

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΝΟΣ ΑΓΩΝΑ ΠΟΔΟΣΦΑΙΡΟΥ ΣΤΙΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ ΠΟΔΟΣΦΑΙΡΙΣΤΩΝ

του
Βανταράκη Αντωνίου

Μεταπτυχιακή Διατριβή που υποβάλλεται στο καθηγητικό σώμα για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων απόκτησης του μεταπτυχιακού τίτλου του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Άσκηση και Ποιότητα Ζωής» των Τμημάτων Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Δημοκρίτειου Παν/μίου Θράκης και του Παν/μίου Θεσσαλίας στην κατεύθυνση «Μεγιστοποίηση Αθλητικής Επίδοσης ή Απόδοσης».

Κομοτηνή
2007

Εγκεκριμένο από το Καθηγητικό σώμα:

1^{ος} Επιβλέπων: Φατούρος Ιωάννης, Λέκτορας

2^{ος} Επιβλέπων: Τζιαμούρτας Αθανάσιος, Επικ. Καθηγητής

3^{ος} Επιβλέπων: Ταξιλδάρης Κυριάκος, Καθηγητής



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 6542/1

Ημερ. Εισ.: 15/06/2009

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

612.044

BAN

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000092666

Στη γυναίκα μου και τα παιδιά μου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε κάποιους ανθρώπους, οι οποίοι συνέβαλαν ουσιαστικά στην εκπόνηση και την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Θεωρώ τον εαυτό μου πραγματικά τυχερό που είχε την ευκαιρία να συνεργαστεί και να λάβει τη βοήθεια αυτών των ανθρώπων και ξέρω ότι τους οφείλω πολλά περισσότερα από αυτές τις ευχαριστίες.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Φατούρο Ιωάννη, ο οποίος υπήρξε για μένα, εκτός από επιβλέπων καθηγητής, πραγματικός φίλος. Τον ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθειά του και την καθοδήγησή του όλο αυτό το διάστημα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κύριο Αθανάσιο Τζιαμούρτα για την καταλυτική βοήθεια που μου παρείχε στη μέτρηση των βιοχημικών δεικτών του οξειδωτικού στρες καθώς και τον κύριο Ταξιλδάρη Κυριάκο για τη βοήθεια, τις συμβουλές και τις συστάσεις του.

Πολλά ευχαριστώ οφείλω και στους συνεργάτες του Εργαστηρίου Φυσικής Αγωγής και Άθλησης (κατεύθυνση Προπονητικής), Μαργώνη Κωνσταντίνο, Ντουρουντό Ιωάννη και Μιχαηλίδη Ιωάννη για την συνεργασία και τη βοήθειά τους καθώς και τους κ.κ. Νικολαΐδη Μιχάλη και Κηπάρο Αντώνη για τη βοήθειά τους στις μετρήσεις της εργασίας μου.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου για την κατανόηση και την στήριξη που μου προσέφεραν.

Βανταράκης Αντώνιος

Ιούλιος 2007

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΑΝΤΩΝΗΣ ΒΑΝΤΑΡΑΚΗΣ: Η επίδραση ενός αγώνα ποδοσφαίρου στις προσαρμογές του οξειδωτικού στρες των ποδοσφαιριστών

(Υπό την επίβλεψη του Λέκτορα κ. Φατούρου Ιωάννη)

Σκοπός: Ήταν να ερευνηθεί η επίδραση ενός αγώνα ποδοσφαίρου στους δείκτες του οξειδωτικού στρες και του οξειδωτικού μηχανισμού των ποδοσφαιριστών έως και 48 ώρες μετά το παιχνίδι.

Μέθοδος: Εικοσιτέσσερις ποδοσφαιριστές ηλικίας 17-22 χρονών χωρίστηκαν σε 2 ομάδες: αυτούς που συμμετείχαν στον αγώνα και αυτούς που δεν συμμετείχαν. Το πρωτόκολλο άσκησης περιλάμβανε ένα φιλικό αγώνα ποδοσφαίρου σε μια διακοπή του Εθνικού ερασιτεχνικού πρωταθλήματος. Δείγματα αίματος λήφθηκαν πριν και αμέσως μετά, 24 και 48 ώρες μετά το τέλος του αγώνα. Οι δείκτες που μετρήθηκαν ήταν: ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC), ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), καταλάση (CAT), ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) και ο λόγος GSH/GSSG. **Αποτελέσματα:** Η συγκέντρωση των TBARS εμφάνισε σημαντική αύξηση (11%) μόνο 48 ώρες μετά τον αγώνα. Τα PC μεταβλήθηκαν σημαντικά καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων από 25% μετά τον αγώνα σε 73% και 64%, 24 και 48 ώρες με το πέρας του αγώνα, αντίστοιχα. Η CAT, η TAC και η GSH δεν μεταβλήθηκαν σχεδόν καθόλου και στις 3 μετρήσεις. Αντιθέτως, η GSSG ξεκίνησε με αύξηση 20% αμέσως μετά τον αγώνα, τριπλασιάστηκε 24 ώρες μετά, για να οκταπλασιαστεί 48 ώρες μετά το τέλος του αγώνα. Μεταβολές παρουσιάστηκαν και στο λόγο GSH/GSSG όμως μόνο στις 48 ώρες μετά τον αγώνα. Δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στις παίκτες που δεν συμμετείχαν στο παιχνίδι. **Συμπέρασμα:** Ένας αγώνας ποδοσφαίρου προκαλεί αύξηση του οξειδωτικού στρες έως και 48 ώρες μετά το τέλος του.

Λέξεις-Κλειδιά: ποδόσφαιρο, οξειδωτικό στρες, αντιοξειδωτικός μηχανισμός

ABSTRACT

ANTONIOS VANTARAKIS: Oxidative stress responses following a football game.

(Under the supervision of Lecturer Fatouros Ioannis)

Purpose: To investigate the impact of a soccer game on indices of oxidative stress and antioxidant status following a football game.

Μέθοδος: Twenty-four football players (17-22 yrs) were assigned to two groups: a) those who played (n=14) in the game and b) those who did not participate in the game (n=10). Subjects participated in a friendly football game during a break of the regular season of the league. Blood samples were received prior to the game and immediately post-game as well as 24 and 48 hours following the game. Blood samples were analyzed for thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyls (PC), total antioxidant capacity (TAC), catalase (CAT), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and their ratio GSH/GSSG. **Αποτελέσματα:** TBARS levels increased (11%) only after 48 hours following the game. PC concentration increased immediately post-game (25%) as well as 24 (73%) and 48 hours (64%) after the game. CAT, TAC, and GSH remained unaffected. In contrast, GSSG increased post-game (20%) as well as 24 (3 fold) and 48 hours (8 fold) following the game. The GSH/GSSG ratio was reduced only 48 hours after the game. No changes were seen in the control group. **Συμπέρασμα:** These data suggest that a single football game augments the levels of oxidative stress indices. This is probably attributed to the absence of a response from the antioxidant system.

Λέξεις-Κλειδιά: football, oxidative stress, antioxidant status

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
ΑΦΙΕΡΩΣΗ.....	ii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	iii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ABSTRACT.....	v
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ.....	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ.....	x
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Σκοπός της έρευνας.....	4
1.2. Σημασία της έρευνας.....	4
1.3. Ερευνητικές υποθέσεις.....	4
1.4. Μηδενικές υποθέσεις.....	5
1.5. Οριοθετήσεις της έρευνας.....	5
1.6. Περιορισμοί της έρευνας.....	6
1.7. Λειτουργικοί ορισμοί.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	8
2. Οξειδωτικό στρες.....	8
2.1. Στοιχεία χημείας.....	8
2.2. Ελεύθερες ρίζες	9
2.3. Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (E.P.O.).....	11
2.4. Αντιοξειδωτικός μηχανισμός	15
2.4.1. Αντιοξειδωτικά ένζυμα.....	18
2.4.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	20
2.5. Οξειδωτικό στρες.....	23
2.6. Βιολογικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών.....	24
2.6.1. Θετικές επιδράσεις.....	24

2.6.2. Αρνητικές επιδράσεις.....	24
2.7. Ανίχνευση και μέτρηση του οξειδωτικού στρες.....	27
2.8. Οξειδωτικό στρες και οξεία άσκηση.....	29
2.9. Αντιοξειδωτικός μηχανισμός και οξεία άσκηση.....	30
2.10. Μηχανισμοί παραγωγής οξειδωτικού στρες κατά την άσκηση.....	32
2.11. Οξειδωτικό στρες και χρόνια άσκηση.....	34
2.12. Αντιοξειδωτικός μηχανισμός και χρόνια άσκηση.....	35
2.11. Οξειδωτικό στρες και ποδόσφαιρο.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	39
3.1. Δείγμα.....	39
3.2. Ερευνητικός σχεδιασμός	40
3.3. Μετρήσεις σωματομετρικών χαρακτηριστικών.....	40
3.4. Μέτρηση της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (VO_{2max}).....	41
3.5. Ο ποδοσφαιρικός αγώνας.....	42
3.6. Καταγραφή της διατροφής των αθλητών.....	43
3.7. Αιμοληψίες	43
3.8. Βιοχημικές αναλύσεις.....	44
3.9. Στατιστική ανάλυση.....	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	51
4.1. Δείκτες οξειδωτικής καταστροφής.....	51
4.2. Αντιοξειδωτικοί δείκτες	54
4.3. Γλουταθειόνες	56
4.4. Συσχέτιση μεταξύ χρόνου συμμετοχής και μεταβολής των δεικτών οξειδωτικού στρες ως προς τις τιμές ηρεμίας.....	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

	Σελίδα
Πίνακας 1. Ταξινόμηση ελευθέρων ριζών.....	11
Πίνακας 2. Αντιοξειδωτικός μηχανισμός στα βιολογικά συστήματα	16
Πίνακας 3. Τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά του δείγματος.....	39
Πίνακας 4. Συγκέντρωση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.....	51
Πίνακας 5. Συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.....	53
Πίνακας 6. Η δραστικότητα τις καταλάσης (CAT) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.....	54
Πίνακας 7. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.....	55
Πίνακας 8. Η συγκέντρωση τις ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.....	56
Πίνακας 9. Η συγκέντρωση τις οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.....	57
Πίνακας 10. Η συγκέντρωση της αναλογίας ανηγμένη προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.....	58
Πίνακας 11. Οι συσχετίσεις μεταξύ χρόνου συμμετοχής και μεταβολής τις μεταβλητής οξειδωτικού στρες ως προς τις τιμές ηρεμίας.....	59

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σελίδα

Σχήμα 1. Μεταβολή τις συγκέντρωσης των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου..... 52

Σχήμα 2. Μεταβολή τις συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου..... 53

Σχήμα 3. Μεταβολή τις δραστικότητα τις καταλάσης (CAT) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου... 54

Σχήμα 4. Μεταβολή της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) κατά την ηρεμία αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου... 55

Σχήμα 5. Μεταβολή τις ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου... 56

Σχήμα 6. Μεταβολή τις οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου... 57

Σχήμα 7. Μεταβολή του λόγου τις γλουταθειόνης στην ανηγμένη (GSH) τις την οξειδωμένη (GSSG) μορφή τις κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου..... 59

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

	Σελίδα
Εικόνα 1. Χημική δομή του DPPH	45
Εικόνα 2. Αντίδραση του TBA με την MDA προς σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος.....	46
Εικόνα 3. Αντίδραση παραγωγής έγχρωμου προϊόντος από το DTNB.....	48

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

VO ₂ max	Μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου
CAT	Καταλάση
DNPH	2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη
DPPH	2,2-διφαινύλο-1 πικρυλδραζύλιο
DTNB	5,5-διθειο-δις-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ)
EDTA	Αιθυλενοδινιτριλοτετραοξικό οξύ
GSH	Ανηγμένη γλουταθειόνη
GSH/GSSG	Λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένη γλουταθειόνη
GSSG	Οξειδωμένη γλουταθειόνη
MDA	Μαλονδιαλδεύδη
PC	Πρωτεϊνικά καρβονύλια
TAC	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
TBARS	Ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό
TCA	Τριχλωροακετικό οξύ
UA	Ουρικό οξύ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΕΝΟΣ ΑΓΩΝΑ ΠΟΔΟΣΦΑΙΡΟΥ ΣΤΙΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ ΠΟΔΟΣΦΑΙΡΙΣΤΩΝ

Το οξυγόνο αποτελεί απαραίτητο στοιχείο για την ζωή, αλλά κάτω από ορισμένες συνθήκες είναι ιδιαίτερα επικίνδυνο γι' αυτήν. Η πλήρης αναγωγή του μοριακού οξυγόνου με την σταδιακή πρόσληψη τεσσάρων ηλεκτρονίων, το καθιστά ικανό να οξειδώνει βιολογικά μόρια τα οποία προέρχονται από τις τροφές, με σκοπό να εξασφαλιστούν οι ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού. Κατά το φυσιολογικό μεταβολισμό του μοριακού οξυγόνου παράγονται μικρές ποσότητες δραστικών χημικών προϊόντων, οι οποίες αποδεσμεύονται από την αναπνευστική αλυσίδα και ονομάζονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (E.P.O.). Οι ελεύθερες ρίζες είναι χημικές ουσίες οι οποίες έχουν ένα τουλάχιστον ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα. Οι ρίζες αυτές εξυπηρετούν διάφορους ρόλους ζωτικής σημασίας, όπως είναι ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η κυτταρική αναπνοή, η παραγωγή προσταγλανδινών και λευκοτριενίων, η φαγοκυττάρωση και η ανοσολογική απάντηση. Ωστόσο, χαρακτηρίζονται εξαιρετικά ασταθείς και δραστικές και εξαιτίας της υψηλής αυτής χημικής δραστηρότητάς τους, μπορούν ακόμη και να καταστρέψουν τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου.

Όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί προκειμένου να αντεπεξέλθουν και να επιβιώσουν από την επικινδυνότητα των E.P.O., έχουν αναπτύξει έναν ισχυρό αντιοξειδωτικό μηχανισμό που αποτελείται τόσο από ενζυμικούς (υπεροξειδική δισμουτάση, υπεροξειδάση της ανηγμένης γλουταθειόνης, καταλάση), όσο και μη ενζυμικούς (α-τοκοφερόλη, ασκορβικό οξύ, β-καροτίνη, ουρικό οξύ, σερουλοπλασμίνη, κλπ) μηχανισμούς εκκαθάρισης των βλαπτικών ελευθέρων ριζών του οξυγόνου. Τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό συμπληρώνουν μηχανισμοί

επιδιόρθωσης ή πλήρους αποικοδόμησης των μακρομορίων που έχουν υποστεί βλάβη από τη δράση των E.P.O.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προέλθει είτε από την αυξημένη παραγωγή των E.P.O., είτε από μειωμένη παραγωγή ενδογενών αντιοξειδωτικών (μεταλλάξεις) ή ακόμα και από την έλλειψη πρόσληψης αντιοξειδωτικών (βιταμίνη E και C). Σε περίπτωση που το οξειδωτικό στρες υπερκεράσει τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του οργανισμού, οι E.P.O. προκαλούν σοβαρές βλάβες στα ελεύθερα λιπαρά οξέα (λιπιδική υπεροξείδωση), οξειδώνουν τις πρωτεΐνες και αλλοιώνουν τα νουκλεϊκά οξέα. Οι πιο γνωστές ασθένειες που σχετίζονται με τις E.P.O. είναι η αθηροσκλήρωση, η γήρανση, τα νευροεκφυλιστικά νοσήματα Parkinson και Alzheimer, καθώς και ο καρκίνος (Barja, 2004; Radak, 2000).

Η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων, με επικράτηση των πρώτων, η οποία οδηγεί τελικά στη κυτταρική βλάβη καλείται οξειδωτικό στρες (Sies, 1985).

Είναι γνωστό ότι η άσκηση προκαλεί αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό (Alessio, 1993; Sies, 1985; Vollard, Shearman, Cooper, 2005). Πιο συγκεκριμένα, η αερόβια άσκηση (τρέξιμο, ποδηλασία, κολύμπι) έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών στους σκελετικούς μυς και την καρδιά, ενώ πηγή παραγωγής των E.P.O. θεωρείται η μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου (Davies, Quintanilla 1992; Kumar, et al., 1992; Vasankari, Kujala, Vasankari, et al., 1997). Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξαν οι έρευνες με βάση την αναερόβια άσκηση (άλματα, σπριντ, ασκήσεις αντιστάσεων). Η παραγωγή των E.P.O. ενδέχεται επιπλέον να προκαλείται και από το φαινόμενο της ισχαιμίας – επαναιμάτωσης, της ξανθίνης οξειδάσης και της αναπνευστικής έκρηξης (Finaud, Lac, Filaire, 2006; Sahlin, Cizinsky, Warholm, et al., 1992).

Η διαλειματικής μορφής άσκηση συνδυάζει επιδράσεις τόσο από την αερόβια όσο και από την αναερόβια άσκηση και σε αυτήν εμπεριέχονται επί το πλείστον τα ομαδικά αθλήματα (ποδόσφαιρο, μπάσκετ, αμερικάνικο ποδόσφαιρο). Οι επιπτώσεις της μορφής αυτής είναι η αυξημένη παραγωγή οξειδωτικού στρες (Svensson, Ekblom, Cotgreave, et al., 2002; Thompson, Williams, Garcia-Roves, et al., 2003; Balakrishnan, Aruradha, 1996).

Το οξειδωτικό στρες που δημιουργείται από την άσκηση, έχει σοβαρές επιδράσεις και στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των συμμετεχόντων. Στην αερόβια άσκηση, τα ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά αυξάνουν τα επίπεδα



συγκέντρωσής τους (Clarkson, 1995; Ji, Fu, 1993; Inal, Akyuz, Turgut, 2001) χωρίς όμως αυτό να είναι ανάλογο της έντασης της άσκησης (Criswell, Powers, Dodd, et al., 1993). Στην αναερόβια άσκηση, τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά αυξάνονται ή μειώνονται ανάλογα με την ένταση της άσκησης (Childs, Jacobs, Kaminski, et al., 2001; Marzatico, Pansarasa, Bertorelli, et al., 1997; Groussard, Machefer, Rannou, et al., 2003), ενώ τα μη ενζυμικά ισχυροποιούνται (Groussard, Rannou-Bekono, Machefer, et al., 2003). Στη διαλειματική άσκηση, τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά δεν μεταβάλλονται (Chang, Tseng, Hsuuw, et al., 2002), ενώ τα μη αντιοξειδωτικά, άλλα μεταβάλλονται και άλλα όχι (Thompson, Williams, Garcia-Roves, et al., 2003; Svensson, Eckblom, Cotgreave, 2002).

Στη χρόνια ανεξαρτήτου είδους προπόνηση, ο οργανισμός των αθλητών προσαρμόζεται στις επιδράσεις του οξειδωτικού στρες είτε λόγω μείωσης της παραγωγής του, είτε λόγω της ισχυροποίησης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού (Alessio, 1993; Margaritis, Tessier, Richard, et al., 1997).

Το ποδόσφαιρο περιλαμβάνεται στη κατηγορία της διαλειματικής άσκησης επειδή χαρακτηρίζεται από περιόδους υψηλής έντασης (σπριντ, τρέξιμο) με μικρά διαλείμματα χαμηλής έντασης (τζόγκινγκ, περπάτημα). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το ποδόσφαιρο προκαλεί αύξηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού (Banfi, et al., 2006; Brites, et al., 1999; Cazzola, Russo-Volpe, Cervato, Cestaro, 2003, Metin, Gumustas, Uslu, Kayserilioglu, Belce, 2003; Pincemail, Lecomte, Castiau, et al., 2000; Schippinger, Wonisch, Abuja, Fankhauser, Winkhofer-Roob, Halwachs, 2002). Σε όλες σχεδόν τις έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί αιμοληψίες μόνο σε κατάσταση ηρεμίας και μόνο μία φορά με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν δεδομένα σύγκρισης. Επιπλέον, οι μελέτες πραγματοποιούνται σε περιόδους προετοιμασίας, διακοπής του πρωταθλήματος ή ακόμα και απλής διαλειματικής προπόνησης χωρίς να εμφανίζονται δεδομένα πραγματικού αγώνα. Επιπρόσθετα, έχει μετρηθεί μόνο ένας παράγοντας οξειδωτικού στρες (λιπιδική υπεροξείδωση) και μόνο μία έρευνα μελέτησε αρκετά διεξοδικά τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό στην άσκηση ποδοσφαίρου (Cazzola, et al., 2003).

Συνεπώς, δεν υπάρχουν καθόλου δεδομένα σχετικά με την επίδραση ενός αγώνα ποδοσφαίρου στην εκδήλωση δεικτών του οξειδωτικού στρες και αντιοξειδωτικής προστασίας. Η σημασία της παρούσας μελέτης έγκειται στο γεγονός ότι καλύπτει όσο το δυνατόν πληρέστερα την επίδραση που έχει ένας κανονικός αγώνας ποδοσφαίρου στις τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες και του

αντιοξειδωτικού μηχανισμού σε ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά. Επιπλέον συσχετίζει το χρόνου συμμετοχής των παικτών με την αύξηση του οξειδωτικού στρες και αντιοξειδωτικού μηχανισμού μετά το παιχνίδι, 24 και 48 ώρες μετά. Οι δείκτες που θα μετρηθούν αποτελούνται από τις ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, την ανηγμένη και οξειδωμένη γλουταθειόνη καθώς και τον αριθμητικό τους λόγο, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τέλος την καταλάση.

1.1 Σκοπός της έρευνας

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να μελετήσει την επίδραση ενός αγώνα ποδοσφαίρου στους δείκτες του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού έως και 48 ώρες μετά το παιχνίδι.

1.2 Σημασία της έρευνας

Είναι η πρώτη φορά που πραγματοποιείτε έρευνα που μελετά τη συμπεριφορά των δεικτών του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού αμέσως μετά από ένα αγώνα ποδοσφαίρου, 24 και 48 ώρες μετά. Επιπλέον, οι επτά παράγοντες που μετρούνται παρουσιάζουν μια ολοκληρωμένη μορφή δεδομένων για την ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες στο ποδόσφαιρο. Σε αυτό αναφέρεται και η συσχέτιση μεταξύ του χρόνου συμμετοχής και της κινητικότητας του οξειδωτικού στρες.

1.3 Ερευνητικές υποθέσεις

- Θα υπάρχει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του οξειδωτικού στρες μεταξύ της πρώτης μέτρησης πριν τον αγώνα και αμέσως μετά τον αγώνα.
- Θα υπάρχει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του οξειδωτικού στρες μεταξύ της πρώτης μέτρησης πριν τον αγώνα και 24 ώρες μετά.
- Θα υπάρχει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του οξειδωτικού στρες μεταξύ της πρώτης μέτρησης πριν τον αγώνα και 48 ώρες μετά.
- Θα υπάρχει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μεταξύ της πρώτης μέτρησης πριν τον αγώνα και αμέσως μετά τον αγώνα.

- Θα υπάρξει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μεταξύ της πρώτης μέτρησης πριν τον αγώνα και 24 ώρες μετά.
- Θα υπάρξει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μεταξύ της πρώτης μέτρησης πριν τον αγώνα και 48 ώρες μετά.

1.4 Μηδενικές υποθέσεις

- Δεν θα υπάρξει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του οξειδωτικού στρες μεταξύ της πρώτης μέτρησης πριν τον αγώνα και αμέσως μετά τον αγώνα.
- Δεν θα υπάρξει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του οξειδωτικού στρες μεταξύ της πρώτης μέτρησης πριν τον αγώνα και 24 ώρες μετά.
- Δεν θα υπάρξει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του οξειδωτικού στρες μεταξύ της πρώτης μέτρησης πριν τον αγώνα και 48 ώρες μετά.
- Δεν θα υπάρξει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μεταξύ της πρώτης μέτρησης πριν τον αγώνα και αμέσως μετά τον αγώνα.
- Δεν θα υπάρξει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μεταξύ της πρώτης μέτρησης πριν τον αγώνα και 24 ώρες μετά.
- Δεν θα υπάρξει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μεταξύ της πρώτης μέτρησης πριν τον αγώνα και 48 ώρες μετά.

1.5 Οριοθετήσεις της έρευνας

Οι οριοθετήσεις της έρευνας περιλαμβάνουν τα παρακάτω:

- i. Οι συμμετέχοντες στην έρευνα ήταν ποδοσφαιριστές ηλικίας 18- 23 ετών.
- ii. Οι συμμετέχοντες ήταν εθελοντές ποδοσφαιριστές με προπονητική ηλικία πάνω από 5 έτη.
- iii. Στην μελέτη συμμετέχουν μόνο άντρες.
- iv. Η άσκηση που έχει επιλεγεί είναι ένας φιλικός αγώνας ποδοσφαίρου

- v. Κατά τη διάρκεια της μελέτης, οι συμμετέχοντες δεν κατανάλωσαν οποιοδήποτε συμπλήρωμα διατροφής ή φάρμακα, αλλά συνέχισαν τις φυσιολογικές διατροφικές τους συνήθειες.

1.6 Περιορισμοί έρευνας

Παρακάτω αναφέρονται οι περιορισμοί της παρούσας έρευνας σε σχέση με την επιλογή του δείγματος και τον πειραματικό σχεδιασμό:

- Η μελέτη στηρίχθηκε στην ειλικρίνεια των συμμετεχόντων όσο αφορά την διατροφή τους και την αποχή τους από την άσκηση, την καφεΐνη και το αλκοόλ.
- Ο ποδοσφαιρικός αγώνας πραγματοποιήθηκε την αγωνιστική περίοδο σε μία διακοπή του πρωταθλήματος της Εθνικής Ερασιτεχνικής κατηγορίας.
- Περιορισμός ως προς τους δείκτες του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού που θα μετρηθούν: Θα μετρηθούν: ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC), η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH/GSSG), η καταλάση (CAT) και η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).

1.7 Λειτουργικοί Ορισμοί

- Ελεύθερη ρίζα: Όταν σε κάποιο ή κάποια από τα άτομα που αποτελούν ένα μόριο υπάρχει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα του, τότε το μόριο χαρακτηρίζεται ως ελεύθερη ρίζα.
- Αντιοξειδωτικός μηχανισμός: Είναι ένα σύνολο μηχανισμών του οργανισμού για την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών.
- Οξειδωτικό στρες: Είναι η κατάσταση του οργανισμού κατά την οποία ο μηχανισμός παραγωγής ελευθέρων ριζών υπερτερεί έναντι του αντιοξειδωτικού μηχανισμού και εμφανίζονται αλλοιώσεις σε διάφορα μόρια που προσβάλλονται από τις ρίζες όπως είναι τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, τα ένζυμα και τα νουκλεϊκά οξέα.
- Λιπιδική υπεροξείδωση: Η φθορά των ακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από τις ελεύθερες ρίζες.

