

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ
ΜΕΛΕΤΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ
ΥΔΑΤΟΣΦΑΙΡΙΣΤΡΙΩΝ ΥΨΗΛΟΥ ΕΠΙΠΕΔΟΥ

Μπάκου Μαρία

Λάρισα 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ
<p style="text-align: center;"><u>ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:</u></p> <p>ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, <i>ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ</i></p> <p>ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΛΑΡΙΣΑΣ</p> <p>ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ</p>	
<p style="text-align: center;"><u>ΜΕΛΟΣ:</u></p> <p>ΚΥΠΑΡΟΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ, <i>ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ</i></p> <p>ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ ΣΕΡΡΩΝ</p> <p>ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ</p>	
<p style="text-align: center;"><u>ΜΕΛΟΣ:</u></p> <p>ΣΤΑΓΚΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ, <i>ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΖΩΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ</i></p> <p>ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΛΑΡΙΣΑΣ</p> <p>ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ</p>	

❖ ***ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ***

Ευχαριστώ τον καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας αυτής.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κυπάρο Αντώνη για την υπομονή του, τις πολύτιμες συμβουλές και την μεγάλη βοήθεια που μου παρείχε κατά τη διάρκεια του εργαστηριακού πειράματος αλλά και κατά τη συγγραφή της διπλωματικής εργασίας αυτής.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους κ. Στάγκο Δημήτριο, κ. Βεσκούκη Αριστεΐδη και κα. Σπανού Χρυσούλα, για την ευχάριστη συνεργασία κατά τη διάρκεια του εργαστηριακού πειράματος και τις χρήσιμες συμβουλές τους.

Τέλος, ευχαριστώ όλη την εργαστηριακή ομάδα και τους συμφοιτητές μου για την ευχάριστη συνεργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου	7
1.1.1 Μοριακό οξυγόνο	7
1.1.2 Ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)	8
1.1.3 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)	9
1.1.4 Υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$)	10
1.1.5 Ρίζα του υδροξυλίου ($OH\cdot$)	11
1.1.6 Μονήρες οξυγόνο (1O_2)	12
1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών	12
Ενδογενείς πηγές	13
1.2.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση	13
1.2.2 Οξείδωση αιμοσφαιρίνης και μυοσφαιρίνης	16
1.2.3 Οξείδωση και ισχαιμία	16
1.2.4 Οξείδωση και φλεγμονή	17
Εξωγενείς πηγές	18
1.3 Βιολογικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών	18
1.3.1 Θετικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών	18
1.3.2 Αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών	19
1.4 Αντιοξειδωτικά	22
1.4.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά	23
1.4.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά	24
1.5 Οξειδωτικό στρες	29
1.6 Οξειδωτικό στρες και αερόβια άσκηση	30
1.6.1 Επιδράσεις στην παραγωγή ελευθέρων ριζών	30
1.6.2 Επιδράσεις στη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών	31
1.6.3 Οξειδωτικό στρες και υδατοσφαίριση	31
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	36
2.1 Επεξεργασία του αίματος μετά από αιμοληψία	36
2.2 Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)	37
2.3 Προσδιορισμός οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG)	37
2.4 Προσδιορισμός καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα	38

2.5 Προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ στο πλάσμα (TBARS)	39
2.6 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα	39
2.7 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)	40
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
3.1 Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)	42
3.2 Προσδιορισμός οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG).....	43
3.3 Προσδιορισμός του λόγου GSH/GSSG	44
3.4 Προσδιορισμός των TBARS	45
3.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	46
3.6 Προσδιορισμός καταλάσης (CAT)	47
3.7 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)	48
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	49
5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	52
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

<u>Εικόνα 1.</u> Η παραγωγή του υποχλωριώδους οξέως με τη βοήθεια του ενζύμου της μυελοϋπεροξειδάσης.....	10
<u>Εικόνα 2.</u> Απεικόνιση της μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων.....	14
<u>Εικόνα 3.</u> Πιθανή εντόπιση των δραστικών μορφών οξυγόνου στα συνεργιστικά σύμπλοκα των μιτοχονδρίων.....	15
<u>Εικόνα 4.</u> Ελεύθερη ρίζα και οι αρνητικές της επιδράσεις.....	20
<u>Γράφημα 1Α.</u> Η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) των ερυθροκυττάρων στο αίμα των υδατοσφαιριστριών.....	42
<u>Γράφημα 1Β.</u> Η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) των ερυθροκυττάρων στο αίμα των υδατοσφαιριστριών.....	43
<u>Γράφημα 1Γ.</u> Ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH/GSSG).....	44
<u>Γράφημα 2Α.</u> Η συγκέντρωση των TBARS στο πλάσμα αίματος των υδατοσφαιριστριών.....	45
<u>Γράφημα 2Β.</u> Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα αίματος των υδατοσφαιριστριών.....	46
<u>Γράφημα 3Α.</u> Η συγκέντρωση της καταλάσης των ερυθροκυττάρων στο αίμα των υδατοσφαιριστριών.....	47
<u>Γράφημα 3Β.</u> Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων στο αίμα των υδατοσφαιριστριών.....	48

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η έντονη άσκηση συνδέεται με την παραγωγή ελευθέρων ριζών η υπερπαραγωγή των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες. Η υδατοσφαίριση είναι ιδιαίτερα απαιτητικό άθλημα, κατά βάση αερόβιο και χαρακτηρίζεται από διαλειμματική προσπάθεια εναλλασσόμενης έντασης. Ο σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να διερευνήσει εάν το συνολικό προπονητικό φορτίο κατά την περίοδο της βασικής προετοιμασίας επιφέρει αλλαγή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και συγκεκριμένων δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα σε αθλήτριες υδατοσφαίρισης υψηλού επιπέδου. Στην έρευνα συμμετείχαν εθελοντικά οκτώ αθλήτριες υδατοσφαίρισης της Ελληνικής Εθνικής Ομάδας οι οποίες έδωσαν δείγμα αίματος στην αρχή της βασικής περιόδου προετοιμασίας και τρεις μήνες μετά, δηλαδή πριν την έναρξη του πρωταθλήματος. Οι δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης και οξειδωτικού στρες που προσδιορίστηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), η αναλογία GSH/GSSG και η καταλάση (CAT) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, καθώς και οι αντιδρώσες ουσίες με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC), και ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) στο πλάσμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπάρχει μεταβολή σε ορισμένους δείκτες οξειδωτικού στρες κατά την περίοδο από την έναρξη της προετοιμασίας ως την έναρξη του πρωταθλήματος. Συγκεκριμένα παρουσιάστηκε πτώση στη συγκέντρωση της GSH και GSSG, χωρίς ωστόσο ο λόγος της GSH/GSSG να αυξηθεί σημαντικά. Μη στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε και στις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των TBARS. Σημαντική αύξηση βρέθηκε στη συγκέντρωση της καταλάσης, ενώ σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος κατά την έναρξη του πρωταθλήματος. Παρόλο που τα παραπάνω ευρήματα δεν υποστηρίζουν πιθανή οξείδωση λιπιδίων ή/και πρωτεϊνών, ωστόσο φαίνεται ότι υπάρχει αλλαγή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του αίματος πριν από την αρχή του πρωταθλήματος. Πιθανόν ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός των αθλητών υψηλού επιπέδου μπορεί να προσαρμοστεί πιο εύκολα σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες λόγω της συχνής έκθεσής του σε αυτό.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές οξυγόνου

Οι ελεύθερες ρίζες (free radicals, FR) είναι μόρια με ένα ή περισσότερα αδέσμευτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ ασταθείς και δραστικές καθώς τείνουν να καλύψουν την εξωτερική τους στιβάδα αποσπώντας ηλεκτρόνια από άλλα μόρια. Ο χρόνος ημιζωής τους είναι πολύ μικρός της τάξης των millisecond έως nanosecond. Η παραγωγή τους πραγματοποιείται κατά τη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων η οποία απαιτεί υψηλή ενέργεια (Finaud et al, 2006).

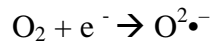
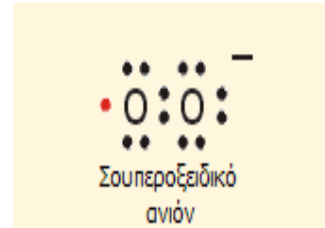
Οι πιο ευρέως διαδεδομένες ελεύθερες ρίζες στα βιολογικά συστήματα είναι οι ρίζες που προέρχονται από μόρια που περιέχουν οξυγόνο και έχουν μία υψηλότερη δραστικότητα από την αρχική κατάσταση του μοριακού οξυγόνου (O_2). Τα μόρια αυτά είναι ευρύτερα γνωστά ως δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS).

1.1.1 Μοριακό οξυγόνο

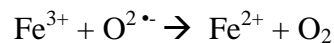
Το μοριακό οξυγόνο αποτελείται από οκτώ ηλεκτρόνια και οκτώ πρωτόνια. Τα ηλεκτρόνιά του είναι κατανομημένα έτσι ώστε μετά από οποιαδήποτε διέγερση να καθίσταται δυνατό για αντιδράσεις με άλλα ζεύγη ηλεκτρονίων. Οι αερόβιοι οργανισμοί απαιτούν μοριακό οξυγόνο για την επιβίωσή τους διότι είναι δέκτης ηλεκτρονίων κατά τη διάρκεια αντιδράσεων οξειδωσης διαφόρων υποστρωμάτων. Παρόλο αυτά, αποτελεί μόνιμο κίνδυνο για τους οργανισμούς καθώς είναι υπεύθυνο για την παραγωγή ελεύθερων ριζών. Εξωγενείς πηγές ROS είναι για παράδειγμα η έκθεση σε ακτινοβολία, το κάπνισμα και το αλκοόλ, ενώ μια σημαντική ενδογενής πηγή ROS είναι ο μεταβολισμός. Το μοριακό οξυγόνο είναι σταθερό όταν έχει ένα ζεύγος ηλεκτρονίων στην εξωτερική του στιβάδα. Αν το O_2 δεχτεί ένα μοναδικό ηλεκτρόνιο μετατρέπεται σε ανιόν του υπεροξειδίου (Halliwell and Guteridge, 1991).

