

# UTICAJ FIZIČKE AKTIVNOSTI NA STEPEN HROMOZOMSKIH ABERACIJA

**Gordana Šošić**, Klinički centar Kragujevac, Klinika za ginekologiju i akušerstvo, Odsek za citogenetska ispitivanja

**Mirjana Varjačić**, Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Ginekologija i akušerstvo / Klinički centar Kragujevac, Klinika za ginekologiju i akušerstvo

## Sažetak

Tokom života ljudi su konstantno izloženi hemikalijama i agensima iz egzogenih i endogenih izvora koji putem reakcije sa molekulom DNA mogu dovesti do oštećenja genoma i genomske nestabilnosti. Formiranje mikronukleusa predstavlja posledicu nastalih hromozomskih aberacija uzrokovanih dejstvom različitih genetskih i sredinskih faktora. Mikronukleusi su citoplazmatske hromatinske mase sa izgledom malih jedara i mogu poticati od celih hromozoma ili od delova hromozoma. Mikronukleus test (MN test) se koristi za detekciju genotoksičnog efekta različitih hemijskih, fizičkih i bioloških mutagena kao i test za određivanje hromozomske nestabilnosti u različitim tipovima ćelija. Frekvencija mikronukleusa je direktno proporcionalna stepenu hromozomskih aberacija. Dokazano je da oštećenje genoma može nastati kao posledica sredinske izloženosti genotoksinima i medicinskim procedurama, usled deficijencije mikronutricijenata i pod uticajem različitih životnih navika i genetskih faktora. Nebalansirana ishrana, nedostatak fizičkog vežbanja, nedovoljno sna i prekovremeni rad doprinose statistički značajno povećanoj frekvenciji mikronukleusa. Takođe je pokazano da naporno vežbanje dovodi do oštećenja DNK, što rezultira formiranjem mikronukleusa. S obzirom na to da profesionalni sportisti sprovode visoko intenzivne fizičke treninge, ova populacija spada u rizičnu grupu za nastanak genomske nestabilnosti i karcinogenezu. Zdrav način života, optimalni unos antioksidanasa i redovna umerena fizička aktivnost značajno redukuju frekvenciju mikronukleusa, odnosno doprinose stabilnosti genoma.

**Ključne reči:** hromozomske aberacije, mikronukleus, MN test, fizičko vežbanje

## THE IMPACT OF PHYSICAL ACTIVITY ON THE LEVEL OF CHROMOSOME ABERRATIONS

### Abstract

During the lifetime, people are constantly exposed to the chemicals and agents of exogenic and endogenic sources, which through reaction with a molecule of DNA can cause the damage of genomes and their instability. The formation of micronuclei is a consequence of chromosomal aberrations caused by the influence of different genetic and environmental factors. Micronuclei are cytoplasmic chromatin masses that look like small nuclei and can originate from whole or parts of chromosomes. Micronucleus test (MN test) is used to detect genotoxic effects of various chemical, physical or biological mutagens, as well as the test for determination of chromosomal instability in a

variety of cell types. Micronucleus frequency is directly proportional to the degree of chromosomal aberrations. It has been shown that genome damage may occur as a result of environmental exposure to genotoxins and medical procedures, due to deficiency of micronutrients and under the influence of various lifestyles and genetic factors. Unbalanced diet, lack of physical exercise, lack of sleep and overwork contribute significantly to increased frequency of micronuclei. It was also shown that strenuous exercise causes DNA damage, which results in the formation of micronuclei. As a professional athlete conduct highly Intensive physical training, these populations are at risk for the development of genomic instability and carcinogenesis. A healthy lifestyle, the optimal intake of antioxidants and regular moderate physical activity significantly reduced the frequency of micronuclei, and contribute to the stability of the genome.

**Keywords:** Chromosome aberrations, Micronuclei, MN test, Physical exercise

TIMS Acta (2015) 9, 49-61

## Uvod

Fizička aktivnost predstavlja oblik telesnog kretanja koji je povezan sa značajnim metaboličkim zahtevima. Vežbanje je poseban oblik fizičke aktivnosti koja je planirana ili organizovana sa ciljem povećanja ili održavanja komponenti fizičke kondicije. Ljudski genom se kroz dugu evoluciju prilagodio određenom stepenu fizičke aktivnosti koja je neophodna za održavanje metaboličkih puteva koji omogućavaju pravilno funkcionisanje i stabilnost organizma. Zato se fizička aktivnost može smatrati prirodnim modulatorom genske ekspresije, odnosno faktorom koji održava zdravlje iznad praga kliničkog oboljenja (Živanić & Dikić, 2008).

Ovaj rad bavi se pregledom nekim od dosadašnjih saznanja koja objašnjavaju na koji način fizička aktivnost utiče na genom, pre svega na hromozomske aberacije, odnosno kakav je efekat fizičke aktivnosti različitog trajanja i intenziteta na stabilnost genoma.

Oštećenje genoma predstavlja jedan od najvažnijih fundamentalnih uzroka degenerativnih i razvojnih bolesti. Mutageni predstavljaju faktore koji u sadejstvu sa molekulom DNK izazivaju genske mutacije (promene u strukturi gena) i hromozomske aberacije (promene u broju i strukturi hromozoma). Brojne studije su pokazale da su ljudi tokom života konstantno izloženi mutagenima iz egzogenih i endogenih izvora, koji putem reakcije sa molekulom DNK mogu dovesti do

**Tabela 1.** Primeri egzogenih i endogenih mutagena (Holland et al., 2008).

EGZOGENI MUTAGENI	ENDOGENI MUTAGENI
<b>Medicinske procedure:</b> - zračna terapija - hemioterapija - lekovi	<b>Produkti metabolizma</b> - reaktivne kiseonične vrste (ROS) - reaktivne azotne vrste (RNS)
<b>Deficijencija mikronutricijenata:</b> - npr. folata	
<b>Životne navike:</b> - pušenje - konzumacija alkohola - upotreba droga - stres	<b>Genetski faktori:</b> - nasleđeni defekti u metabolizmu i reper-mehanizmima molekule DNK
<b>Sredinski genotoksini:</b> - zagađenje vazduha	Imunski sistem

genomske nestabilnosti, što za posledicu može imati nastanak hromozonskih aberacija. Kao posledica hromozomske nestabilnosti nastale pod dejstvom različitih genetskih i sredinskih faktora može doći do formiranja mikronukleusa (Veerachari, Venkatesh, Yadav, & Narayanappa, 2011).

Svakodnevno, u svakoj ćeliji organizma, nastaje na hiljade potencijalnih mutagenih oštećenja DNK. Naši urođeni reper-mehanizmi efikasno popravljaju ova oštećenja različitim putevima: fotoreaktivacijom, isecanjem baza, isecanjem nukleotida, transferom metil grupe, sparivanjem loše uparenih nukleotida, popravkom jednolančanih i dvolančanih prekida DNK itd. (Rao, 2009; Čavić, 2012). Mehanizmi reparacije DNK su veoma slični i uključuju 4 osnovna koraka: prepoznavanje deformacije heliksa DNK, popravku oštećenog dela različitim mehanizmima (isecanjem nukleotida endonukleazom, isecanjem baza DNK glikozilazom, ispravke pogrešnog uparivanja baza, popravke u vezi sa transkripcijom), popunjavanje praznine u lancu DNK sintezom novog lanca uz pomoć DNK polimeraze na osnovu neoštećenog lanca DNK kao matrice i spajanje nosivog lanca sa preostalim delom DNK pomoću DNK ligaze (Lieberman, Marks, & Smith 2008; Rao, 2009)

Od različitih formi oštećenja DNK najopasniji su prekidi duplog heliksa DNA (DSBs), koji nastaju kada se dva komplementarna lanca simultano prekinu na približno istim mestima. Ukoliko se desi da se neki od DSBs ne poprave, deo njih formira mikronukleuse.