- Ουσίες αντιδρώντες με θειορβιτουρικό οξύ (Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS): Είναι αλδεϋδες που ανιχνεύονται στο αίμα και σχηματίζονται από την υπεροξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Αποτελούν δείκτη της υπεροξείδωσης των λιπιδίων.
- Μαλονδιαλδεϋδη (MDA): Αποτελεί μια μορφή των TBARS και είναι δείκτης της υπεροξείδωσης των λιπιδίων.
- Πρωτεϊνικά καρβονύλια: Είναι ενώσεις που σχηματίζονται από την υπεροξείδωση των λιπιδίων (δραστικές αλδεϋδες), από την οξείδωση σακχάρων ή την οξείδωση των προϊόντων τους με υπολείμματα λυσίνης. Μια άλλη πηγή είναι η οξείδωση μορίων που στην πλαϊνή αλυσίδα τους έχουν αμινομάδα. Αποτελούν δείκτη της οξείδωσης των πρωτεϊνών.
- Ανηγγμένη γλουταθειόνη (GSH): Είναι ένα τριπεπτίδιο το οποίο βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε όλα τα ζώα και τα φυτά. Η πιο σημαντική αντιοξειδωτική λειτουργία της είναι η μεταφορά υδρογόνων και οργανικών υπεροξειδίων.
- Οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG): Είναι η οξειδωμένη μορφή της ανηγμένης γλουταθειόνης που σχηματίζεται παίρνοντας ένα ζεύγος υδρογονοιδόντων από την τελευταία κατά την αντίδραση αναγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2).
- Λόγος ανηγμένης /οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG): Είναι ένα κλινικό εργαλείο για τη μελέτη του οξειδωτικού στρες.
- Καταλάση: Αντιοξειδωτικό ένζυμο που συμμετέχει σε αντιδράσεις της παρακάτω μορφής:



- Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα: Βιοχημικός δείκτης αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού.
- Προπονητική επιβάρυνση: το σύνολο της προπόνησης που υλοποιείται από έναν αθλητή (Martin, Carl, Lehnertz, 1993).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

2 Οξειδωτικό στρες

2.1 Στοιχεία χημείας

Η μεγάλη ποικιλία των μορφών της ύλης που μας περιβάλλει προέρχεται από το συνδυασμό λίγων απλών "στοιχείων" που δεν μπορούν να χωρισθούν σε απλούστερα ή να προέλθουν από απλούστερα. Τα "στοιχεία" δεν εμφανίζουν την ίδια διάδοση στη φύση. Δώδεκα από αυτά αποτελούν το 99% της γήινης λιθόσφαιρας και όλα τα υπόλοιπα αποτελούν το 1%. Το μοριακό οξυγόνο (O_2) είναι το πλέον διαδεδομένο στοιχείο στη φύση.

Η δομή των στοιχείων τίθεται για πρώτη φορά σε πειραματική βάση από τον Dalton το 1808. Εντούτοις, σαφής αντίληψη για τη δομή τους διατυπώνεται το 1885 από το Rutherford. Σύμφωνα με την άποψη του, που σε γενικές γραμμές ισχύει και σήμερα, κάθε στοιχείο αποτελείται από άτομα και κάθε άτομο αποτελείται από τον πυρήνα και τα ηλεκτρόνια που περιφέρονται γύρω από αυτόν και φέρουν ένα στοιχειώδες "αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο". Ο πυρήνας αποτελείται από τα πρωτόνια (p) που φέρουν "στοιχειώδες θετικό ηλεκτρικό φορτίο" και τα νετρόνια (n) που είναι ηλεκτρικά ουδέτερα και η μάζα τους είναι ίση με εκείνη των πρωτονίων. Το άτομο κάθε στοιχείου σε κανονικές συνθήκες φέρει τον ίδιο αριθμό ηλεκτρονίων και πρωτονίων με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ως ηλεκτρικά ουδέτερο. Τα άτομα του ίδιου στοιχείου είναι ίδια μεταξύ τους. Το 1913 ο Bohr, στην προσπάθειά του να ξεπεράσει τις ασάφειες του μοντέλου που πρότεινε ο Rutherford, διατυπώνει άποψη σύμφωνα με την οποία το ηλεκτρόνιο μπορεί να κινηθεί γύρω από τον πυρήνα σε καθορισμένες τροχιές που συμβολίζονται με τα γράμματα K, L, M κ.λ.π. και ονομάζονται στιβάδες.

Τα ηλεκτρόνια κατανέμονται γύρω από τον πυρήνα του ατόμου σε ηλεκτρονικές στιβάδες. Ο μεγαλύτερος αριθμός ηλεκτρονικών στιβάδων που μπορεί να έχει ένα άτομο είναι επτά. Ο μεγαλύτερος αριθμός ηλεκτρονίων για τη στιβάδα K είναι 2, για τη στιβάδα L είναι 8, για τη στιβάδα M είναι 18, για τη στιβάδα M και O είναι 32, για την P είναι 18 και για την Q είναι 8.

Εκτός από την περιστροφή του γύρω από τον πυρήνα, κάθε ηλεκτρόνιο περιστρέφεται δεξιόστροφα ή αριστερόστροφα γύρω από τον εαυτό του. Η αυτοπεριστροφή αυτή προσδίδει στο ηλεκτρόνιο στροφορμή που ονομάζεται "spin" (s).

Η δραστικότητα του ατόμου καθορίζεται από την εξωτερική στιβάδα του. Η στιβάδα αυτή, όπως ήδη αναφέρθηκε, μπορεί να περιλάβει μέχρι οκτώ ηλεκτρόνια. Έτσι, άτομα στοιχείων που φέρουν οκτώ ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα τους παρουσιάζουν πολύ μεγάλη αδράνεια για δημιουργία χημικών δεσμών (π.χ. ευγενή αέρια). Όλα τα άτομα παρουσιάζουν μια τάση να συμπληρώσουν την εξωτερική στιβάδα τους είτε με προσθήκη είτε με αποβολή ηλεκτρονίων.

Η πρόσληψη ηλεκτρονίου με spin αντίθετης φοράς από τη φορά του spin ενός τουλάχιστον ηλεκτρονίου της εξωτερικής στιβάδας ονομάζεται αναγωγή, ενώ η αποβολή ενός ηλεκτρονίου της εξωτερικής στιβάδας ονομάζεται οξείδωση. Η τάση των ατόμων να συμπληρώσουν την εξωτερική στιβάδα τους με οκτώ ηλεκτρόνια προσδιορίζει την τάση τους να ενωθούν με άλλα άτομα του ίδιου ή άλλων στοιχείων και ονομάζεται σθένος.

Το άτομο του οξυγόνου φέρει οκτώ ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα του. Από τα ηλεκτρόνια της στιβάδας αυτής, τα τέσσερα έχουν, ανά δύο, αντίθετα spin μεταξύ τους και χαρακτηρίζονται ως ασύζευκτα.

2.2 Ελεύθερες ρίζες

Ρίζα είναι ένα μόριο, τμήμα μορίου ή άτομο που περιέχει ένα τουλάχιστον ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο εξωτερικό τροχιακό του (Clarkson, Thompson, 2000). Αυτός ο ορισμός περιλαμβάνει επίσης τα ιόντα μετάλλων μετάπτωσης όπως Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , το άτομο του υδρογόνου και το άτομο του οξυγόνου. Ορισμένα κοινά μόρια, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και το διοξείδιο του αζώτου (NO_2), περιέχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο εξωτερικό τροχιακό τους και, εξ ορισμού, θεωρούνται ρίζες. Η παρουσία ενός ασύζευκτου ηλεκτρονίου στο εξωτερικό τροχιακό μιας ρίζας συμβολίζεται συμβατικά ως τελεία ή στιγμή στο πάνω

δεξιό ή αριστερό τμήμα του χημικού τύπου της ρίζας αυτής. Ένα άτομο ή μόριο ή ακόμα μια ομάδα ατόμων μετατρέπεται σε ρίζα είτε με πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου (αναγωγή), όπως φαίνεται στην αντίδραση [1] που δείχνει την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος (O_2^-) ή με αποβολή ενός ηλεκτρονίου (οξειδωση), όπως φαίνεται στην αντίδραση [2], που δείχνει την οξείδωση του ασκορβικού οξέος στη διϋδρομορφή του μέσω ενός ενδιάμεσου προϊόντος που είναι η ασκορβυλική ρίζα:



Οι ελεύθερες ρίζες είναι χημικές ουσίες που έχουν ένα τουλάχιστον ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στιβάδα (Evans, 2000; Halliwell, Gutteridge, 1985; Radak, 2000) και παράγονται συνέχεια κατά τον φυσιολογικό μεταβολισμό των κυττάρων (Sies, 1985). Εξαιτίας της μεγάλης αστάθειας τους, αντιδρούν γρήγορα με γειτονικά μόρια αφαιρώντας ή συνεισφέροντας αμοιβαία κάποια ηλεκτρόνια της εξωτερικής τους τροχιάς. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να ξεκινήσουν αλυσιδωτή αντίδραση με αποτέλεσμα την τροποποίηση πολλών μορίων, καθώς τα ηλεκτρόνια μπορούν να μετακινηθούν από ένα μόριο στο επόμενο (Clarkson, Thompson, 2000; Karlsson, 1997). Η μεγάλη δραστηρότητα τους οφείλεται στην ιδιότητά τους να δημιουργούν αλυσιδωτές αντιδράσεις (Bulkley, 1990). Οι ελεύθερες ρίζες διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες, α) τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) ή Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου (E.P.O.), β) τις δραστικές μορφές αζώτου (RNS) και γ) τις δραστικές μορφές θείου (RSS). Στο πίνακα 1 παρουσιάζονται αναλυτικά οι τρεις αυτές κατηγορίες.

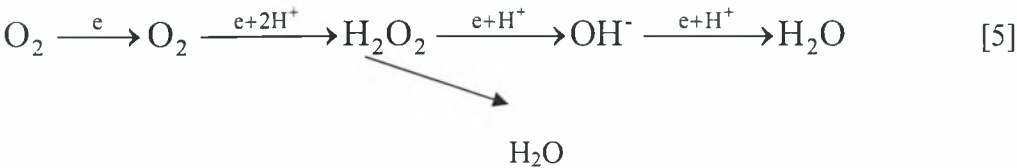
Πίνακας 1: Ταξινόμηση ελευθέρων ριζών.

Ελεύθερες Ρίζες	Μοριακός Τύπος
<u>Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου)</u>	<u>ROS (EPO)</u>
Ιόν υπεροξειδίου του οξυγόνου	$O_2^{\bullet -}$
Όζον	O_3
Μονήρης κατάσταση μοριακού οξυγόνου	O_2
Ρίζα υδροξυλίου	$OH^{\bullet}$
Υπεροξειδίο του Υδρογόνου	H_2O_2
Υδρουπεροξιδική ρίζα	$HO_2^{\bullet}$
Υποχλωρικό οξύ	$HOCl$
	$RO^{\bullet}$
Ρίζα αλκοξυλίου	$ROO^{\bullet}$
Ρίζα περοξυλίου	$ROOH^{\bullet}$
Υδροπεροξύλιο	
<u>Δραστικές Μορφές Αζώτου</u>	<u>RNS</u>
Οξειδίο του Αζώτου	$NO^{\bullet}$
Διοξειδίο του Αζώτου	$NO_2^{\bullet}$
Περοξεινιτρίτιο ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου	$ONOO^{\bullet -}$
<u>Δραστικές Μορφές Θείου</u>	<u>RSS</u>
Ρίζα Θείου	$RS^{\bullet}$

2.3 Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

Το 95% του οξυγόνου που φθάνει στα κύτταρα, υφίσταται σταδιακή ελεγχόμενη τετρασθενή αναγωγή σε H₂O με την πρόσληψη τεσσάρων ηλεκτρονίων που παράγονται στον κύκλο του Krebs, και μεταφέρονται σε αυτό μέσω των μιτοχονδριακών ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας από την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής σχηματίζονται δραστικά ενδιάμεσα χημικά προϊόντα που ονομάζονται δεσμευμένες ρίζες οξυγόνου (ΔΡΟ) και παραμένουν σταθερά συνδεδεμένες στα

ενεργά κέντρα των οξειδοαναγωγικών ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας με αποτέλεσμα να μην αποτελούν κίνδυνο για το κύτταρο. Αντίθετα, το 5% του οξυγόνου που φθάνει στα κύτταρα υφίσταται σταδιακή μονοσθενή αναγωγή με την πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου κάθε φορά:

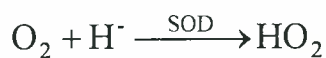


Η μονοσθενής αναγωγή του οξυγόνου γίνεται σε θέσεις που δεν συνδέονται με την αναπνευστική αλυσίδα. Έτσι, οι ρίζες του οξυγόνου που σχηματίζονται ανεξέλεγκτα, δεν είναι συνδεδεμένες σε συγκεκριμένες θέσεις, γι' αυτό ονομάζονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (EPO) (Clarkson, Thompson, 2000). Οι ρίζες αυτές ελευθερώνονται μέσα στο κύτταρο ή ορισμένες από αυτές, διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και μεταφέρονται σε άλλα σημεία του σώματος, παρουσιάζουν υψηλή χημική δραστηριότητα και μπορούν να καταστρέψουν τη φυσιολογική λειτουργία του κυττάρου (Sen, 1995). Ως δυνητικά κυτταροτοξικές EPO χαρακτηρίζονται το υπεροξειδικό ανιόν (O_2^-), η υδρουπεροξειδική ρίζα ($\text{HO}_2^\cdot$), το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), η υδροξυλική ρίζα ($\text{OH}^\cdot$) και η λιπουπεροξειδική ρίζα ($\text{LOO}^\cdot$, όπου L = λιπίδιο) (Bellus, 1978; Vollaard, Shearman, Cooper, 2005).

Υπεροξειδικό ανιόν (O_2^-). Η πρόσληψη ενός ηλεκτρονίου από ένα μόριο οξυγόνου που βρίσκεται στη φυσική ηλεκτρονική κατάσταση του προϋποθέτει την εισαγωγή του σε ένα από τα π-αντιδεσμικά τροχιακά του. Στην περίπτωση αυτή σχηματίζεται το υπεροξειδικό ανιόν που, στην πράξη, είναι μοριακό οξυγόνο με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, που του παρέχει αυξημένη χημική δραστηριότητα και ένα στοιχειώδες αρνητικό φορτίο. Η ρίζα αυτή είναι βραχύβια, πολύ δραστική σε υδρόφιλο περιβάλλον και δεν μπορεί να διαπεράσει τις βιολογικές μεμβράνες, εκτός αν υπάρχει διαθέσιμο κανάλι ανιόντων για να διευκολύνει τη διάβαση της. Έτσι, η κινητικότητα της ρίζας αυτής μετά το σχηματισμό της περιορίζεται στον ενδοκυττάριο χώρο. Ο περιορισμός αυτός δε μειώνει τη δυνατότητα πρόκλησης βλαβών από το υπεροξειδικό ανιόν, αλλά καθορίζει πιθανότατα τον τύπο της βλάβης αυτής. Η κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι διαπερατή στη ρίζα

αυτή. Αυξημένη παραγωγή υπεροξειδικού ανιόντος σε θέσεις που βρίσκονται κοντά σε μεμβράνες είναι δυνατό να προκαλέσει τη βλάβη τους εξαιτίας της υδρόφοβης φύσης του χώρου μεταξύ των μεμβρανών. Η υψηλή δραστηριότητα του υπεροξειδικού ανιόντος το καθιστά ικανό να μεταθέτει χλώριο ακόμα και από αδρανείς ενώσεις όπως είναι ο τετραχλωράνθρακας (CCl₄).

Υδροϋπεροξειδική ρίζα (HO₂). Η πρόσληψη ενός πρωτονίου από το υπεροξειδικό ανιόν καταλύεται από την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και οδηγεί στο σχηματισμό της υδροϋπεροξειδικής ρίζας:



Σε pH 7.4 μόνο ένα μικρό μέρος του υπεροξειδικού ανιόντος μπορεί να υπάρξει στην πρωτονιωμένη μορφή του, ως υδροϋπεροξειδική ρίζα. Σε ισχαιμικούς ιστούς ή κοντά σε βιολογικές μεμβράνες όπου οι συνθήκες είναι περισσότερο όξινες, μεγαλύτερο μέρος του υπεροξειδικού ανιόντος μπορεί να υπάρχει υπό μορφή υδροϋπεροξειδικής ρίζας. Η ρίζα αυτή είναι πολύ δραστική και τοξική και έχει μειωμένη πολικότητα σε σχέση με το υπεροξειδικό ανιόν με αποτέλεσμα να είναι σε θέση να διασχίζει την κυτταρική μεμβράνη.

Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Η πρόσληψη ενός μονήρους ηλεκτρονίου από το υπεροξειδικό ανιόν οδηγεί στο σχηματισμό του δισθενούς υπεροξειδικού ιόντος (O₂²⁻), που δεν έχει πλέον ασύζευκτα ηλεκτρόνια και εξ ορισμού δεν είναι ρίζα. Ο σχηματισμός του ιόντος αυτού in vivo σε φυσιολογικό pH συνοδεύεται από την ταχύτατη πρόσληψη πρωτονίου του, που οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου. Σε υδατικό διάλυμα, δύο υπεροξειδικά ανιόντα αντιδρούν αυτόματα ή με την καταλυτική επίδραση της SOD με δύο πρωτόνια και σχηματίζεται υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο:



Άλλωστε, η υδρουπεροξειδική ρίζα, όπου σχηματίζεται, μετατρέπεται παρουσία του υπεροξειδικού ανιόντος και πρωτονίων σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο με την καταλυτική επίδραση της SOD:



Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να σχηματισθεί απευθείας από τη δισθενή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου, χωρίς τον ενδιάμεσο σχηματισμό υπεροξειδικού ανιόντος. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από ορισμένες οξειδάσες όπως η D-αμινοξική οξειδάση και η γλυκολική οξειδάση που βρίσκονται σε ειδικά κυτταρικά οργανίδια που ονομάζονται υπεροξυσώματα. Από το υπεροξείδιο του υδρογόνου που σχηματίζεται στα υπεροξυσώματα, ποσοστό μεγαλύτερο από 40% διαχέεται στο κυτταρόπλασμα. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι σχετικά αδρανές αλλά μπορεί να διασχίσει την κυτταρική μεμβράνη.

Υδροξυλική ρίζα (OH). Πρώτος ο Fenton πρότεινε την ύπαρξη της υδροξυλικής ρίζας το 1894 και υποστήριξε ότι σχηματιζόταν κατά την οξείδωση του δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) από το υπεροξείδιο του υδρογόνου:

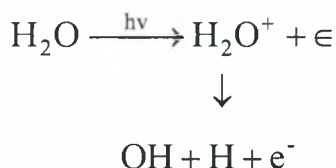


Αν και πολλά άλλα μέταλλα, όπως είναι το τρισθενές τιτάνιο (Ti^{3+}), ο μονοσθενής χαλκός (Cu^+) και το δισθενές κοβάλτιο (Co^{2+}) προωθούν in vitro το σχηματισμό της υδροξυλικής ρίζας, ο δισθενής σίδηρος (Fe^{2+}) αποτελεί το κύριο ιόν που προωθεί το σχηματισμό της in vivo. Η αντίδραση του Fenton τροποποιήθηκε για να περιλάβει την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου από το υπεροξειδικό ανιόν. Η αντίδραση αυτή γίνεται σε δύο στάδια κατά τους Haber και Weiss:



Επιπλέον, η υδροξυλική ρίζα μπορεί να σχηματισθεί κατά την ομολυτική διάσπαση του ενός από τους δύο ομοιοπολικούς δεσμούς υδρογόνου-οξυγόνου του

H₂O. Όταν οι ιστοί εκτίθενται σε ακτινοβολία (γ-, χ-, β-ακτινοβολία, κ.λ.π.), το μεγαλύτερο μέρος της ενεργείας που προσλαμβάνεται, απορροφάται από το νερό του κυττάρου, αφού αυτό αποτελεί το κύριο συστατικό του. Έτσι, η ακτινοβολία προκαλεί την ετερολυτική διάσπαση του ενός από τους δύο ομοιοπολικούς δεσμούς υδρογόνου-οξυγόνου στο νερό, αφήνοντας τελικά ένα ηλεκτρόνιο στο οξυγόνο και ένα ηλεκτρόνιο στο υδρογόνο, με αποτέλεσμα να σχηματίζονται δύο ρίζες, η υδροξυλική και η υδρογονική ή άτομο του υδρογόνου:



Η υδροξυλική ρίζα είναι η πιο δραστική ρίζα που είναι γνωστή μέχρι σήμερα στη Χημεία και μπορεί να αντιδράσει με σχεδόν κάθε τύπο μορίου (σάκχαρα, αμινοξέα, φωσφολιπίδια και νουκλεϊκά οξέα). Έτσι, οι αντιδράσεις Fenton ή Haber-Weiss είναι πολύ σημαντικές αφού αποτελούν τους μηχανισμούς μέσω των οποίων η περιορισμένη χημική δραστικότητα του υπεροξειδικού ανιόντος και του υπεροξειδίου του υδρογόνου μπορεί να αυξηθεί με τη μετατροπή τους στην πολύ δραστική χημικά υδροξυλική ρίζα. Άλλωστε, η αυξημένη χημική δραστικότητα της υδροξυλικής ρίζας είναι υπεύθυνη για τον πολύ περιορισμένο βιολογικό χρόνο ημίσειας ζωής που έχει. Η σημαντικότερη ιδιότητα της υδροξυλικής ρίζας είναι η ικανότητα της να δημιουργεί δευτερογενείς ρίζες που είναι λιγότερο δραστικές από τις πρωτογενείς, αλλά δεν είναι αδρανείς. Οι δευτερογενείς ρίζες μπορεί να προκαλέσουν βλάβη στη θέση παραγωγής τους ή σε θέσεις απομακρυσμένες από αυτήν. Η υδροξυλική ρίζα είναι τόσο δραστική ώστε συνήθως αντιδρά άμεσα με άλλα μόρια που βρίσκονται στη θέση του σχηματισμού της ή κοντά σε αυτή.

2.4 Αντιοξειδωτικός μηχανισμός

Οι ελεύθερες ρίζες (EPO) παράγονται συνέχεια σε μικρές ποσότητες κατά το φυσιολογικό μεταβολισμό των κυττάρων του οργανισμού. Όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να εξουδετερώνουν τις βλαπτικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου και να ελέγχουν τη δραστικότητά τους (Bulkley, 1990). Η οξειδάση του κυττοχρώματος των μιτοχονδρίων καταναλώνει το

μεγαλύτερο μέρος του διαθέσιμου μοριακού οξυγόνου με ελεγχόμενο τρόπο, έτσι ώστε να μην περισσεύει οξυγόνο ικανό να μετατραπεί σε ελεύθερες ρίζες.

Πέρα από την προστασία που του προσφέρει η δομική κατασκευή του το κύτταρο διαθέτει δύο βασικές γραμμές άμυνας, την ενζυμική και τη μη ενζυμική (Sen, 1995) και είτε παράγονται στο σώμα μας (ενδογενή), είτε προέρχονται από την τροφή (εξωγενή). Δηλαδή τα αντιοξειδωτικά τούτα συστήματα είναι αποτελεσματικά διότι μπορούν να δώσουν το ηλεκτρόνιό τους στις ελεύθερες ρίζες με σκοπό αυτές να αδρανοποιηθούν και να σταματήσει η δράση τους. Το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα έχει ζωτική σημασία στην προστασία του οργανισμού κατά του οξειδωτικού στρες. Τα ενζυματικά και μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά εμφανίζουν μεγάλη προσαρμοστικότητα στην οξεία και χρόνια άσκηση σύμφωνα με την βιβλιογραφική ανασκόπηση του Ji (1999).

Γενικά κάθε ουσία που όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το οξειδωμένο υπόστρωμα, καθυστερεί ή αναστέλλει σημαντικά την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος (Halliwell, Gutteridge, 1998). Στο παρακάτω πίνακα (πίνακας 2) παρουσιάζονται οι τρεις αυτές κατηγορίες.

Πίνακας 2: Αντιοξειδωτικός μηχανισμός στα βιολογικά συστήματα

Ενδοκυττάρια ενζυμικά
Δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD)
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)
Καταλάση (CAT)

Εξωκυττάρια μη ενζυμικά

Ασκορβικό οξύ

Ουρικό οξύ

Θειόλες

GSH

Λιποϊκό οξύ

Διϋδρολιποϊκό οξύ

Τρανσφερρίνη

Λακτοφερρίνη

Σερουλοπλασμίνη

Αλβουμίνη

Χολερυθρίνη

Φεριτίνη

Απτοσφαιρίνη

Αιμοπεξίνη

Μη ενζυμικά κυτταρικής μεμβράνης

Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)

Συνένζυμο Q₁₀

B-καροτίνη

Βιταμίνη A

Συστήματα επιδιόρθωσης ή αποικοδόμησης

Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η υπεροξειδάση της γλουτοθειόνης (GPX), η ρεκτουδάση της γλουταθειόνης (GR), η καταλάση (CAT) και ορισμένες μεταλλοπρωτεΐνες (σερουχοπλασμάνη, τρανσφερίνη). Αντίστοιχα τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν λιπόφιλες και υδρόφιλες αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η α-τοκοφερόλη, το ασκορβικό οξύ, το β-καροτένιο, το ουρικό οξύ ή γλουταθειώνη (GSH), η ουμπικινόνη (Q10) (Mylonas, Kouretas, 1999).

Πέρα από την προστασία που του προσφέρει η δομική κατασκευή του, το κύτταρο διαθέτει τρεις βασικές γραμμές άμυνας.

Η πρώτη γραμμή άμυνας αποτελείται από ένζυμα που "εκκαθαρίζουν" καταλυτικά τις EPO που παράγονται κατά τη μη ελεγχόμενη μονοσθενή αναγωγή του μοριακού οξυγόνου. Τα σημαντικότερα από τα ένζυμα που περιλαμβάνονται σε αυτή τη γραμμή άμυνας είναι η υπεροξειδική δισμουτάση, η οξειδάση της ανηγμένης γλουταθειόνης, η καταλάση και ορισμένες μεταλλοπρωτεΐνες (σερουλοπλασμίνη, τρανσφερρίνη).

Η δεύτερη ενδογενής γραμμή άμυνας του οργανισμού στη βλαπτική δράση των EPO αποτελείται από σειρά μη ενζυμικών συστημάτων που περιλαμβάνουν λιπόφιλες και υδρόφιλες αντιοξειδωτικές ουσίες όπως είναι η α-τοκοφερόλη, το ασκορβικό οξύ, το β-καροτένιο, το ουρικό οξύ, η γλυκόζη, η αλβουμίνη, η τρανσφερρίνη, η λακτοφερρίνη, η απτοσφαιρίνη, η αιμοπεξίνη, διάφορες θειόλες μεταξύ των οποίων η GSH και το διϋδρολιποαμίδιο, η ουμπικινόλη και η βιλιρουβίνη. Οι δύο πρώτες ενδογενείς γραμμές άμυνας συνδέονται μεταξύ τους σε ορισμένες περιπτώσεις, με αποτέλεσμα την αναγέννηση των συμμετεχόντων μορίων χωρίς την παραγωγή νέων ριζών.