1.1.2 Ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$)

Το ανιόν του υπεροξειδίου δημιουργείται από την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο, το οποίο καθίσταται ιδιαίτερα ενεργό μετά την αντίδραση αυτή.



Με την αναγωγή του ανιόντος του υπεροξειδίου παράγεται μοριακό οξυγόνο καθώς και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η παρουσία ιόντων σιδήρου οδηγεί και στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου:



Οι συνεχόμενες αυτές αντιδράσεις καταλήγουν στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου και είναι γνωστές και ως αντίδραση του Fenton.

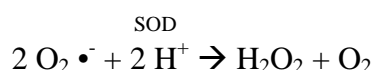
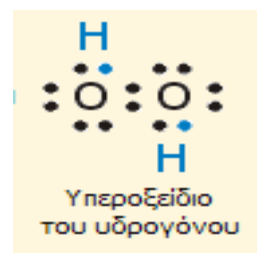
Το ανιόν του υπεροξειδίου παράγεται ενζυμικά και μη ενζυμικά. Η κύρια κυτταρική πηγή του είναι τα μιτοχόνδρια. Στις ενζυμικές πηγές συμπεριλαμβάνονται διαμινοοξειδάσες και εξαρτώμενες από το κυτόχρωμα P₄₅₀ οξυγενάσες. Μία ακόμα πηγή ανιόντος υπεροξειδίου αποτελεί η μετατροπή της αναγωγής της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης. Η μη ενζυμική παραγωγή του ανιόντος του υπεροξειδίου γίνεται όταν μονήρες ηλεκτρόνιο μεταφέρεται άμεσα στο οξυγόνο είτε από αναχθέντα συνένζυμα είτε από προσθετικές ομάδες (π.χ. ομάδες σιδήρου, θείου) ή από ξενοβιοτικά, τα οποία προηγουμένως έχουν αναχθεί από ορισμένα ένζυμα. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων διαθέτει πολλά οξειδοαναγωγικά κέντρα, από τα οποία μπορούν να διαφύγουν ηλεκτρόνια προς το οξυγόνο συνιστώντας έτσι την κύρια πηγή O_2 για τους περισσότερους ιστούς.

Το ανιόν του υπεροξειδίου το οποίο είτε παράγεται από τις μεταβολικές διεργασίες είτε από την ενεργοποίηση του οξυγόνου διά της φυσικής ακτινοβολίας,

θεωρείται η κύρια ελεύθερη ρίζα οξυγόνου και μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσει με άλλα μόρια και να οδηγήσει στη γένεση δευτερογενών δραστικών ριζών οξυγόνου είτε άμεσα, είτε κυρίως μέσω διεργασιών που καταλύονται από μέταλλα και ένζυμα (Halliwell and Guteridge, 1991).

1.1.3 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου παράγεται κυρίως στα υπεροξεισώματα, κύρια οργανίδια, τα οποία καταναλώνουν οξυγόνο στο κύτταρο και συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες που χρησιμοποιούν οξυγόνο. Η παραγωγή του καταλύεται από οξειδάσες, όπως οξειδάσες των αμινοξέων και της γλυκόζης. Υπεροξειδίο του υδρογόνου μπορεί να παραχθεί επίσης και από την αυτό-οξειδοαναγωγή του ανιόντος του υπεροξειδίου:

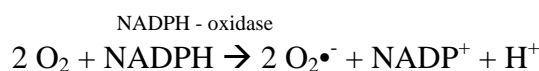


Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, SOD) σε οξικό περιβάλλον. Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν θεωρείται ρίζα καθώς δεν έχει αδέσμευτα ηλεκτρόνια, ωστόσο αποτελεί δραστική μορφή οξυγόνου (ROS) εξαιτίας της τοξικότητάς του και της ιδιότητας του να προάγει την παραγωγή ριζών και άλλων δραστικών ενώσεων οξυγόνου.

Λόγω της οξειδωτικής του δράσης, το H_2O_2 όπως και άλλες δραστικές οξυγονούχες ενώσεις (reactive oxygen species, ROS) αρχικά θεωρούνταν ως βλαβερά παραπροϊόντα και ότι όσο πιο γρήγορα αποβάλλονταν από τον οργανισμό τόσο το καλύτερο για τη φυσιολογική του λειτουργία. Ωστόσο, σχετικά πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι το H_2O_2 είναι απαραίτητο στην κυτταρική λειτουργία. Ως ουδέτερο μικρό μόριο διαχέεται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, αλλά επίσης παράγεται και απομακρύνεται εύκολα με μια σειρά φυσιολογικών διεργασιών. Οι ιδιότητες αυτές καθιστούν το H_2O_2 ιδανικό για τη ρύθμιση της μεταγωγής βιολογικών σημάτων μέσω αλυσίδας αντιδράσεων φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης, που καταλύονται από πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες.

Η παραγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου έχει μελετηθεί συστηματικά στα ουδετερόφιλα κύτταρα, που παίζουν σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου. Τα ουδετερόφιλα λευκοκύτταρα ενεργοποιούνται όταν

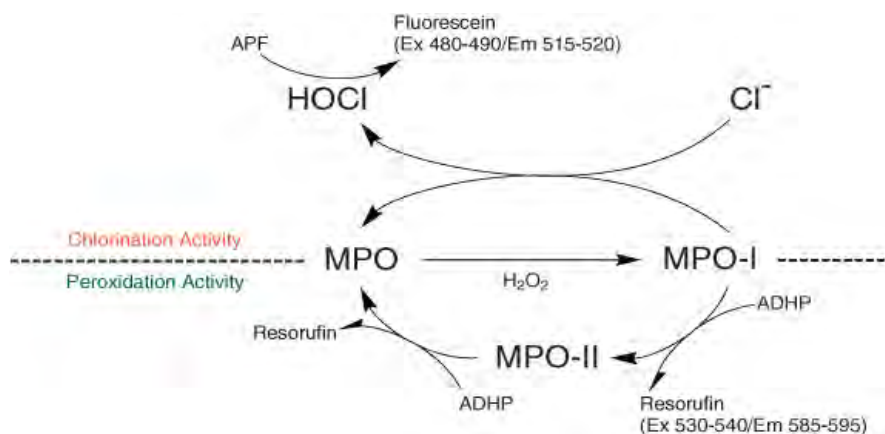
εμφανισθεί σε ιστούς μολυσματικός παράγοντας και τον εγκλωβίζουν για να εξουδετερώσουν την παθογόνο δράση του. Η δράση αυτή του H₂O₂ εξαρτάται άμεσα από το σύμπλοκο της οξειδάσης της NADPH - ανηγμένη μορφή του φωσφορικού νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου. Το σύμπλοκο αυτό παράγει μικρές ποσότητες H₂O₂ στο ασφαλές περιβάλλον των φαγοσωμάτων για να εξουδετερωθούν με οξείδωση οι παθογόνοι οργανισμοί. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να μετατραπεί σε υποχλωριώδες οξύ που είναι πολύ δραστικό για τη διάσπαση των αντιγόνων.



Το υπεροξείδιο του υδρογόνου διασπάται από το ένζυμο καταλάση, το οποίο αποτρέπει τη συσσώρευση του στους ζωικούς ιστούς, εφόσον το H₂O₂ αποτελεί προϊόν πλήθους βιοχημικών αντιδράσεων (Halliwell and Gutteridge, 1991).

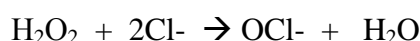
1.1.4 Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

Το υποχλωριώδες οξύ είναι η μοναδική οξειδωτική ένωση που παράγεται από το ένζυμο της μυελοϋπεροξειδάσης, το οποίο και συμβάλλει στη δυσλειτουργία και το θάνατο των κυττάρων του ενδοθηλίου κατά την αθηροσκλήρυνση.



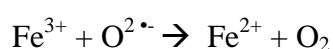
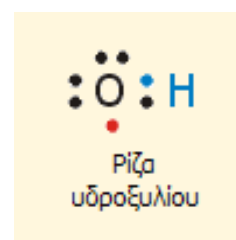
Εικόνα 1. Η παραγωγή του υποχλωριώδους οξέως με τη βοήθεια του ενζύμου της μυελοϋπεροξειδάσης.

Το υποχλωριώδες οξύ μπορεί επίσης να παραχθεί από το υπεροξείδιο του υδρογόνου με την προσθήκη χλωρίου.

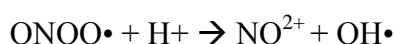
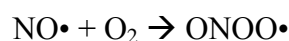


1.1.5 Ρίζα του υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$)

Η ρίζα υδροξυλίου είναι το τελικό προϊόν της αντίδρασης Fenton. Την παραγωγή της επιταχύνει η παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης που στα βιολογικά συστήματα είναι ο σίδηρος.



Μπορεί επίσης να παραχθεί από την διάσπαση της υπεροξυνιτρώδους ρίζας, η οποία προκύπτει από την αντίδραση της ρίζας του οξειδίου του αζώτου με το οξυγόνο. Η ρίζα του οξειδίου του αζώτου συντίθεται με τη βοήθεια του ενζύμου συνθετάση του οξειδίου του αζώτου στο ενδοθήλιο των αγγείων, στο Κεντρικό Νευρικό σύστημα και στα φαγοκύτταρα (λευκοκύτταρα). Ως ασταθής που είναι, η υπεροξυνιτρώδης ρίζα διασπάται σε όξινο περιβάλλον, δίνοντας ρίζα υδροξυλίου.