Mikronukleusi predstavljaju citoplazmatske hromatinske mase sa izgledom malih jedara, koji nastaju tokom metafaze/anafaze ćelijskog ciklusa. Pod dejstvom klastrogenih agenasa, koji vrše prekide hromozoma, nastaju mikronukleusi koji se sastoje od acentričnih fragmenata, dok usled dejstva aneugeničnih agenasa, koji remete pravilnu segregaciju hromozoma, nastaju mikronukleusi koji se sastoje od celih hromozoma (Milošević-Đorđević, 2010). Mikronukleus predstavlja deo hromatinskog materijala koji se ne inkorporira u jedro jedne od ćerki ćelija tokom ćelijske deobe, i na stadijumu telofaze se eliminiše iz nukleusa.

U cilju detekcije prisustva i određivanja frekvence mikronukleusa u različitim tipovima ćelija koristi se mikronukleus test (MN test) koji predstavlja brz test za detekciju genotoksičnog efekta različitih

hemijskih, fizičkih i bioloških mutagena, kao i test za određivanje hromozomske nestabilnosti. MN test detektuje genomsku nestabilnost, uključujući prekide hromozoma, gubitke delova i rearanžmane hromozoma, amplifikaciju gena i nerazdvajanje hromozoma. Prisustvo mikronukleusa je pokazatelj hromozonskih aberacija, a frekvencija mikronukleusa direktno je proporcionalna stepenu hromozonskih aberacija (Wagner, Reichhold, & Neubauer, 2011).

Kvantifikacija mikronukleusa može se vršiti na različitim tipovima humanih ćelija, *in vivo*, bez dodatne kultivacije (limfociti, fibroblasti ili ekfolijativne epitelne ćelije) ili *in vitro*, kultivacijom limfocita periferne krvi (*cytokinesis-blocked micronucleus assay, CBMN assay*). Mikronukleusi su prisutni kod ljudi kao spontano nastali, u normalnom opsegu od 0 do 12 MN na 1000 binuklearnih limfocita periferne krvi, odnosno 0,5-2,5 MN na 1000 ćelija bukalne sluznice (Nefic, Musanovic, Kurteshi, Prutina, & Turcalo, 2013). U rutinskom radu frekvencija mikronukleusa se najčešće određuje na ćelijama organizama izloženih jonizujućem zračenju, kada ima klinički značaj, jer predstavlja biološki dozimetar ozračenosti organizma.

Cilj ovog rada je da osim kratkog pregleda studija koje su dosada proučavale uticaj različitih egzogenih i endogenih faktora na promenu frekvencije mikronukleusa, prikaže i dosadašnja saznanja o uticaju fizičke aktivnosti na stepen hromozonskih aberacija.

### **Uticaj egzogenih i endogenih faktora na frekvenciju mikronukleusa**

Promena frekvencije mikronukleusa je praćena u različitim studijama u zavisnosti od pola, godina života, životnih navika, faktora domaćina, stepena izloženosti mutagenima radne i životne okoline, načina ishrane i telesnog vežbanja, zdravstvenog statusa itd.

Studije su pokazale da među polovima postoje različite frekvencije mikronukleusa u limfocitima periferne krvi i da je frekvencija kod žena viša u odnosu na muškarce, što se tumači gubitkom jednog od X hromozoma putem mikronukleusa (Bonassi et al., 2001; Kopjar et al., 2010). Nasuprot ovakvim nalazima, studije na ćelijama bukalne sluznice navode da ne postoje statistički značajna razlika

u frekvencama mikronukleusa među polovima (Bonassi et al., 2011).

Poznato je da sa starenjem dolazi do smanjene reparativne sposobnosti ćelija da reaguju na oštećenja DNK, što može dovesti do povećane učestalosti hromozomski aberacija, a time i do povećane frekvence mikronukleusa, kako u limfocitima periferne krvi, tako i u ćelijama bukalne sluznice. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) pokazala je da se sa starenjem najčešće gube polni hromozomi (kod žena X, kod muškaraca Y hromozom) od kojih se tada mogu formirati mikronukleusi (Ishikawa, Tian & Yamauchi, 2003; Kopjar et al., 2010; Nefic & Handzic, 2013; Bonassi et al., 2011; Nefic et al., 2013).

Načini života i navike (pušenje, alkohol, dijeta sa deficijencijom vitamina i suplemenata) dovode do povećane frekvence mikronukleusa (Holland et al., 2008). Genotoksični efekat duvanskog dima objašnjava se dejstvom benzopirena koji je njegova sastavna komponenta (Ishikawa et al., 2003), tako da je frekvencija mikronukleusa u ćelijama bukalne sluznice i u limfocitima

periferne krvi kod pušača utrostručena u odnosu na nepušače. Zapažen je i značajan sinergistički efekat alkohola i duvana, koji dovodi do porasta frekvence mikronukleusa od oko 5,5 puta u odnosu na nepušače i antialkoholičare (Holland et al., 2008).

Istraživanja pokazuju da osobe koje svakodnevno konzumiraju voće i zeleno povrće imaju nižu frekvenciju mikronukleusa u odnosu na osobe koje u svojoj ishrani ne koriste ove namirnice (Bonassi et al., 2011). Visoke koncentracije određenih mikronutricijenata koji se dodaju ishrani (vitamin E, retinol, folati, nikotinska kiselina, kalcijum, riboflavin, pantotenska kiselina i biotin) kod zdravih osoba povezani su sa značajnom redukcijom mikronukleusa (Fenech, 2010). Brojni mikronutricijenti su kofaktori enzima ili ulaze u strukturu proteina uključenih u sintezu i reparaciju DNK, prevenciju oksidativnog oštećenja DNK i održavanje metilacije DNK. Antioksidanti kao što su cink, vitamin C, vitamin E su značajni u prevenciji oksidativnog oštećenja DNK; folati preveniraju inkorporaciju uracila u DNK; metionin, holin, folati, vitamin B12 održavaju metilaciju DNK; cink, magnezijum

**Tabela 2.** Promene u bazalnoj frekvenci MN kao posledica određenih bolesti i stanja proučavana u različitim studijama

Pacijenti	Tip ćelija korišćen u MN testu	Frekvencija mikronukleusa	Studija (autori)
<i>Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) ili HPV +</i>	Ćelije skvamoznog epitela	porast	Findri Guštek, Oreščanin, Kopjar, Mlinarić-Missoni, Fistončić, & Krivak, 2013
Carcinoma mammae Carcinoma pulmonis Carcinoma cervicis uteri	Ćelije bukalne sluznice	Značajan porast	Nersesyan, Vardazaryan, Gevorgyan, & Arutyunyan, 2002
Lymphoma, Non-Hodgkin	Ćelije bukalne sluznice	Značajan porast	Nersesyan, Vardazaryan, Gevorgyan, & Arutyunyan, 2002
Gojazna deca	Limfociti periferne krvi	Porast	Andreassi, Barale, Lozzo, & Picano, 2011; Scarpato, Verola, Fabiani, Bianchi, Saggesse & Federico, 2011
Diabetes Mellitus	Limfociti periferne krvi	Porast	Andreassi, Barale, Lozzo, & Picano, 2011
Kardiovaskularne bolesti	Limfociti periferne krvi	Porast	Andreassi, Barale, Lozzo, & Picano, 2011
Xeroderma pigmentosum	Ćelije skvamoznog epitela	Porast	Holland et al., 2008
Ataxia Telangiectasia	Ćelije bukalne sluznice	Nema porasta	Holland et al., 2008
Down Syndrome	Limfociti periferne krvi	Značajan porast	Holland et al., 2008

su kofaktori ili komponente DNK reparativnih enzima; niacin, folati su značajni u održavanju dužina telomera (Bull et al., 2014).