Ως τρίτη γραμμή άμυνας του οργανισμού στη βλαπτική δράση των EPO θεωρούνται οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης ή πλήρους αποικοδόμησης των προσβληθέντων πρωτεϊνών, πυρηνικών οξέων και λιπιδίων.

2.4.1 Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) πρώτη φορά απομονώθηκε από τους Mann και Kleilin (1938). Η καταλυτική της λειτουργία ανακαλύφθηκε από τους Mc Cord και Fridovitch (1969) και υπάρχει σε τρεις τουλάχιστο μορφές. Η μια μορφή περιέχει ψευδάργυρο και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Η δεύτερη μορφή περιέχει μαγνήσιο και βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και η τρίτη περιέχει σίδηρο και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Ferrari, Ceconi, et al., 1991, Mylonas, Kouretas, 1999). Η SOD καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδικού ανιόντος σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και σε οξυγόνο:



Η αντίδραση αυτή γίνεται αυτόματα, αλλά η SOD αυξάνει τον ενδοκυττάριο ρυθμό της κατά 10^9 φορές (Ferrari, Ceconi, et al., 1991) γιατί παρακάμπτει την ηλεκτροστατική απώση των αρνητικά φορτισμένων υπεροξειδικών ανιόντων.

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που υπάρχει σχεδόν σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού. Το ένζυμο αυτό συναντάται σε υποκυτταρικά οργανίδια, όπως στα υπεροξυσωμάτια του ήπατος και των νεφρών ή στο κυτταρόπλασμα, όπως στα μυοκαρδιακά κύτταρα (σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις) (Mannervick, Axelsson 1980; Sinclair, et al., 1990). Η καταλάση καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό:



Η υπεροξειδάση της ανηγμένης γλουταθειόνης (Px-GSH) απαντάται σε δύο μορφές. Η μια μορφή, που είναι η πιο διαδεδομένη, φέρει στο ενεργό κέντρο της σελήνιο και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια, ενώ η δεύτερη μορφή δεν έχει σελήνιο στο ενεργό κέντρο της. Το ένζυμο αυτό παρουσιάζει υψηλή δραστηριότητα στο ήπαρ και στα ερυθρά αιμοσφαίρια, μέση δραστηριότητα στους πνεύμονες και στην καρδιά και χαμηλή δραστηριότητα στους μυς (Chow, Tappel, 1972). Για το μυοκαρδιακό κύτταρο η Px-GSH αποτελεί το σημαντικότερο ενδογενή μηχανισμό άμυνας.

Η Px-GSH καταλύει την αντίδραση των υδροϋπεροξειδίων με την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH). Από την αντίδραση αυτή σχηματίζεται οξειδωμένη γλουταθειόνη και το προϊόν αναγωγής του υδροϋπεροξειδίου:



Η Px-GSH παρουσιάζει εξειδίκευση για το δότη των ατόμων υδρογόνου, που μπορεί να είναι μόνο η GSH, αλλά δεν παρουσιάζει εξειδίκευση για το υδροϋπεροξείδιο, που μπορεί να είναι από το υπεροξείδιο του υδρογόνου έως τα λιποϋδροϋπεροξείδια.

Είναι φανερό ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου αποτελεί κατάλληλο υπόστρωμα τόσο για την καταλάση όσο και την Px-GSH, γεγονός που πιθανότατα

οφείλεται στην κατανομή των δύο αυτών ενζύμων στους ίδιους υποκυτταρικούς χώρους.

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η Px-GSH αναγεννάται με την αναγωγή της GSSG που καταλύεται από τη GSSG-οξειδοοδουκτάση, η οποία δρα μόνο παρουσία NADPH και βρίσκεται στις ίδιες θέσεις που βρίσκεται η Px-GSH (Flohe, Schlegel 1971).

Ορισμένες μεταλλοπρωτεΐνες παρουσιάζουν οξειδωτική δράση, στην οποία δεν εμπλέκονται τα μέταλλα που φέρουν στο μόριο τους. Η σερουλοπλασμίνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που κυκλοφορεί στο πλάσμα σε συγκέντρωση 300 mg/100 ml κατά προσέγγιση και θεωρείται ως η πρωτεΐνη μεταφοράς του χαλκού. Επιπλέον, η σερουλοπλασμίνη εμφανίζει σημαντικές οξειδωτικές ιδιότητες. Έτσι, η πρωτεΐνη αυτή οξειδώνει το δισθενή σίδηρο (Fe^{2+}) σε τρισθενή (Fe^{3+}) χωρίς την απελευθέρωση EPO και παρεμποδίζει την $\text{Fe}^{2+}(\text{Cu}^+)$ -εξαρτώμενη υπεροξειδωση των λιπιδίων. Τα επίπεδα της σερουλοπλασμίνης αυξάνονται σημαντικά κατά τη διάρκεια λοιμώξεων, φλεγμονωδών νοσημάτων και εγκυμοσύνης. Η τρανσφερρίνη, που αποτελεί τον κύριο φορέα των ιόντων του σιδήρου, παρουσιάζει επίσης ασθενή οξειδωτική δράση.

Οι ενδογενείς ενζυμικοί μηχανισμοί άμυνας του οργανισμού στη βλαπτική δράση των EPO βρίσκονται κάτω από γενετικό έλεγχο. Η παρουσία του υπεροξειδίου του υδρογόνου επάγει την παραγωγή τριάντα πρωτεϊνών. Από τις πρωτεΐνες αυτές, εννέα ελέγχονται από το γονίδιο "oxy-R". Το γονίδιο αυτό ελέγχει, εκτός από την πρωτεϊνική απάντηση του οργανισμού στο οξειδωτικό stress, την πρωτεϊνική απάντηση του στη θερμική καταπληξία και στους αλκυλιωτικούς παράγοντες (Storz, Tartaglia, Ames, 1990). Από τις τριάντα πρωτεΐνες που η παραγωγή τους επάγεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, οι πέντε επάγονται και από τη θερμική καταπληξία. Από τις πέντε αυτές πρωτεΐνες, τρεις ελέγχονται από το γονίδιο oxy-R (Morgan, Christman, Jacobson, et al., 1986).

2.4.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο γνωστή αντιοξειδωτική βιταμίνη από τις τέσσερις τοκοφερόλες που αποτελούν τη βιταμίνη E. Η α-τοκοφερόλη είναι λιποδιαλυτό μόριο που βρίσκεται στις μεμβράνες των κυττάρων και στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Η βιταμίνη αυτή φέρει μια υδροξυλομάδα, της οποίας το άτομο του υδρογόνου αποσπάται εύκολα από το μόριο. Έτσι, οι ρίζες που σχηματίζονται ως ενδιάμεσα

προϊόντα κατά την υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων, αντιδρούν εκλεκτικά με την α-τοκοφερόλη και μετατρέπονται σε λιποϋδροϋπεροξειδία με αποτέλεσμα τον τερματισμό της αλυσιδωτής αντίδρασης. Η α-τοκοφερόλη μετατρέπεται σε α-τοκοφερυλική ρίζα (α-τοκοφερόλη-O[•]) που θεωρείται ακίνδυνη για τον ανθρώπινο οργανισμό. Η ρίζα αυτή είναι υδατοδιαλυτή, γι' αυτό μεταφέρεται στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης ή στο υδρόφιλο κυτταρόπλασμα. Σε υδρόφιλο περιβάλλον η α-τοκοφερυλική ρίζα αναγεννάται αντιδρώντας με το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) (Weters, Sies 1988), που μετατρέπεται σε ασκορβυλική ρίζα (AH[•]) (Sinclair, Barnett, Lunec, 1990).

Ορισμένες θειόλες όπως η GSH, πιθανολογείται ότι μπορούν να αντιδράσουν με την α-τοκοφερυλική ρίζα με αποτέλεσμα την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Weters, Sies, 1988). Η περιεκτικότητα ορισμένων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) του πλάσματος σε α-τοκοφερόλη είναι το μέτρο της άμυνας τους στην υπεροξειδωση και, κατ' επέκταση, στην εξέλιξη νόσων που σχετίζονται με την υπεροξειδωση αυτή όπως είναι η αθηροσκλήρωση (Gey, Brubacher, Stahelin, 1987).

Συγκεντρώσεις α-τοκοφερόλης υψηλότερες από τις φυσιολογικές ενδέχεται να προωθούν την οξειδωση των λιπαρών οξέων και να προκαλούν το σχηματισμό λιποξυ-ριζών. Οι τοκοφερόλες, εκτός από τη δράση τους ως εκκαθαριστές ριζών που προέρχονται από την υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων, αντιδρούν με το διηγεμένο οξυγόνο και το αδρανοποιούν (Kaiser, DiMascio, Murphy, Sies, 1990).

Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) είναι ένας ακόμα γνωστός αντιοξειδωτικός παράγοντας. Η βιταμίνη αυτή αποτελεί το υδατοδιαλυτό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο κυτταρόπλασμα ή στο εξωκυττάριο υγρό. Η αντιοξειδωτική δράση της συνδέεται με την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Weters, Sies, 1988; Clarkson, et al., 2000). Στην περίπτωση αυτή το ασκορβικό οξύ (AH[•]) μετατρέπεται σε ασκορβυλική ρίζα (AH[•]), που είναι σχετικά αδρανής και ακίνδυνη για τον οργανισμό. Η ρίζα αυτή ανάγεται σε ασκορβικό οξύ (AH₂) από τη NADH-ρεδοукτάση.

Το ασκορβικό οξύ σε συνδυασμό με δισθενή ή με τρισθενή σίδηρο μπορεί να διεγείρει έντονα την υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων. Η ασκορβυλική ρίζα που προκύπτει, αν δεν αναγεννηθεί από την NADH-ρεδοукτάση, μπορεί να ανάγει ένα άλλο ιόν τρισθενούς σιδήρου (Bieiski, Richter, 1975). Κατά τη διάρκεια της οξειδωσης του ασκορβικού οξέος σχηματίζεται επίσης υπεροξειδίο του υδρογόνου.

Οι θειόλες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην προστασία του οργανισμού από τις βλαπτικές επιδράσεις των EPO. Έτσι, η GSH, ένα τριπεπτίδιο (γ-Glu-Cys-Gly) που



αποτελεί την κύρια θειόλη μικρού μοριακού βάρους του κυττάρου, είναι εκκαθαριστής του υπεροξειδίου του υδρογόνου, των λιποϋδροϋπεροξειδίων και των φωσφολιποϋδροϋπεροξειδίων.

Οι θειόλες, κάτω από ορισμένες συνθήκες όπως είναι το αλκαλικό pH και η παρουσία ιόντων μετάλλων μετάπτωσης (Fe^{2+} , Cu^{+}), είναι δυνατό να εμφανίσουν οξειδωτική δράση. Η οξειδωτική δράση της GSH σχετίζεται με την αναγωγή του δισθενούς σιδήρου. Οι θειόλες οξειδώνονται παρουσία οξυγόνου και παράγουν θειϊλικές ρίζες (GS $\cdot$), υπεροξειδικό ανιόν και υδροξυλική ρίζα.

Τα καροτενοειδή είναι μια ομάδα αντιοξειδωτικών ουσιών που απαντώνται στον ανθρώπινο οργανισμό σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από εκείνες των τοκοφερολών. Οι αντιοξειδωτικές αυτές ουσίες, εξαιτίας της καλής διαλυτότητας τους, μπορούν να προστατεύουν υδρόφοβα μόρια που δεν είναι προσεγγίσιμα από τις τοκοφερόλες. Από τα καροτενοειδή, το λυκοπένιο που είναι το πλησιέστερο πρόδρομο μόριο του β-καροτενίου, αποτελεί τον αποτελεσματικότερο βιολογικό εκκαθαριστή του διηγερμένου οξυγόνου (Krisinsky, 1989). Ένα μόριο του λυκοπενίου μπορεί να απενεργοποιήσει εκατοντάδες μόρια διηγερμένου οξυγόνου με ένα μηχανισμό φυσικής απόσβεσης. Ανάλογη αλλά ασθενέστερη δράση εμφανίζει το β-καροτένιο. Τα καροτενοειδή, οι φυτικές φαινόλες και άλλα φυτικά εκχυλίσματα, χρησιμοποιούνται σε συμπληρώματα διότι έχει αποδειχθεί ότι η αντιοξειδωτική τους δράση βοηθά στην πρόληψη ασθενειών (Mylonas, Kouretas, 1999).

Το ουρικό οξύ έχει την ικανότητα να δεσμεύει σταθερά τα ιόντα σιδήρου και χαλκού, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων και να αποτελεί εκκαθαριστή EPO (Ames, Cathcart, Schwiers, Hochstein, 1981).

Η γλυκόζη, της οποίας η συγκέντρωση στο πλάσμα αυξάνει σημαντικά μετά από γεύμα πλούσιο σε υδατάνθρακες, αποτελεί εκκαθαριστή της υδροξυλικής ρίζας.

Η αλβουμίνη, που βρίσκεται σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα (50-60 mg/ml), δεσμεύει ισχυρά τα ιόντα μονοσθενούς χαλκού και ασθενώς τα ιόντα δισθενούς σιδήρου. Τα ιόντα του μονοσθενούς χαλκού που βρίσκονται δεσμευμένα στο μόριο της μπορούν να μετέχουν στην αντίδραση Fenton ώστε να σχηματίζεται υδροξυλική ρίζα από υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η υδροξυλική ρίζα που σχηματίζεται δεσμεύεται αμέσως στην αλβουμίνη και δεν ελευθερώνεται στο πλάσμα. Έτσι, η δραστική αυτή ρίζα ασκεί τη βλαπτική δράση της στην αλβουμίνη και δεν καταστρέφει άλλα μόρια μεγαλύτερης βιολογικής σημασίας.

Η σερουλοπλασμίνη δεσμεύει ισχυρά μεγάλη ποσότητα ιόντων χαλκού, με αποτέλεσμα να δρα ως εκκαθαριστής της υδροξυλικής ρίζας με μηχανισμό ανάλογο με εκείνον που δρα η αλβουμίνη.

Η απτοσφαιρίνη και η αιμοπεξίνη δεσμεύουν την αιμοσφαιρίνη που κυκλοφορεί σε ελεύθερη μορφή. Η αιμοσφαιρίνη και η μεθαιμοσφαιρίνη είναι ισχυρές υπεροξειδάσες και είναι σε θέση να προκαλέσουν υπεροξειδωση λιπαρών οξέων. Η σύνδεση των σφαιρινών αυτών με την απτοσφαιρίνη και την αιμοπεξίνη περιορίζει σημαντικά τη δράση τους αυτή (Gutteridge, Smith, 1988).

Η τρανσφερρίνη και η λακτοφερρίνη δεσμεύουν το δισθενή σίδηρο με αποτέλεσμα να σταματούν ή να μειιάζουν τη συμμετοχή του στη λιπιδική υπεροξειδωση και σε αντιδράσεις τύπου Haber-Weiss που καταλύονται από αυτόν.

2.5 Οξειδωτικό στρες

Η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων, με επικράτηση των πρώτων, η οποία οδηγεί τελικά στη κυτταρική βλάβη καλείται οξειδωτικό στρες (Sies, 1985). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προέλθει είτε από αυξημένη παραγωγή των E.P.O., είτε από μειωμένη παραγωγή ενδογενών αντιοξειδωτικών (μεταλλάξεις) ή έλλειψη στη διαιτητική πρόσληψη αντιοξειδωτικών (βιταμίνη E και C). Στην περίπτωση αυτή οι ρίζες μπορούν να προσβάλουν τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες, τα ένζυμα και τα νουκλειακά οξέα (Clarkson, et al., 2000), προκαλώντας αντίστοιχα υπεροξειδωση, μετουσίωση, αδρανοποίηση και διαφοροποίηση. Επιπρόσθετα, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλαπτικές καταστάσεις για τα κύτταρα και τους ιστούς προκαλώντας γήρας και την ανάπτυξη διαφόρων νόσων (καρδιακά νοσήματα, πνευμονική δυσλειτουργία, νευρολογικές ασθένειες και καρκίνο) (Parthasarathy, Khan-Merchant, Penumetcha, Santanaki, 2001; Sies, 1991; Yu, 1994; Harrison, 1997; Gutteridge, 1993; De Loryeril, Salen, Accominotti, Cadau, Steghens, Bocecher de Leirb 2001; Vollaard, et al., 2005). Επίσης το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το μονοξείδιο του αζώτου ($NO^\bullet$) και η ρίζα του υδροξυλίου ($OH^\bullet$) έχει βρεθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν καταστροφές στο κυτταρικό τοίχωμα του (Ford-Hutchinson, 1985), τις πρωτεΐνες (Radak, Kaneko, Tahara, et al., 1999) το DNA του

κυττάρου (Breimer, 1988) και τα λίπη (Halliwell, Gutteridge, 1985; Slater, 1984, Lee, Paffenbanyer, 2000).

2.6 Βιολογικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών οξυγόνου

2.6.1 Θετικές επιδράσεις

Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών είναι μια φυσιολογική βιολογική διαδικασία απαραίτητη στην αναβολική λειτουργία των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού του DNA και του RNA καθώς και βασικών πρωτεϊνών (Karlsson, 1997). Οι E.P.O. σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα και πιο συγκεκριμένα με τις διαδικασίες καταστροφής ιών-βακτηριδίων (αντιγόνων) κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης (Fehrenbach, et al., 2001; Jenkins, 1988; Rimbach, et al., 1999), καθώς και τη θεραπεία τραυματισμένων οργάνων ή ιστών κατά τη διάρκεια φλεγμονής, ύστερα από έντονη άσκηση και έκκεντρες συσπάσεις (Malm, 2001). Επιπροσθέτως, παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση των κυτταρικών σημάτων ή στη βιογένεση των κυττάρων καθώς μπορούν να μεταδώσουν μηνύματα ή να επηρεάσουν την οξειδωαναγωγική κατάσταση του οργανισμού (Linnane, Zhang, Yarovaya, et al., 2002; Reid, 2001; Rimbach, et al., 1999; Sen, 2001; Sen, Packer, 1996). Η θετική δράση των E.P.O. επισημαίνεται στη λειτουργία του μυϊκού συστήματος με την αύξηση της μυϊκής συστολής κατά την αύξηση παραγωγής των E.P.O. καθώς και απώλεια των συστατικών μυών κατά την αναστολή τους (Andrade, Reid, Allen, et al., 1998; Coombes, Powers, Rowell, et al., 2001; Reid, 2001).

2.6.2 Αρνητικές επιδράσεις

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, οι E.P.O. διακρίνονται για την αστάθειά και την έντονη δραστηρότητά τους με συνέπεια να προκαλούν κυτταρικές βλάβες και να μεταβάλλουν προσωρινά ή οριστικά την ομοιότητα του κυττάρου (Nicotera, 1994). Επιπροσθέτως, οι E.P.O. αντιδρούν σχεδόν με όλα τα μακρομόρια και δημιουργούν αρκετές βλάβες σε αυτά, αλλάζοντας τη μορφή και το μέγεθος τους (Alessio, 1993; Cooper, Vollaard, Choueiri, 2002; Jenkins, 1988; Pietta, 2000).

Επιπτώσεις των E.P.O. στα λιπαρά οξέα. Ο σχηματισμός των δραστικών ελευθέρων ριζών στα κύτταρα και τους ιστούς μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες στο περιβάλλον των βιομεμβρανών (Slater, 1984). Τα λιπίδια αποτελούν μια ομάδα ουσιών με κύριο χαρακτηριστικό ότι είναι αδιάλυτα στο νερό. Στα λιπίδια συμπεριλαμβάνονται τα λιπαρά οξέα, οι ακυλογλυκεφόλες, τα γλυκεροφωσφολιπίδια και τα στεροειδή (Halliwell, Gutteridge, 1999).

Οι μεμβράνες που περιβάλλουν τα κύτταρα και οι λιποπρωτεΐνες περιέχουν μεγάλες ποσότητες πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) που οξειδώνονται σχετικά εύκολα. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχουν δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς άνθρακα – άνθρακα ($-CH=CH-$). Στα PUFAs των βιολογικών συστημάτων ο διπλός δεσμός έχει την τάση να βρίσκεται σε κάθε τρίτο άτομο άνθρακα ($-CH=CH-CH_2-CH=CH-$). Οι διπλοί δεσμοί στο PUFAs δεν είναι ποτέ συζευγμένοι και στην οργανική χημεία συζευγμένοι διπλοί δεσμοί ή συζευγμένα διένια ονομάζονται δύο διπλοί δεσμοί που χωρίζονται με έναν απλό δεσμό ($-CH=CH-CH=CH-CH-$).

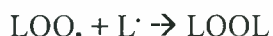
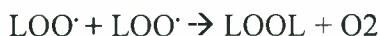
Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν τα PUFAs των κυτταρικών μεμβρανών και αφαιρούν ένα άτομο υδρογόνου, κυρίως από μια μεθυλενική ομάδα που βρίσκεται ανάμεσα στους δύο διπλούς δεσμούς του PUFA. Έτσι το άτομο του υδρογόνου που φεύγει αφήνει στη μεθυλενική ομάδα το μοναδικό του ηλεκτρόνιο και σχηματίζεται αλκυλορίζα ($-CH^{\cdot}-$). Από το σημείο αυτό αρχίζει η λιπιδική υπεροξειδωση, η οποία δείχνει να έχει μία προτίμηση στα PUFAs η οποία αυξάνεται με τον αριθμό των διπλών δεσμών.

Η λιπιδική υπεροξειδωση έχει τρία στάδια: έναρξη (initiation), διάδοση (propagation) και τερματισμό (termination) και μπορούμε να την παρακολουθήσουμε φασματομετρικά, διότι τα συζευγμένα διένια απορροφούν ισχυρά σε μήκος κύματος 230-235 nm (Clarkson, Thompson, 2000).

Ως έναρξη της λιπιδικής υπεροξειδωσης εννοούμε την πρώτη αντίδραση αφαίρεσης υδρογόνου από τα PUFAs. Οι λιποϋπεροξειδικές ρίζες ($LOO^{\cdot}$) που σχηματίζονται από την πρώτη αλυσιδωτή αντίδραση μπορούν να αφαιρέσουν υδρογόνο από ένα άλλο γειτονικό λιπαρό οξύ και αρχίζουν μια νέα αλυσιδωτή αντίδραση λιπιδικής υπεροξειδωσης. Με τον τρόπο αυτό τα $LOO^{\cdot}$ Προωθούν την διάδοση της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε άλλα λιπαρά οξέα.

Ελεύθερες ρίζες, οι οποίες μπορούν να «επιτεθούν» στα PUFAs είναι η ρίζα του υδροξυλίου (OH) (Mylonas, Kouretas, 1999), η αλκοξυλικύριζα (RO[•]), η υπεροξειδική ρίζα (ROO[•]).

Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις που ακολουθούν την έναρξη συνεχίζονται στο σημείο εκείνο που οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν μεταξύ τους και εξουδετερωθούν:



ή διακόπτονται με την παρεμβολή ουσίας (όπως είναι η βιταμίνη E) που εξουδετερώνει τις ελεύθερες (Sen, 1995).

Τελικά προϊόντα από την διάσπαση των λιπιδικών υπεροξειδίων είναι αέρια υδρογονάνθρακες (αιθάνιο, αιθυλένιο, πεντάνιο) και η μαλονική διαλδεϋδη (MDA). Η MDA είναι κορεσμένη διαλδεϋδη αρκετά τοξική, σχηματίζεται σε μικρές ποσότητες και χρησιμοποιείται σαν δείκτης της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Finaud et al., 2006; Halliwell, et al., 1989).

Τέλος η λιπιδική υπεροξειδωση ενοχοποιείται για τη γήρανση, παθήσεις όπως ο καρκίνος, η αθηροσκλήρωση, παγκρεατίτιδα, μυϊκή καταστροφή, άσθμα, διαβήτης κ.α. (Mylonas, Kouretas, 1999).

Επιπτώσεις των E.P.O. στις πρωτεΐνες. Η επίδραση των E.P.O. στις πρωτεΐνες είναι δυνατό να προκαλέσει μεταλλάξεις δομικών πρωτεϊνών και δυσλειτουργία των ενζύμων (Radak, Kaneko, Tahara, et al., 1999), καταστροφή των αμινοξέων τους, συσσωμάτωσή τους, αλλαγή του καθαρού φορτίου τους και διάσπασή τους σε συγκεκριμένες θέσεις που οδηγούν συνήθως σε καταστροφή της δευτεροταγούς και της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών αυτών και τελικά στη μετουσίωσή τους. Επιπλέον, προκαλούν διαταραχές στις οδούς μετάδοσης μηνύματος με συνέπεια σημαντικές αλλαγές στις ιδιότητες των μεμβρανών και των κυττάρων όπου ανήκουν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Η οξειδωση των πρωτεϊνών μπορεί να επέλθει από φλεγμονές, από τη άσκηση ή την ισχαιμία-επαναιμάτωση (Levine, 2002; Stadtman, Levine, 2000), ωστόσο όμως η καταστροφή των πρωτεϊνών αυξάνεται σταδιακά με την ηλικία (Standman, 2001).

Επιπτώσεις των E.P.O. στα νουκλειακά οξέα. Το DNA είναι ένα πολύ ευαίσθητο μόριο στη δράση των E.P.O. in vivo (Dizdaroglu, Jaruga, Birincioglu, et

al., 2002). Οι E.P.O. μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική τροποποίηση του DNA, τη καταστροφή των βάσεων πουρίνης ή / και γουανίνης καθώς και τη διάσπαση των αλυσίδων διπλής έλικας τους. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η λανθασμένη κωδικοποίηση ή η πλήρης αδυναμία κωδικοποίησης που οδηγούν σε γενετικές αλλοιώσεις αλλά και σε παρεμπόδιση της σύνθεσης λιπαρών οξέων, πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων (Breimer, 1988). Πηγές της καταστροφής του DNA θεωρούνται το κάπνισμα, η χρόνια φλεγμονή και η διαρροή ενζύμων από τα μιτοχόνδρια, η οποία αυξάνεται με την άσκηση (Alessio, 1993; Beckman, Ames, 1997; Kasai, 2002). Εξαιτίας της ευαισθησίας του DNA, οι οργανισμοί έχουν αναπτύξει επιδιορθωτικούς μηχανισμούς ώστε να απομακρύνουν τις βλάβες του DNA και να διατηρείται αβλαβές το γενετικό υλικό. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου η ικανότητα των μηχανισμών αυτών μπορεί να ξεπεραστεί ή και να αλλάξει, κάτι που θα δημιουργήσει σοβαρές βλάβες στο DNA.

Επιπτώσεις των E.P.O. στο μυϊκό πόνο. Ένα μικρό ποσοστό των E.P.O. είναι απαραίτητο για τη μυϊκή συστολή (Andrade, et al., 1998; Coombes, et al., 2001; Reid, 2001). Ωστόσο, το οξειδωτικό στρες που επέρχεται από τη συσσώρευση των E.P.O. στους μύες, συμβάλλει στην κόπωση των ασκούμενων μυών και στο μυϊκό πόνο μετά από άσκηση που προκαλεί μυϊκή καταστροφή (Childs, Jacobs, Kaminski, et al., 2001; Evans, 2000; Radak, Pucsok, Mecseki, et al., 1999).