Η ρίζα υδροξυλίου είναι πολύ τοξική και δεν υπάρχει ειδικό αντιοξειδωτικό για αυτή. Είναι η κύρια υπεύθυνη ρίζα για την οξείδωση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών.

1.1.6 Μονήρες οξυγόνο (1O_2)

Το μονήρες οξυγόνο παράγεται από το μοριακό οξυγόνο με αλλαγή στην στροφορμή των ηλεκτρονίων του. Στο μοριακό οξυγόνο τα έξι από τα οκτώ του ηλεκτρόνια διατάσσονται σε τέσσερις τροχιές. Τα δύο από αυτά σε τροχιά που χαρακτηρίζεται 2s, ενώ τα υπόλοιπα τέσσερα σε τρεις τροχιές που χαρακτηρίζονται ως 2p. Τα δύο από τα τέσσερα αυτά ηλεκτρόνια παρουσιάζουν αντίθετη στροφορμή και καταλαμβάνουν το πρώτο τροχιακό, ενώ τα άλλα δύο παρουσιάζουν την ίδια στροφορμή και καταλαμβάνουν από ένα τροχιακό το καθένα. Επειδή τα δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια παρουσιάζουν την ίδια στροφορμή, το μοριακό οξυγόνο μπορεί να αντιδράσει με ένα μόνο ηλεκτρόνιο κάθε φορά, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η δραστηριότητά του. Εάν όμως ένα από τα ασύζευκτα αυτά ηλεκτρόνια διεγερθεί και αλλάξει η στροφορμή του, προκύπτει το μονήρες οξυγόνο, το οποίο είναι ιδιαίτερα δραστικό, αφού τα δύο ηλεκτρόνια με αντίθετη στροφορμή μπορούν να αντιδράσουν γρήγορα με άλλα ζεύγη ηλεκτρονίων (Halliwell and Guteridge, 1991).

Το μονήρες οξυγόνο σχηματίζεται κατά την άμεση μεταφορά ενέργειας από μόρια φωτοευαίσθητα όπως χρωστικές ενώσεις οι οποίες απορροφούν φωτεινή ακτινοβολία και μεταφέρουν την ενέργεια αυτή στο μοριακό οξυγόνο. Αποτέλεσμα αυτού είναι η διέγερση από τη θεμελιώδη κατάσταση του οξυγόνου σε μονήρες το οποίο και αντιδρά εύκολα με αμινοξέα και αποτελεί τον μεγαλύτερο καταλύτη για την έναρξη της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, η οποία οδηγεί σε καταστροφή της μεμβράνης.

1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από ενδογενείς πηγές, δηλαδή από μεταβολικά μονοπάτια του οργανισμού αλλά και από εξωγενείς πηγές (Halliwell and Guteridge, 1991). Οι κυριότερες από τις φυσιολογικές διαδικασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν:

A) Την παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων.

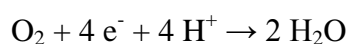
Β) Την φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως οι λιποοξυγενάσες, οι κυκλοοξυγενάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογενάσες κατά την οποία παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων.

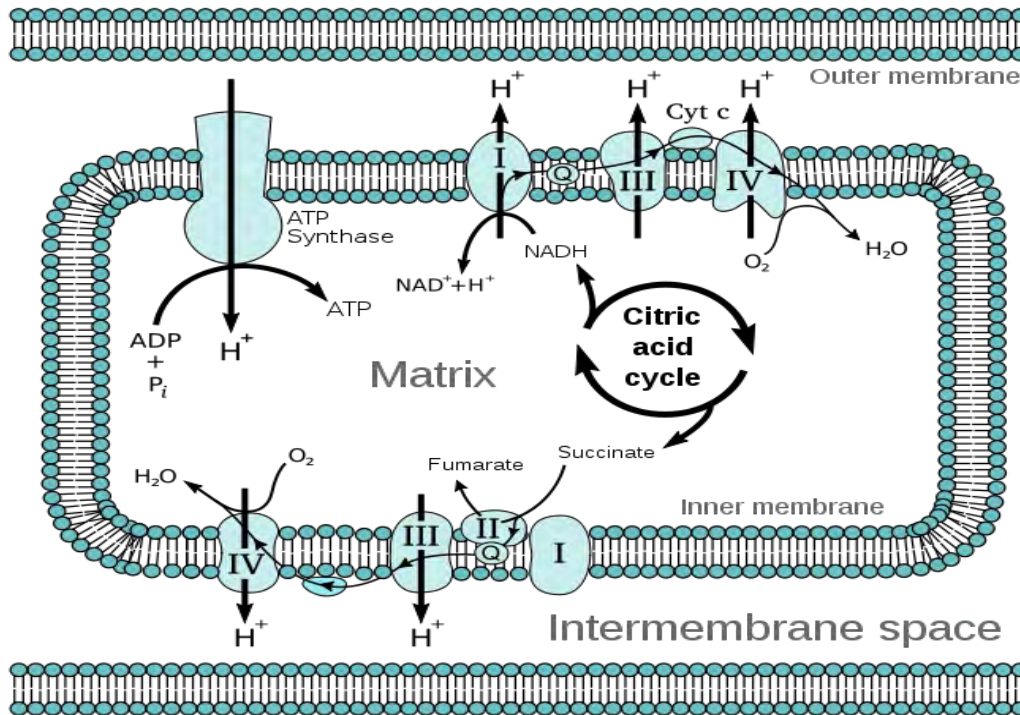
Γ) Την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος.

Ενδογενείς πηγές

1.2.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Είναι γενικά αποδεκτό ότι ο μεταβολισμός του οξυγόνου, ο οποίος λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια, συνδέεται με την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Di Meo S, Venditti P, 2001). Το αποτέλεσμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι ο σχηματισμός ATP. Η οξείδωση των υποστρωμάτων υφίσταται στον κύκλο του Krebs και στην αναπνευστική αλυσίδα με το οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων. Στην αναπνευστική αλυσίδα το 95-99% του οξυγόνου που καταναλώνεται μετατρέπεται σε H₂O σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση που καταλύεται από το συνένζυμο Q (Fehrenbach and Northoff, 2001):

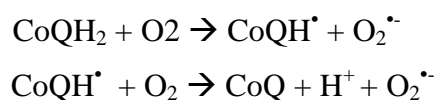


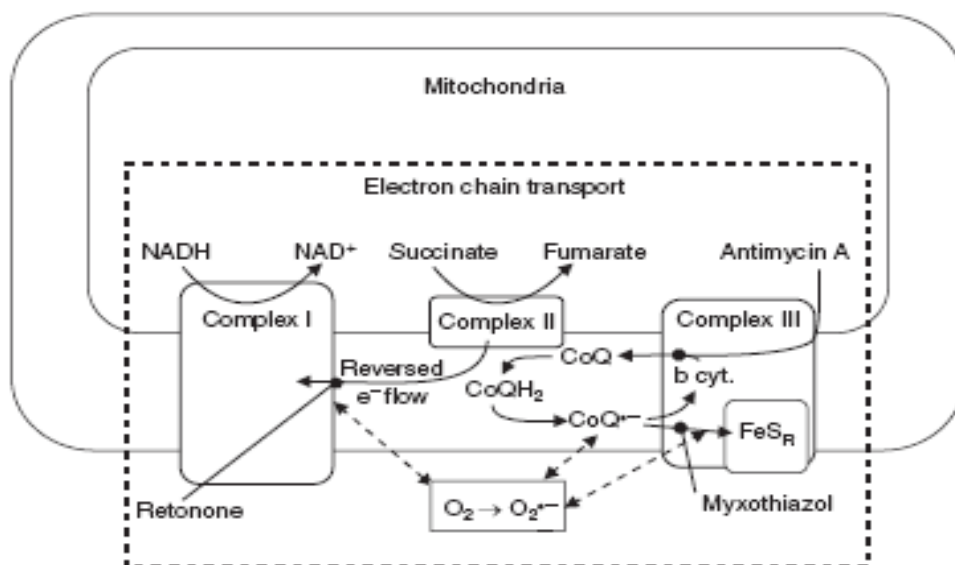


Εικόνα 2. Απεικόνιση της μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Διακρίνεται η παραγωγή ATP καθώς και η παραγωγή H₂O.

Ωστόσο ένα ποσοστό της τάξεως του 1-5% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ανιόν του υπεροξειδίου (O₂^{•-}) (Clarkson, 1995; Lenaz, 1998) . Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών είναι ανάλογη της δράσης της αναπνευστικής αλυσίδας αλλά η τελευταία είναι ανεξάρτητη του όγκου του οξυγόνου.

Δύο είναι τα κύρια στοιχεία που εντοπίζονται στην αναπνευστική αλυσίδα όσον αφορά την παραγωγή των ελευθέρων ριζών: τα σύμπλοκα I και III. Η ποσότητα των ελευθέρων ριζών που παράγονται σε αυτά τα σύμπλοκα κυμαίνεται και εξαρτάται από το ATP, το οξυγόνο, τη θερμοκρασία και άλλες παραμέτρους που ποικίλλουν ανάλογα με την άσκηση (Nohl and Jordan, 1986). Μέσω του συνενζύμου Q10 μπορεί να παραχθεί ανιόν του υπεροξειδίου μετά από οξείδωση της ουβικινόλης σε ανιόν της ημικινόνης:





Εικόνα 3. Πιθανή εντόπιση των δραστικών μορφών οξυγόνου στα συνεργιστικά σύμπλοκα των μιτοχονδρίων.