Folna kiselina, kao donor metil grupe, zajedno sa vitaminom B12, učestvuje u sintezi S-adenozil metionona koji je esencijalan za održavanje DNK metilacije i epigenetsku kontrolu ekspresije gena, kao i održavanje strukturnog integriteta centromernih i subtelomernih delova hromozoma i prevođenje dUMP u dTTP pri čemu se formira timin. U slučajevima deficijencije folata, timin se zamenjuje uracilom u molekulu DNK, što može dovesti do point mutacija, jednolančanih i dvolančanih prekida DNK, prekida hromozoma i formiranja mikronukleusa (Fenech, Aitken, & Rinaldi, 1998).

Nebalansirana ishrana, nedostatak fizičkog vežbanja (manje od dva puta nedeljno), nedovoljno sna (6 sati ili manje dnevno), prekovremeni rad (9 i više sati dnevno), doprinose statistički značajno povećanoj frekvenci mikronukleusa (Huang, Huang, Weng, Nakayama, & Morimoto, 2009).

Zapaženo je da je frekvencija mikronukleusa u pozitivnoj korelaciji sa opterećenom porodičnom anamnezom za oboljevanje od kancera. Kod obolelih od karcinoma dojke i uterusa i njihovih rođaka prisutan je porast frekvencije mikronukleusa u ćelijama bukalne sluznice, u odnosu na kontrolnu grupu (Nefic & Handzic, 2013).

Pored brojnih poznatih štetnih dejstava anaboličkih androgenih steroida (AAS) na organizam i organske sisteme u studijama koje su rađene na bodibilderima, koji su koristili AAS, zabeležen je porast frekvencije mikronukleusa, što pokazuje da dati lekovi poseduju i mutageni efekat (Torres-Bugarín et al., 2007).

### **Efekat fizičkog vežbanja na nastanak oksidativnog stresa**

Za obavljanje svih životnih procesa u organizmu živa bića zahtevaju kontinuirano snabdevanje energijom. Tokom intenzivnog treninga ove potrebe višestruko rastu. Nosilac energije u životinjskom svetu je molekul adenzin trifosfata (ATP), čije fosfoandiridne veze poseduju visoku energiju neophodnu za održavanje istovetno naelektrisanih fosfatnih grupa. Reakcijom razgradnje

ATP-a na ADP i AMP oslobađa se velika količina energije, a istovremeno se vrši i suprotna reakcija sinteze ATP-a. Pri mirovanju ili pri laganom i umerenom radu ATP se sintetise aerobnim putem, dok se anaerobnim procesima obezbeđuje energiju za početak fizičke aktivnosti i za mišićni rad visokog intenziteta (Živanić & Dikić, 2008).

Pri aerobnom radu, u prisustvu kiseonika, piruvat kao produkt razgradnje glukoze, ulazi u Krepsov ciklus u mitohondrijama, gde se oksidativnom fosforilacijom stvara ATP. Substrat aerobnog metabolizma mogu biti i masti pri čemu se dobija više energije, a izuzetno to mogu biti i proteini. Mera aerobne sposobnosti organizma je maksimalna potrošnja kiseonika  $(VO_2)_{max}$ , tj. količina kiseonika koja se utroši za stvaranje energije pri radu maksimalnog kapaciteta. Kod fizički aktivnih osoba  $(VO_2)_{max}$  je veća za 20-30% u odnosu na sedentarne osobe istog pola i starosne dobi (Živanić & Dikić, 2008).

Oko 70% dnevnih potreba za energijom dobijamo radom naših velikih organa (srce, mozak, bubreg i jetra), gde se na svaki mol potrošenog kiseonika sintetise 2,5 mola ATP-a (Lieberman, Marks, & Smith, 2008). Najveći deo kiseonika se koristi u respiratornom lancu mitohondrija za sintezu ATP-a (Banerjee, Mandal, Chanda, & Chakraborti, 2003). Tokom intenzivnog fizičkog vežbanja dolazi do značajnog porasta korišćenja kiseonika, kako u celom telu za 10-15 puta, tako i u mišićima za oko 100 puta (Gandhi & Gunjan, 2009; Sharma, Shailey, & Gandhi, 2012).

Reaktivne vrste (RS) predstavljaju heterogenu grupu koja se najvećim delom sastoji od slobodnih radikala, a u manjoj zastupljenosti su neradikalna jedinjenja poput vodonik peroksid ( $H_2O_2$ ) i peroksinitritni jon ( $ONOO^-$ ). U zavisnosti od atoma u aktivnom centru postoje: reaktivne kiseonične (ROS), reaktivne azotne (RNS), reaktivne ugljenikove (RCS) i reaktivne sumporne (RSS) vrste (Đukić, Ninković, & Jovanović, 2008).

Stvaranje ROS i RNS predstavlja normalan fiziološki proces (Brkić, Marić, Tomić, & Dimitrijević, 2010). Najveći deo slobodnih radikala je kiseoničnog porekla i nastaje u procesu oksidativne fosforilacije na nivou respiratornog lanca mitohondrija, nepotpunom redukcijom molekulskog kiseonika. Tokom tog procesa na svakih 25 molekula kiseonika, koji se redukuju u normalnom metabolizmu, stvara se jedan slobodni radikal (Banerjee et al., 2003). Elektroni koji učestvuju

u njihovom formiranju dobijaju se iz redukovanih prenosilaca elektrona respiratornog lanca. U procesu oksidativne fosforilacije tokom transporta elektrona duž respiratornog lanca mitohondrija, na nekim mestima dolazi do nepotpune redukcije kiseonika i stvaranja slobodnih radikala. Tako se na lokacijama prenosilaca elektrona gde veza sa slobodnim radikalima nije tako čvrsta (kao što je kompleks NADH-KoQ reduktaze) otpušta superoksidni radikal ( $O_2^-$ ) (Todorović, Stojanović, & Babić, 2002).

Ostala mesta nastanka kiseoničnih radikala mogu biti proces oksidativne hidrosilacije u mikrozomima, autooksidacija malih molekula, u toku fagocitoze u leukocitima, u procesu sinteze eikosanoida, kao produkti katalitičkih reakcija nekih enzima (uglavnom oksidaza) i u oksido-redukcionim reakcijama u prisustvu metala sa promenljivom valencom (Todorović, Stojanović, & Babić, 2002). Osim endogenim putem, slobodni radikali mogu nastati i egzogeno, pod dejstvom sredinskih polutanata ili u metabolizmu ksenobiotika (Đukić, Ninković, & Jovanović, 2008).

Slobodni radikali u svojoj spoljašnjoj orbitali poseduju jedan ili više nesparenih elektrona što ih čini visoko reaktivnim jedinjenjima koja inciraju lančane reakcije preuzimajući elektrone od susednih molekula, čime popunjavaju svoju orbitalu i time prelaze u stabilno stanje, a istovremeno stvaraju novi slobodni radikal, što čini da susedni molekuli postaju nestabilni i reaguju sa okolnim molekulima (Stanković & Radovanović, 2012). Pri ovim reakcijama sa biološkim molekulima (lipidima, proteinima i DNK) slobodni radikali izazivaju njihovu oksidaciju, što narušava strukture ovih molekula i uzrokuje njihova oštećenja (Lieberman, Marks, & Smith, 2008; Todorović, Stojanović, & Babić, 2002).