2.7 Ανίχνευση και μέτρηση του οξειδωτικού στρες

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παρουσιάζουν υψηλή δραστικότητα, γι' αυτό έχουν πολύ μικρό χρόνο ζωής και η συγκέντρωσή τους παραμένει χαμηλή. Έτσι, η μέτρηση τους με τις συνήθεις αναλυτικές τεχνικές είναι εξαιρετικά δύσκολο να πραγματοποιηθεί άμεσα (Radak, 2000). Η μέθοδος επιλογής για μια τέτοια μέτρηση παραμένει η φασματοσκοπία συντονισμού του ηλεκτρονικού spin. Η μέτρηση EPO που παράγονται σε ζώντες ιστούς συχνά επιτυγχάνεται με την τεχνητή αντίδραση τους με κάποιο παγιδευτή, που οδηγεί στο σχηματισμό σταθερών ελευθέρων ριζών, όπως τα νιτροξειδία, οι οποίες στη συνέχεια μετρούνται με φασματοσκοπία συντονισμού του ηλεκτρονικού spin (Rosen, Finkelstein, Rauckman, 1982).

Από τις τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποια που να δίνει ακριβή μέτρηση του οξειδωτικού στρες. Έτσι γίνονται δεκτές περισσότερες από μια τεχνικές που μπορεί να χρησιμοποιούνται για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων (Jenkins, 1988; Allessio, 1993; Halliwell, Gutteridge, 1985; Yu, 1992). Για αυτό καθιερώθηκε η μέτρηση με την χρήση διαφόρων μεθόδων έμμεσης ανίχνευσης, που ονομάζονται μέθοδοι των δακτυλικών αποτυπωμάτων και περιλαμβάνουν τα προϊόντα της λιπιδιακής και πρωτεϊνικής υπεροξειδωσης, την οξειδωτική βλάβη των νουκλειικών οξέων, την οξείδωση της γλουταθειώνης και τις αλλαγές που παρουσιάζονται στην κινητικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων και βιταμινών.

Η συγκέντρωση των ΕΡΟ στα βιολογικά συστήματα εκτιμάται συνήθως με τη μέτρηση των προϊόντων της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και ειδικότερα της (MDA) μαλονδιαλδεύδης (Jenkins, 2000; Clarkson, 1997). Η αλδεύδη αυτή σχηματίζει ένα έγχρωμο προϊόν όταν θερμαίνεται σε όξινο περιβάλλον παρουσία θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS), (Dahle, Hill, Holman, 1962; Clarkson, 1995). Επίσης και με την μέτρηση των αερίων αιθάνιο και πεντάνιο (Clarkson, et al., 2000).

Δύο επίσης δείκτες που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση του οξειδωτικού στρες είναι η γαλακτική αφυδρογονάση (LDH) και η (CK) κρεατινική κινάση τα οποία θεωρούνται ότι χαρακτηρίζουν τον μυϊκό τραυματισμό επειδή διαρρέουν από τους μυς κατά την διάρκεια της φλεγμονής των μυϊκών κυττάρων.

Το οξειδωτικό στρες, μετά την άσκηση, μπορεί να μετρηθεί και από την δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών καταλάση (CAT), το ουρικό οξύ (UA), την γλουταθειονική υπεροξειδάση (GPX), τις βιταμίνες Ε και C, και άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Επίσης προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η οποία αν και δεν διαχωρίζει τους αντιοξειδωτικούς παράγοντες στους οποίους οφείλεται, είναι κατατοπιστική για την κατάσταση του οξειδωτικού στρες του οργανισμού (Vollaard, et al., 2005).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι εξής δείκτες για την μέτρηση του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού: α) τα TBARS, β) τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC), γ) η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), δ) η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), ε) ο λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH/GSSG), στ) η καταλάση (CAT) και ζ) η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).

2.8 Οξειδωτικό στρες και οξεία άσκηση

Η άσκηση μπορεί να δημιουργήσει μια ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικού και αντιοξειδωτικού επιπέδου, δηλαδή την κατάσταση που λέγεται οξειδωτικό στρες (Leeuwenburgh, Heinecke, 2001). Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι η έντονη δραστηριότητα προκαλεί οξειδωτικό στρες (Allesio, Goldfarb, 1988; Allesio, 1993; Goldfarb, 1993; Ji, Mitchell, 1994). Στην άσκηση η συνολική πρόσληψη οξυγόνου αυξάνεται είκοσι φορές (Clarkson, et al., 2000) ενώ τα επίπεδα οξυγόνου σε μία μυϊκή ίνα αυξάνονται μέχρι και εκατό φορές (Ji, 1999; Mastaloudis, et al., 2001). Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι μετά την άσκηση αυξάνονται τα προϊόντα της λιπιδιακής υπεροξείδωσης όπως η MDA (μαλονδυαλδεΰδη) και τα λιπιδιακά υδροϋπεροξειδία (Lindsay, Romaschin, Walker, 1989; Davies, Quantanilla, Brooks, Parker, 1982; Kanter, Nolter, Holloszy, 1993).

Το 1978 εκπονήθηκε η πρώτη έρευνα συσχέτισης της φυσικής άσκησης (αερόβια) με την οξειδωτική βλάβη στους ιστούς του ανθρώπου (Dillard, Litov, Savin, Dumelin, Tappel, 1978). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μέτριας έντασης άσκηση αύξησε τα επίπεδα εκπνεόμενου πεντανίου, ενός προϊόντος της λιπιδιακής υπεροξείδωσης, κατά 1,8 φορές. Οι Allesio και συν. (1988) βρήκαν 349% υψηλότερα τα επίπεδα της MDA στους σκελετικούς μυς σε μη προπονημένους μετά από άσκηση 20 λεπτών. Οι Child και συν. (1998) εξετάζοντα αερόβια άσκηση μεγάλης διάρκειας (ημιμαραθώνιο δρόμο) βρήκαν ότι υπήρξε αύξηση της λιπιδιακής υπεροξείδωσης και του μυϊκού τραυματισμού υποδεικνύοντας ανεπάρκεια του αντιοξειδωτικού μηχανισμού στη διάρκεια αερόβιας άσκησης μεγάλης διάρκειας. Οι Mastaloudis και συν. (2001) μετά από άσκηση 50 χιλιομέτρων παρατήρησαν ότι η αερόβια άσκηση προκάλεσε λιπιδιακή υπεροξείδωση με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων της βιταμίνης E. Την αύξηση της οξείδωσης των πρωτεϊνών παρατήρησαν οι Radak και συν. (2003) ύστερα από παρόμοια άσκηση. Επιπλέον, οι Tsai και συν. (2001) βρήκαν ότι μετά από μαραθώνιο δρόμο υπήρξε αύξηση της CK και μεταβολιτών της λιπιδιακής υπεροξείδωσης σε άντρες δρομείς.

Στην αναερόβια άσκηση περιλαμβάνονται όλες εκείνες οι δραστηριότητες που αφορούν τα άλματα, τις ταχύτητες και τις ασκήσεις με αντιστάσεις. Ωστόσο, μικρά είναι τα ευρήματα που επικεντρώνονται στη παραγωγή των E.P.O. σε σχέση με την αναερόβια άσκηση (Groussard, et al, 2003). Οι Ramel και συν. (2004), μελέτησαν εάν η άσκηση αντιστάσεων επηρεάζει τα προϊόντα της οξείδωσης των λιπιδίων. Από τα

αποτελέσματα φάνηκε μετά την άσκηση αυξάνεται η συγκέντρωση της MDA (Ramel, Wagner, Elmadfa, 2004). Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν οι Dousset και συν. (2002) σε έρευνά τους όπου εξέτασαν τον ρόλο της ισομετρικής άσκησης στα άνω άκρα. Οι συγγραφείς παρατήρησαν αύξηση των TBARS στο αίμα, δείχνοντας έτσι την ύπαρξη οξειδωτικού στρες. Οι Alessio και συν. (1988) εξέτασαν την λιπιδική υπεροξείδωση σε σκελετικούς μυς 8 ποντικών αμέσως μετά από 1 λεπτό δρόμο ταχύτητας, 45 μέτρων / λεπτό. Τα αποτελέσματα ανέφεραν ότι ελάχιστη ποσότητα υψηλής έντασης άσκηση μπορεί να αυξήσει την λιπιδική υπεροξείδωση. Επίσης αύξηση των TBARS παρατηρήθηκε σε έρευνα των Kayatekin και συν. (2002). Στην έρευνά τους, 55 ποντίκια ασκήθηκαν 15 φορές σε ταχύτητα 35 m/δευτερόλεπτο για 30 δευτερόλεπτα. Σε έρευνά τους, οι Marzatico και συν. (1997), μέτρησαν την επίδραση 6 επί 150m και ανέφεραν αύξηση της λιπιδικής υπεροξείδωσης. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Kayatekin, και συν. (2002) μετά από 15 συνεχόμενα στριντ των 30 sec. (Kayatekin, Gonenc, Acikgoz, Uysal, Dayi, 2002). Σε αντίθετα αποτελέσματα κατέληξαν και οι έρευνες των Groussard και συν. (2003), καθώς η επίδραση της μέγιστης αναερόβιας άσκησης 30 δευτ. στο Wingate τεστ σε δείκτες οξειδωτικού στρες, παρουσίασε τη μείωση της λιπιδιακής υπεροξείδωσης (TBARS),

Η διαλειματική άσκηση περιλαμβάνει τόσο αερόβια όσο και αναερόβια προπόνηση. Σε έρευνα των Bloomer και συν. (2005) σε 10 νεαρούς αθλητές ανωμάλου δρόμου φάνηκε ότι η έντονη άσκηση 30 λεπτών αυξάνει κάποιους δείκτες του οξειδωτικού στρες στο αίμα (GSSG) ενώ η MDA δεν παρουσίασε σημαντική αύξηση. Ερευνώντας τα επίπεδα της υπεροξείδωσης των λιπιδίων μετά από 90 λεπτά συνεχόμενης διαλειματικής προπόνησης με τρέξιμο και περπάτημα σε προπονημένους αθλητές, οι Thompson και συν. (2001), παρατήρησαν αύξηση στα επίπεδα της MDA (Thompson, et al., 2001).

2.9 Αντιοξειδωτικός μηχανισμός και οξεία άσκηση

Πολλές είναι οι έρευνες που μελέτησαν τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό της αερόβιας άσκησης. Οι Mastaloudis και συν. (2001), εξέτασαν την επίδραση ενός αγώνα υπερμαραθωνίου 50 km στις αντιοξειδωτικές ουσίες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε αύξηση των αντιοξειδωτικών βιταμίνης C και του ουρικού οξέος εκτός της α-τοκοφερόλης η οποία μειώθηκε. Στα ίδια αποτελέσματα

κατέληξε και οι Palmer και συν. (2003), μελετώντας 28 προπονημένους αθλητές σε αγώνα 80 km (Palmer, et al, 2003). Σε έρευνα σε εργοποδήλατο των Aston και συν. (1998), παρατηρήθηκε αύξηση της TAC, ενώ σε κολυμβητές 800m. αναφέρθηκε αύξηση των CAT και GPX με μείωση GSH (Inal, Akyuz, Turgut, et al, 2003). Έχει αναφερθεί επίσης ότι η GSH αυξάνεται κατά τη διάρκεια προοδευτικά έντονης (Meydani, Evans, 1993) και παρατεταμένης άσκησης (Ji, Katz, Fu, Griffiths, Spencer, 1993). Αντικρουόμενα εμφανίστηκαν τα αποτελέσματα των Camus και συν. (1994) οι οποίοι δεν παρατήρησαν καμία διαφορά στις GSH και GSSG ύστερα από περπάτημα σε ανηφόρα ή τρέξιμο σε κατηφόρα για 35 λεπτά (Camus, Felekidis, Pincemail, et al., 1994), καθώς και των Marin και συν. (1990), όπου δεν βρήκαν διαφορές στις GSH και GSSG ύστερα από τρέξιμο σε διάδρομο για 30 λεπτά (Marin, Hanninen, Muller, Klinger, 1990).

Στα ίδια επίπεδα κυμαίνονται και οι έρευνες αναερόβιου τύπου άσκησης στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό. Οι Ortenblad και συν. (1997) εξέτασαν τα επίπεδα του ενζυμικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού στο αίμα και στους μύες κατά τη διάρκεια συνεχόμενων αλμάτων διάρκειας 30 δευτ. Από τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η προπόνηση συνεχόμενων αλμάτων σχετίζεται με την αύξηση της δραστηριότητας ενζύμων της SOD, της GPX και της GR στο μυϊκό ιστό (Ortenblad, et al, 1997). Σε μία άλλη έρευνα με σπριντ σε επιμύες, οι Kayatekin και συν. (2002) ανέφεραν ότι μετά από 15 συνεχόμενα σπριντ των 30 δευτ., τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD και GPX παρέμειναν αμετάβλητα και στους 2 ιστούς (Kayatekin, et al., 2002). Αύξηση στις συγκεντρώσεις των GPX και CAT ανέφεραν οι Inal και συν. (2001) έπειτα από 100 μέτρα σπριντ στη κολύμβηση. Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματα έδειξαν τη μείωση της συνολικής γλουταθειόνης (Inal, Akyuz, Turgut, Getsfrid, 2001). Η επίδραση της μέγιστης αναερόβιας άσκησης 30 δευτ. στο Wingate τεστ σε δείκτες αντιοξειδωτικού μηχανισμού είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των ενζυμικών αντιοξειδωτικών SOD, GSH με αμετάβλητη την GPX. Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση των μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών UA και βιταμίνης C, καθώς και μείωση της α-τοκοφερόλης και της βιταμίνης A (Groussard, et al., 2003). Σε έκκεντρες συστολές ή σε ασκήσεις αντιστάσεων έχει αναφερθεί αύξηση των ενζυμικών αντιοξειδωτικών μείωση της TAC και της GSH (Uchiyama, Tsukamoto, Yoshimura, Tamaki, 2006; Childs, et al, 2001).

Στη διαλειματική άσκηση, τα επίπεδα των μη ενζυματικών αντιοξειδωτικών αυξάνονται, ωστόσο χρειάζεται επιπλέον διερεύνηση με περισσότερες μελέτες. Οι

Ilhan και συν. (2004), μελέτησαν τις επιδράσεις της διαφορετικής έντασης της άσκησης στην ανηγμένη γλουταθειόνη και στη λιπιδική υπεροξειδωση. Οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε 3 γκρουπ με διαφορετικό είδος άσκησης. Το πρώτο πραγματοποίησε ένα αερόβιο πρωτόκολλο, το δεύτερο ένα αναερόβιο πρωτόκολλο και το τρίτο ένα αερόβιο-αναερόβιο πρωτόκολλο. Από τα αποτελέσματα φάνηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων των TBARS στο αερόβιο-αναερόβιο γκρουπ και μείωση στα επίπεδα της γλουταθειόνης. Επίσης η γλουταθειόνη αυξήθηκε περισσότερο στις γυναίκες από ότι στους άντρες (Ilhan, Kamanli, Ozmerdivenli, Ilhan, 2004). Οι Hellsten και συν. (1998) σε έρευνα τους, εφήρμοσαν διαλειματική προπόνηση 100 λεπτών, με στόχο την ενδυνάμωση των άνω και κάτω άκρων 7 αθλητών. Τα αποτελέσματα της αιμοληψίας UA στο αίμα έδειξαν ανεβασμένα τα επίπεδα του UA. Αντιθέτως, τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο μυ, ήταν μειωμένα. Διαπιστώνεται ότι μία διαλειματική άσκηση μεγάλης διάρκειας και υψηλής έντασης μπορεί να προκαλέσει σημαντική απελευθέρωση των πουρινών από το μυ στο αίμα, γεγονός το οποίο συνεισφέρει στη συντήρηση χαμηλότερου επιπέδου συγκέντρωσης μυϊκού ATP (Hellsten, Sjodin, Richter, et al, 1998).

2.10 Μηχανισμοί παραγωγής οξειδωτικού στρες κατά την άσκηση

Είναι πλέον γεγονός ότι η άσκηση σχετίζεται με τη παραγωγή ελευθέρων ριζών στον οργανισμό. Οι ερευνητές κατάφεραν να προσδιορίσουν τους μηχανισμούς παραγωγής του οξειδωτικού στρες, χωρίς όμως να είναι σε θέση να γνωρίζουν το βαθμό της επίδρασης της κάθε είδους άσκησης στο κάθε ένα μηχανισμό, καθώς και τη συμβολή του κάθε μηχανισμού στη παραγωγή οξειδωτικού στρες (Vollaard, et al., 2005). Είναι όμως κοινά αποδεκτό, ότι ο μεταβολισμός του οξυγόνου κατά την ηρεμία, τη διάρκεια και μετά την άσκηση επιφέρει την παραγωγή καθώς και αύξηση των ελευθέρων ριζών (Di Meo & Venditti, 2001; Ji, 1996).

Η διαρροή των ηλεκτρονίων κατά την αναπνευστική αλυσίδα θεωρείται μία από τις βασικές πηγές των E.P.O. κατά την άσκηση (Boveris, & Chance, 1973; Cadenas, Boveris, Ragan, Stoppani, 1977; Sjodin, et al., 1990). Η αερόβια αναπνοή συνίσταται στην αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. Η όλη διαδικασία, που λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και περιλαμβάνει μια ροή ηλεκτρονίων που παράγονται στο κύκλο του Krebs και μεταφέρονται στο μοριακό οξυγόνο. Κατά τη μεταφορά αυτή, υπάρχει διαρροή των ηλεκτρονίων από

την αναπνευστική αλυσίδα μέσω του ενζύμου ουβικινόλη, με αποτέλεσμα τη παραγωγή του $O_2^{\bullet -}$ (Moller, Wallin, Knudsen, 1996). Έρευνες έχουν δείξει ότι κατά τη μέγιστη άσκηση, η συνολική πρόσληψη οξυγόνου αυξάνεται κατά 20 φορές (Astrand, Rodahl, 1986), ενώ τα επίπεδα οξυγόνου σε μια μυϊκή ίνα μπορεί να αυξηθούν μέχρι και 100 φορές (Keul, Doll, Koppler, 1972).

Η ισχαιμία-επαναιμάτωση των ιστών και η οξειδωση της αιμοσφαιρίνης και της μυοσφαιρίνης κατά την άσκηση, είναι δύο πιθανοί μηχανισμοί παραγωγής E.P.O. Στο ανοσοποιητικό σύστημα φαίνεται να υπάρχει παραγωγή των E.P.O., όπου τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και τα μακροφάγα, με τη βοήθεια των E.P.O. που παράγουν, αντιμετωπίζουν τις φλεγμονές που εμφανίζονται και καταστρέφουν ιούς και βακτηρίδια. Η περιγραφή του τρόπου παραγωγής τους αναφέρθηκε στο προηγούμενο υποκεφάλαιο.

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός θεωρείται η αυτοοξειδωση των κατεχολαμινών, μέσω της ενεργοποίησης των β-αδρενεργών υποδοχέων στα μιτοχόνδρια, των οποίων τα επίπεδα αυξάνονται κατά πολύ σε καταστάσεις άγχους και άσκησης (Kumar, Reddy, Prasad, 1992; Singh, 1992). Επίσης, τα ένζυμα ξανθινοξειδάση και υποξανθίνη, παράγουν E.P.O. κατά τη διάρκεια καρδιακής ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης (Sjodin, et al., 1990).

Τέλος, η αυξημένη θερμοκρασία, το γαλακτικό οξύ και το είδος της άσκησης τα οποία έχουν τη δυνατότητα να μετατρέπουν το $O_2^{\bullet -}$ σε $OH^{\bullet}$ θεωρούνται βασική πηγή παραγωγής των E.P.O. κατά τη διάρκεια της άσκησης (Clarkson, Thompson, 2000; Cooper, et al., 2002). Πιο συγκεκριμένα, η αερόβια άσκηση σχετίζεται με την αύξηση της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου, συνεπώς και με την αύξηση της παραγωγής των E.P.O. Ωστόσο, το φαινόμενο αυτό δεν δε θα μπορούσε να υφίστανται με άσκηση χαμηλής έντασης (τρέξιμο <50% της VO_{2max}). Επίσης παρατηρείτε και το φαινόμενο ότι όσο πιο έντονη είναι μία άσκηση, τόσο πιο σημαντική είναι η παραγωγή των ελεύθερων ριζών και του οξειδωτικού στρες (Lovlin, et al., 1987; Mastaloudis, et al., 2001; Palmer, et al., 2003).

Στο μεγαλύτερο ποσοστό των ερευνών που σχετίζονται με την άσκηση, έχουν βρεθεί αποτελέσματα αντιφατικά μεταξύ τους. Η διαπίστωση αυτή σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με τη χρήση διαφορετικών δειγμάτων με διαφορετικές ανταποκρίσεις του οργανισμού του καθενός, καθώς και με διαφορετική αντιοξειδωτική ικανότητα σε

κάθε έρευνα, στοιχεία που επηρεάζουν τα δεδομένα διαφορετικών ερευνών όπως προπονητική κατάσταση, ηλικία και φύλο, καθώς και επιδράσεις διάφορων τύπων ασκήσεων. Επιπροσθέτως, ο μεγάλος αριθμός διαφορετικών προπονητικών πρωτοκόλλων που χρησιμοποιούνται επηρεάζει διαφορετικά τις ανταποκρίσεις του κάθε δείγματος της εκάστοτε μελέτης (Finaud, et al., 2006; Hellsten, 1996).

2.11 Οξειδωτικό στρες και χρόνια άσκηση

Η συστηματική αερόβια άσκηση έχει ως αποτέλεσμα τη προσαρμογή του οργανισμού σε ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών όλων σχεδόν των βιολογικών συστημάτων του ανθρώπου (Bloomer, Goldfarb, McKenzie, 2006; Finaud, et al, 2006). Επιπρόσθετα, η συνεχόμενη και μεγάλης χρονικής διάρκειας έκθεση του οργανισμού σε μεγάλες ποσότητες E.P.O. μπορεί να προκαλέσουν μείωση του οξειδωτικού στρες τροποποιώντας τη παραγωγή τους. Ενδεχομένως, η ελαφριά εντατική άσκηση αποτυγχάνει να προκαλέσει προσαρμογές επειδή η παραγωγή των E.P.O. εξουδετερώνεται επαρκώς από την αντιοξειδωτική άμυνα (Radak, Taylor, Ohno, Goto, 2001). Πιθανόν, οι ανταποκρίσεις να προκύπτουν από τη συσσώρευση των επιδράσεων των επαναλαμβανόμενων ασκήσεων οι οποίες είναι αρκετά έντονες και με μεγάλη διάρκεια. Γι' αυτό το μειωμένο οξειδωτικό στρες το οποίο προκαλείται από τη χρόνια προπόνηση μπορεί να προέρχεται από το ενισχυμένο αντιοξειδωτικό σύστημα. Με βάση τα δεδομένα αυτά, οι ερευνητές απέδειξαν πως υπάρχει προσαρμογή τόσο στην αντιοξειδωτική άμυνα όσο και στο σύστημα επιδιόρθωσης βλαβών που προκαλεί η ίδια η άσκηση.

Σε μελέτη τους οι Kumar και συν. (1992) μελέτησαν αν η πρόσληψη συμπληρωμάτων βιταμίνης E προστατεύει την καρδιά από το οξειδωτικό στρες που οφείλεται στην αερόβια άσκηση στο κολύμπι. Από τα αποτελέσματα φάνηκε μεταξύ άλλων ότι η άσκηση ως την εξάντληση προκαλεί παραγωγή ελευθέρων ριζών στο μυοκάρδιο. Σε έρευνα των Jenkins και συν. (1993) διαπιστώθηκε ότι οι προπονημένοι μύες έχουν μικρότερη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες και την λιπιδιακή υπεροξείδωση σε σχέση με τους απροπόνητους. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από τους Vinsent και συν. (1999). Φαίνεται ότι το προπονητικό επίπεδο επηρεάζει την λιπιδιακή υπεροξείδωση και το μέγεθος της κατά την άσκηση. Επιπλέον, η συστηματική άσκηση προκαλεί προσαρμογές στο αντιοξειδωτικό σύστημα και το στρες που προκαλεί η άσκηση (Kim, Yu, McCartez, Lee, Herlihy,

1996). Η επίδραση της χρόνιας αερόβιας άσκησης έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της προστασίας των ιστών από το οξειδωτικό στρες στη διάρκεια της φυσικής δραστηριότητας (Radak, Pucsuk, Boros, Joofai, Taylor, 2000). Σε έρευνες σε προπονημένους σκιέρ και δρομείς αμέσως μετά από εξουθενωτική άσκηση, βρέθηκαν μειωμένα τα επίπεδα της MDA. Ολοκληρώνοντας, είναι προφανής η λιπιδιακή υπεροξείδωση που αντιμετωπίζουν αθλητές χρόνιων αθλημάτων (Hubner-Wozniak, Panczenko-Kresowka, Lerczak, Posnik, 1994; Rokitzki, Logemann, Sagredos, Murphy, Wetzel-Roth, Keul, 1994a). Ανεβασμένα βρέθηκαν και τα επίπεδα της MDA σε προπονημένους έφηβους κολυμβητές, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου σε έρευνα των Santos-Silva και συν. (2001).

Περιορισμένες είναι τα ερευνητικά στοιχεία σχετικά με την επίδραση της συστηματικής αναερόβιας άσκησης στο οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, έχει βρεθεί ότι οι αναερόβια προπονημένοι αθλητές έχουν λιγότερες οξειδωτικές βλάβες και μυϊκές καταστροφές μετά την άσκηση, συγκριτικά πάντα με μη προπονημένους (Powers, et al, 1999; Ortenblad, et al, 1997). Σε έρευνα των Margoni και συν. (2007) προσδιορίστηκε η αύξηση των δεικτών οξειδωτικού στρες μετά από χρόνια έντονη άσκηση αντιστάσεων (Margonis, et al., 2007).

Η χρόνια διαλειματική άσκηση, χαρακτηρίζει τη προπόνηση όλων σχεδόν των ομαδικών αθλημάτων καθώς περιλαμβάνει προπονητικά στοιχεία τόσο αερόβιας όσο και αναερόβιας άσκησης. Έρευνες σε ποδόσφαιρο, ράγκμπυ και μπάσκετ, επιδεικνύουν αύξηση του οξειδωτικού στρες (Balakrishnan, Anuradha, 1998; Banfi, et al., 2006).