Υπάρχει μια συνεργιστική δράση μεταξύ του CoQH₂ και του κυτοχρώματος b₅₆₆ στο σύμπλοκο III. Ωστόσο η άποψη αυτή είναι αμφιλεγόμενη καθώς το συνένζυμο Q στην ανηγμένη του μορφή αποτελεί αντιοξειδωτικό μέσο. Επίσης, έχει δείχθει πως οι ROS δεν απελευθερώνονται αυθόρμητα από τα μιτοχόνδρια αλλά εμφανίζονται όταν το δυναμικό της μεμβράνης τους αποκτήσει μια μέγιστη τιμή (Nohl et al, 2003)

Η υπόθεση ότι τα μιτοχόνδρια είναι η κύρια πηγή ελευθέρων ριζών βασίστηκε σε in vitro πειράματα με απομονωμένα μιτοχόνδρια. In vivo μελέτες παρείχαν άμεσες αποδείξεις ότι τα μιτοχόνδρια παράγουν ελεύθερες ρίζες μέσω της άσκησης (Leewenburgh et al, 1999).

Έτσι λοιπόν, οι in vivo και οι in vitro μελέτες τείνουν να επιβεβαιώνουν ότι η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα μπορεί να είναι η κύρια πηγή ROS σε ρυθμούς άσκησης αλλά και χαλάρωσης στον μυ, αλλά και σε άλλους ιστούς, όπως το ήπαρ και τους νεφρούς (Di Meo and Venditti, 2001).

1.2.2 Οξείδωση αιμοσφαιρίνης και μυοσφαιρίνης

Η οξείδωση της αιμοσφαιρίνης μπορεί να προκαλέσει την παραγωγή των ROS. Στον ανθρώπινο οργανισμό το 3% της ολικής αιμοσφαιρίνης μεταβολίζεται μέσω αυτοοξείδωσης. Η αντίδραση αυτή, η οποία αυξάνεται με την άσκηση, παράγει μεθαιμοσφαιρίνη και ανιόν του υπεροξειδίου.

Η μυοσφαιρίνη μπορεί επίσης να οξειδωθεί μέσω αυτοοξείδωσης ή από άλλες ελεύθερες ρίζες κατά την ισχαιμική επανοξυγόνωση με την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η μυοσφαιρίνη αντιδρά κατόπιν με το υπεροξείδιο του υδρογόνου και παράγει άλλες ρίζες, όπως ρίζες σιδήρου και υπεροξειδίου.

1.2.3 Οξείδωση και ισχαιμία

Μία άλλη κύρια πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών αποτελεί το φαινόμενο της ισχαιμίας, το οποίο επέρχεται μετά από χειρουργικές επεμβάσεις καθώς και κατά τη διάρκεια φυσικής άσκησης (Fehrenbach E, Northoff H, 2001; Jackson MJ, O'Farrell S, 1993). Κατά τη διάρκεια εξαντλητικής ή αναερόβιας άσκησης το οξυγόνο μεταφέρεται στους σκελετικούς μύες και ενεργούς ιστούς, ενώ την ίδια στιγμή άλλοι ιστοί βρίσκονται σε κατάσταση υποξαιμίας (Cooper et al, 2002). Με το τέλος της άσκησης οι ιστοί αυτοί δέχονται μια μεγάλη ποσότητα οξυγόνου. Το φαινόμενο αυτό καλείται ισχαιμική επανοξυγόνωση (σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης).

Η αφυδρογονάση της ξανθίνης παίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ουρικού οξέος από το μεταβολισμό της τριφωσφορικής, της διφωσφορικής και της μονοφωσφορικής αδενοσίνης (ATP, ADP, AMP). Στους υποξαιμικούς ιστούς η αφυδρογονάση μπορεί να μετατραπεί σε οξειδάση της ξανθίνης (Frederiks and Bosch, 1995). Κατά την επανοξυγόνωση, η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει την παραγωγή ανιόντος του υπεροξειδίου από την αντίδραση μεταξύ οξυγόνου, υποξανθίνης και ξανθίνης (Goldfarb, 1999; Heunk, et al, 1999). Ωστόσο, ο ρόλος της οξειδάσης της ξανθίνης στους μύες είναι αμφιλεγόμενος, καθώς η ποσότητά της σε αυτούς είναι πολύ μικρή.

Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι το φαινόμενο της ισχαιμικής επανοξυγόνωσης αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια (Di Meo

and Venditti, 2001). Άλλες μελέτες επισήμαναν ότι η διάβρωση των φαγοκυττάρων και η αυτοοξειδωση της μυοσφαιρίνης, της μεθαιμοσφαιρίνης και των κατεχολαμινών συμβάλλουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω του φαινομένου της ισχαιμίας (Gunther et al, 1999).

1.2.4 Οξείδωση και φλεγμονή

Η φλεγμονή, μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος, αποτελεί έναν προστατευτικό μηχανισμό του ανθρώπινου οργανισμού. Κατά τη διάρκεια φλεγμονών, μία ποικιλία φαγοκυττάρων, όπως ουδετερόφιλα και μακροφάγα παράγουν ελεύθερες ρίζες, ικανές να καταστρέψουν βακτηρίδια και ιούς. Παράλληλα όμως, παραγωγή ελευθέρων ριζών υφίσταται και κατά την παραγωγή ενέργειας στα κύτταρα του οργανισμού αλλά και κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αποβολής τοξινών και αποβλήτων προϊόντων με συνέπεια την αύξηση της ριζικής δραστηριότητας. Όταν επέρχεται υπερβολική δραστηριότητα ελευθέρων ριζών οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, κατάσταση κατά την οποία οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν και σε υγιή κύτταρα. Αυτό μπορεί να προκαλέσει και περαιτέρω φλεγμονή καθώς και μια ποικιλία νόσων, όπως καρδιαγγειακή νόσο, καρκίνο, καταρράκτες, νόσο του Πάρκινσον, νόσο του Αλτσχάιμερ, φλεγμονώδη εντερική νόσο, αρθρίτιδα, διαβήτη, πνευμονοπάθειες, αυτοάνοσες νόσους, νόσους του ήπατος, νόσους των νεφρών, δερματικές παθήσεις και άλλα.

Αν και δεν είναι βέβαιος ο τρόπος με τον οποίο η άσκηση μειώνει τη φλεγμονή, θεωρείται πιθανό ότι αυτό συμβαίνει επειδή ένα ενεργό σώμα παράγει περισσότερες αντιοξειδωτικές ουσίες, με τη βοήθεια των οποίων μεταβολίζονται οι ελεύθερες ρίζες που προκαλούν φλεγμονή.

Η έντονη ή υπερβολική άσκηση οδηγεί σε παραγωγή ελευθέρων ριζών προκαλώντας οξειδωτικό στρες το οποίο αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο της ασκησιογενούς φλεγμονής (Jaesch, H., 1995). Η ασκησιογενής φλεγμονή χαρακτηρίζεται από διείσδυση μακροφάγων και ουδετερόφιλων κυττάρων στον τραυματισμένο μυϊκό ιστό τα οποία παράγουν ελεύθερες ρίζες (κυρίως υπεροξειδίου του υδρογόνου και ρίζα του υδροξυλίου) διευρύνοντας έτσι την παραγωγή οξειδωτικού στρες (Jaesch, 1995; Tiidus, 1998; Evans and Cannon, 1991)

Οι πληροφορίες σε ότι αφορά τον συσχετισμό των ελευθέρων ριζών με το σύνδρομο υπερπροπόνησης είναι ελάχιστες. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί μόνο μία έρευνα, κατά την οποία μετρήθηκε το οξειδωτικό στρες σε επιμύες, έπειτα από αερόβια άσκηση που οδήγησε σε υπερπροπόνηση και δεν μπόρεσε να τεκμηριωθεί μία σχέση οξειδωτικού στρες και υπερπροπόνησης πιθανά διότι το προπονητικό πρωτόκολλο δεν ήταν ιδιαίτερα έντονο για τα πειραματόζωα (Ogonovszky et al, 2005)

Εξωγενείς πηγές

Οι φυσικές διεργασίες του μεταβολισμού δεν είναι ο μόνος τρόπος παραγωγής των ελευθέρων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες και κατ' επέκταση το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί και από εξωγενείς πηγές. Οι βασικότερες από αυτές είναι: α) Περιβαλλοντική ρύπανση, β) Ιονίζουσα και υπεριώδης ακτινοβολία, όπως κατά την υπερβολική έκθεση στον ήλιο και από μακρά έκθεση σε ακτίνες X, γ) Υπερβολική άσκηση, δ) Τοξικά χημικά και λοιμώδη προϊόντα ε) Προϊόντα βασισμένα στο πετρέλαιο καθώς και τοξικά προϊόντα που βρίσκονται στα λούστρα των επίπλων και στις μπογιές, όπως βαλσαμικά υγρά, βενζίνη και φορμαλδεΰδη, στ) Ανθυγιεινές τροφές, όπως τυποποιημένες και τηγανιτές τροφές και ζ) Κάπνισμα, το οποίο αυξάνει ραγδαία το φορτίο των ελευθέρων ριζών.

1.3 Βιολογικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

1.3.1 Θετικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται στο ανοσοποιητικό σύστημα και συγκεκριμένα δρουν κατά των αντιγόνων μέσω της φαγοκύττωσης (Jenkins RR, 1988). Η δράση αυτή, όπως αναπτύχθηκε και στο παραπάνω υποκεφάλαιο, αυξάνεται κατά τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις, οι οποίες προκαλούνται από τη φυσική άσκηση, ιδιαίτερα όταν η άσκηση είναι τραυματική και επίπονη (Malm, 2001).