Organizam poseduje elemente antioksidativne zaštite: enzimske (superoksid-dismutazu (SOD), katalazu (CAT) i glutation-peroksidazu (GSH-Px), glutation-S transferazu (GST) i glutation reduktazu (GR)) i neenzimske (vitamin E, vitamin C, karoten, mokraćnu kiselinu i glutation) koji neutrališu slobodne radikale i time eliminišu njihov štetni uticaj na biološke makromolekule (Todorović, Stojanović, & Babić, 2002).

U niskim i srednjim koncentracijama ROS i RNS ostvaruju brojne fiziološke uloge u međučelijskoj komunikaciji, normalnom rastu ćelija, učešće u apoptozi

i ćelijskom starenju, u sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja, u modulaciji snage kontrakcije skeletnih mišića, indukciji migracije leukocita i antimikrobnoj aktivnosti fagocita itd. Međutim, njihov negativan efekat se ispoljava kada prevlada prooksidantno stanje u ćeliji u odnosu na antioksidantno, i tada je organizam u stanju oksidativnog stresa. Ovaj disbalans može nastati kada dođe do povećanog stvaranja slobodnih radikala, kada se smanje količine raspoloživih antioksidanasa ili kada se poveća potrošnja antioksidanasa (Brkić i dr., 2010; Stevanović i dr. 2012).

Tokom fizičke aktivnosti dolazi do porasta potrošnje kiseonika i povećanog stvaranja ROS u mitohondrijama mišića, jetre i srca (Sharma, Shailey, & Gandhi, 2012), što može biti uzrok oksidativnog stresa (Pešić i dr., 2009) i reakcije slobodnih radikala sa ćelijskim makromolekulima (lipidi, proteini, nukleinske kiseline).

Mogući izvori ROS koje nastaju tokom fizičkog vežbanja su: mitohondrijalni elektronski transportni lanac, ishemičko-reperfuzioni mehanizam, reakcije katalizovane ksantin oksidazom, autooksidacija kateholamina i aktivacija inflamatornih ćelija usled mišićno-tkivnog oštećenja (Gandhi, & Gunjan, 2009).

Osim stvaranja slobodnih radikala pri aerobnom treningu, oslobađanje slobodnih radikala moguće je i tokom prolazne hipoksije prisutne pri visoko intenzivnom aerobnom radu, kada dolazi do porasta  $H^+$ , koji može da reaguje sa superoksidnim anjonom što dovodi do nastanka reaktivnih kiseoničnih vrsta. Hipoksija može da dovede i do oslobađanja Fe ili Cu sa svojih normalnih transportera, tako da ovi metali mogu katalizovati reakcije slobodnih radikala (Banerjee et al., 2003).

Studije su pokazale da sportske aktivnosti i akutno naporno vežbanje značajno povećavaju vrednosti reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i reaktivnih azotnih vrsta (RNS) kod rukometaša, fudbalera, ragbista, hokejaša, bejzbol i softbol igrača (Sharma, Shailey, & Gandhi, 2012), koji nekada prelaze antioksidativne kapacitete organizma i mogu za posledicu imati oksidativno oštećenje DNK.



### Oksidativno oštećenje DNK

Kiseonični radikali (superoksidni  $O_2^{\cdot-}$ , hidroksilni  $OH^{\cdot}$ , peroksidni  $H_2O_2^{\cdot}$ ) predstavljaju glavni uzrok DNK oštećenja (Todorović, Stojanović, & Babić, 2002). Nivo oksidativnog oštećenja molekula DNK kod ljudi iz „prirodnih izvora“ je visok i iznosi  $1,5 \times 10^5$  produkata oksidativnog oštećenja po ćeliji, što predstavlja 0,005% od totalnog broja nukleotida u humanom genomu (Gandhi, & Gunjan, 2009).

Rezultat oksidativnog stresa može biti oštećenje bilo koje komponente DNK, tj. bilo koje azotne baze ili šećerno-fosfatnog lanca. Identifikovano je oko 100 tipova oksidativno izmenjenih DNK (Đukić, Ninković, & Jovanović, 2008). Radikali pirimidina i purina daju veći broj modifikovanih baza u molekulu DNK, kao što su 5-OH citidin, hipoksantin, timin glikol itd., putem različitih mehanizama (Rao, 2009).

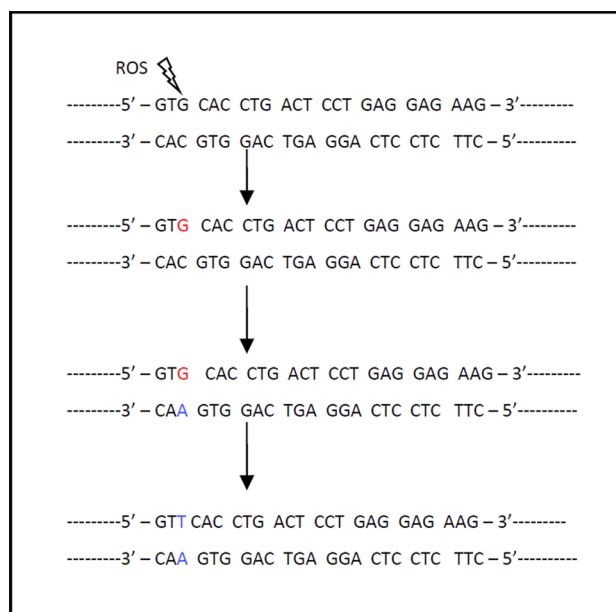
Neki od najčešćih tipova oksidativnog oštećenja DNK su:

1. Pojedinačne lezije azotnih baza - najčešće nastaju reakcijom  $OH^{\cdot}$  sa timinom, citozinom, 5 - metilcitozinom, adeninom i guaninom.
2. Jednolančani prekidi molekula DNK - posredovane najčešće  $OH^{\cdot}$  koji vrši apstrakciju atoma H sa ostatka 2-deoksiribize na C3, C4 i C5 mestu.
3. Formiranje normalnih i oksidovanih abazičnih mesta, pri čemu fosfodiesteraska okosnica ostaje intaktna.
4. Stvaranje intralančanih ukrštenih veza između susednih baza DNK, pri čemu dolazi do reakcije pirimidin radikala sa susednim purinom ili pirimidinom.
5. Stvaranje interlančanih ukrštenih veza u DNK.
6. Stvaranje ukrštenih veza DNK-protein.
7. Stvaranje nukleobaznih produkata u reakciji sa proizvodima lipidne peroksidacije kao što je malondialdehid (MDA).
8. Dvolančani prekidi u molekulu DNA- uzrokovani su sa dva simultana ili nezavisna dejstva slobodnih radikala. Prekidi se mogu razlikovati međusobno prema veličini i prema hemijskim modifikacijama azotnih baza i deoksiriboznih ostataka (Gandhi, & Gunjan, 2009; Cadet, et al., 2012; Sharma, Shailey, & Gandhi, 2012).

U grupi kiseoničnih radikala, najreaktivniji je hidroksilni radikal, koji sa molekulom DNK reaguje četiri puta brže od ostalih kiseoničnih radikala. Stopa reakcije  $OH^{\cdot}$  sa azotnim bazama je pet puta veća nego sa šećernom komponentom (Zimonjić, Savković, & Anđelković, 1990). Hidroksilni radikali reaguju sa DNK adicijom za dvostruke veze azotnih baza i apstrakcijom atoma vodonika iz metil grupe timina, kao i iz svake C-H veze 2-deoksiriboze (Cooke, Evans, Dizdaroglu, & Lunec, 2003).