2.12 Αντιοξειδωτικός μηχανισμός και χρόνια άσκηση

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, αξιόλογη είναι η χρόνια άσκηση στην ισχυροποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Οι Elosua και συν. (2003) προσδιόρισαν στην επίδραση αερόβιας άσκησης σε κυκλοεργόμετρο στην οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) και τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό αγύμναστων αντρών και γυναικών. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε αύξηση της GPX κατά 27,7%, της GR κατά 17,6% και μείωση της LDL κατά 15,9%. Οι ερευνητές ανέφεραν ότι η άσκηση αύξησε τη δραστηριότητα των ενζυμικών αντιοξειδωτικών και μείωσε τις συγκεντρώσεις της οξειδωμένης LDL. Παράλληλα, η αερόβια προπόνηση διάρκειας 10 εβδομάδων, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της GSH, της GSSG και της GR, ενώ αντιθέτως αυξήθηκαν τα επίπεδα της GPX. Οι

ερευνητές θεώρησαν ότι τα χαμηλά επίπεδα GSSG σε σχέση με τη GSH και η υψηλή δραστηριότητα της GPX εξηγούνται από τη μείωση της υπεροξειδωσής στα ερυθροκύτταρα (Tessier, Hida, Favier, Marconnet, 1995). Σε μία άλλη έρευνα, οι Evelo και συν. (1992) προσδιόρισαν την αύξηση της GSH στις πρώτες 20 εβδομάδες προπόνησης, ωστόσο, οι τιμές αυτές επανήλθαν στα αρχικά επίπεδα 20 εβδομάδες μετά (Evelo, Palmen, Artur, Janssen, 1992). Οι Robertson και συν. (1991) εξέτασαν την αντιοξειδωτική ικανότητα υψηλά προπονημένων δρομέων αθλητών (80–147 μίλια/εβδ.) και μία ομάδα ελέγχου, και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των αθλητών ήταν σημαντικά ανεβασμένη. Επιπλέον, οι αθλητές εμφάνισαν υψηλότερες τιμές συγκέντρωσης της βιταμίνης E, της GSH και στη CAT (Robertson, Maughan, Duthie, Morrice, 1991). Σε μία άλλη έρευνα των Palazzetti και συν. (2003) σε 9 τριαθλητές ύστερα από έντονη προπόνηση 4 εβδομάδων, μειωμένα βρέθηκαν τα επίπεδα της TAC, κάτι που ίσως δηλώνει την ανεπάρκεια της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού των αθλητών αυτών να αντεπεξέλθουν στην έντονη αυτή αερόβια άσκηση (Palazzetti, Richard, Favier, et al, 2003).

Η χρόνια διαλειματική άσκηση ισχυροποιεί των αντιοξειδωτικό μηχανισμό των αθλητών. Στις περισσότερες έρευνες εμφανίζεται μείωση της GSH, ενώ παράλληλη είναι η αύξηση της CAT και των ενζυμικών αντιοξειδωτικών (Balakrishnan, et al., 1998; Klapcinska, et al., 2005). Οι προπονημένοι γενικά έχουν δείξει χαμηλότερα στοιχεία καταστροφής από ότι οι απροπόνητοι. Έτσι η προπόνηση ίσως να αυξάνει την αντιοξειδωτική άμυνα και να αντισταθμίζει, να βάζει ένα φράγμα στις ελεύθερες ρίζες που γέννιούνται με την άσκηση (Clarkson, et al., 2000). Η συστηματική άσκηση έχει την ικανότητα να μειώνει την εκδήλωση του οξειδ. στρες μετά από άσκηση στο DNA και το άλμα (Nies, Hartmann, Grunert-Fuchts, Speit, 1996) και αυξάνει την προστασία των ιστών από το οξειδωτικό στρες (Radak 2000).

2.13 Οξειδωτικό στρες και ποδόσφαιρο

Το ποδόσφαιρο χαρακτηρίζεται από την πολύ έντονη διαλειμματική δραστηριότητα των αθλητών η οποία συνδυάζει περιόδους εναλλαγών υψηλής και χαμηλής έντασης. Οι Banfi και συν. (2005) ερεύνησαν δείκτες του οξειδωτικού στρες σε ποδοσφαιριστές. Στην έρευνα πήραν μέρος 44 αθλητές επαγγελματίες

ποδοσφαίρου οι οποίοι τουλάχιστον τον τελευταίο χρόνο γυμνάζονταν 5 φορές την εβδομάδα και είχαν έναν αγώνα ποδοσφαίρου 90 λεπτών και 15 μη αθλούμενοι. Στην έρευνα η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα δεν είχε σημαντική διαφορά με την ομάδα ελέγχου ενώ υπήρχε διαφορά στο (NO) μονοξείδιο του αζώτου και την GR (γλουταθειόνη).

Τις αλλαγές στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των ποδοσφαιριστών, εξέτασαν οι Brites και συν (1999). Στην έρευνα συμμετείχαν 30 ποδοσφαιριστές και 12 μη αθλούμενοι ως ομάδα ελέγχου, όλοι άνδρες. Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα στους ποδοσφαιριστές ήταν 25% και το ουρικό οξύ 30% ψηλότερες αντίστοιχα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Από τα αποτελέσματα φάνηκε, ότι αθλητές ποδοσφαίρου υπό κανονική προπόνηση έχουν αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα.

Σε μία άλλη έρευνα των Klarcinska και συν (2005), εξέτασαν τα αντισώματα που παράγει ο οργανισμός στο αντιοξειδωτικό σύστημα σε επαγγελματίες ποδοσφαιριστές. Στην έρευνα πήραν μέρος 11 ποδοσφαιριστές οι οποίοι προπονούνταν 2 φορές την ημέρα (14 φορές την εβδομάδα) 60-90 λεπτά και στην αγωνιστική περίοδο έπαιζαν 1-2 αγώνες την εβδομάδα. Αυτοί έτρεξαν σε δοκιμασία στο δαπεδοεργόμετρο μέχρις εξαντλήσεως δύο φορές σε διάστημα 3 μηνών κάθε δοκιμασία. Η MDA και η CK παρουσίασαν αύξηση μετά την δοκιμασία και τις 2 φορές. Επιβεβαιώνεται ότι η άσκηση δημιουργεί οξειδωτικό στρες. Η CAT και GSH παρουσίασε αύξηση μετά τις δοκιμασίες επίσης.

Οι Schippinger και συν (2002) ερεύνησαν την λιπιδική υπεροξείδωση και την αντιοξειδωτική ικανότητα σε παίκτες αμερικανικού ποδοσφαίρου. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι πριν την αγωνιστική περίοδο η αντιοξειδωτική ικανότητα των αθλητών ήταν στα χαμηλότερα επίπεδα και στην αγωνιστική περίοδο αυξήθηκε.

Το οξειδωτικό στρες και την αντιοξειδωτική ικανότητα σε αθλητές ποδοσφαίρου και καλαθοσφαίρισης υψηλού επιπέδου εξέτασαν οι Pincemail και συν (2001) και φάνηκε ότι ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός των αθλητών στο μέσον της αγωνιστικής περιόδου ήταν σε κανονικά επίπεδα, πλην της GPX που είχε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Κατά τους Metin και συν (2003) η συστηματική άσκηση προκάλεσε μείωση της λιπιδικής υπεροξείδωσης. Στην έρευνά τους σε ποδοσφαιριστές, έδειξε ότι είχαν λιγότερο οξειδωτικό στρες απ' ό,τι η ομάδα ελέγχου και οι θειόλες του αίματος ήταν περισσότερες.

Οι Kingsley και συν. (2005) ερεύνησαν εάν 10 ημέρες χορήγηση 750 mg phosphatidylsetine θα έχει επίδραση στο οξειδωτικό στρες μετά από άσκηση. Στην

έρευνα πήραν μέρος 16 άνδρες ποδοσφαιριστές και η άσκηση που έγινε ήταν επαναληπτικό shuttle run σε δύο περιόδους, ειδικά σχεδιασμένο ώστε να προσομοιάζει με αγώνα ποδοσφαίρου (Nicholas, et al., 2000). Έδειξε ότι το συγκεκριμένο συμπλήρωμα δεν είχε επίδραση στο οξειδωτικό στρες παρά μόνον αύξησε τον χρόνο της εξάντλησης από την δοκιμασία, συν παρατηρήθηκε αύξηση δεικτών του οξειδωτικού στρες.

Οι Cazzola και συν. (2003), μελέτησαν τις διαφορές στους δείκτες του οξειδωτικού στρες, την ρευστότητα της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων και το αντιοξειδωτικό σύστημα μεταξύ 20 επαγγελματιών ποδοσφαιριστών και 20 μη αθλούμενους. Οι ποδοσφαιριστές αθλούνταν πρωί απόγευμα για 1,5-2 h κάθε φορά εκτελώντας συνεχόμενο και διαλειματικό τρέξιμο. Δείγματα αίματος λήφθηκαν όταν ήταν ξεκούραστοι και μετά από 12 h νηστεία. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι η τακτική προπόνηση βελτιώνει το αντιοξειδωτικό σύστημα.

Παρ' όλο που υπάρχουν έρευνες γύρω από το άθλημα του ποδοσφαίρου και το οξειδωτικό στρες, φαίνεται ότι όλες προσανατολίζονται για την αξία του ως άσκηση. Δεν υπάρχουν δεδομένα για έναν αγώνα ποδοσφαίρου και την επίδραση του στους δείκτες του οξειδωτικού μηχανισμού αμέσως μετά , 24 ώρες και 48 ώρες μετά . Αυτό το κενό πιστεύουμε ότι θα καλύψει η παρούσα μελέτη και έτσι θα έχουμε μια σαφέστερη εικόνα για την επιβάρυνση του αγώνα ποδοσφαίρου, αλλά και για την προπόνηση που θα προγραμματίζουμε μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Όπως διατυπώθηκε στη εισαγωγή, σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να διερευνήσει την επίδραση ενός αγώνα ποδοσφαίρου στους δείκτες του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού έως και 48 ώρες μετά το παιχνίδι. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μία ομάδα ελέγχου (C), οι οποίοι ήταν οι ποδοσφαιριστές που δεν συμμετείχαν στον αγώνα, και η πειραματική ομάδα (E), οι οποίοι συμμετείχαν στον αγώνα ποδοσφαίρου. Το κεφάλαιο έχει οργανωθεί στα ακόλουθα υποκεφάλαια: δείγμα της έρευνας, ερευνητικός σχεδιασμός, ανθρωπομετρικές μετρήσεις, μέτρηση της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου, ο ποδοσφαιρικός αγώνας, καταγραφή της διατροφής των αθλητών, αιμοληψίες, βιοχημικές αναλύσεις και στατιστική ανάλυση.

3.1 Δείγμα

Στην μελέτη έλαβαν μέρος εθελοντικά 24 ποδοσφαιριστές, 17 – 22 ετών με πολύχρονο προπονητικό παρελθόν. Πριν την συμμετοχή τους στην έρευνα, κάθε αθλητής ενημερώθηκε σχετικά με όλες τις διαδικασίες, τους κινδύνους και τα οφέλη της έρευνας και υπέγραψε γραπτή συγκατάθεση σύμφωνη με τις δεοντολογικές αρχές του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης, που βρίσκεται σε συμφωνία με Διακήρυξη του Ελσίνκι (1975) σχετικά με την χρησιμοποίηση ανθρώπων σε ερευνητικές διαδικασίες. Επίσης, όλοι οι αθλητές συμπλήρωσαν ερωτηματολόγιο ιατρικού ιστορικού ώστε να εντοπισθούν πιθανοί μυοσκελετικοί ή άλλοι περιορισμοί. Τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων και ο δείκτης μέγιστης πρόσληψης

οξυγόνου (VO₂ max), για κάθε δείγμα, ως μέσες τιμές ± τυπικό σφάλμα (SE) παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Τα φυσιολογικά χαρακτηριστικά του δείγματος.

	Ομάδα ελέγχου (N=11)	Πειραματική ομάδα (παίκτες N=11)
Ηλικία (έτη)	20.2 ± 1.1	20.6 ± 1.3
Ύψος (cm)	1.76 ± 2.2	1.78 ± 3.1
Βάρος (Kg)	72.7 ± 4.8	73.8 ± 6.4
Ποσοστό σωματικού λίπους (%)	8.2 ± 0.7	7.8 ± 1.2
Μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου σε διάδρομο (ml/kg/min)	59.7 ± 3.8	60.6 ± 4.1

3.2 Ερευνητικός Σχεδιασμός

Στη πρώτη επίσκεψη των ποδοσφαιριστών στο εργαστήριο του Τ.Ε.Φ.Α.Α. του Δ.Π.Θ. πραγματοποιήθηκαν σωματομετρικές μετρήσεις καθώς και μέτρηση της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (VO_{2max}). Επίσης, μοιράστηκαν φυλλάδια καταγραφής της διατροφής του κάθε ποδοσφαιριστή για τρεις ημέρες και οδηγίες προφορικές και γραπτές για την σωστή συμπλήρωσή του. Στην συνέχεια στην δεύτερη επίσκεψη, η ερευνητική ομάδα επισκέφθηκε το ποδοσφαιρικό γήπεδο όπου σε ειδικό χώρο, πραγματοποιήθηκαν οι λήψεις αίματος πριν από το παιχνίδι και αμέσως μετά. Η λήψη αίματος έγινε σε όλους τους ποδοσφαιριστές που συμμετείχαν στον αγώνα, τους αναπληρωματικούς και αυτούς που δεν συμμετείχαν. Η τρίτη και τέταρτη επίσκεψη έγινε στο εργαστήριο ακριβώς 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα, για λήψη αίματος από όλους τους ποδοσφαιριστές της ομάδας.

3.3. Μετρήσεις σωματομετρικών χαρακτηριστικών

Το σωματικό βάρος των αθλητών μετρήθηκε με ηλεκτρονική ζυγαριά (Seca 707, Hamburg, Germany) με ακρίβεια 0,1 Kg μετά από νηστεία 8-10 ωρών. Το ύψος των δοκιμαζόμενων μετρήθηκε με ορθοστάτη ύψους με κλίμακα μέτρησης 1 mm. Οι αθλητές φορούσαν μόνο τα εσώρουχα τους και δεν φορούσαν παπούτσια κατά την μέτρηση του ύψους και του βάρους. Υπολογίσθηκε επίσης, ο δείκτης σωματικής

μάζας (BMI), μέσω του λόγου του σωματικού βάρους δια το τετράγωνο ύψους (Kg/m^2 , Spirduso, 1995).

Ο προσδιορισμός της σύστασης σώματος πραγματοποιήθηκε με λιπομέτρηση με την μέθοδο των δερματοπτυχών και σύμφωνα με τις καθιερωμένες και επίσημες τεχνικές λιπομέτρησης της Αμερικάνικης Αθλητιατρικής Εταιρείας (ACSM, 2000). Για τον υπολογισμό της πυκνότητας σώματος μετρήθηκαν οι πτυχές του δικέφαλου, της κοιλίας και του τετρακέφαλου. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με δερματοπτυχόμετρο Harpenter (Harpenden, HSK-BI, British Indicators, UK) και όλες πραγματοποιήθηκαν στην δεξιά πλευρά του σώματος. Κάθε δερματοπτυχή μετρήθηκε το λιγότερο δυο φορές και αν η δεύτερη μέτρηση διέφερε περισσότερο από 2 mm από την πρώτη, επακολουθούσε και τρίτη μέτρηση. Χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος του αθροίσματος των δυο μετρήσεων για κάθε δερματοπτυχή. Η πυκνότητα του σώματος υπολογίστηκε από την εξίσωση των Jackson & Pollock (1978). Το ποσοστό του σωματικού λίπους υπολογίστηκε από την εξίσωση του Siri (1961). Η διαδικασία συλλογής όλων των ανθρωπομετρικών μετρήσεων πραγματοποιήθηκε από ένα μόνο άτομο.

3.4 Μέτρηση της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (VO_2max).

Όλες οι μετρήσεις της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (VO_2max) πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσικής Αγωγής & Άθλησης του Δημοκρίτειου πανεπιστημίου Θράκης, κατά τις ώρες 07.00 (± 2). Για την διεξαγωγή της δοκιμασίας χρησιμοποιήθηκε φορητός αναλυτής SensorMedics VmaxST USA. Πριν από κάθε δοκιμασία, ο αναλυτής και ο αγωγός αέρα υπόκεινται σε διαδικασία βαθμονόμησης και ακεραιότητας αντίστοιχα, λαμβάνοντας ο αναλυτής ένα μείγμα αερίων προκαθορισμένης συγκέντρωσης σε οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα (16% O_2 , 4% CO_2 , Sensormedics, CA), ενώ η ακεραιότητα ελέγχεται από έναν ειδικό κύλινδρο όγκου 5 λίτρων, όπως περιγράφηκε προηγούμενα (Douroudos, 2006, Fatouros 2005). Τα στοιχεία που κατεγράφησαν σε κάθε δοκιμασία ήταν στοιχεία του περιβάλλοντος χώρου όπως η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία καθώς και η βαρομετρική πίεση, καθώς και αυτά που αφορούσαν την καθαυτή μέτρηση, όπως ο όγκος του οξυγόνου και του διοξειδίου του άνθρακα l/min , το αναπνευστικό τους πηλίκιο RQ, ο χρόνος εξάντλησης και ο καρδιακός σφυγμός HR. Ο καρδιακός σφυγμός μετρήθηκε μέσω φορητού τηλεμετρικού παλμογράφου electro polar (polar

625x, Kempele, Finland) και μιας ζώνης που φορούσε ο συμμετέχοντας κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας και η οποία ήταν τοποθετημένη στο στήθος του (κάτω από το στήννο). Η καρδιακή συχνότητα καταγραφόταν κάθε 5 δευτερόλεπτα. Η παράμετρος που αξιολογήθηκε κατά την δοκιμασία ήταν ο χρόνος εξάντλησης του αθλητή. Κατά τη διάρκεια αυτή, ο δοκιμαζόμενος έκανε προθέρμανση στο διάδρομο για 5 λεπτά και διατακτικές ασκήσεις για άλλα 3 λεπτά. Ο δοκιμαζόμενος πριν ξεκινήσει το τεστ, φορούσε σαν γιλέκο την ειδική συσκευή μέτρησης μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (φορητός αναλυτής VmaxST, sensorMedics USA), η οποία συνδεδεόταν με ένα καλώδιο σε μία ειδική τουρμπίνα αερίων και μία μάσκα, η οποία κάλυπτε τη μύτη και το στόμα.

Ο δοκιμαζόμενος ξεκινούσε να τρέχει με ταχύτητα 7 km/h και κάθε δύο λεπτά αυξανόταν κατά 1 km/h, μέχρι που δεν θα μπορούσε να συνεχίσει πλέον την προσπάθεια. Η καταγραφή των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του ειδικού προγράμματος της Metasoft, το οποίο κατέγραφε και αποθήκευε τη κάθε αναπνοή του συμμετέχοντα (breath by breath) και ταυτόχρονα τους μετέτρεπε σε μέσους όρους των 20 δευτερολέπτων για μελλοντική ανάλυση. Για να διαπιστωθεί ότι έχει επιτευχθεί η καταγραφή της VO_{2max} έπρεπε να ικανοποιείται τουλάχιστον 1 από τα ακόλουθα κριτήρια: 1) η καταγραφή της VO_{2max} να παρουσιάσει σταθερότητα παρά την αύξηση της επιβάρυνσης, 2) επίτευξη αναπνευστικού πηλίκου ($RER: VCO_2/VO_2$) μεγαλύτερη από 1.1 ή 3) επίτευξη της ΜΚΣ. Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε σε εργοδιάδρομο (Marathon, Medical technology, LTD) και εφαρμόσθηκε η καταγραφή υποκειμενικής κόπωσης, της κλίμακας Borg 6 – 20 (Lippincot, Williams & Wilkins, 2000) κατά την διάρκεια και το τέλος της κάθε δοκιμασίας.

3.5 Ο Ποδοσφαιρικός Αγώνας

Η διαδικασία της άσκησης ήταν ένας φιλικός ποδοσφαιρικός αγώνας ο οποίος διεξήχθη σε μια διακοπή μιας εβδομάδας προς τα τέλη του πρωταθλήματος της Εθνικής Ερασιτεχνικής κατηγορίας της Ελληνικής Ποδοσφαιρικής Ομοσπονδίας (ΕΠΟ). Ήταν ένας αγώνας εντός έδρας με μία δυνατή αντίπαλο. Ο αγώνας ξεκίνησε στις 15.00 το απόγευμα και τελείωσε στις 17.00. Το παιχνίδι πραγματοποιήθηκε ως προετοιμασία-φορμάρισμα σκληρών επόμενων αγώνων. Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως δεν είχε διακοπεί η προπόνηση καθ' όλη την εβδομάδα.

3.6 Καταγραφή της διατροφής των αθλητών

Οι αθλητές κατέγραψαν την διατροφή τους για 5 ημέρες για το διάστημα πριν τον αγώνα. Η διατροφή καταγράφηκε σε ειδικό έντυπο που είχε ειδικό χώρο για το πρωινό, το πρωινό σνακ, το μεσημεριανό, το μεσημεριανό σνακ, το βραδινό και το βραδινό σνακ. Η διατροφή των 5 ημερών αναλύθηκε χρησιμοποιώντας το διατροφικό πρόγραμμα Science Fit Diet 200A (Sciencefit, Αθήνα, Ελλάδα). Η διατροφή ελέγχθηκε για την συνολική ποσότητα θερμίδων, τη σύστασή της, ιδιαίτερα όσον αφορά την ημερήσια πρόσληψη των βιταμινών E, C και β-καροτίνης αλλά και άλλων αντιοξειδωτικών στοιχείων. Η διατροφή των αθλητών καταγράφηκε για να ελεγχθούν τυχόν παράγοντες της που επηρεάζουν την παραγωγή οξειδωτικού στρες.

3.7 Αιμοληψίες

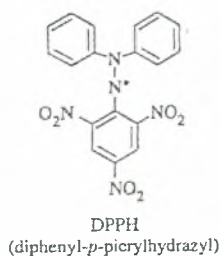
Από κάθε εθελοντή θα ληφθούν τις χρονικές στιγμές που προαναφέραμε δείγματα αρτηριοφλεβικού αίματος των 20 ml από την μεσοβασιλική φλέβα του χεριού των αθλητών. Οι αθλητές παρουσιάστηκαν στο εργαστήριο 30 λεπτά πριν την αιμοληψία, διάστημα κατά το οποίο παρέμειναν καθιστοί. Από τα 20 ml κάθε δείγματος, το 1 ml θα χρησιμοποιηθεί για να γίνει η γενική εξέταση αίματος (ολικό αίμα) για τον καθορισμό των μεταβολών του όγκου του πλάσματος κατά τη διάρκεια του αγώνα. Από τα 20 mL αίματος, τα 10 mL τοποθετήθηκαν σε 2 σωληνάρια που περιείχαν αντιπηκτική ουσία (EDTA), ενώ το υπόλοιπο αίμα (10 mL) τοποθετούταν σε 2 σωλίνες ανάλυσης ορού. Στην συνέχεια και μέσα σε διάστημα μισής ώρας, το αίμα που ήταν τοποθετημένο στα σωληνάρια με το αντιπηκτικό και στους σωλίνες ανάλυσης ορού φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στους 4° C, στις 4000 στροφές ανά λεπτό (rpm) σε ψυχόμενη φορητή φυγόκεντρο (Mikro 22R Hettich zentrifugen) για τον διαχωρισμό του πλάσματος και του ορού που θα χρησιμοποιούταν για τον προσδιορισμό των βιοχημικών παραμέτρων. Το υπερκείμενο (πλάσμα και ορός) που συλλέχθηκε από τα σωληνάρια αποθηκεύτηκε σε πολλαπλούς μικρούς σωληνίσκους από πολυπροπυλένιο (Erpendorf) και αποθηκεύτηκε στους -75°C σε βαθύ καταψύκτη (ULT FREEZER -86) μέχρι να χρησιμοποιηθεί για τις βιοχημικές αναλύσεις. Ο ορός και το πλάσμα που αποθηκεύτηκαν στους μικρούς σωληνίσκους δεν ξεπάγωσαν σε καμία περίπτωση, παρά μόνο πριν την πραγματοποίηση των βιοχημικών αναλύσεων.

Ο ορός θα χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και της καταλάσης. Το πλάσμα θα χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Μετά τη συλλογή φλεβικού αίματος σε Vacutainer τα οποία περιείχαν EDTA ως αντιπηκτικό, ακολούθησε καλή ανάμιξη. Μετά τη συλλογή φλεβικού αίματος σε Vacutainer τα οποία περιείχαν EDTA ως αντιπηκτικό, ακολούθησε καλή ανάμιξη. Σε κάθε Vacutainer προστέθηκε ίση ποσότητα 5% TCA και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση σε vortex (2500 rpm). Έπειτα οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν στις 6000rpm (4020 g) στους 5°C για 20min. Στη συνέχεια το υπερκείμενο μοιράσθηκε σε σωλήνες erpendorf (περίπου 200μL/σωλήνα) και καταψύχθηκε στους -20°C μέχρι να ξεκινήσουν οι πειραματικοί προσδιορισμοί. Μετά την απόψυξή τους σε κάθε σωλήνα erpendorf προστέθηκαν 60μL 5% TCA και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση σε κεφαλή erpendorf στις 16000rpm (28620g) στους 5°C για 5min. Το υπερκείμενο (αιμόλημα) συγκεντρώθηκε σε νέα erpendorf και χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της GSH και GSSG. Ο υπολογισμός της μεταβολής του όγκου του πλάσματος μετά την άσκηση σε σχέση με πριν θα γίνει σύμφωνα με τον τύπο του Dill και Costill, 1974 (πρέπει να το προσθέσεις στην βιβλιογραφία). Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν δυο φορές για κάθε δείγμα και αν η πρώτη ανάλυση διέφερε περισσότερο από 10% από την δεύτερη, η ανάλυση επαναλαμβανόταν. Καταγράφηκε ο μέσος όρος των δυο αναλύσεων.

3.8 Βιοχημικές Αναλύσεις

Οι φωτομετρικοί προσδιορισμοί έγιναν σε φωτόμετρο Hitachi U-1500. Από την εταιρεία SIGMA προμηθεύτηκαν τα εξής υλικά: TBA, DTNB, DPPH, NADPH, ρεδουκτάση της γλουταθειόνης, οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης. Τα NaH₂PO₄, NaHPO₄ και Tris (hydroxymethyl) aminomethane προέρχονται από την εταιρεία MERCK. Το TCA αγοράσθηκε από την εταιρεία Pancreac και το Na₂SO₄ από την Fluca.

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Janaszewska και Bartosz (2002).

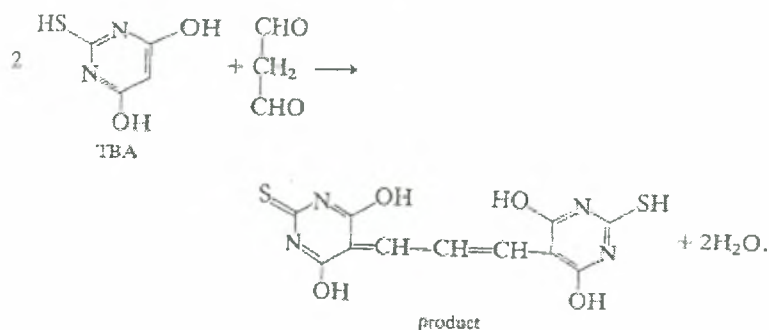


Εικόνα 1: Χημική δομή του DPPH (Από: Halliwell and Gutteridge, 1998).

Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι φασματοφωτομετρική και η αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού προσδιορίζεται με την ικανότητά του να απομακρύνει ένα ηλεκτρόνιο από μια σταθερή ελεύθερη ρίζα, το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), η οποία διαθέτει συγκεκριμένο ESR (electron spin resonance) (Halliwell et al., 1998) Σύμφωνα με το πρωτόκολλο προστέθηκαν 20μL ορού σε 480μL 10mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου, pH 7,4 και 500μL διαλύματος 0,1mM DPPH σε μεθανόλη. Μετά από 30min επώασης σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 520nm. Τα δείγματα ελέγχου περιείχαν 500μL 10mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου, pH 7,4 και 500μL 0,1mM DPPH σε μεθανόλη. Για τον έλεγχο της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν θετικοί μάρτυρες, οι οποίοι περιείχαν 5μL διαλύματος 10mM ασκορβικού οξέος σε τελική συγκέντρωση 50μM. Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων εκφράστηκαν ως η % μείωση της απορρόφησης του αρνητικού μάρτυρα, δηλαδή:

$$\% \text{ μείωση} = \frac{\text{Απορρόφηση}_{\text{δείγμα ελέγχου}} - \text{Απορρόφηση}_{\text{δείγμα ορού}}}{\text{Απορρόφηση}_{\text{δείγμα ελέγχου}}} \times 100\%$$

TBARS (thiobarbitouric acid reactive substances). _Στη συγκεκριμένη μέθοδο μετράται κυρίως η μαλονδυαλδεϋδη (MDA) ως δείκτης υπεροξείδωσης λιπών και κατά επέκταση ως δείκτη οξειδωτικού στρες. Η MDA αντιδρά με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) και παράγεται έγχρωμο προϊόν σύμφωνα με την αντίδραση (Halliwell et al., 1998):



Εικόνα 2: Αντίδραση του TBA με την MDA προς σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος.

Ο προσδιορισμός της MDA έγινε με τη μέθοδο των Keles M.S et al (2001). Συγκεκριμένα μέσα σε σωλήνες Falcon προστέθηκαν κατά σειρά 0,1ml ορού και 0,5ml 35% TCA. Κατόπιν ισχυρής ανάδευσης σε vortex προστέθηκαν 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl (50mM, pH 7,4) και ακολούθησε ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10min. Έπειτα προστέθηκε 1.0ml διαλύματος 0,75% θειοβαρβιτουρικού οξέος σε 2M Na₂SO₄. Το διάλυμα θερμάνθηκε για 45min στους 100⁰C για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση που θα δώσει το έγχρωμο προϊόν. Στη συνέχεια οι σωλήνες Falcon τοποθετήθηκαν σε πάγο για να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε προσθήκη 1ml 70% TCA, ισχυρή ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση στις 5000rpm (2790g) για 10min στους 25⁰C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον φυγοκέντρηση στις 10000rpm για 10min στους 25⁰C γιατί παρατηρήθηκε πως το ίζημα επαναδιαλύονταν γρήγορα και παρεμπόδιζε τη φωτομέτρηση. Τέλος έγινε προσδιορισμός της απορρόφησης του υπερκείμενου στα 530nm εις τριπλούν για κάθε δείγμα. Στο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό προστέθηκαν 100μL dH₂O αντί για ορό. Οι συνολικές ενώσεις που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ προσδιορίστηκαν με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης

για την MDA $1,56 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν. Στην περίπτωση μας η συνολική ποσότητα των TBARS προσδιορίσθηκε ως :

$$\text{Ποσότητα TBARS} = \frac{\text{Απορρόφηση}_{\text{δείγμα}}}{1,56} \times 310 \text{ nmoles/ml ορού}$$

Προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης ορού. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο μετρήθηκε η δραστηριότητα της καταλάσης στον ορό με τη μέθοδο των Aebi et al. (1984). Η καταλάση ως γνωστό καταλύει την αντίδραση:



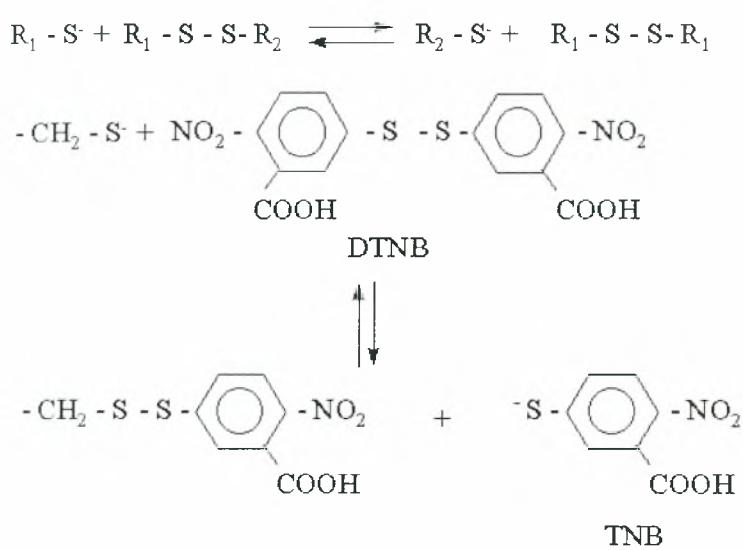
Σε 20 μL ορού προστέθηκαν 2,975 ml 67mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου, pH 7,4 και το διάλυμα επώασθηκε για 10 min στους 37°C έτσι ώστε το ένζυμο να αποκτήσει τη μέγιστη δραστηριότητα. Έπειτα προστέθηκαν 5 μL 30% H_2O_2 (τελική συγκέντρωση 15mM) και κατόπιν γρήγορης ανάδευσης έγινε φωτομέτρηση για 3sec στα 240nm σε κυψελίδα χαλαζία οπότε υπολογίστηκε ο ρυθμός διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό ο ορός αντικαταστάθηκε από ρυθμιστικό διάλυμα. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Η δραστηριότητα της καταλάσης υπολογίσθηκε ως εξής:

$$\text{Δραστηριότητα} = \frac{\Delta O.D \times 3 \times 10^6}{62,4 \times 20} \mu\text{moles/min/ml}$$

Ποσοτικός προσδιορισμός της GSH σε αιμόλυμα. Στο συγκεκριμένο προσδιορισμό εφαρμόσθηκε η μέθοδος των Reddy Y.N. et al. (2004). Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης απομακρύνει το H_2O_2 προς σχηματισμό H_2O με την οξείδωση της ανηγμένης



Στη συνέχεια η οξειδωμένη GSSG επανέρχεται στην ανηγμένη μορφή της χρησιμοποιώντας την αναγωγική ισχύ του NADPH και το ένζυμο ρεδοκτάση της γλουταθειόνης: $GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$ (Halliwell et al., 1998). Η ελεύθερη ομάδα $-SH$ μπορεί να αντιδράσει με το DTNB όπως φαίνεται στην εικόνα.



Εικόνα 3: Αντίδραση παραγωγής έγχρωμου προϊόντος από το DTNB.
(Από: www.altavista.com).

Σε 20 μL από το υπερκείμενο που προέκυψε κατόπιν φυγοκέντρησης του αιμολύματος προστέθηκαν 660 μL 67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών νατρίου και καλίου, pH 7,95 και 330 μL διαλύματος DTNB (39,6 mg DTNB σε 100ml 1% κιτρικού νατρίου). Κατόπιν ανάδευσης τα διαλύματα επωάσθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και απουσία φωτός για 15 min. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 412 nm. Στο τυφλό προστέθηκαν 20 μL dH₂O αντί για υπερκείμενο. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε εις τριπλούν για κάθε δείγμα. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων βασίζεται στο άρθρο των Khyrian et al (2003) σύμφωνα με το οποίο η σύνδεση GSH – DTNB δίνει έγχρωμο προϊόν με συντελεστή απορρόφησης 13,6 mM⁻¹ cm⁻¹ (στοιχειομετρική αντίδραση). Στην περίπτωση μας ισχύει:

$$\text{Ποσότητα GSH} = \frac{\text{Απορρόφηση}_{\text{δείγμα}}}{13,6} \times 131,3 \text{ } \mu\text{moles/ml ολικού αίματος}$$

Προσδιορισμός της GSSG. Με τη συγκεκριμένη μέθοδο των Tietze F., et al. (2004), προσδιορίζεται η οξειδωμένη γλουταθειόνη. Το κίτρινο χρώμα που παρατηρείται τελικά οφείλεται στη ακόλουθη αντίδραση, αφού δηλαδή η GSSG αναχθεί σε GSH οπότε ο αρχή της μεθόδου είναι πλέον η ίδια με την προηγούμενη μέθοδο προσδιορισμού της GSH. Σε 260 μL υπερκείμενου από αιμόλυμα κατόπιν φυγοκέντρωσης προστέθηκαν 20 –30 μL 1M NaOH μέχρι το pH να ανέβει στο 7 – 7,5. Έπειτα σε κάθε erppendorf προστέθηκαν 4 μL 2-vinylpyridine monomer και έγινε επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Με αυτό τον τρόπο το 2- vinylpyridine λειτούργησε ως μάσκα που δεσμεύει την GSH έτσι ώστε στην συνέχεια να γίνει ο προσδιορισμός μόνο της GSSG. Μετά την επώαση 5 μL από κάθε erppendorf τοποθετήθηκαν σε νέα σωληνάκια και προστέθηκαν 100 μL 3mM διαλύματος NADPH. Το NADPH διαλύθηκε σε 143mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου, 6,3 mM Na_2EDTA , pH 7,5. Επιπλέον προστέθηκαν 100 μL 10mM διαλύματος DTNB (0,04 gr DTNB σε 10ml 143mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου, 6,3mM Na_2EDTA , pH 7,5), 600 μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (143mM, 6,3mM Na_2EDTA , pH 7,5), 189 μL dH_2O και στο τέλος 1 μL ρεδοκτάση της γλουταθειόνης. Έγινε γρήγορη ανάδευση και φωτομέτρηση στα 412nm για 3min, εις διπλούν για το κάθε δείγμα οπότε υπολογίσθηκε ο ρυθμός παραγωγής έγχρωμου προϊόντος ανά λεπτό. Ο προσδιορισμός της GSSG έγινε σύμφωνα με τη βοήθεια εξίσωσης που διεξήχθη από την πρότυπη καμπύλη και έπειτα η τιμή της συγκέντρωσης πολλαπλασιάστηκε επί 400 για να υπολογισθούν τα nmoles της GSSG σύμφωνα με το βαθμό αραιώσης. Στην συγκεκριμένη μέθοδο είναι απαραίτητη η εξίσωση που προκύπτει από την πρότυπη καμπύλη. Η πρότυπη καμπύλη προκύπτει μετρώντας την απορρόφηση διαλυμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις GSSG σύμφωνα με τον ακόλουθο πίνακα:

(μL)	τυφλό	0,12 nmoles	0,25 nmoles	0,75 nmoles	1,5 nmoles
GSSG (αραιωμένο διάλυμα)	-	12	25	75	150
NADPH	100	100	100	100	100
DTNB	100	100	100	100	100

Ρυθμιστικό διάλυμα *	600	600	600	600	600
dH ₂ O	199	187	174	124	49
GR	1	1	1	1	1

* ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (143mM, 6,3mM Na₂EDTA, pH 7,5)

Το διάλυμα GSSG που χρησιμοποιήθηκε στην πρότυπη καμπύλη προκύπτει με τον εξής τρόπο: αρχικά παρασκευάσθηκε ένα πυκνό διάλυμα GSSG (0,0061 gr GSSG/10 ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (143mM, 6,3mM Na₂EDTA, pH 7,5), το οποίο στη συνέχεια αραιώθηκε 1:100 σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (143mM, 6,3mM Na₂EDTA, pH 7,5) ώστε το τελικό διάλυμα να έχει συγκέντρωση 10 nmoles/ml.

3.9 Στατιστική ανάλυση

Οι συγκρίσεις των μεταβολών των συγκεντρώσεων όλων των παραμέτρων στα 3 χρονικά σημεία αιμοληψίας μεταξύ της ομάδας των ποδοσφαιριστών που αγωνίστηκαν και της ομάδας των ποδοσφαιριστών που δεν αγωνίστηκαν θα γίνουν με τη μέθοδο της ανάλυσης διακύμανσης (two way ANOVA). Το επίπεδο σημαντικότητας θα ελεγχθεί με την μέθοδο της ανάλυσης διακύμανσης. Την εύρεση σημαντικής διαφοράς θα ακολουθήσουν post hoc contrasts για να ανιχνευτούν διαφορές στις μεταβολές κατά συνθήκη ανάμεσα στα διάφορα χρονικά σημεία. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θα οριστεί στο $\alpha = 0.05$. Η στατιστική ανάλυση θα πραγματοποιηθεί στις πρωτογενείς μετρήσεις ενώ στην περίπτωση που υπάρχουν μεταβολές στον όγκο του πλάσματος, τότε θα χρησιμοποιηθούν οι διορθωμένες τιμές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο όγκος του πλάσματος μετά την άσκηση ήταν το $0,99 \pm 0,03$ (μη σημαντική μεταβολή $p>0,05$) του αρχικού. Για το λόγο αυτό δεν χρειάστηκε να γίνουν διορθώσεις στα αποτελέσματα.

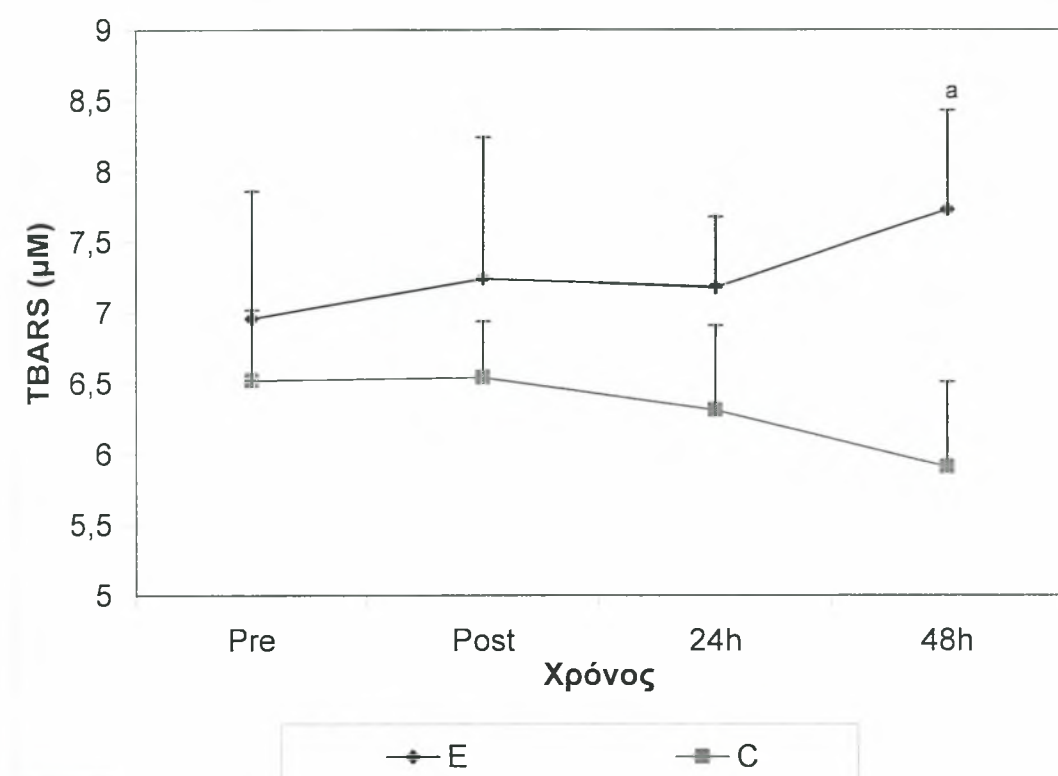
4.1 Δείκτες οξειδωτικής καταστροφής

Ο αγώνας ποδοσφαίρου δεν αύξησε σημαντικά τις συγκεντρώσεις των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στους παίκτες που έπαιξαν στον αγώνα (E) όσο και σε αυτούς που δεν αγωνίστηκαν (C). Πιο συγκεκριμένα η E ομάδα, αμέσως μετά τον αγώνα παρουσιάστηκε μικρή αύξηση της τάξεως του 4% η οποία διατηρήθηκε και μετά από 24 ώρες, ενώ 48 ώρες μετά υπήρξε αύξηση με ποσοστό 11%. Η αύξηση αυτή ήταν στατιστικά σημαντική ($p<0,05$) με την αντίστοιχη της ομάδας C. Οι μεταβολές των TBARS παρουσιάζονται στο πίνακα 4 και στο σχήμα 1.

Πίνακας 4: Συγκέντρωση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.

TBARS (μM)	Ηρεμία Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	Μετά τον αγώνα Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	24 ώρες μετά Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	48 ώρες μετά Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)
E	$6,96 \pm 0,9$	$7,24 \pm 1,0$	$7,18 \pm 0,5$	$7,73 \pm 0,7$
C	$6,52 \pm 0,5$	$6,54 \pm 0,4$	$6,31 \pm 0,6$	$5,91 \pm 0,6$

E: πειραματική ομάδα, C: ομάδα ελέγχου.



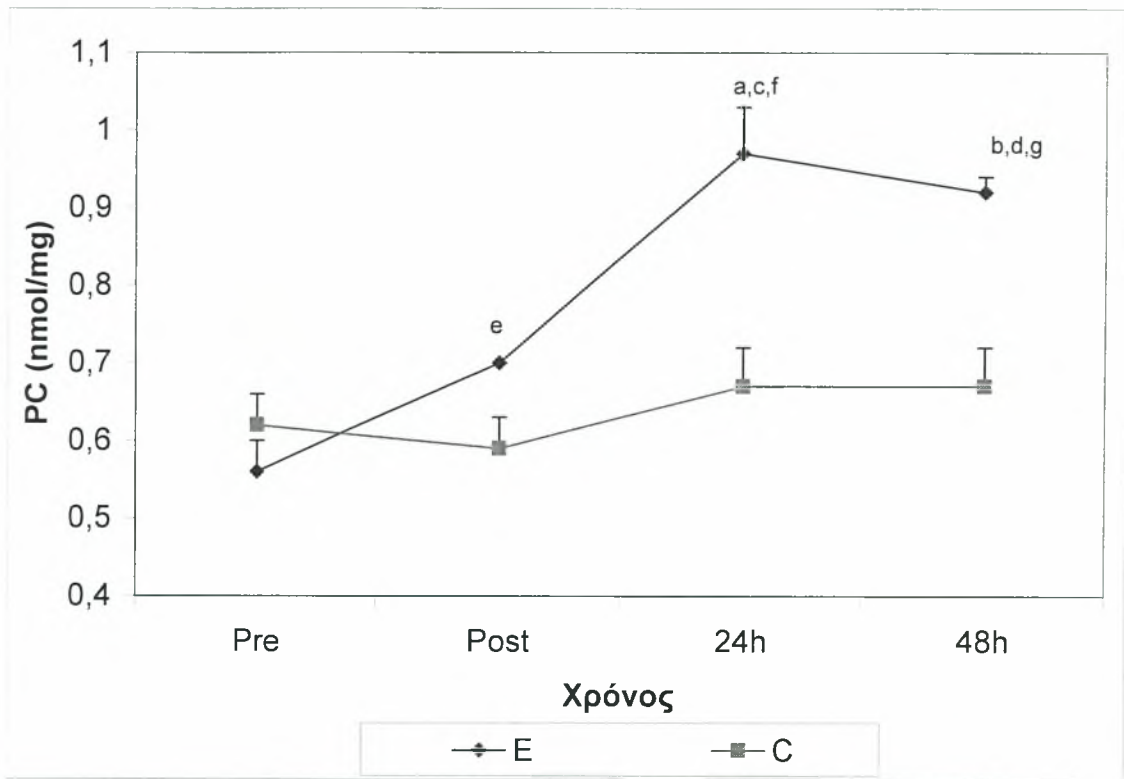
Σχήμα 1. Μεταβολή της συγκέντρωσης των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου. ^a δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με 48h Control.

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC) παρουσίασαν σημαντική αύξηση ($p < 0,05$) μετά από έναν αγώνα ποδοσφαίρου τόσο μεταξύ της ομάδας E, όσο και σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μεταβολή αυτή της E ξεκίνησε με αύξηση 25% αμέσως μετά τον αγώνα, 73% και 64%, μία και δύο μέρες μετά τον αγώνα αντίστοιχα, όπου εμφανίστηκαν και οι πιο σημαντικές αυξήσεις ($p < 0,05$). Στις ίδιες χρονικές στιγμές εμφανίστηκαν και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές με την αντίστοιχη ομάδα C. Οι μεταβολές παρουσιάζονται αναλυτικά στο πίνακα 5 και στο σχήμα 2.

Πίνακας 5: Συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.

PC (nmol/mg)	Ηρεμία	Μετά τον αγώνα	24 ώρες μετά	48 ώρες μετά
	Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)
E	0,56 ± 0,04	0,70 ± 0,03	0,97 ± 0,06	0,92 ± 0,02
C	0,62 ± 0,04	0,59 ± 0,04	0,67 ± 0,05	0,67 ± 0,05

E: πειραματική ομάδα, C: ομάδα ελέγχου.



Σχήμα 2. Μεταβολή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.

^a δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με post, ^b δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με post, ^c δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με pre, ^d δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με pre, ^e δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με post C, ^f δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με 24h C, ^g δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με 48h C.

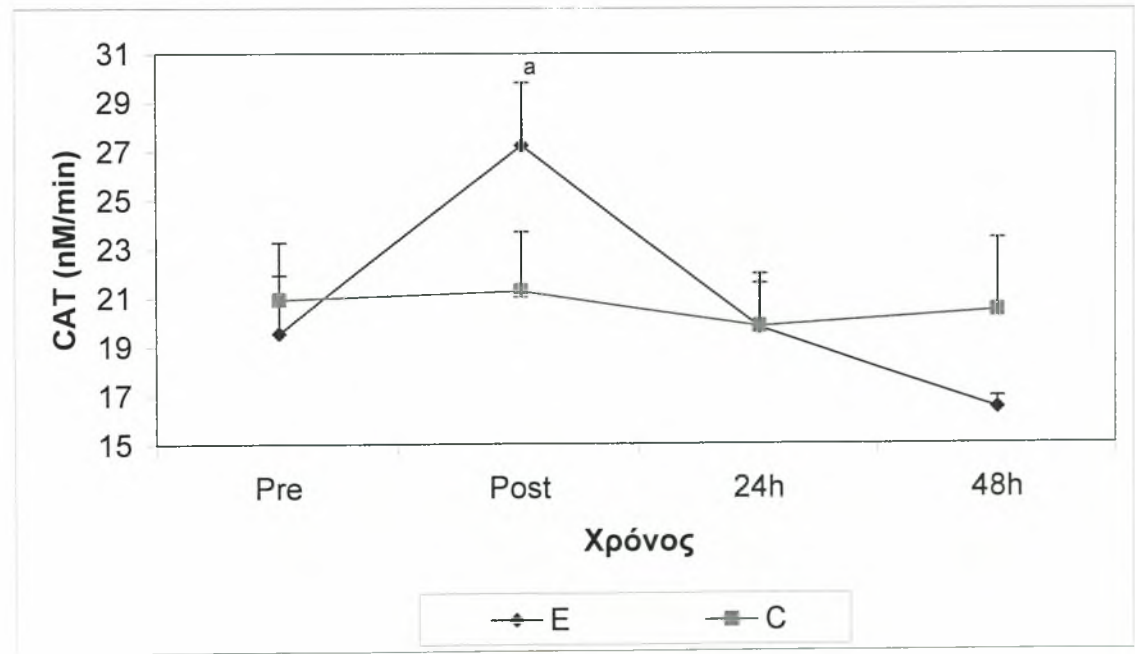
4.2 Αντιοξειδωτικοί δείκτες

Η δραστικότητα του ένζυμου τις καταλάσης (CAT) στη E, εμφάνισε μια σημαντική αύξηση μετά το τέλος του αγώνα ποδοσφαίρου. Η μεταβολή η οποία προέκυψε ήταν τις τάξης του 40%. Αντιθέτως, 24 και 48 ώρες μετά, δεν υπήρξε καμία σημαντική μεταβολή τις με τα επίπεδα ηρεμίας. Επιπλέον, 48 ώρες μετά τον αγώνα εμφάνισε μία μικρή μείωση (-15%) η οποία ήταν μη στατικά σημαντική. Καμία μεταβολή δε παρουσιάστηκε σε σχέση με τη C. Στο πίνακα 6 καθώς και στο σχήμα 3 παρουσιάζονται αναλυτικά οι μεταβολές τις καταλάσης.

Πίνακας 6: Η δραστικότητα τις καταλάσης (CAT) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.

CAT (mM/min)	Ηρεμία Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	Μετά τον αγώνα Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	24 ώρες μετά Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	48 ώρες μετά Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)
E	19,54 ± 2,37	27,24 ± 2,57	19,78 ± 2,18	16,47 ± 0,46
C	20,91 ± 2,36	21,26 ± 2,44	19,81 ± 1,78	20,46 ± 2,98

E: πειραματική ομάδα, C: ομάδα ελέγχου.

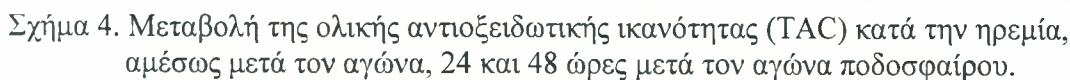


Σχήμα 3. Μεταβολή τις δραστικότητα τις καταλάσης (CAT) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.

^a δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με pre.

Πίνακας 7: Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.

Ε: πειραματική ομάδα, C: ομάδα ελέγχου.