Οι περισσότερες μελέτες εστιάζουν στις επιζήμιες δράσεις των ελευθέρων ριζών. Παρόλο αυτά, παίζουν σημαντικό ρόλο στα κυτταρικά μηνύματα ή στη βιοσύνθεση των κυττάρων, καθώς μπορούν να χρησιμεύσουν ως κυτταρικοί διαμεσολαβητές ή αγγελιοφόροι κυτταρικών μηνυμάτων. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν

επίσης να τροποποιούν και να ελέγχουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου (Sen, 2001; Sen and Packer, 1996; Reid, 2001).

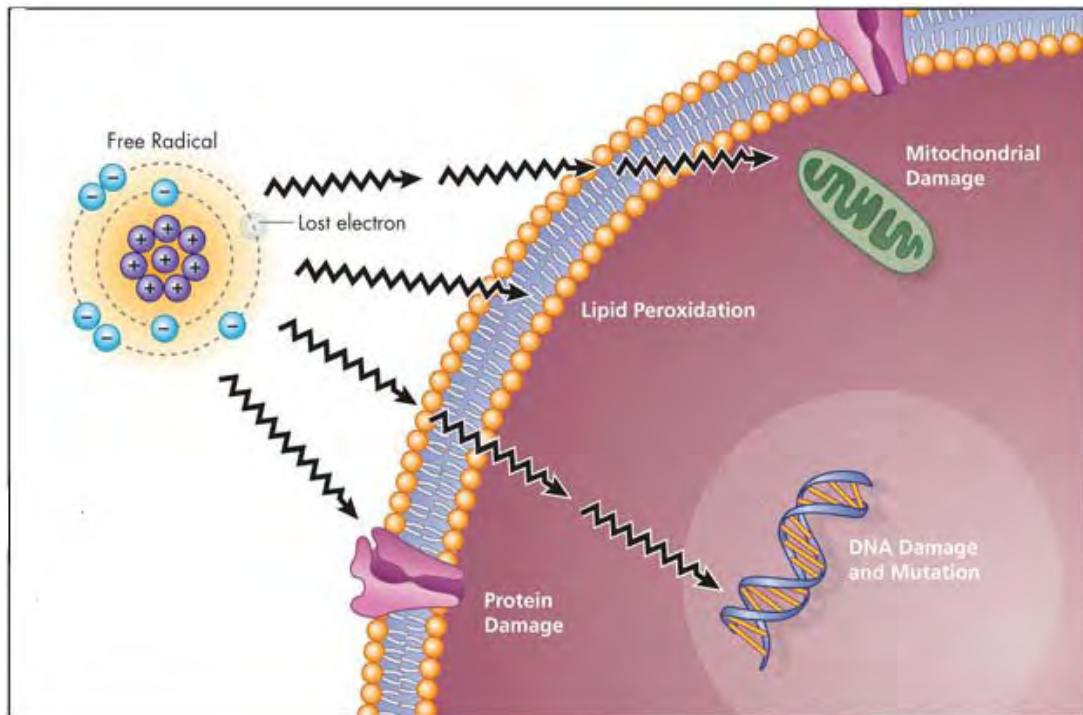
Κάποιες ακόμα από τις σημαντικές θετικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών είναι η συμμετοχή τους στην ενεργοποίηση των ενζύμων, στην αποτοξίνωση από εθιστικές ουσίες αλλά και στη διευκόλυνση του κορεσμού από γλυκογόνο (Jenkins, 1988).

Απαραίτητη είναι και η εμπλοκή τους στη μυϊκή συστολή (Linnane et al., 2002). Ο ρόλος τους στη μυϊκή συστολή τονίζεται διότι η αναστολή της παραγωγής των ελευθέρων ριζών οδηγεί στη μείωση της ισχύος των συσταλτικών μυϊκών ινών. Αντίστροφα, η αύξηση των ελευθέρων ριζών έχει ως συνέπεια και την αυξημένη δύναμη συστολής των μυών (Andrade et al., 1998). Ωστόσο, μια σημαντική ποσότητα ελευθέρων ριζών στους μυϊκούς ιστούς εμπλέκεται στο μυϊκό κάματο, το οποίο αποτελεί και μία από τις αρνητικές επιδράσεις τους στις βιολογικές αντιδράσεις.

1.3.2 Αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Παρά τις κάποιες θετικές επιδράσεις τους, οι ελεύθερες ρίζες έχουν και επιζήμιες επιδράσεις εξαιτίας της ιδιότητας που έχουν να μεταβάλλουν το μέγεθος και το σχήμα των συστατικών με τα οποία αντιδρούν (Alessio, 1993; Pietta, 2000). Συνεπώς, μπορούν να επιφέρουν την απόπτωση σε υγιή κύτταρα, φλεγμονή αλλά και άλλες τροποποιημένες λειτουργίες.

Όλη αυτή η φθορά συμβάλλει στην εμφάνιση εκφυλιστικών ασθενειών, όπως καταρράκτη, καρκίνο, Alzheimer και Parkinson, αλλά και στην κυτταρική γήρανση (Golden et al, 2002).



Εικόνα 4. Ελεύθερη ρίζα και οι αρνητικές της επιδράσεις. Προκαλεί καταστροφή πρωτεϊνών, λιπιδίων αλλά και DNA.

1.3.2.1 Οξείδωση λιπιδίων

Η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην γένεση της αθηροσκλήρωσης (Vasankari et al, 1997; Young and McEneny, 2001). Συγκεκριμένα, οι ελεύθερες ρίζες ξεκινούν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και ιδιαίτερα των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Morel et al., 1983). Η οξείδωση αυτή εξαρτάται από την αντιοξειδωτική ικανότητα του αίματος και μπορεί να αυξηθεί από το οξειδωτικό στρες σε συνδυασμό με τη φυσική άσκηση (Ma et al., 1994; Pincemail et al., 2000).

Ωστόσο, οι επιδράσεις αυτές είναι μερικώς ή πλήρως εξισοροπημένες στους αθλητές επειδή η άσκηση μειώνει την εμφάνιση καρδιαγγειακού προβλήματος (Pincemail et al, 2000). Οι ελεύθερες ρίζες έχουν επίσης την ικανότητα να οξειδώνουν τα πολυακόρεστα ελεύθερα λιπαρά οξέα που συμμετέχουν στην σύνθεση της δομής της κυτταρικής μεμβράνης (Alessio et al., 1993). Αυτή η αντίδραση προάγει τη λιπιδική υπεροξείδωση, μια αλυσιδωτή αντίδραση που παράγει άλλες

ελεύθερες ρίζες, όπως ρίζες υπεροξειδίου και υδροϋπεροξειδίου, και ουσίες όπως συζυγή διένια και μηλονική διαλδεϋδη (Young IS, McEneny J, 2001).

Η λιπιδική υπεροξείδωση μεταβάλλει την ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών, την ικανότητα συγκράτησης μιας ισορροπημένης κλίμακας συγκέντρωσης και επίσης αυξάνει την κυτταρική διαπερατότητα και τη φλεγμονή (Radak et al., 1999).

Συνεπώς, με βάση τις επιδράσεις αυτές της λιπιδικής υπεροξείδωσης, είναι πιθανό να ανιχνευθεί η απώλεια ενδοκυτταρικών υγρών, η μειωμένη μεταφορά ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο, διαφοροποιημένες μιτοχονδριακές και κυτταρικές λειτουργίες καθώς και η απώλεια πρωτεϊνών και ενζύμων (Jackson and O'Farrell, 1993).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν καταστροφή σε οποιοδήποτε τύπο κυττάρου, συμπεριλαμβανομένων και των μυϊκών κυττάρων αλλά και των ερυθροκυττάρων (Tavazzi et al, 2000).

1.3.2.2 Οξείδωση πρωτεϊνών

Στις αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών συγκαταλέγεται και η οξείδωση που προκαλούν σε δομικές πρωτεΐνες αλλά και πρωτεΐνες αίματος, αναστέλλοντας το σύστημα πρωτεόλυσης (Szweda et al., 2002). Κατά την οξείδωση, οι πρωτεΐνες μπορεί να χάσουν κάποια από τα αμινοξέα τους ή να τεμαχιστούν. Αυτές οι αντιδράσεις οδηγούν σε διαφοροποιήσεις των δομικών πρωτεϊνών ή σε αλλαγές των ενζυμικών λειτουργιών (Radak et al, 1999). Η οξείδωση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων συνοδεύεται από γενική αύξηση σε σχετικά επίπεδα ομάδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων, που αποτελούν και δείκτες εμφάνισης οξειδωτικού στρες (Packer, 1997; Levine, 2002; Renke et al, 2000; Leewenburgh et al, 1999). Η οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να είναι και αποτέλεσμα φλεγμονής, φυσικής άσκησης ή της ισχαιμίας (Levine, 2002; Stadtman and Levine, 2000).

Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες καταβολίζονται προς σχηματισμό αμινοξέων, σε αντίθεση με τα καρβονυλικά παραπροϊόντα. Συνέπεια αυτού είναι να επέρχεται

αναστολή της πρωτεόλυσης και συσσώρευση οξειδωμένων πρωτεϊνών (Renke et al, 2000). Επομένως, η αναδιαμόρφωση των πρωτεϊνών, η γενετική μεταγραφή και η ακεραιότητα του κυττάρου περιορίζονται κάτω από τη δράση των δραστικών μορφών οξυγόνου. Σημαντική είναι και η ικανότητα των ελευθέρων ριζών να μεταβάλλουν τα λυσοσώματα και τα πρωτεασώματα, δύο κύρια μονοπάτια μεταβολισμού των πρωτεϊνών (Szweda et al., 2002).