Adicija hidroksilnih radikala na duple veze C5 -C6 pirimidina dovodi do produkcije C5-OH radikala i C6-OH radikala. Hidroksilni radikali vrše adiciju na C4, C5 i C8 poziciju purina, pri čemu nastaju C4-OH, C5-OH i C8-OH radikali (Cooke, Evans, Dizdaroglu, & Lunec, 2003). 8-hidroksi-7,8-dihidroguanil radikal daljom oksidacijom daje 8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin), najčešće detektovan biomarker oksidativnog oštećenja DNK (Rao, 2009; Kryston, Georgiev, Pissis, & Georgakilas, 2011). Hidroksilni radikali pri reakciji sa šećernom komponentom DNK dovode do apstrakcije atoma vodonika iz svake C-H veze 2-deoksiriboze, što za posledicu može imati stvaranje apurinskih mesta na molekulu DNK, jednostrukih i dvostrukih prekida DNK, dok pod uticajem hidroksilnog radikala apstrakcijom vodonika iz metil grupe timina nastaje alil radikal (Cook et al., 2003).

U studijama na bakterijama i ćelijskim kulturama sisara pokazano je da 8-OHdG može da izrokuje greške od strane DNK polimeraze, jer iako je 8-OHdG relativno slab premutagen, on indukuje G→T transferziju u lancu DNK, odnosno dolazi do mutacija tipa supstitucije (Loft et al., 2008). Genske mutacije koje nastaju usled supstitucije baznog para mogu po tipu biti: misens, nonsens, tihe i neutralne. Osim lezija prisutnih u transkripcionim regijama, efekat na transkripciju mogu dati i mutacije prisutne u regijama koje se ne prevode. Tako prisustvo pojedinačnog 8-OHdG u regionu promotora može sprečavati vezivanje transkripcionog faktora, a samim tim i sprečiti transkripciju. S obzirom da je ovaj region bogat GC bazama smatra se da predstavlja metu delovanja ROS (Cooke et al., 2003).



Slika 1. Oksidativno oštećenje DNK (supstitucija nukleotidne baze) G→T transferzija

Oksidativno izmenjene baze u molekulu DNK imaju potencijal da uspore ili zaustave transkripcioni proces, što dalje može uzrokovati greške pri replikaciji DNK i genomsku nestabilnost. Tako, oksidacijom timina nastaje timidin glikol, koji nije direktno povezan sa mutagenozom, već dovodi do blokiranja replikacije DNK. Takođe, ROS mogu uticati na smanjenje aktivnosti proteina neophodnih za ćelijske procese kao što je apoptoza ili DNK reparacija. Da bi se nastavio transkripcioni proces velike lezije koje nastaju dejstvom ROS moraju biti uklonjene (Rao, 2009). Glavni put reparativne reakcije na oksidativna oštećenja DNK izazvana kiseoničnim radikalima je isecanje baza (base excision repair), koji može biti kratak put i dugačak put. Oba puta obuhvataju 4 glavna koraka, uobičajna za DNK reparaciju :

1. Prepoznavanje izmenjene baze.
2. Isecanje DNK lanca na mestu fosfatno-šećernog ostatka pomoću DNK glikozilaze, a zatim kačenje AP endonukleaze (APE1) na 5' stranu baze na mestu prekida lanca.
3. Popunjavanje praznine u lancu pomoću poli  $\beta$  i oslobađanje 5' - deoksiribofosfata (dRP), a istovremeno na mesto popravke dolazak kompleksa DNK-ligaze III -XRCC1.

4. DNK-ligaze III zatvara prekid u lancu, a poli  $\beta$  se oslobađa. Kada je proces završen oslobađa se i DNK-ligaze III-XRCC1.

U dugačkom putu dodatno se aktiviraju i drugi enzimi i faktori (poli  $\beta$ , poli  $\delta/\epsilon$ , PCNA, FEN1, PARP-1, PNKP, poli  $\lambda$ , Werner syndrome protein). Kratak put je dominantan mehanizam pri baznoj ekscizionoj reparaciji (Rao, 2009).

Najopasnija forma oštećenja DNK predstavlja dvolančani prekid DNK (DSB<sub>2</sub>). Ulazak ovako oštećene DNK u mitozu dovodi do defekata tokom segregacije, kao što su zaostajanja hromozoma, hromozomska fragmentacija i stvaranje hromozomskih mostića (Chow, & Poon, 2010). Posledica ovih događaja mogu biti hromozomske aberacije (Đukić, Ninković, & Jovanović, 2008). Zbog opasnosti koje nose ova oštećenja eukariotska ćelija je razvila kompleks koji brzo i efikasno detektuje ovakve lezije, signalizira njihovo prisustvo i sprovodi njihovu reparaciju.

Kontrolni punktovi odgovora na DNK oštećenja kontrolišu integritet diploidnog hromozomskog komplementa. Ovi kontrolni punktovi (*checkpoints*) predstavljaju tačke ćelijskog ciklusa koje ćelija može da prođe samo ukoliko su prethodne faze kompletirane. Enzimi Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinaza koji se aktivira na osnovu dvolančanog prekida DNK (DSBs) i ATM and Rad3-related (ATR) kinaza koji se aktivira na osnovu jednolančanog prekida DNK (ssDNA) aktiviraju efektorne kinaze (Chk1 i Chk2) koje ćelijski ciklus zaustavljaju u S fazi i omogućava se DNK reparacija ili aktivaciju apoptoze.

Dupli prekidi se repariraju ili homologom rekombinacijom (HR), kod koje oštećeni hromozom sinapsira sa neoštećenim homologim parom hromozoma i homologa sekvenca se kopira u oštećeni deo, ili nehomologim spajanje krajeva (NHEJ), koji obuhvata ligaciju dva kraja DNK, bez sinapsiranja sa neoštećenim DNK molekulom (Cuozzo, et al., 2007).



### **Efekat fizičkog vežbanja na stepen hromozonskih aberacija meren mikronukleus testom**

Studije koje su proučavale uticaje fizičke aktivnosti na stepen oksidativnog DNK oštećenja su koristile različite laboratorijske testove kao i različite laboratorijske protokole. Broj studija koje su detekovale promenu frekvence mikronukleusa kao meru aneugenog i klastrogenog dejstva oksidativnog stresa na hromozomima limfocita periferne krvi nakon sprovedenog fizičkog vežbanja je mali.

Limfociti periferne krvi predstavljaju idealan model za hromozomsku analizu, proučavanje kinetike ćelijskog ciklusa i biohemijske testove (Gandhi, & Kumar, 2007). Limfociti se kontinuirano kreću kroz krvne sudove, limfne sudove, sekundarne limfne organe i periferna limfoidna tkiva i predstavljaju idealan model za proučavanje delovanja mutagena na genomsku stabilnost.

Studija koja je proučavala stepen hromozonskih aberacija kod sportista u dinamičnim sportovima i takmičenjima, kakvi su bejzbol, softball i hokej, a koji uključuju i aerobne i anaerobne fizičke vežbe, pokazala je statistički značajan porast hromozonskih oštećenja u ćelijama bukalne sluznice i u limfocitima periferne krvi nakon napornog, akutnog vežbanja u odnosu na kontrolnu, sedentarnu, grupu koja nije vežbala. DNK oštećenje su merena komet testom, dok su hromozomska oštećenja merena MN testom. Razlike u merenim parametrima između igrača ova dva sporta bile su bez statističkog značaja (Shailey, Gandhi, & Sharma, 2012).