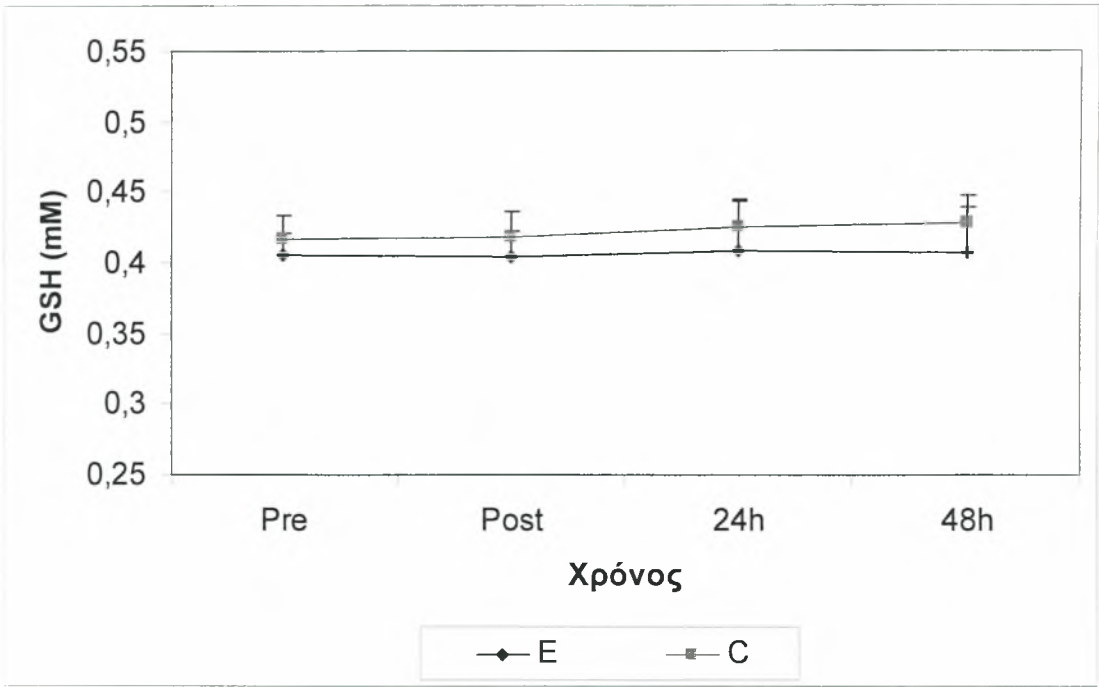
4.3 Γλουταθειόνες

Όσον αφορά την ανοιγμένη γλουταθειόνη (GSH) δεν μεταβλήθηκε σχεδόν καθόλου μετά τον αγώνα και στις 2 ομάδες με μία μικρή μη στατιστικά σημαντική διαφορά της τάξης των 2,5% για την C ομάδα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στο παρακάτω πίνακα 8 και σχήμα 5.

Πίνακας 8: Η συγκέντρωση της ανοιγμένης γλουταθειόνης (GSH) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.

GSH (mM)	Ηρεμία Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	Μετά τον αγώνα Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	24 ώρες μετά Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	48 ώρες μετά Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)
E	0,405 ± 0,016	0,404 ± 0,019	0,409 ± 0,036	0,407 ± 0,032
C	0,417 ± 0,016	0,418 ± 0,018	0,425 ± 0,019	0,428 ± 0,020

E: πειραματική ομάδα, C: ομάδα ελέγχου.



Σχήμα 5. Μεταβολή της ανοιγμένης γλουταθειόνης (GSH) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.

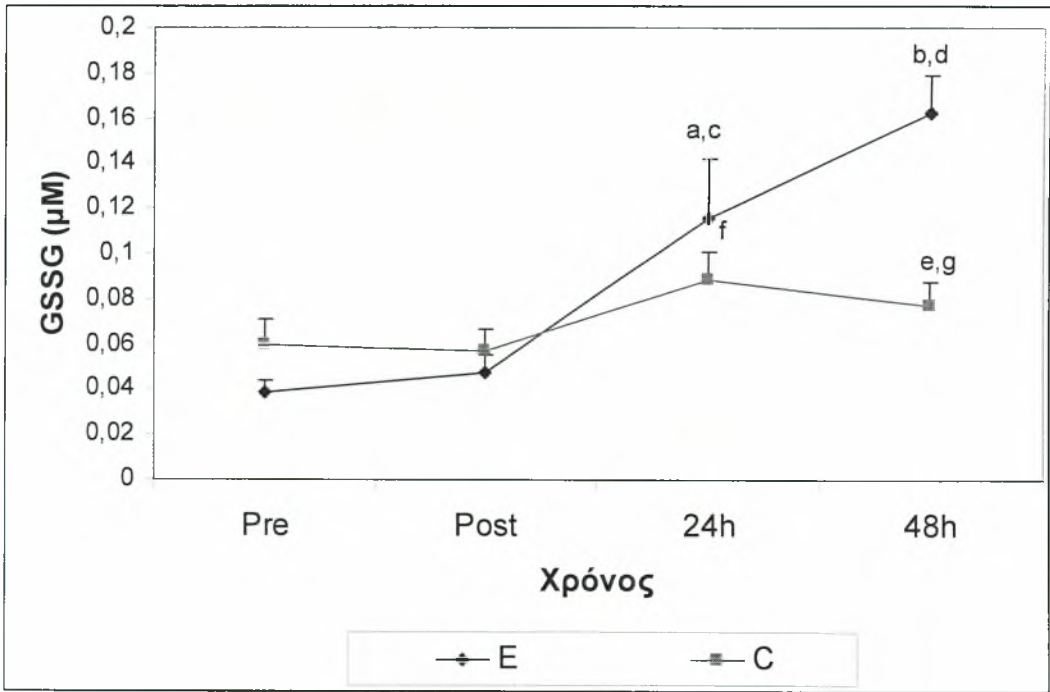
Η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) παρουσίασε σημαντική στατιστική αύξηση ($p<0,05$) μετά από έναν αγώνα ποδοσφαίρου. Η μεταβολή αυτή στην E ομάδα, ξεκίνησε με αύξηση 20% αμέσως μετά τον αγώνα, τριπλασιάστηκε 24 ώρες

μετά, για να οκταπλασιαστεί 48 ώρες μετά το τέλος του αγώνα ποδοσφαίρου. Σημαντική στατιστική διαφορά παρουσιάστηκε και στην ομάδα C, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα. Επιπλέον, σημαντικά στατιστική διαφορά εμφανίστηκε μεταξύ της ομάδας E με τη C, 48 ώρες μετά τον αγώνα. Οι μεταβολές παρουσιάζονται αναλυτικά στο πίνακα 9 και στο σχήμα 6.

Πίνακας 9: Η συγκέντρωση τις οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.

GSSG (μM)	Ηρεμία	Μετά τον αγώνα	24 ώρες μετά	48 ώρες μετά
	Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)	Τιμή και τυπικό σφάλμα (±)
E	0,039 ± 0,005	0,047 ± 0,008	0,116 ± 0,026	0,162 ± 0,017
C	0,060 ± 0,011	0,057 ± 0,010	0,089 ± 0,012	0,077 ± 0,011

E: πειραματική ομάδα, C: ομάδα ελέγχου.



Σχήμα 6. Μεταβολή τις οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.

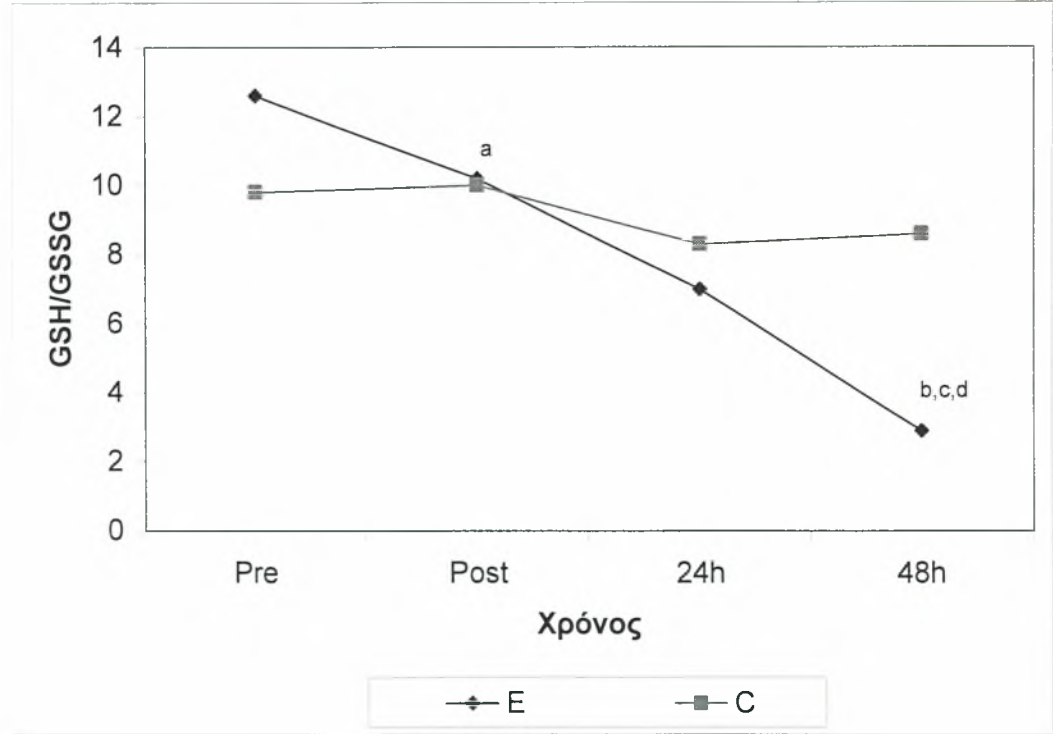
^a στατιστικά σημαντική διαφορά με pre, ^b στατιστικά σημαντική διαφορά με pre, ^c στατιστικά σημαντική διαφορά με post, ^d στατιστικά σημαντική διαφορά με post, ^e στατιστικά σημαντική διαφορά με pre, ^f στατιστικά σημαντική διαφορά με post, ^g στατιστικά σημαντική διαφορά με 48h της E.

Αφού εξετάσθηκαν οι μεταβολές της γλουταθειόνης στην ανηγμένη (GSH) και την οξειδωμένη (GSSG) της μορφή, είναι δυνατό να προσδιοριστεί ο λόγος τους (GSH/GSSG). Ο λόγος τους αποτελεί σημαντικό δείκτη οξειδωτικού στρες. Τα δεδομένα της Ε παρουσίασαν σημαντική πτώση ($p<0,05$) ιδίως 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα. Η μείωση αυτή εντοπίσθηκε στο 19% μεταξύ των τιμών ηρεμίας και αμέσως μετά τον αγώνα, στο 44% και 77%, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα αντίστοιχα. Στατιστικά σημαντική ήταν και η διαφορά της Ε με τη C, 48 ώρες μετά το τέλος του αγώνα. Οι μεταβολές αυτές παρουσιάζονται στο πίνακα 10 αλλά και σχηματικά στο σχήμα 7.

Πίνακας 10: Η συγκέντρωση της αναλογίας ανηγμένη προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.

GSH/GSSG	Ηρεμία Τιμή και τυπικό σφάλμα ($\pm$)	Μετά τον αγώνα Τιμή και τυπικό σφάλμα ($\pm$)	24 ώρες μετά Τιμή και τυπικό σφάλμα ($\pm$)	48 ώρες μετά Τιμή και τυπικό σφάλμα ($\pm$)
E	12,6 $\pm$ 1,42	10,2 $\pm$ 1,14	7 $\pm$ 1,69	2,9 $\pm$ 0,38
C	9,8 $\pm$ 1,50	10 $\pm$ 1,51	8,3 $\pm$ 1,50	8,6 $\pm$ 2,22

E: πειραματική ομάδα, C: ομάδα ελέγχου.



Σχήμα 7. Μεταβολή του λόγου τις γλουταθειόνης στην ανηγμένη (GSH) τις την οξειδωμένη (GSSG) μορφή τις κατά την ηρεμία, αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου.

^a δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με pre, ^b δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με pre, ^c δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με post, ^d δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά με τη 48h μέτρηση της ομάδας C.

4.4. Συσχέτιση μεταξύ χρόνου συμμετοχής και μεταβολής των δεικτών οξειδωτικού στρες ως προς τις τιμές ηρεμίας

Πίνακας 11: Οι συσχετίσεις μεταξύ χρόνου συμμετοχής και μεταβολής τις μεταβλητής οξειδωτικού στρες ως προς τις τιμές ηρεμίας.

Δείγμα Χρόνος	TBARS	PC	CAT	TAC	GSH	GSSG	GSH/GSSG
D1	R=0,078 r<0,712	R=0,435 r<0,030*	R=0,307 r<0,136	R=0,018 r<0,931	R=-0,010 r<0,961	R=0,389 r<0,054	R=-0,445 r<0,026*
D2	R=0,092 r<0,661	R=0,566 r<0,003*	R=0,056 r<0,792	R=0,013 r<0,950	R=-0,016 r<0,940	R=0,303 r<0,141	R=-0,173 r<0,408
D3	R=0,262 r<0,206	R=0,464 r<0,020*	R=-0,032 r<0,880	R=-0,095 r<0,650	R=0,029 r<0,891	R=0,602 r<0,001*	R=-0,512 r<0,009*

D1: post-pre, D2: 24h post-pre, D3: 48h post-pre, * στατιστικά σημαντική διαφορά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα έρευνα προσδιορίζει τον σημαντικό βαθμό επίδρασης ενός αγώνα ποδοσφαίρου στους δείκτες οξειδωτικού στρες, όχι όμως και στους δείκτες αντιοξειδωτικού μηχανισμού, στους παίκτες που συμμετέχουν έναντι αυτών που δεν συμμετέχουν στον αγώνα. Η επίδραση αυτή, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, φάνηκε να σχετίζεται άμεσα με τις επιδράσεις αερόβιας και αναερόβιας άσκησης σε αθλητές όσον αφορά το οξειδωτικό στρες, ενώ αντιθέτως στη λειτουργία του αντιοξειδωτικού μηχανισμού διαφέρει. Ωστόσο, δεν εμφανίστηκαν μεταβολές στις συγκεντρώσεις των δεικτών οξειδωτικού στρες και αντιοξειδωτικού μηχανισμού στην συνθήκη ελέγχου (κατάσταση ηρεμίας) ανάμεσα στις δύο ομάδες .

Το ποδόσφαιρο χαρακτηρίζεται από την πολύ έντονη διαλειμματική δραστηριότητα των αθλητών η οποία συνδυάζει περιόδους εναλλαγών υψηλής και χαμηλής έντασης. Κατά τη διάρκεια ενός αγώνα, οι παίκτες εκτελούν πλήθος διαφορετικών δραστηριοτήτων όπως τρέξιμο, άλματα, λακτίσματα οι οποίες περιλαμβάνουν στοιχεία αντοχής, δύναμης, ταχύτητας καθώς και ισχύος (Bangsbo, 1994; Reilly, 1997). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η αερόβια και η αναερόβια άσκηση επηρεάζουν σημαντικά τις συγκεντρώσεις του οξειδωτικού στρες (Marzatico, et al., 1997; Vider, et al., 2001; Ortenblad, et al., 1997). Πρόσφατες έρευνες αναφέρουν την μείωση των επιπέδων οξειδωτικού στρες σε αθλητές διαλειμματικής άσκησης ομαδικών αθλημάτων (Chang, et al., 2002; Metin, et al., 2003), ενώ διερευνούν και την σχέση του με το επίπεδο φυσικής κατάστασης των αθλητών (Chang, et al., 2002).

Στη παρούσα μελέτη, η συγκέντρωση του δείκτη της λιπιδιακής υπεροξειδωσης (TBARS) δεν παρουσίασε σημαντική αύξηση μετά από τον αγώνα, ούτε 24 και 48 ώρες μετά, ενώ εμφάνισε μία μικρή στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (C). Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι

Cazzola και συν. (2003), σε έρευνά τους σε ποδοσφαιριστές σε περίοδο προπόνησης και όχι μετά από αγώνα. Οι συγγραφείς ανέφεραν πως οι αθλητές που υπόκεινται σε έντονη δραστηριότητα-άσκηση είναι ικανή να προκαλέσει οξειδωτικό στρες, το οποίο όμως εξισορροπείται από τα αυξημένα επίπεδα των ενζυματικών και μη αντιοξειδωτικών του οργανισμού (Cazzola, et al., 2003). Σε έρευνά τους οι Chang και συν. (2002) προσδιόρισαν τη σημαντική μείωση της λιπιδιακής υπεροξείδωσης αμέσως μετά από αγώνα αμερικάνικου ποδοσφαίρου, (Chang, Tseng, Hsuuw, et al., 2002). Σε ανάλογα αποτελέσματα κατέληξαν οι Metin και συν. (2003), οι οποίοι ανέφεραν την ύπαρξη χαμηλότερων επιπέδων MDA σε νεαρούς ποδοσφαιριστές σε κατάσταση ηρεμίας (Metin, Gumustas, Uslu, Kayserilioglu, Belce, 2003).

Σε αντίθετα αποτελέσματα με σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων των TBARS, κατέληξαν ερευνητές που μελέτησαν τη χρόνια διαλειμματική προπόνηση στο ποδόσφαιρο (Balakrishnan, Anuradha, 1998), στο μπάσκετ (Pincemail, et al., 2000, Schroder, et al., 2001), με πρωτόκολλα διαλειμματικής άσκησης με κύριο χαρακτηριστικό την υψηλή καρδιακή συχνότητα (Miyazaki, et al., 2001) αλλά και το έντονο τρέξιμο (Thompson, et al., 2001, Kingsley, et al., 2005).

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC) σχηματίζονται από την οξείδωση των αμινοξέων (αργινίνη, λυσίνη, θρεονίνη, προλίνη) και αποτελούν προϊόν αντιδράσεων με αμινοξέα, υδατάνθρακες και λιπαρά οξέα (Uchida, Stadtman, 1993). Τα δεδομένα της παρούσας έρευνας κατέδειξαν μία στατιστικά σημαντική αύξηση 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα κατά 73% και 64% αντίστοιχα. Επιπλέον, εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά σε όλους τους χρόνους σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο τα δεδομένα σχετικά με τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά από άσκηση εμφανίζονται περιορισμένα. Έρευνες αναφέρουν ότι η αερόβια άσκηση αυξάνει τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά την άσκηση και επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα 24 ώρες μετά (Michailidis, et al., 2007). Σε μια διαφορετική μελέτη, οι Bloomer και συν. (2005) διαπίστωσαν μη σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση του δείκτη αμέσως μετά καθώς και 24 ώρες μετά το τέλος ενός πρωτοκόλλου αερόβιας και αναερόβιας άσκησης. Παράλληλα σε έρευνα αναερόβιου τρεξίματος σε επιμύες, διαπιστώθηκε αύξηση του επιπέδου των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους πνεύμονες, προτείνοντας έτσι την ύπαρξη της οξείδωσης των πρωτεϊνών μετά από αναερόβια άσκηση (Radak, et al., 2000).

Η δραστικότητα του ένζυμου τις καταλάσης (CAT) στους παίκτες που συμμετείχαν στον αγώνα, εμφάνισε μια σημαντική αύξηση μετά το τέλος του αγώνα

ποδοσφαίρου. Η μεταβολή η οποία προέκυψε ήταν της τάξεως του 40%. Αντιθέτως, 24 και 48 ώρες μετά, δεν υπήρξε καμία σημαντική μεταβολή της σε σχέση με τα επίπεδα ηρεμίας. Σύμφωνα με τους Michailidi και συν. (2007) και Vider και συν, 2001, μετά από αερόβια άσκηση εμφανίζεται στατιστικά σημαντική αύξηση στη CAT. Αντιθέτως, στη διεθνή βιβλιογραφία πολλές είναι οι μελέτες που δεν εντόπισαν σημαντικές μεταβολές στην δραστηριότητα της CAT μετά την άσκηση (Duthie et al. 1990; Khassaf et al. 2001).

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) είναι ένας δείκτης που συναθροίζει τη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ουσιών όπως το ουρικό οξύ, τη βιταμίνη E και C, β-καροτένιο κ.ά.. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) παρουσιάστηκε σχεδόν αμετάβλητη μετά από τον ποδοσφαιρικό αγώνα και παρέμεινε σταθερή στα αρχικά επίπεδα ηρεμίας. Ενώ στα ίδια επίπεδα κυμάνθηκε 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα. Σε έρευνα των Banfi και συν. (2006) και Balakrishnan και συν. (1998) σε αγωνιστική ποδοσφαιρική περίοδο, δεν βρέθηκαν διαφορές στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Παράλληλα έρευνες αναφέρουν την αύξηση της TAC καθώς και άλλων μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών κατά τη διάρκεια ομαδικών αθλημάτων που περιλαμβάνουν διαλειμματική άσκηση (Cazzola, et al., 2003; Brites, et al., 1999; Evelson, et al., 2002).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των μορφών της γλουταθειόνης στους ποδοσφαιριστές, η ανηγμένη της μορφή (GSH) παρέμεινε σταθερή και στις τρεις επακόλουθες μετρήσεις. Ωστόσο, η οξειδωμένη γλουταθειόνη παρουσίασε σημαντική αύξηση μετά τον αγώνα ποδοσφαίρου. Η αύξηση αυτή τριπλασιάστηκε 24 ώρες μετά, για να οκταπλασιαστεί 48 ώρες μετά το τέλος του αγώνα. Τέλος, ο λόγος της ανηγμένη προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη είχε σημαντική μείωση ιδιαίτερα 48 ώρες μετά τον αγώνα. Τα αποτελέσματα της GSH έρχονται σε αντίθεση με αυτά των Svensson και συν. (2002), οι οποίοι ανέφεραν την αύξηση του υποστρώματος μετά από διαλειμματικού τύπου άσκηση. Επιπροσθέτως, οι Balakrishnan και συν. (1998) διαπίστωσαν μείωση της GSH μετά από διαλειμματική προπόνηση ομαδικών αθλημάτων (ποδόσφαιρο, χόκεϋ). Όσον αφορά την οξειδωμένη γλουταθειόνη, σημαντικές είναι οι διαφορές που παρουσιάζονται σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα. Τα αποτελέσματα αυτά εμφανίζονται σε ασκήσεις μετά από έκκεντρες συστολές (Childs, et al., 2001; Goldfarb, et al., 2005), ασκήσεις με αντιστάσεις (Bloomer, et al., 2005), ή σε πολύ έντονες αερόβιες ασκήσεις (Aguilo, et al., 2005).

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που εξετάζει την μεταβολή ενός συνόλου βιοχημικών παραμέτρων οξειδωτικού στρες, αμέσως μετά, 24 και 48 ώρες με το πέρας ενός αγώνα ποδοσφαίρου. Το οξειδωτικό στρες αναπτύσσεται μετά την εφαρμογή διαλειμματικής άσκησης σε αθλητές (Chang, et al., 2002; Metin, et al., 2003). Η μεταβολή αυτή αποτελεί επακόλουθο μιας σειράς μεταβολικών αποκρίσεων του οργανισμού κατά την αερόβια άσκηση και συγκεκριμένα την παραγωγή και μεταφορά ηλεκτρονίων από το μιτοχονδριακό σύστημα μεταφοράς (Ji, 1995). Συνέπεια της μεταβολικής αυτής απόκρισης είναι η παραγωγή ελευθέρων ριζών (Yu, 1994).

Μια άλλη πιθανή εξήγηση ότι η διαλειμματική άσκηση προάγει το οξειδωτικό στρες, είναι η επικείμενη αύξηση των ουδετερόφιλων λευκών αιμοσφαιρίων. Τα ουδετερόφιλα προκαλούν μια σειρά μεταβολών, όπως αυξημένη συγκέντρωση ριζών υπεροξειδίου, μείωση της συγκέντρωσης της βιταμίνης C και του ουρικού οξέος στο πλάσμα (Quindry, Stone, King & Broeder, 2003). Επιπρόσθετα συνδέεται άμεσα, με την ύπαρξη φλεγμονής και το μυϊκό πόνο (Tiidus, 1998).

Τα αποτελέσματά της παρούσας έρευνας σχετικά με τις συγκεντρώσεις των TBARS επιβεβαιώθηκαν από προηγούμενες έρευνες, οι οποίες αποδεικνύουν ότι η υψηλής έντασης αναερόβια άσκηση και η έντονη αερόβια άσκηση εμφανίζουν μία καθυστέρηση (>48 ώρες) στην αύξηση των επιπέδων των TBARS (40%-70%) (Childs, et al., 2001; Marzatico, et al., 1997). Η καθυστέρηση αυτή ενδεχομένως να ξεκινάει από τη δραστηριότητα των λευκοκυττάρων, των μακροφάγων καθώς και/ή της οξειδάσης της ξανθίνης, εξαιτίας του φαινομένου της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης παρά την διαρροή των ελεύθερων ριζών από τα μιτοχόνδρια στη πρόσληψη οξυγόνου κατά την άσκηση.

Η αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων που εμφανίστηκε αμέσως μετά τον αγώνα πρέπει να οφείλεται κατά κύριο λόγο στην οξείδωση της αλβουμίνης, η οποία αποτελεί περίπου το 60 % των πρωτεϊνών του ορού (Anderson, Anderson, 2002), καθώς και άλλων κύριων πρωτεϊνών του ορού (αντισώματα, τρανσφερίνη κ.ά.). Τα καρβονύλια σχηματίζονται από την οξείδωση των αμινοξέων (αργινίνη, λυσίνη, θρεονίνη, προλίνη). Η απομάκρυνση των οξειδωμένων πρωτεϊνών από το αίμα πιθανόν να είναι θέμα χρόνου καθώς οι συγκεντρώσεις των PC παραμένουν ανεβασμένες για μεγάλο χρονικό διάστημα όπως παρουσιάζεται αμέσως μετά, 24 και 48 ώρες με το πέρας του αγώνα. Αυτή η αύξηση μπορεί να εξηγηθεί μηχανικά από την εισβολή των φαγοκυττάρων στο τραυματισμένο μυϊκό ιστό

αρκετές ώρες μετά τον αγώνα και μπορεί να παράγει ένα σημαντικό ποσοστό ελευθέρων ριζών οξυγόνου ενώ σχετίζεται παράλληλα με τη βασική φλεγμονή και το μυϊκό πόνο (Tiidus, 1998).

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η καταλάση (CAT) αυξήθηκε μόνο αμέσως μετά τον αγώνα, ενώ παρέμεινε σταθερή 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα. Η CAT δεν έχει κάποια συγκεκριμένη λειτουργία στον ορό καθώς αποτελεί ένα ενδοκυτταρικό ένζυμο. Για τον λόγο αυτό, η αυξημένη δραστηριότητά της μετά την άσκηση πιθανόν δείχνει αυξημένη καταστροφή μυϊκών ινών ή ερυθροκυττάρων και εκροή της CAT στο πλάσμα του αίματος (Antunes, Derick, Cadenas, 2002).

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) παρέμεινε σε σταθερά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια των τριών μετρήσεων. Το γεγονός αυτό, πιθανόν να σχετίζεται με την αυξημένη δραστηριότητα της CAT, κάτι που δηλώνει τη μη ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού των συμμετεχόντων.

Ενδιαφέρον προκαλεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση της γλουταθειόνης η οποία παρουσίασε μία σταθερή πορεία κατά τη διάρκεια των τριών μετρήσεων και δε φάνηκε να επηρεάζεται από τη μεγάλη ένταση του αγώνα. Ενδεχομένως, τα αποθέματα ηπατικού GSH να επαρκούσαν για την παρούσα χρησιμοποίησή της. Δε συνέβη όμως το ίδιο και με τις μεταβολές της GSSG, όπου τα επίπεδα της τριπλασιάστηκαν 24 ώρες και οκταπλασιάστηκαν 48 ώρες μετά το τέλος του αγώνα ποδοσφαίρου. Δεν έχει βρεθεί κάποια επιστημονική εξήγηση που να εξηγεί την αμφίδρομη σχέση της GSH με τη GSSG καθώς και τα δύο υποστρώματα βρίσκονται βασικά σε άλλους ιστούς.

Ο λόγος της GSH προς GSSG αποτελεί σημαντικό δείκτη παρουσίας οξειδωτικού στρες. Στα δεδομένα της μελέτης φαίνεται η σημαντική μείωση του λόγου εξαιτίας της μεγάλης αύξησης της GSSG.