1.3.2.3 Οξείδωση DNA

Είναι γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν καταστροφή και σε αλληλουχίες DNA όπως και σε βάσεις επιδιόρθωσης του (Alessio, 1993; Wallace, 2002). Κάθε τμήμα του DNA είναι πιθανό να δεχτεί προσβολή από ελεύθερες ρίζες (Dizdaroglu et al, 2002). Το επιδιορθωτικό του σύστημα είναι συνεχές αλλά η ισχύς του μπορεί να ηττηθεί καθώς πιθανό είναι να επέλθουν και μετατροπές στις επιδιορθωτικές διαδικασίες (Wallace, 2002; Beckman and Ames, 1997). Αποτέλεσμα της οξείδωσης του DNA είναι οι μεταλλάξεις καθώς αποτελεί και κύριο παράγοντα της εμφάνισης καρκίνου και της κυτταρικής γήρανσης (Kasai, 2002; Fehrenbach and Northoff, 2001). Βρέθηκαν διάφορες πηγές καταστροφής του DNA οι οποίες ήταν συνέπειες του καπνίσματος ή της χρόνιας φλεγμονής και οι οποίες αυξάνονται με τη φυσική άσκηση (Alessio, 1993; Beckman and Ames, 1997).

1.4 Αντιοξειδωτικά

Ως αντιοξειδωτική, ορίζεται κάθε ουσία που μπορεί να αντισταθμίσει την καταστροφική επίδραση του οξειδωτικού στρες, είτε παράγοντας μια λιγότερο δραστική ελεύθερη ρίζα, είτε αναστέλλοντας την επιζήμια δράση της αλυσιδωτής αντίδρασης των ελευθέρων ριζών σε ουσίες, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και DNA (Dekkers et al., 1996).

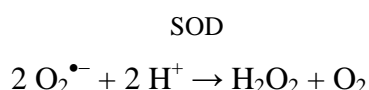
Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχει ποικιλία ενεργών αντιοξειδωτικών, συμπεριλαμβανομένων των ενζυμικών και των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ουσιών (Powers and Lennon, 2000). Όλα τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι ενδοκυτταρικές αλλά και εξωκυτταρικές ουσίες. Η ικανότητα του αντιοξειδωτικού συστήματος εξαρτάται από φυσικά συστατικά, όπως βιταμίνες και ιχνοστοιχεία, αλλά

και από ενδογενή παραγωγή ενζυμικών αντιοξειδωτικών, που μπορούν να διαφοροποιηθούν μέσω της άσκησης, της προπόνησης, της διατροφής και της γήρανσης (Dekkers et al., 1996). Επιπροσθέτως, η αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού είναι σημαντική και για φυσιολογία των αθλητών, καθώς η άσκηση αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών.

1.4.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

1.4.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η υπεροξειδική δισμουτάση είναι το κύριο αμυντικό ένζυμο κατά των ριζών υπεροξειδίου και το πρώτο κατά του οξειδωτικού στρες. Αντιπροσωπεύει μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν την αυτοοξειδωση του ανιόντος υπεροξειδίου προς παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, και συγκεκριμένα:



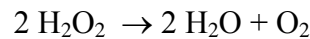
Σε όλα τα κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία, το μεγαλύτερο μέρος του ανιόντος υπεροξειδίου που παράγεται στα μιτοχόνδρια, ανάγεται από την υπεροξειδική δισμουτάση, ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Das et al., 1997). Στα μυϊκά κύτταρα, 65-85% της δράσης της υπεροξειδικής δισμουτάσης επέρχεται στο κυτταρόπλασμα (Powers and Lennon, 2000).

Η SOD βρίσκεται σε διάφορες μορφές στον οργανισμό. Αυτή που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, υφίσταται με τη μορφή συνενζύμου (Mn-SOD), με τη βοήθεια του μαγγανίου, ενώ στο κυτταρόπλασμα με τη μορφή Cu-Zn-SOD, με τη συνένωση χαλκού και ψευδαργύρου.

1.4.1.2 Καταλάση (CAT)

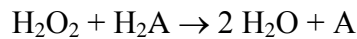
Η καταλάση βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα και συγκεκριμένα στα υπεροξειδοσώματα αυτών καθώς και σε κυτταρικές δομές που χρησιμοποιούν οξυγόνο για να αποβάλλουν τοξικές ουσίες, οι οποίες παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) (Antunes et al., 2002). Το H₂O₂ μετατρέπεται σε νερό και οξυγόνο με τη δράση της καταλάσης:

CAT



Η καταλάση μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει το H_2O_2 για να αποβάλλει τοξικές ουσίες μέσω μιας αντίδρασης υπεροξειδωσής με υποστρώματα όπως η φαινόλη, η αλκοόλη ή το φορμικό οξύ:

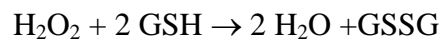
CAT



1.4.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και στο κυτταρόπλασμα και έχει την ικανότητα να μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό, χρησιμοποιώντας ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) την οποία και μετατρέπει στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG):

GPX



Η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης είναι ίδια με αυτή της καταλάσης όσον αφορά το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η διαφορά τους έγκειται στο γεγονός ότι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι πιο αποτελεσματική στην μετατροπή υψηλών συγκεντρώσεων ελευθέρων ριζών, ενώ η καταλάση αποκτά σημαντική δράση με χαμηλές συγκεντρώσεις H_2O_2 .

1.4.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

1.4.2.1 Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και είναι πιθανότατα το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό στα εξωκυτταρικά υγρά, αλλά είναι επίσης αποτελεσματική και στο κυτταρόπλασμα (Bigard, 2001; Palmer et al, 2003). Η ποσότητά της είναι άφθονη σε ιστούς όπου η παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι σημαντική. Αυτό το φαινόμενο ορίζεται ως μια προσαρμογή ενάντια στο οξειδωτικό στρες (Palmer et al, 2003).

Στα εξωκυτταρικά υγρά, η βιταμίνη C έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Εντός του κυττάρου, ενισχύει τη δράση της βιταμίνης E και της ανηγμένης γλουταθειόνης, βοηθώντας να επιστρέψουν στην ενεργή τους μορφή μετά την αντίδρασή τους με ελεύθερες ρίζες (Evans, 2000; Ashton et al, 1999). Μία ακόμα ικανότητα της βιταμίνης C είναι να παγιδεύει τα ιόντα χαλκού, τα οποία έχουν ισχυρή οξειδωτική δράση. Για αυτό το λόγο, η συμπληρωματικότητά της έχει μελετηθεί συχνά.

Στους αθλητές, έχει συζητηθεί και η προληπτική της δράση (Takanami et al, 2000). Ανεπάρκεια της βιταμίνης C έχει αρνητικά αποτελέσματα στην αποδοτικότητά της και η συμπληρωματικότητά της (ειδικά σε συνδυασμό με τη βιταμίνη E και άλλα αντιοξειδωτικά) βοηθά στη διατήρηση μιας επαρκούς ποσότητάς της στους ιστούς (Laursen, 2001).

Επίσης, συμβάλλει στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και διευκολύνει την απορρόφηση άλλων θρεπτικών συστατικών, όπως της βιταμίνης E και του σεληνίου (Halliwell, 1996).

1.4.2.2 Βιταμίνη E (Τοκοφερόλη)

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή πρωτεΐνη και απαντά σε οκτώ διαφορετικές isoμορφές τοκοφερολών. Η α-τοκοφερόλη είναι η πλέον δραστική μορφή της βιταμίνης E στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Η κύρια αντιοξειδωτική της δράση αφορά στην προστασία κατά της υπεροξειδωσης λιπιδίων. Η βιταμίνη C, η GSH, το β-καροτένιο και το λιποϊκό οξύ λειτουργούν μαζί με την βιταμίνη E ως αντιοξειδωτικές ουσίες και έχουν την ικανότητα να την αναγεννούν από την οξειδωμένη της μορφή (Buettner, 1993; Richter, 1987).

1.4.2.3 Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι χρωστικές που απαντώνται στα φυτά και σε μικροοργανισμούς, αλλά δεν συντίθενται από τα ζώα. Στη φύση υπάρχουν περίπου 600 καροτενοειδή και ταξινομούνται στα καροτένια, τα ξανθόφιλα και το λυκοπένιο (Edge et al., 1997). Είναι γνωστό ότι δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες και τα κυριότερα είναι η β-καροτίνη και η βιταμίνη A, η οποία παράγεται από την β-καροτίνη.

1.4.2.4 Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες που παράγονται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και μηλονικό οξύ (Willcox et al., 2002; Wedworth SM, Lynch S, 1995). Μελέτες in vitro επισημάναν τις αντιοξειδωτικές επιδράσεις των φλαβονοειδών, οι οποίες αναστέλλουν τα προ-οξειδωτικά ένζυμα ή τη μορφοποίηση συμπλόκων με προ-οξειδωτικά ιόντα, όπως ιόντα σιδήρου (Fe^{2+} , Fe^{3+}) ή χαλκού (Cu^{2+}). Τα φλαβονοειδή έχουν επίσης περιοριστική δράση ενάντια σε κάποιες ελεύθερες ρίζες, χορηγώντας άμεσα ένα άτομο υδρογόνου σε αυτές.