U istraživanju na šest volontera nakon iscrpljujućeg sprinta pokazan je statistički značajan porast frekvence MN u limfocitima periferne krvi nakon 24-48h kod svih subjekata. Vrednosti frekvence mikronukleusa su porasle sa 37 MN/3000 binuklearnih ćelija, pre vežbanja, na 55-56 MN/3000 binuklearnih ćelija 24/48 h nakon vežbanja. Ova razlika je bila statistički značajna, i zaključak ove studije je bio da naporno vežbanje uzrokuje mutacije na nivou hromozoma (Schiffli, Zieres, & Zankl, 1997).

Istraživanje hromozonskih aberacija vršeno je u okviru dve grupe ispitanika (trenirani i netrenirani dobrovoljci), kod kojih su sprovedene vežbe izdržljivosti sa 85% maksimalnog utroška kiseonika tokom 30 minuta. Krv je uzorkovana pre, odmah posle i 30 minuta nakon testiranja na ergometru. Dobijeni rezultati MN testa su

pokazali da stepen spontanih hromozonskih aberacija nije porastao zaključno sa poslednjim merenjem, nakon 30 minuta. Nakon toga, uzorci krvi su in vitro bili izloženi X-zračenju, koje je značajno povećalo stepen indukovanih hromozonskih oštećenja u grupi netreniranih subjekata nakon 30 minuta trčanja, što nije bio slučaj sa treniranim subjektima. Odnos X-indukovanih prema spontanim hromozonskim aberacijama imao je tendenciju rasta posle sprovedenog trčanja samo u grupi netreniranih osoba. Preliminarni zaključak ove studije je bio da intenzivne vežbe indukuju laka hromozomska oštećenja samo kod netrenirane grupe, i da se data oštećenja mogu intenzivirati u ovoj grupi kod sekundarno indukovano g stresa (Umegaki, Higuchi, Inoue, & Esashi, 1998).

U studiji sprovedenoj na rvačima u tradicionalnom rvanju u Indiji meren je procenat mikronukleusa u grupi muškaraca rvača i u zdravoj kontrolnoj grupi. Rezultati t-testa su pokazali da je razlika u frekvencama mikronukleusa između grupa bila statistički značajna, odnosno studija beleži postojanje „genetičkog stresa“ u grupi rvača, čija je posledica porast frekvence mikronukleusa. Opšti zaključak studije je bio da naporno vežbanje u odnosu na umereno ima štetno dejstvo na imunski sistem i na sam DNK, što rezultira oštećenjem na nivou hromozoma i vodi u formiranje mikronukleusa (Gandhi, & Kumar, 2007).

Uticaj spoljašnjih faktora na stepen oksidativnog oštećenja DNK izazvanog fizičkim vežbanjem proučavani su u studiji koja je istraživala efekat niskog pritiska kiseonika na oksidativni stres, pre i posle maksimalnog vežbanja. Rezultati studije pokazuju da tokom napornog vežbanja kod subjekata u akutnoj hipoksiji dolazi do povećanja broja prekida DNK lanaca u odnosu na subjekte koji naporno vežbaju pod normalnim uslovima. Ova studija pokazuje da akutna hipoksija povećava produkciju ROS i dovodi do oksidativnog stresa. Povećana produkcija ROS pri akutnoj hipoksiji je zabeležena u kardiomiocitima kokoške i kod Hep3B ćelijske linije. Tokom tkz. hipoksičnog stresa, antioksidantni sistem je nedovoljan da spreči prekide na DNK nakon napornog vežbanja (Møller, Loft, Lundby, & Olsen, 2001).

Efekat fizičkih vežbi sprovedenih na višim nadmorskim visinama (2200-2500 mnnv) u uslovima akutne hipoksije proučavan je na ispitanicima kod kojih je sproveden trening skijanja tokom pet dana, 3 sata

dnevno. Dijagnostifikovan je statistički značajan porast frekvence mikronukleusa petog dana u odnosu na izmerene frekvence prvog dana. Povišena nadmorska visina, odnosno nizak pritisak kiseonika, dovodi do metaboličkih i fizioloških promena koji vode u disbalans između antioksidativnog kapaciteta i produkcije ROS. Hipoksija na taj način generiše oksidativno oštećenje i prekide na molekuli DNK, odnosno ima mutagen efekat i uzrokuje hromozomske aberacije (Møller et al., 2001; Akpınar et al., 2010).

### **Adaptivni odgovor limfocita na oksidativni stres**

U eksperimentnom modelu kontinuiranog treninga na laboratorijskim pacovima proučavan je adaptivni odgovor limfocita na oštećenja tokom fizičkog vežbanja. Eksperimentalnu grupu su činili pacovi u kavezu sa točkom za trčanje, a kontrolnu grupu su činili pacovi u kavezu bez točka za trčanje. Istraživanje je sprovedeno u dve etape: prvi period kontinuirane fizičke aktivnosti u trajanju od 8 nedelja i drugi u trajanju od 20 nedelja. Nakon sprovedenog treninga u eksperimentalnoj grupi došlo je do porasta vrednosti superoksid dismutaze (SOD2) u periodu nakon 8 nedelja vežbanja, dok je u eksperimentalnoj grupi nakon 20 nedelje porasla vrednost glutation peroksidaze. Rezultati oksidativnog oštećenja u eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu bili su redukovani za 21% nakon 8 nedelja, odnosno 45% nakon 20 nedelja. Ovo smanjenje oksidativno- indukovano oštećenja DNK limfocita životinja koje su trenirane se objašnjava povećanjem transkripcione ekspresije enzima SOD2 nakon 8 nedelja za 939%, kao i povećanje SOD2 (19%), katalaze (25%), APEX1 (46%), Prkdc (9%), Mgmt (26%) nakon 20 nedelja. Različit porast nivoa različitih enzima ukazuje na različite strategije u vezi sa adaptacijom na oksidativni stres. Nakon 8. nedelje kontinuiranog vežbanja dolazi do porasta antioksidativnih enzima (SOD2), dok nakon 20 nedelje vežbanja rastu i antioksidativni enzimi (SOD2 i katalaza) i reparativni enzimi (APEX1, Prkdc, Mgmt). Nakon kontinuiranog vežbanja limfociti pacova in vitro su pokazali porast DNK rezistencije na oksidativna oštećenja pri akutnoj izloženosti vodonik peroksidu. Rezultati ove studije ukazuju da kontinuirano vežbanje

ima protektivnu ulogu i dovodi do porasta rezistencije limfocita na DNK oštećenja. U osnovi adaptivnog efekta na oksidativna oštećenja DNK je verovatno povećana ekspresija gena za enzime antioksidacionog sistema i DNK reparativne enzime (Siu et al., 2011).

Proučavanje DNK oštećenja posle takmičarskih disciplina koje su zahtevale visoko izdržljivo vežbanje kod dobro treniranih subjekata pokazalo je da data oštećenja nisu perzistentna. Nakon završetka ultra maratona u trajanju od 7 sati, nađena je statistički značajna proporcija (10%) ćelijskog oštećenja u odnosu na vrednosti pre takmičenja. Međutim, u okviru 2 sata, rezultati su se normalizovali, da bi jednu nedelju nakon takmičenja broj ćelijskih oštećenja pao ispod početnih vrednosti. Smatra se da adaptivni efekat redovnog treninga igra esencijalnu ulogu u antioksidativnoj odbrani, čime se objašnjava rezistencija profesionalnih sportista na DNK oštećenja (Wagner, Reichhold, & Neubauer, 2011).