Για τη περαιτέρω ενίσχυση και διερεύνηση των αποτελεσμάτων κρίθηκε σημαντικό να εντοπιστεί η όποια συσχέτιση μεταξύ της μεταβλητής, χρόνος συμμετοχής, και των μεταβολών των εκάστοτε δεικτών του οξειδωτικού στρες αμέσως μετά, 24 και 48 ώρες με τη λήξη του ποδοσφαιρικού αγώνα. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν τρεις μεταβλητές D1, D2, D3, οι οποίες προκύπτουν από τις τιμές των μεταβλητών του οξειδωτικού στρες σε σχέση με τις τιμές ηρεμίας, π.χ. D1= τιμή αμέσως μετά - τιμή pre.

Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ του χρόνου συμμετοχής σε ένα ποδοσφαιρικό αγώνα και τη μεταβολή δεικτών του οξειδωτικού

στρες. Οι δείκτες των PC και στις 3 χρονικές περιόδους που ορίστηκαν, όπως και ο λόγος της GSH/GSSG στις περιόδους D1 και D3, έδειξαν να επηρεάζονται σημαντικά από το χρόνο συμμετοχής στη δραστηριότητα. Ομοίως και η μεταβλητή GSSG κατά τη περίοδο D3.

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η εμφάνιση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στηρίζεται στη οξείδωση των πρωτεϊνών του ορού. Η απομάκρυνση των οξειδωμένων πρωτεϊνών από το αίμα πιθανόν να είναι θέμα χρόνου (έως 48 ώρες), καθώς πραγματοποιείται εισβολή των φαγοκυττάρων στο τραυματισμένο μυϊκό ιστό αρκετές ώρες μετά τον αγώνα και μπορεί να παράγει ένα σημαντικό ποσοστό ελευθέρων ριζών οξυγόνου ενώ σχετίζεται παράλληλα με τη βασική φλεγμονή και το μυϊκό πόνο (Tiidus, 1998).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επτά δείκτες του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού σε αντίθεση με τις περισσότερες μελέτες όπου χρησιμοποιούνται δυο με τρεις δείκτες. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι κανένας δείκτης από μόνος του δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αξιόπιστα για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες γιατί όλοι εμφανίζουν ορισμένα μειονεκτήματα (Banfi, et al., 2006; Brites, et al., 1999; Cazzola, et al., 2003; Metin, et al., 2003; Pincemail, et al., 2000; Schippinger, et al., 2002). Έτσι ένα σύνολο δεικτών του οξειδωτικού στρες θα αποτελούσε μια περισσότερο αξιόπιστη μέθοδο για την εκτίμησή του. Οι δείκτες αυτοί θα πρέπει να σχετίζονται με τις επιδράσεις των ριζών στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και το DNA. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείκτες για όλα όσα προαναφέρθηκαν εκτός από την καταστροφή του DNA.

Φαίνεται λοιπόν από τα αποτελέσματα μας, ότι ένας αγώνας ποδοσφαίρου αναπτύσει το οξειδωτικό στρες των συμμετεχόντων και ιδιαίτερα αυτών οι οποίοι έχουν μεγαλύτερη συμμετοχή στον αγώνα. Ωστόσο όμως, ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός καταφέρει και εξουδετερώνει το εμφανιζόμενο οξειδωτικό στρες. Οι δείκτες που επηρεάζονται σημαντικά είναι τα TBARS, τα PC, η CAT, η GSSG και ο λόγος GSH προς GSSG.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά σχετικά με τις μηδενικές υποθέσεις που έγιναν μπορούν να αναφερθούν τα παρακάτω:

- Βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της πρώτης μέτρησης πριν τον αγώνα και αμέσως μετά τον αγώνα στους δείκτες PC, GSSG και του λόγου GSH/GSSG..
- Δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές των συγκεντρώσεων των TBARS, της TAC, της CAT και της GSH.
- Δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές σε κανέναν δείκτη για τη συνθήκη ελέγχου.

Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

Η διάρκεια των μεταβολών των δεικτών του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού αποτελεί έναν τομέα στον οποίο υπάρχει περιορισμένη βιβλιογραφία. Με την παρούσα εργασία παρουσιάστηκαν πληροφορίες για το θέμα αυτό όμως θα μπορούσαν να προστεθούν δείκτες της επίδρασης των ελευθέρων ριζών στο DNA καθώς και πιο πρόσφατοι και αξιόπιστοι δείκτες του οξειδωτικού στρες. Επιπλέον παρόμοιες μελέτες θα μπορούσαν να γίνουν με διαφορετικά ομαδικά αθλήματα όπως μπάσκετ, χειροσφαίριση κ.α.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aguilo, A., Tauler, P., Fuentespina, E., Tur, J.A., Cordova, A., Pons, A., (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology Behavior*, 84, (1): 1-7.
- Alessio, H.M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 25, (2), 218-24.
- Alessio, H.M., Goldfarb, H.A., Cutler, G.R., (1988). MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *American Journal Physiology*, 255, (24), C874-C877.
- Ames, B.N., Catchcart, R., Schwiers, E., et al., (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, (11), 6858-62.
- Anderson, N.L., Anderson, N.G., (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11, 845-867.
- Andrade, F.H., Reid, M.B., Allen, D.G., et al., (1998). Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *Journal of Physiology*, 509, (2): 565-75.
- Antunes, F., Derick, H., Cadenas, E., (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, (9), 1260-7.
- Ashton, T., Rowlands, C.C., Jones, E., et al., (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 77, (6), 498-502.
- Balakrishnan, S.D., Anuradha, C.V., (1998). Exercise, depletion of antioxidants and antioxidant manipulation. *Cell Biochemistry and Function*, 16, (4), 269-75.
- Banfi, G., Marinelli, M., Roi, G.S., Agape, V., (1993). Usefulness of free testosterone / cortisol ratio during a season of elite speed skating athletes. *International Journal of Sports Medicine*, 14, 373-379.
- Bangsbo, J., (1994). Energy demands in competitive soccer, *Journal of sports science*. 12, S5-12.
- Barja, G., (2004). Free radicals and aging. *Trends of Neuroscience*, 27 (10): 595-600.

- Beckman, K.B., Ames, B.N., (1997). Oxidative decay of DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, (32), 19633-6.
- Bieiski, B.H.J., Richter, H.W., (1975). Some properties of the absorbance free radicals. *Annals of the New York Academy Science*, 258, 231.
- Bloomer, R.J., Goldfarb, H.A., Wideman, L., McKenzie, J.M., Consitt, A.L., (2005). Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 19, (2), 276–285.
- Bloomer, J.R., Goldfarb, H.A., Mckenzie, J.M., (2006). Oxidative Stress Response to Aerobic Exercise: Comparison of Antioxidant Supplements. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 38, (6), 1098–1105.
- Boveris, A., and Chance, B., (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 134, 707-716.
- Breimer, L.H., (1988). Ionizing radiation-induced mutagenesis. *British Journal of Cancer*, 57, 6.
- Brites, F.D., Evelson, P.A., Christiansen, M.G., Nicol, M.F., Basilico, M.J., Wilkins, R.W., Llesuy, S.F., (1999). Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. *Clinical Science*, 96, (4), 381-5.
- Bulkley, D.H., (1990). An electromagnetic theory of life. *Medicine Hypotheses*, 30, (4), 281-285.
- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C.I. and Stoppani, A.O.M. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinolcytochrome c reductase from beef heart mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 180, 248-257.
- Camus, G., Felekidis, A., Pincemail, J., et al., (1994). Blood levels of reduced/oxidized glutathione and plasma concentration of ascorbic acid during eccentric and concentric exercises of similar energy cost. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique*, 102, 67–70.
- Cazzola, R., Russo-Volpe, S., Cervato, G., Cestaro, B., (2003). Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *European Journal of Clinical Investigation*, 33, 924–930.
- Chang, C.K., Tseng, H.F., Hsuuw, Y.D., et al., (2002). Higher LDL oxidation at rest and after a rugby game in weekend warriors. *Annual Nutrition and Metabolism*, 46: 103-7
- Childs, A., Jacobs, C., Kaminski, T., et al., (2001). Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, (6) 745-53.

- Chow, C.K., Tapel, A.L., (1972). An enzymatic protective mechanism vs lipid peroxidation damage to lungs of oxygen exposed rats. *Lipids*, 7, 518.
- Clarkson, P.M., (1995). Antioxidants and physical performance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 131-41.
- Clarkson, P.M., Thompson, H.S., (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, (S), 637-46.
- Coombes, J.S., Powers, S.K., Rowell, B., et al., (2001). Effects of vitamin E and α -lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. *Journal of Applied Physiology*, 90, 1424-30.
- Cooper, C.E., Vollaard, N.B.J., Choueiri, T., et al., (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 30, (2), 280-5.
- Criswell, D., Powers, S., Dodd, S., Lawler, J., Edwards, W., Renshler, K., Grinton, S., (1993). High intensity training-induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 25, 1135-1140.
- Dahle, L.K., Hill, E.G., Holman, R.T., (1962). The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. 98: 253-61.
- Davies, K.J., Quantanilla, T.A., Brooks, A.G., Packer, L., (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107, 1198-1205.
- De Lorgeril, M., Salen, P., Accominotti, M., Cadau, M., Steghens, J.P., Boucher, F., de Leiris, J., (2001). Dietary and blood antioxidants in patients with chronic heart failure. Insights into the potential importance of selenium in heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 3(6): 661-9.
- Di Meo, S., Venditti, P., (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biological Signals and Receptors*, 10, 125-40.
- Dillard, C.J., Litov, R.E., Savin, W.M., Dumelin, E.E., Tappel A.L., (1978). Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *Journal of Applied Physiology*, 45, 927-32.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., et al., (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32, (11), 1102-15.
- Dousset, E., Steinberg, J.G., Faucher, M., and Jammes, Y. (2002). Acute hypoxemia does not increase the oxidative stress in resting and contracting muscle in humans. *Free Radical Research*, 36, 701-704.

- Duthie, G.G., Robertson, J.D., Maughan, R.J., Morrice, P.C., (1990). Blood antioxidant status and erythrocyte lipid peroxidation following distance running. *Archives of biochemistry and biophysics*, 282(1): 78-83.
- Elosua, R., Molina, L., Fito, M., Arquer, A., Sanchez-Quesada, J.L., Covas, M.I., Ordonez-Llanos, J., Marrugat, J. (2003). Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute phase physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis*, 167, 327-334.
- Evans, W.J., (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, (S), 647-52.
- Evelo, C.T.A., Palmen, N.G.M., Artur, Y., Janssen, G.M.E., (1992). Changes in blood glutathione concentrations, and in erythrocyte glutathione reductase and glutathione S-transferase activity after running training and after participation in contests. *European Journal of Applied Physiology*, 64, 354–8.
- Fehrenbach, E., Northoff, H., (2001). Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exercise Immunology Revolution*, 7, 66-89.
- Ferrari, R., Ceconi, C., Curello, S., et al., (1991). Oxygen free radicals and myocardial damage: Protective role of thiol-containing agents. *American Journal of Medicine*, 91(suppl 3c): 95.
- Finaud, J., Lac, G., Filaire, E., (2006). Oxidative stress: Relation with exercise and training. *Sports Medicine*, 36, (4), 327-358.
- Ford-Hutchinson, A.W., (1985). Leukotrienes. The formation and role as inflammatory mediators. *Fed Proc*, 44:25.
- Gey, K.F., Brubacher, G.B., Stahelin, H.B., (1987). Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 45(suppl 5): 1368-77.
- Goldfarb, A.H., (1993). Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. *Medicine Science in Sports and Exercise*. 25, (2), 232-6.
- Groussard, C., Machefer, G., Rannou, F., et al., (2003). Physical fitness and plasma non-enzymatic antioxidant status at rest and after a Wingate test. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 28, (1), 79-92.
- Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., et al., (2003). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 89, 14-20.
- Gutteridge, J.M., (1993). Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radical Research Community*, 19(3):141-58.

- Gutteridge, J.M., (1985). Superoxide dismutase inhibits the superoxide-driven Fenton reaction at two different levels. Implications for a wider protective role. *FEBS Letters*, 185, (1), 19-23.
- Gutteridge, J.M.C., Smith, A., (1988). Antioxidant protection by haemopexin of haemstimulated lipid peroxidation. *Biochemistry*, J256, 861.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (1985). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, UK: Clarendon Press.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (1999). Oxidative stress and antioxidant protection: some special cases. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*, (p. 530-533). 3rd ed. Oxford: Clarendon Press.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press. Oxford.
- Harrison, D.G., (1997), Endothelial function and oxidant stress. *Clinical Cardiology*, 20,(S2): 11-17.
- Hellsten, Y., Sjodin, B., Richter, E.A., et al., (1998). Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *American Journal of Physiology*, 274, E600-6.
- Hubner-Wozniak, E., Panczenko-Kresowka, B., Lerczak, K., Posnik, J., (1994). Effects of graded treadmill exercise on the activity of blood antioxidant enzymes, lipid peroxides and nonenzymatic anti-oxidants in long-distance skiers. *Biology of Sport*, 11, (4), 217-226.
- Inal, M., Akyuz, F., Turgut, A., (2001). Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clinical Chemistry Acta*, 305(1-2):75-80.
- Inal, M., Akyuz, F., Turgut, A., et al., (2003). Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 33, (4), 564-7.
- Jenkins, R.R., (1988). Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Medicine*, 5, 156-70.
- Jenkins, R.R., (2000). Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, (2- Suppl.), 670-4.
- Ji, L.L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proceedings society for experimental biology and medicine*, 222, 283-292.
- Ji, L.L., (1995). Exercise and oxidative stress: role of the cellular antioxidant systems. *Exercise and sports sciences reviews*, 23, 135-166.
- Ji, L.L., (1996). Exercise, oxidative stress, and antioxidants. *American Journal of Sports Medicine*, 24, (6), S20-S24.

- Ji, L.L., Fu, R., (1993). Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *Journal of Applied Physiology*, 72, 549–554.
- Ji, L.L., Katz, A., Fu, R.G., Griffiths, M., Spencer, M., (1993). Blood glutathione status during exercise: Effect of carbohydrate supplementation. *Journal of Applied Physiology*, 74, 788-792.
- Ji, L.L., Fu, R., Mitchell, W.E., (1992). Glutathione and antioxidant enzymes in skeletal muscle: effects of fiber type and exercise intensity. *Journal of Applied Physiology*. 73:1854–1859,
- Kaiser, S., Di Mascio, P., Murphy, M.E., Sies, H., (1990). Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 277, (1), 101-8.
- Kanter, M., Nolte, L., Holloszy, J., (1993). Effect of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and post-exercise. *Journal of Applied Physiology*, 74: 965-969.
- Karlsson, J., (1997). Antioxidants and EXERCISE. Champaign, III.
- Kasai, H., (2002). Chemistry-based studies on oxidative DNA damage formation, repair, and mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 33, (4), 450-6.
- Kayatekin, B.M., Gonenc, S., Acikgoz, O., Uysal, N., and Dayi, A. (2002). Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *European Journal of Applied Physiology*. 87: 141-144.
- Keul, J., Doll, E., Koppler, D., (1972). *Energy Metabolism of Human Muscle*. Basel: Karger.
- Khassaf, M., Child, R.B., Mcardle, A., Brodie, D.A., Esanu, C. & Jackson, M.J. (2001). Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by ondaming exercise. *Journal Applied Physiology*, 90, 1031–1035.
- Kim, J.D., Yu, B.P., McCarter, R.J.M., Lee, S.Y. and Herlihy, J.T. (1996b). Exercise and diet modulate cardiac lipid peroxidation and antioxidant defenses. *Free Radical Biology and Medicine*, 20: 83-88.
- Kingsley, M.I., Wadsworth, D., Kilduff, L.P., McEneny, J., Benton, D., (2005). Effects of phosphatidylserine on oxidative stress following intermittent running. *Medicine Science in Sports and Exercise*, 37, (8), 1300-6.
- Klapcinska, B., Kempa, K., Sobczak, A., Sadowska-Krepa, E., Jagsz, S., Szoltysek, I., (2005). Evaluation of autoantibodies against oxidized LDL (oLAB) and blood antioxidant status in professional soccer players. *International Journal of Sports Medicine*, 26, (1), 71-8.

- Krinsky, N.I., (1989). Membrane antioxidants. *Annals of the New York Academy Science*, 551: 17-32.
- Kumar, C.T., Reddy, V.K., Prasad, M., et al., (1992). Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidative stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 111:109-115.
- Lee, I., M., Paffenbarger R.,S.,(2000). *American Journal of Epidemiology*, 151,293.
- Leewenburgh, C., Heinecke, J.W., (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current medical chemistry*, 8:829-838.
- Levine, R.L., (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9): 790-6.
- Linnane, A.W., Zhang, C., Yarovaya, N., et al., (2002). Human aging and global function of coenzyme Q10. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959: 396-411.
- Malm, C., (2001). Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. *Acta physiologica Scandinavica*, 171: 233-9.
- Mannervick, B., Axelsson, K., (1980). Role of cytoplasmic thioltransferase in cellular regulation by thiol-disulphide interchange. *Biochemichal Journal*, 190, (1), 125-30.
- Margaritis, I., Tessier, F., Richard, M.J., Marconnet, P., (1997). No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *International Journal of Sports Medicine*, 18, (3), 186-90.
- Margonis, K., Fatouros, G.I., Jamourtas, Z.A., Nikolaidis, G.M., Douroudos, I., Chatzinikolaou, A., Mitrakou, A., Mastorakos, G., Papassotiriou, I., Taxildaris, K., Kouretas, D., Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free radical Biology and Medicine*, In press.
- Marin, E., Hanninen, O., Muller, D., Klinger, W., (1990). Influence of acute physical exercise on glutathione and lipid peroxides in blood in rat and man. *Acta physiologica Hungarica*, 76: 71-6.
- Marzatico, F., Pansarasa, O., Bertorelli, L., et al., (1997). Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 37: 235-9.
- Mastaloudis, A., Leonard, S.W., Traber, M.G., (2001). Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, (7), 911-22.
- Metin, G., Gumustas, M.K., Uslu, E., Kayserilioglu, A., Belce, A., (2003). Effect of regular training on plasma thiols, malondialdehyde and carnitine concentrations in young soccer players. *Chinical Journal of Physiology*, 46, (1), 35-9.

- Meydani, M., Evans, W.J., (1993). Free radicals, exercise, and aging. In: Yu, B. P., ed. *Free Radicals in Aging* (pp. 183-204). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Michailidis, Y., Jamurtas, Z.A., Nikolaidis, G.M., Fatouros, G.I., Koutedakis, Y., Papassotiriou, I., Kouretas, D., (2007). Sampling time is crucial for measurement of exercise-induced oxidative stress biomarkers. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, (in press).
- Møller, P., Wallin, H., Knudsen, L., (1996). Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-biological interactions*, 102:17-36.
- Morgan, R.W., Christman, M.F., Jacobson, F.S., Storz, G., Ames, B.N., (1986). Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, (21), 8059-63.
- Mylonas, C., Kouretas, D., (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo*, 13(3): 295-309.
- Nicotera, P.O., (1994). Molecular mechanisms of toxic cell death: an overview. *Alternative Methods in Toxicology*, 1B: 23-39.
- Niess, AM., Hartmann, A., Grunert-Fuchs, M., Poch, B. & Speit, G. (1996). DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *International Journal Sports Medicine*, 17 (6), 397-403.
- Ortenblad, N., Madsen, K., Djurhuus, M.S., (1997). Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *American Journal of Physiology*, 272 (4): R1258-63.
- Palazzetti, S., Richard, M.J., Favier, A., et al., (2003). Overload training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 28, (4), 588-604.
- Palmer, F.M., Nieman, D.C., Henson, D.A., et al., (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *European Journal of Applied Physiology*, 89: 77.
- Parthasarathy, Khan-Merchant, Penumetcha, Santanaki, 2001
- Pietta, P.G., (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63: 1035-42.
- Pincemail, J., Lecomte, J., Castiau, J., et al., (2000). Evaluation of autoantibodies against oxidized LDL and antioxidant status in top soccer and basketball players after 4 months of competition. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, (4), 559-65.
- Powers, S.K., Ji, L.L., Leeuwenburgh, C., (1999). Exercise training induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 31, 987-997.

- Quindry, J.M., Stone, W.L., King, J. & Broeder, C.E. (2003). The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Medicine Science Sports & Exercice*, 35, (7), 1139-1145.
- Radak, Z. (2000). *Free radicals in exercise and aging*. In: Human Kinetics, eds. Versa Press, 2000: (pp. 21-25, 52, 216).
- Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvari, M. Nyakas, C. & Goto, S. (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, (1-2), 69-74.
- Radak, Z., Pucsok, J., Mecseki, S., Csont, T & Ferdinandy, P. (1999). Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, (7-8), 1059-1063.
- Radak, Z., Pucsuk, J., Boros, S., Joofai, L., Taylor, A.W., (2000). Changes in urine 8-hydroxydeoxyguanosine levels of super-marathon runners during a four-day race period. *Life Science*, 66, (18), 1763-7.
- Radak, Z., Taylor, A.W., Ohno, H., and Goto, S. (2001). Adaptation to exercise-induced oxidative stress: From muscle to brain. *Exercise Immunology Revolution*, 7: 90-107.
- Ramel, A., Wagner, H.K., Elmadfa, I., (2004). Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. *European Journal of Nutrition*, 43: 2–6.).
- Reid, M.B., (2001). Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *Journal of Applied Physiology*, 90: 724-31.
- Reilly, T., Ekblom, B., (1997). The use of recovery methods post-exercise. *Journal of Sports Science*, 23, 6, 619-627.
- Rimbach, G., Hohler, D., Fischer, A., et al., (1999). Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archiv fur Tierernahrung*, 52, (3), 203-22.
- Robertson, J.D., Maughan, R.J., Duthie, G.G., Morrice, P.C., (1991). Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clinical Science*, 80: 611–8.
- Rokitzki, L., Logemann, E., Sagredos, A.N., Murphy, M., Wetzel-Roth, W., Keul, J., (1994)a. Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress. *Acta physiologica Scandinavica*, 151: 149-158.
- Rosen, G.M., Finkelstein, E., Rauckman, E.J., (1982). A method for the detection of superoxide in biological systems. *Archives of biochemistry and biophysics*, 215: 367.

- Sahlin, K., Cizinsky, S., Warholm, M., Hoberg, J., (1992). Repetitive static muscle contractions in humans: a trigger of metabolic and oxidative stress? *European Journal of Applied Physiology*, 64: 228–36.
- Santos-Silva, A., Rebelo, M.I., Castro, E.M., Belo, L., Guerra, A., Rego, C., Quintanilha, A., (2001). Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. *Clinical Chimica Acta*, 306: 119-126.
- Schippinger, G., Wonisch, W., Abuja, P.M., Fankhauser, F., Winklhofer-Roob, B.M., Halwachs, G., (2002). Lipid peroxidation and antioxidant status in professional American football players during competition. *European Journal of Clinical Investigation*, 32(9):686-92.
- Schroder, H., Navarro, E., Mora, J., Galiano, D., Tramullas, A., (2001). Effects of α -tocopherol, β -carotene and ascorbic acid on oxidative, hormonal and enzymatic exercise stress markers in habitual training activity of professional basketball players. *European Journal of Nutrition*, 40: 178-184.
- Sen, C.K., (1995). Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal of Applied Physiology*. 79(3): 675-686.
- Sen, C.K., (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 33 (3): 368-70.2001
- Sen, C.K., Packer, L., (1996). Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB Journal*, 10: 709-20. Packer, 1996
- Sies, H., (1985). Oxidative stress. Introduction remarks. In E. Sies, (Eds.), *Oxidative stress* (pp. 1-8). Academic Press, London.
- Sies, H., (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift*, 69, (21-23), 965-8.
- Sinclair, A.J., Barnett, A.H., Lunec, J., (1990). Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *British Journal of Hospital Medicine*. 43, (5), 334-44.
- Singh, V.N., (1992). A current perspective on nutrition and exercise. *Journal of Nutrition*, 122 (suppl. 3), 760-765.
- Sjodin, B., Hellsten Westing, Y., et al., (1990). Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Medicine*, 10: 236-54.
- Slater, T.F., (1984). Free-radicals mechanisms in tissue injury. *Journal of Biochemistry*, 222: 1-15.
- Stadtman, E.R. & Levine, R.L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 191-208.

- Standman, E.R., (2001). Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928:22-38.
- Storz, G., Tartaglia, L.A., Ames, B.N., (1990). Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science*, 248, (4952), 189-94.
- Svensson, M., Ekblom, B., Cotgreave, I., et al., (2002). Adaptative stress response of glutathione and acid uric metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta physiologica Scandinavica*, 176: 43-56.
- Tessier, F., Hida, H., Favier, A., Marconnet, P., (1995). Muscle GSH-Px activity after prolonged exercise training and selenium supplementation. *Biological Trace Element Research*, 47: 279–85.
- Thompson, D., Williams, C., Kingsley, M., Nicholas, C.W., Lakomy, H.K.A., McArdle, F., and Jackson, M.J. (2001). Muscle soreness and damage parameters after prolonged intermittent shuttle-running following acute vitamin C supplementation. *International Journal of Sports Medicine*. 22: 69-75.
- Thompson, D., Williams, C., Garcia-Roves, P., McGregor, S.J., McArdle, F., Jackson, M.J., (2003). Post-exercise vitamin C supplementation and recovery from demanding exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 89, (3-4), 393-400.
- Tiitus, P.M., (1998). Radical species in inflammation and overtraining. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 76: 533-8.
- Tsai, K., Hsu, T., Hsu, K., Cheng, H., Liu, T., Hsu, C., Kong, C., (2001). Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(11): 1465–1472.
- Uchida, K. & Stadtman, E.R. (1993). Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 6388–6393.
- Uchiyama, S., Tsukamoto, H., Yoshimura, S., Tamaki, T., (2006). Relationship between oxidative stress in muscle tissue and weight-lifting-induced muscle damage. *Pflugers Archives - European Journal of Physiology*, 452: 109–116.
- Vasankari, T.J., Kujala, U.M., Vasankari, T.M., et al., (1997). Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defenses. *Free Radical Biology and Medicine*, 22, (3), 509-13 33.
- Vider, J., Lehtmaa, J., Kullisaar, T., Vihalemm, T., Zilmer, K., Kairane, C., Landor, A., Karu, T. & Zilmer, M. (2001). Acute immune response in respect to exercise – induced oxidative stress. *Pathophysiology*, 7, 263-270.
- Vincent, H.K., Powers, K.S., Stewart, J.D., Shanley, A.R., Demirel, H., Naito. H., (1999). Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress. *International Journal of Obesity*, 23: 67–74.

- Vollaard, B.J.N., Shearman, P.J., Cooper, E.C., (2005). Exercise-induced oxidative stress: Myths, realities, and physiological relevance. *Sports Medicine*, 35, (12), 1045-1062.
- Weters, H., Sies, H., (1988). The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation in dependent on vitamin E. *European Journal of Biochemistry*, 174: 353.
- Yu, B., (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physical Review*, 74: 139 –162.