Παρά τις συνεχείς αποδείξεις για τις in vitro αντιοξειδωτικές ικανότητες των φλαβονοειδών, οι γνώσεις για τις in vivo ιδιότητες αυτών είναι ελλιπείς (Depeint et al, 2002; Wedworth and Lynch, 1995). Ωστόσο κάποιες μελέτες τείνουν να εξακριβώσουν τις in vivo ιδιότητες των φλαβονοειδών (Morand et al, 1998). Άλλωστε, φαίνεται να ασκούν και δράση εξοικονόμησης βιταμίνης E και β-καροτίνης. Οι in vivo ιδιότητες βρίσκονται υπό συζήτηση καθώς κάποιες από αυτές μπορεί να είναι προ-οξειδωτικές και επειδή τα φλαβονοειδή βρίσκονται στον οργανισμό ως προϊόντα μεταβολισμού με χαμηλή αντιοξειδωτική δράση (Cotelle, 2001).

1.4.2.5 Θειόλες

Οι θειόλες είναι μια τάξη μορίων που χαρακτηριστικό τους είναι τα σουλφυδρικά κατάλοιπα στο ενεργό τους κέντρο. Η σύνθεσή τους γίνεται με τη βοήθεια κυστεΐνης και μεθειονίνης. Παίρνουν μέρος σε πολυάριθμες λειτουργίες στα βιολογικά συστήματα, όπως στην πρωτεϊνοσύνθεση, στην οξειδοαναγωγή, στην κυτταρική βιοσύνθεση και στην ανοσία. Παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στο αντιοξειδωτικό μηχανισμό του οργανισμού (Sen and Packer, 2000).

1.4.2.5.1 Γλουταθειόνη

Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), είναι η κυριότερη θειόλη στον οργανισμό. Δρα ως υπόστρωμα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και μπορεί να εξουδετερώσει άμεσα τοξικές ελεύθερες ρίζες καθώς και να ενισχύσει την αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών C και E (May JM, Qu Z, Whitesell RR, et al,

1996). Παρουσία οξειδωτικού στρες, είναι πιθανό να παρατηρηθεί αύξηση στην αναλογία ανηγμένης/οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG) και στην ολική ποσότητα θειόλης (Tessier et al, 1995; Svensson et al, 2002). Αυτά τα φαινόμενα φαίνεται να εμπλέκονται στη γένεση νευρογενετικών ασθενειών, όπως είναι η νόσος του Parkinson και του Alzheimer (Schulz et al, 2000). Παρατηρούνται επίσης και κατά τη γήρανση και μετά από φυσική άσκηση.

Σε κύτταρα που δεν έχουν υποβληθεί σε κατάσταση στρες, το μεγαλύτερο μέρος αυτού του οξειδοαναγωγικού ρυθμιστή βρίσκεται σε αναχθείσα μορφή. Η γλουταθειόνη συντίθεται στο κυτταρόπλασμα από τα αμινοξέα L-γλουταμικό, L-κυστεΐνη και γλυκίνη σε δύο διαδοχικά βήματα. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωσή της κυμαίνεται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και απαντά σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια (Argigo, 1999). Στον πυρήνα διατηρεί την οξειδοαναγωγική κατάσταση των πρωτεϊνών που φέρουν σουλφυδρυλικές ομάδες και είναι απαραίτητες για την επιδιόρθωση και την έκφραση του DNA. Δρα ως συνένζυμο πολυάριθμων ενζύμων που συμμετέχουν στην προστασία του κυττάρου, όπως υπεροξειδάσες γλουταθειόνης, τρανσφεράσες γλουταθειόνες, τρανσφεράσες θειόλης, αφυδρογονάση φορμαλδεΐδης.

1.4.2.6 Θειοαναγωγάσες (TRX)

Οι θειοαναγωγάσες είναι μικρές, πλειοτρόπες σουλφυδρυλικές πρωτεΐνες με δραστηριότητα οξειδοαναγωγάσης. Στον άνθρωπο έχουν αναγνωριστεί τρία γονίδια θειορεδοξίνης (TRX1, TRX2, sp TRX3). Οι TRX όλων των οργανισμών διαθέτουν ένα εξελικτικά συντηρητικό ενεργό κέντρο, το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα κυστεΐνη-γλυκίνη-προλίνη-κυστεΐνη. Οι TRX αποτελούν δότες ηλεκτρονίων για πολλές υπεροξειδοαναγωγάσες, ιδιαίτερα σημαντικές για την αναγωγή των υπεροξειδίων. Επιπλέον, αυτή η μικρή πρωτεΐνη μπορεί άμεσα να ανάγει μερικές δραστικές ρίζες οξυγόνου καθώς και να ανδιπλώσει οξειδωμένες πρωτεΐνες. Επίσης, επάγει αυτοκρινείς δράσεις ανάλογες με εκείνες των αυξητικών παραγόντων και των κυτταροκινών (Γιαννακόπουλος, 2009).

1.4.2.7 Μεταλλοθειονίνες

Φαίνεται ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση ανάμεσα στα ιόντα μετάλλων και στην αντίσταση στο οξειδωτικό στρες. Αυτή η συσχέτιση ερμηνεύεται βιολογικά με βάση το ρόλο των ιόντων μετάλλων, ιδίως του Cu^{2+} και του Zn^{2+} , στην παραγωγή οξειδωτικών ουσιών. Οι μεταλλοθειονίνες είναι μια ομάδα μικρών πρωτεϊνών, πλούσιων σε κυστεΐνη, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να συνδέουν διαφορετικά ιόντα μετάλλων. Αυτές οι πρωτεΐνες έχουν ιδιαίτερη σημασία στην αντιμετώπιση της τοξικότητας των μετάλλων, όπως του χαλκού (Γιαννακόπουλος, 2009).

1.4.2.8 Συνένζυμο Q (CoQ_{10})

Το συνένζυμο Q_{10} είναι γνωστό ότι αντιδρά άμεσα σε ρίζες υπεροξειδίου ή έμμεσα στην αναγέννηση των βιταμινών C και E (Crane, 2001). Δρα επίσης και ως ένας μεσολαβητής για την έκφραση των γονιδίων και της πρωτεϊνοσύνθεσης στους μύες (Rosenfelt et al, 2002). Σε αυτή την περίπτωση το CoQ_{10} δρα ως προ-οξειδωτική ουσία, παράγοντας ανιόν του υπεροξειδίου το οποίο μετατρέπεται σε υπεροξειδίο του υδρογόνου με τη δράση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου. Με τη σειρά του, το υπεροξειδίο του υδρογόνου δρα ως δεύτερος αγγειοφόρος/μεσολαβητής για την έκφραση των γονιδίων. Η συμμετοχή του CoQ_{10} έχει μελετηθεί σε αθλητικές ομάδες με περιορισμένα αποτελέσματα στη μείωση του οξειδωτικού στρες και της φυσικής απόδοσης (Braun et al, 1991; Svensson, 1999).

1.4.2.9 Φερριτίνη

Ο σίδηρος απαιτείται για την ομαλή κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό και μπορεί να έχει αντιοξειδωτικές επιδράσεις ως συμπαράγοντας της καταλάσης. Ωστόσο, ιόντα σιδήρου μπορεί να έχουν προ-οξειδωτική δράση στην αντίδραση κατά Fenton ή μπορούν να οξειδώσουν τη βιταμίνη C και να ελαττώσουν την αντιοξειδωτική προστασία εναντίον των ελευθέρων ριζών (Sevanian et al, 1991; Meneghini, 1997). Επομένως, η υπερβολική ποσότητα σιδήρου είναι επιζήμια και η φερριτίνη, μία από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες μεταβολισμού του σιδήρου, παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας στη συγκέντρωση του σιδήρου (Cairo et al, 2002). Πολλές μελέτες τονίζουν τον προστατευτικό ρόλο της φερριτίνης ενάντια στην επιζήμια δράση των ελευθέρων ριζών, επειδή η φερριτίνη μειώνει το σχηματισμό ελευθέρων

ριζών απομονώνοντας το σίδηρο στο αίμα ή στα κύτταρα (Orino et al, 2001). Επίσης, μια αύξηση στη σύνθεση της φερριτίνης παρατηρείται ως απόκριση στη φυσική άσκηση, στην κυτταρική καταστροφή και στη φλεγμονή που προάγουν το οξειδωτικό στρες (Applegate et al, 1998).

1.4.2.10 Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο (Svensson et al, 2002). Η έντονη φυσική άσκηση είναι γνωστό ότι αυξάνει τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος στο πλάσμα (Green and Fraser, 1988). Η αύξηση αυτή μπορεί να έχει ως συνέπεια τη διάχυσή του στους μύες με σκοπό την προστασία τους από την οξείδωση μέσω ελευθέρων ριζών (Hellsten et al, 1998). Πράγματι, το ουρικό οξύ, στο πλάσμα και στους μύες, είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά με άμεση δράση έναντι του μονήρους οξυγόνου, του υποχλωριώδους οξέος, τις ρίζες υπεροξειδίου ή του όζοντος (Kean, 2000). Μερικές μελέτες απέδειξαν ότι το ουρικό οξύ αντιπροσωπεύει ένα μεγάλο τμήμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Wayner et al, 1987). Έτσι, προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες, το υαλουρονικό οξύ και το DNA από τη δράση των ελευθέρων ριζών. Μία ακόμη σημαντική αντιοξειδωτική ιδιότητα του ουρικού οξέος είναι η ικανότητά του να δημιουργεί σταθερά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου. Αυτή η διαδικασία αναστέλλει την λιπιδική υπεροξείδωση και την οξείδωση της βιταμίνης C (Davies et al, 1986). Επομένως αποτελεί «προστάτη» της βιταμίνης C αλλά και της βιταμίνης E (Ma et al., 1994)

1.5 Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου υπέρ των πρώτων και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Το οξειδωτικό στρες ενοχοποιείται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων καθώς και στη διεργασία της γήρανσης, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον η προσπάθεια φαρμακολογικής τροποποίησης της απόκρισης των οργανισμών στο οξειδωτικό στρες (Γιαννακοπούλου Ε, 2009).