Studija sprovedena kod vrhunskih sportista - karatista pokazala je nakon trenažnog opterećenja pad  $O_2^{\cdot -}$  praćen beznačajnim promenama enzimske aktivnosti SOD, što se objašnjava nedovoljno visokom količinom  $O_2^{\cdot -}$  pre i posle opterećenja, kao i dovoljnim nivoom askorbata i dihidroaskorbata u plazmi koji kupiraju oslobađanje  $O_2^{\cdot -}$  pri fizičkom opterećenju. S druge strane, studija je identifikovala statistički značajan porast  $H_2O_2$ , što je praćeno značajnim porastom CAT u eritrocitima sportista. Zaključak studije je bio da se kod vrhunskih sportista nakon dugogodišnjeg intenzivnog treninga razvio enzimski kompenzatorni mehanizam na potencijalna oksidativna oštećenja ćelijskih makromolekula nakon fizičkog opterećenja (Pešić i dr., 2009).

### **Zaključak**

Jedan od uzroka DNK oštećenja može biti oksidativni stres, a porast koncentracije slobodnih radikala dovodi se u vezu sa više od 100 različitih oboljenja, uključujući malignitet, autoimune bolesti, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Đukić, Ninković, & Jovanović, 2008). Teorija starenja daje vezu između slobodnih radikala i fenomena DNK oštećenja/ DNK reparacije. Prema teoriji starenja akumulacija

DNK oštećenja i opadanje kapaciteta reparacije DNK za uklanjanje oštećenja rezultira gubitkom funkcije ćelije i apoptozom (Rao, 2009).

Podaci dobijeni u studijama pokazuju značajan uticaj načina života i ishrane, kako na nastanak oštećenja, tako i na prevenciju oštećenja genoma. Unos određenih mikronutritijenata u preporučenim dozama, zdrav način života i redovna fizička aktivnost značano redukuju frekvencu MN, odnosno stepen hromozonskih aberacija.

Redovna umerena fizička aktivnost i umereni trening imaju povoljno dejstvo u primarnoj i sekundarnoj prevenciji hroničnih bolesti. Neke studije pokazuju da akutno, intenzivno fizičko vežbanje, odnosno pretreniranost, povećava rizik od oštećenja ćelijskih makromolekula (lipidi, proteini, DNK), usled porasta stvaranja slobodnih radikala koji izazivaju nastanak oksidativnog stresa (Gandhi & Gunjan, 2009). Oštećenje na nivu molekula DNK ili hromozoma dovodi do pojave genomske nestabilnosti, čija je jedna od mogućih posledica alteracija u ekspresiji protoonkogenih ili inaktivacija antionkogenih što može dovesti do procesa karcinogeneze (Shailey, Gandhi, & Sharma, 2012). S obzirom da profesionalni sportisti sprovode visoko intenzivne fizičke treninge, ova populacija spada u rizičnu grupu za nastanak genomske nestabilnosti i svih posledica koje ovo stanje sa sobom nosi.

Ipak, kod profesionalnih sportista nakon dugogodišnjih intenzivnih treninga, dolazi do povećane ekspresije antioksidativnih mehanizama kao vid kompenzatorne reakcije na potencijalno prisutan oksidativni stres nakon fizičkog opterećenja. Tačan mehanizam adaptivnog odgovora na kontinuirano, planski usmereno vežbanje, još uvek nije dovoljno poznat. Proučavanje promena antioksidativnog sistema i DNK reparatornih mehanizama nakon fizičke aktivnosti je značajno polje istraživanja i može biti primenjeno u borbi protiv bolesti koje se dovode u vezu sa oksidativnim stresom.

Životna sredina i način života i životne navike mogu dovesti do naslednih promena u fenotipu, bez menjanja osnovne DNK strukture putem epigenetske modifikacije DNK: metilacijom DNK i reverzibilnom posttranslacionom modifikacijom aminokiselinskih ostataka histona.

Najčešće mesta DNK metilacije i histonske modifikacije su regioni bogati CG dinukleotidima (tkz. CpG ostrva).

Zapaženo je da niske doze zračenja, preko generacije ROS, mogu uzrokovati DNK hipometilaciju i aktivaciju utišanih gena u vezi sa DNK reparacijom. Uticaj ROS koje nastaju tokom fizičkog treninga na epigenetsku modifikaciju DNK još uvek nije dovoljno proučavan. Malobrojni podaci pokazuju da regularne fizičke vežbe mogu uzrokovati DNK metilaciju i posttranskripcionu histonsku modifikaciju kao vid redoks posredovane adaptacije (Radak, Zhao, Koltai, Ohno, & Atalay, 2013).

## LITERATURA

- Akpınar, N., Hamurcu, Z., Donmez-Altuntas, H., Çoksevrim, B., Koca, F., & Sungur, G. (2010). Effect of exercise at high altitude on micronucleus frequency. *Ovidius University Annals, Series Physical Education & Sport/Science, Movement & Health*, 10(2), 329-333.
- Andreassi, M.G., Barale, R., Iozzo, P., & Picano, E. (2011). The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis*, 26(1), 77-83. 2011 doi: 10.1093/mutage/geq077
- Banerjee, A.K., Mandal, A., Chanda, D., & Chakraborti, S. (2003). Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Molecular and cellular biochemistry*, 253(1-2), 307-312.
- Bonassi, S., Coskun, E., Ceppi, M., Lando, C., Bolognesi, C., Burgaz, S., Holland, N., Kirsh-Volders, M., Knasmueller, S., Zeiger, E., Carnesoltas, D., Cavallo, D., da Silva, J., de Andrade, V.M., Demircigil, G.C., Domínguez Odio, A., Donmez-Altuntas, H., Gattas, G., Giri, A., Giri, S., Gómez-Meda, B., Gómez-Arroyo, S., Hadjidekova, V., Haveric, A., Kamboj, M., Kurteshi, K., Martino-Roth, M.G., Montero Montoya, R., Nersesyan, A., Pastor-Benito, S., Favero Salvadori, D.M., Shaposhnikova, A., Stopper, H., Thomas, P., Torres-Bugarín, O., Yadav, A.S., Zúñiga González, G., & Fenech, M. (2011). The Human MicroNucleus project on eXfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 728(3), 88-97. doi:10.1016/j.mrrev.2011.06.005
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Müller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A., & Zijno, A. (2001). Human MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 37(1), 31-45.
- Brkić, S., Marić, D., Tomić, S., & Dimitrijević, R. (2010). Virusne infekcije i oksidativni stres. *Vojnosanitetski pregled*, 67(12), 1015-1020.
- Bull, C.F., Mayrhofer, G., O'Callaghan, N.J., Au, A.Y., Pickett, H.A., Low, G.K., Zeegers, D., Hande, M.P., & Fenech, M.F. (2014). Folate deficiency induces dysfunctional long and short telomeres; both states are associated with hypomethylation and DNA damage in human WIL2-NS cells. *Cancer Prevention Research*, 7(1), 128-38. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0264

