в кръв.
2. Интензивните аеробни натоварвания (като  $VO_{2max}$  теста) предизвикват вътресъдова хемолиза.
3. Нивата на липидна пероксидация зависят от степента на тренираност на спортистите.
4. Общият антиоксидантен капацитет в кръвната плазма е значително увеличен при добре тренирани спортисти.
5. Кратки по продължителност аеробни натоварвания (около 15 мин.) не предизвикват индуцирани от оксидативен стрес клетъчни увреждания при спортисти, независимо от интензивността на тренировката.

6. При спортисти се установява по-добра ензимна антиоксидантна защита (по-висока активност на SOD) в сравнение с тези при хора, които не се занимават активно със спорт.

7. Интензивните физически натоварвания активират ензимната антиоксидантна защита (по-висока активност на GPX).

8. Голямата дисперсията в активността на изследваните ензими не позволява да се установят стандарти за практическо използване на тези параметри без наличие на "собствени референтни стойности" за всяко изследвано лице.

В обобщение може да се каже, че промените в оксидативния статус на спортистите зависи от степента на тяхната работоспособност. При високо тренираните спортисти, индуцираните от интензивните физически натоварвания прооксидативни процеси се компенсират от добре развита антиоксидантна защита. Добре развитата антиоксидантна защита е резултат от адаптационните изменения в организма на спортистите в резултат на регулярните тренировъчни въздействия.

### **ПРЕПОРЪКИ**

1. При изчисляването на биохимичните параметри в кръв трябва да се правят корекции с цел правилното интерпретиране на получените резултати, тъй като промените в обема на плазмата след интензивни физически натоварвания са значителни.

2. Коригирането на стойностите на маркерите за оксидативен стрес да се прави в съответствие с промяната на белтъчната концентрация в кръвната плазма, като най-чувствителна променлива.

3. Определяне на "собствени референтни стойности" за всяко изследвано лице по отношение на активността на антиоксидантните ензими.

### **ПРИНОСИ**

Основният принос на настоящата работа е комплексното изследване на про- и антиоксидантните отговори на организма в кръвна плазма и еритроцити на спортисти след прилагане на интензивно аеробно натоварване.



***Публикации във връзка с дисертационния труд***

1. **Eroglu Y**, Daglioglu O. The effect of submaximal exercise on oxidant and antioxidant mechanisms in judokas and sedentary. International Journal of Sport Studies, 2013; 3(5):480-486.
2. **Eroglu Y**. Oxidative stress in exercise training and role of antioxidants. Sports and Science, 2015; 5: 126-130
3. Alexandrova A, **Eroglu Y**, Petrov L, Makaveev R, Georgieva A, Tzvetanova E. Blood plasma oxidative stress parameters after maximal oxygen uptake test in wrestlers. International Journal of Sport Studies, 2016; 6(6):359-366.