- Cadet, J., Loft, S., Olinski, R., Evans, M.D., Bialkowski, K., Richard Wagner, J., Dedon, P.C., Møller, P., Greenberg, M.M., & Cooke, M.S. (2012). Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids. *Free radical research*, 46(4),367-381. doi: 10.3109/10715762.2012.659248
- Chow, J., & Poon, R.Y. (2010). DNK damage and polyploidization. *Advances in experimental medicine and biology*, 676, 57-71.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(10),1195-1214.
- Cuozzo, C., Porcellini A., Angrisano, T., Morano, A., Lee, B., Di Pardo, A., Messina, S., Iuliano, R., Fusco, A., Santillo, M.R., Muller, M.T., Chiariotti, L., Gottesman, M.E., & Avvedimento, E.V. (2007). DNA damage, homology-directed repair, and DNA methylation. *PLoS genetics*, 3(7),1144-1145.
- Čavić, M. (2012). Uloga ćelijskog starenja u razvoju i terapiji malignih oboljenja. *Hemijski pregled*, 53(6), 147-151.
- Đukić, M., Ninković, M., & Jovanović, M. (2008). Oxidative stress: Clinical diagnostic significance. *Journal of Medical Biochemistry*, 27(4), 409-425.
- Fenech, M., Aitken, C., & Rinaldi, J. (1998). Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adult. *Carcinogenesis*, 19(7), 1163-1171.
- Fenech, M.F. (2010). Dietary reference values of individual micronutrients and nutriones for genome damage prevention: current status and a road map to the future. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1438S-1454S. doi: 10.3945/ajcn.2010.28674D
- Findri Guštek, Š., Oreščanin, V., Kopjar, N., Mlinarić-Missoni, E., Fistončić, I., & Krivak Bolanča, I. (2013). The Correlation of the Lifestyle and Medical Conditions with the Incidence of Micronuclei in the Vaginal Epithelial Cells. *Journal of Women's Health, Issues & Care*, 6, 1-6.
- Gandhi, G., & Gunjan, Y. (2009). Exercise-Induced Genetic Damage: A Review. *International Journal of Human Genetics*, 9(2), 69-96.
- Gandhi, G., & Kumar, P. (2007). The Capillary Blood *In-Vivo* Micronucleus Test: Wrestlers Exercising at Akharas. *Journal of Exercise Science and Physiotherapy*, 3(2), 129-135.
- Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller S., & Fenech M. (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 659(1-2), 93-108. doi: 10.1016/j.mrrev.2008.03.007
- Huang, P., Huang, B., Weng, H., Nakayama, K., & Morimoto, K. (2009). Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-metal workers. *Preventive Medicine*, 48(4), 383-388. doi: 10.1016/j.ypmed.2008.12.023
- Ishikawa, H., Tian, Y., & Yamauchi T. (2003). Influence of gender, age and lifestyle factors on micronuclei frequency in healthy Japanese populations. *Journal of Occupational Health*, 45, 179-181.
- Kopjar, N., Kašuba, V., Milić, M., Rozgaj, R., Željezić, D., Gajski, G., Mladinić, M., & Garaj-Vrhovac, V. (2010). Normal and Cut-Off Values of the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay on Peripheral Blood Lymphocytes in the Croatian General Population. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 61, 219-234. doi: 10.2478/10004-1254-61-2010-2027
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P., & Georgakilas A.G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation research*, 711(1-2):193-201. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2010.12.016.
- Lieberman, M., Marks, A.D., & Smith, C. (2008). *Markove osnove medicinske biohemije*. (D. Milić, M. Jovin-Oka, & N. Oka, prev.) Beograd: Data status.
- Loft, S., Høgh Danielsen, P., Mikkelsen, L., Risom, L., Forchhammer, L., & Møller, P. (2008). Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 5),1071-1076. doi: 10.1042/BST0361071.
- Milošević-Đorđević, O. (2010). *Principi kliničke citogenetike*. Kragujevac: Medicinski fakultet Univerziteta u Kragujevcu.
- Møller, P., Loft, S., Lundby, C., & Olsen, N.V. (2001). Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(7), 1181- 1186.
- Nefic, H., & Handzic, I. (2013). The effect of age, sex, and lifestyle factors on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes of the Bosnian population. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 753(1), 1-11. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.03.001
- Nefic, H., Musanovic, J., Kurteshi, K., Prutina, E., & Turcalo, E. (2013). The effects of sex, age and cigarette smoking on micronucleus and degenerative nuclear alteration frequencies in human buccal cells of healthy Bosnian subjects. *Journal of Health Sciences*, 3(3), 196-204.
- Nersesyan, A.K., Vardazaryan, N.S, Gevorgyan, A.L., & Arutyunyan, R.M.(2002). Micronucleus level in exfoliated buccal mucosa cells of cancer patients. *Archive of Oncology*, 10(1), 35-6.
- Pešić, S., Jakovljević, V., Čubrilo, D., Živković, V., Jorga, V., Mujović, V., & Stojimirović, B. (2009). Evaluacija oksidativnog statusa kod vrhunskih sportista-karatista u procesu treninga. *Vojnosanitetski pregled*, 66(7), 551-555.
- Radak, Z., Zhao, Z., Koltai, E., Ohno, H., & Atalay, M. (2013). Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxidants & redox signaling*, 18(10),1208-1246. doi: 10.1089/ars.2011.4498
- Rao, K.S. (2009). Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 46(1),9-15
- Scarpato, R., Verola, C., Fabiani, B., Bianchi, V., Saggese, G., & Federico, G. (2011). Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the gamma-H2AX focus assay and micronucleus test. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(2), 685-693. doi: 10.1096/fj.10-168427
- Schiffel, C., Zieres, C., & Zankl, H. (1997). Exhaustive physical exercise increases frequency of micronuclei. *Mutation research*, 389(2-3),243-246.
- Sharma, R., Shailey, & Gandhi, G. (2012). Pre-cancerous (DNA and chromosomal) lesions in professional sports, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 8( 4),578-585. doi: 10.4103/0973-1482.106544
- Siu, P.M., Pei, X.M., Teng, B.T., Benzie, I.F., Ying, M., & Wong, S.H. (2011). Habitual exercise increases resistance of lymphocytes to oxidant-induced DNA damage by upregulating expression of antioxidant and DNA repairing enzymes. *Experimental Physiology*, 96(9), 889-906. doi: 10.1113/expphysiol.2011.058396
- Stanković, M., & Radovanović, D. (2012). Oksidativni stres i fizička aktivnost. *SportLogia* 8(1), 1–10. doi: 105550/sgia.120801.se.0015
- Stevanović, J., Borozan, S., Božić, T., Jović, S., Đekić, T., & Dimitrijević, B. (2012). Oksidativni stres. *Veterinarski glasnik*, 66(3-4), 273-283.

Todorović, T., Stojanović, T., & Babić, M. (2002). *Osnovi medicinske biohemije*. Beograd: IŠ Stručna knjiga d.p.

Torres-Bugarín, O., Covarrubias-Bugarín, R., Zamora-Perez, A.L., Torres-Mendoza, B.M., García-Ulloa, M., & Martínez-Sandoval, F.G. (2007). Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. *British Journal of Sports Medicine*, 41(9), 592-596.

Umegaki, K., Higuchi, M., Inoue, K., & Esashi, T. (1998). Influence of one bout of intensive running on lymphocyte micronucleus frequencies in endurance-trained and untrained men. *International journal of sports medicine*. 19(8), 581-585.

Veerachari, U., Venkatesh S., Yadav A., & Narayanappa, R. (2011). Biomonitoring genetic instability in normal healthy population using a simple cytogenetic marker – micronucleus test. *International Multidisciplinary Research Journal*, 1/2, 01-09.

Wagner, K.H., Reichhold, S. & Neubauer, O. (2011). Impact of endurance and ultraendurance exercise on DNA damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1229, 115–123. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06106.x.

Zimonjić, D.B., Savković, N., & Anđelković, M. (1990). *Genotoksični agensi*. Beograd: Naučna knjiga.

Živanić, S., & Dikić, N. (2008). *Sportska medicina*. Beograd: Heleta.

---

Datum prijave rada: 30.04.2014.

Datum prihvatanja rada: 22.12.2014.

#### Kontakt

Gordana M. Šošić, Klinički centar Kragujevac, Klinika za ginekologiju i akušerstvo, odsek za citogenetska ispitivanja, Zmaj Jovina 30

E-mail: gordana.sosic.2011.02@gmail.com

Mirjana Varjačić, Univerzitet u Kragujevcu, Fakultet medicinskih nauka, Ginekologija i akušerstvo, Svetozara Markovića 69

E-mail: miravarjadic@yahoo.com