1.6 Οξειδωτικό στρες και αερόβια άσκηση

1.6.1 Επιδράσεις στην παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι επιδράσεις της άσκησης στο οξειδωτικό στρες ερευνήθηκαν σε πολλές μελέτες με μεθόδους που συμπεριλάμβαναν αερόβια άσκηση, όπως το τρέξιμο και την κολύμβηση (Child et al, 1998; Lovlin et al, 1987; Aguilo et al, 2005). Η αερόβια άσκηση συνοδεύεται από αύξηση του όγκου του οξυγόνου, που ενδεχομένως μπορεί να αυξήσει με τη σειρά του την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Επομένως, πολλές μελέτες έχουν προτείνει ότι τέτοιου είδους φυσική άσκηση δυναμώνουν την δράση ελευθέρων ριζών και στον άνθρωπο αλλά και στα ζώα (Vider et al, 2001).

Ωστόσο, αυτό το φαινόμενο δεν παρατηρείται κατά τη διάρκεια άσκησης με χαμηλή ένταση. Σε αυτή την περίπτωση, η αντιοξειδωτική ικανότητα δεν υπερνικείται και δεν εμφανίζεται καταστροφή μέσω ριζών. Άλλωστε όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση της άσκησης, τόσο μεγαλύτερη είναι η επίδραση των ριζών και τόσο πιο σημαντικό το οξειδωτικό στρες που επέρχεται (Lovlin et al, 1987), το οποίο επιβεβαιώθηκε από μελέτες που συσχετίζουν τον όγκο του οξυγόνου με το οξειδωτικό στρες (Ashton et al, 1998). Παρόλα αυτά, υπάρχουν και μελέτες που σημειώνουν ότι το οξειδωτικό στρες δεν αυξάνεται μετά από έντονη άσκηση. Τα αντιφατικά αυτά αποτελέσματα μπορούν να εξηγηθούν μέσω της φυσικής αντιοξειδωτικής κατάστασης, που δεν ελέγχεται πάντα στις μελέτες, καθώς και από την ένταση ή το επίπεδο της άσκησης. Για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, οι μελέτες αυτές γίνονται με τη βοήθεια προπονημένων αθλητών αντοχής οι οποίοι είναι προσαρμοσμένοι στις συνέπειες της άσκησης, όπως στην επίδραση των ελευθέρων ριζών (Chevion et al, 2003). Κάποιες φορές βέβαια, οι προπονημένοι υποβαλλόμενοι μπορεί να παρουσιάσουν τα ίδια αποτελέσματα με τους μη προπονημένους, όσον αφορά την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες (Palazzetti et al, 2003). Οι όποιες διαφορές μπορούν να εμφανιστούν με τη χρήση μεθόδων για τη μέτρηση του οξειδωτικού στρες.

1.6.2 Επιδράσεις στη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών

Η άσκηση αντοχής προκαλεί επίσης αλλαγές στη συγκέντρωση μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών ή στην ενζυμική αντιοξειδωτική δραστικότητα. Πολυάριθμες μελέτες, σε ανθρώπους και σε ζώα, έδειξαν ότι η ενζυμική αντιοξειδωτική δραστικότητα αυξάνεται στο αίμα ή στους ιστούς μετά από αερόβια άσκηση (Inal et al, 2001; Ji and Fu, 1993). Η προσαρμογή αυτή μπορεί να επανέλθει πολύ γρήγορα μετά την παραγωγή ελευθέρων ριζών και φαίνεται να είναι ειδική για την οξείδωση των μυϊκών ινών που είναι και το κύριο τμήμα παραγωγής ριζών (Ji and Fu, 1993). Ωστόσο, η αύξηση της ενζυμικής αντιοξειδωτικής ικανότητας δεν είναι ανάλογη της έντασης της άσκησης (Criswell et al, 1993).

Οι επιδράσεις της αερόβιας άσκησης δεν έχουν περιορισμούς στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Η συγκέντρωση των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών τροποποιείται αλλά τα αποτελέσματα είναι συχνά αντιφατικά. Για παράδειγμα, κάποιες μελέτες προτείνουν ότι η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) ή ο λόγος GSH/GSSG μειώνεται καθώς αναλώνεται ενάντια των ριζών (Inal et al, 2001). Αντίθετα, οι βιταμίνες C και E καθώς και το ουρικό οξύ, τείνουν να αυξάνονται μετά από έντονη προσπάθεια (Palmer et al, 2003). Οι βιταμίνες C και E αποκτούν φαίνεται να δραστηριοποιούνται για να προστατεύσουν τον οργανισμό από τις επιζήμιες επιδράσεις των ελευθέρων ριζών. Η αύξηση του ουρικού οξέος δεν θεωρείται ως αποκλειστική προσαρμογή ενάντια του οξειδωτικού στρες, μιας και αποτελεί τελικό προϊόν του κύκλου των πουρινών (Mastaloudis et al, 2001). Την αύξηση στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα προκαλούν όλες οι τροποποιήσεις μαζί.

1.6.3 Οξειδωτικό στρες και υδατοσφαίριση

Οι καταστάσεις έντονης άσκησης κατά τη διάρκεια μιας προπονητικής περιόδου αυξάνουν το οξειδωτικό στρες, καθώς ο κάματος μπορεί να συνοδεύεται και από την εμφάνιση αλλαγών στη φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού αλλά και στη λειτουργία του μεταβολισμού (Tsopanakis et al, 1994; 1998).

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι αθλητές που συμμετέχουν σε αθλήματα αντοχής, όπως μαραθωνοδρόμοι, κολυμβητές και άλλοι, έχουν μεγάλη αναλογία

μυϊκών ινών βραδείας συστολής στους μύες που επιτελούν έργο σε σύγκριση με τους μύες που ασκούνται σε μικρής και εξαντλητικής διάρκειας δραστηριότητες.

Είναι επίσης γνωστό ότι οι μυϊκές ίνες βραδείας συστολής των γραμμωτών μυών είναι προσαρμοσμένες στη λειτουργία της αναπνοής και στην αξιοποίηση του οξυγόνου μέσω του οξειδωτικού μεταβολισμού, περιέχουν περισσότερη μυοσφαιρίνη, έχουν ισχυρότερο αντιοξειδωτικό μηχανισμό και είναι περικυκλωμένες από τριχοειδή (Karlsson, 1997).

Σύμφωνα λοιπόν με την ένταση και τη διάρκεια της άσκησης, καθώς και το επίπεδο προσαρμογής των αθλητών, αναμένονται διάφορες αποκρίσεις στο οξειδωτικό στρες.

Η υδατοσφαίριση έχει πολλά κοινά στοιχεία με την κολύμβηση, όσον αφορά την απόκριση ενός οργανισμού στο οξειδωτικό στρες. Δεν βρέθηκαν μελέτες που να ασχολούνται ειδικά με τη μέτρηση όμοιων με αυτής της εργασίας δεικτών οξειδωτικού στρες σε υδατοσφαιριστές ή υδατοσφαιρίστριες. Παρόλα αυτά, η μελέτη του Καμψασακάλη και των συνεργατών του (2009), που αφορά σε παιδιά ηλικίας 10-11 ετών είναι αρκετά χρήσιμη, αφού τα παιδιά αυτά ασκήθηκαν χρόνια προπόνηση στην κολύμβηση.

Συγκεκριμένα, στη μελέτη αυτή (Kabasakalis et al, 2009), συμμετείχαν αρχικά 16 αγόρια και 16 κορίτσια. Στην πορεία 5 αγόρια και 3 κορίτσια αποκλείστηκαν από τη μελέτη διότι δεν προπονήθηκαν τακτικά ή/και έχασαν μια προγραμματισμένη δειγματοληψία λόγω ασθένειας. Όλα τα παιδιά ήταν μέλη κολυμβητικού σωματίου και είχαν προπονηθεί για τουλάχιστον ένα χρόνο. Κανένα κορίτσι δεν πέρασε τη διαδικασία της εμμηναρχής.

Τα παιδιά υποβλήθηκαν σε αιμοληψία, καθορισμένο διαιτολόγιο, σε ανθρωπομετρικές και σε μετρήσεις επιδόσεων σε τρία χρονικά σημεία: στην έναρξη της προπονητικής περιόδου, 13 εβδομάδες μετά και 23 εβδομάδες μετά την προπόνηση. Κάθε προπονητική περίοδος διήρκεσε 75-90 λεπτά, η απόσταση κολύμβησης ήταν 2687 ± 547 μέτρα και η προπόνηση επαναλαμβανόταν τουλάχιστον 3 φορές την εβδομάδα. Το σχέδιο της προπόνησης ήταν σύμφωνο με τις

προπονητικές προϋποθέσεις για τις ηλικίες αυτές. Τα παιδιά αυτά, λάμβαναν μέρος σε τοπικούς αγώνες κολύμβησης και παρευρίσκονταν σε γυμναστική εκπαίδευση στο σχολείο δύο φορές την εβδομάδα. Οι συμμετέχοντες έδωσαν 6 mL φλεβικού αίματος σε κενό φιαλίδιο και 2 mL σε φιαλίδιο με EDTA. Για πρακτικούς λόγους η αιμοληψία γινόταν τις απογευματινές ώρες. Για να αποφευχθούν πιθανές επιδράσεις στις μετρήσεις από γεύματα και από την εξάσκηση πριν από αυτές, τα παιδιά έπαιρναν το γεύμα τους τουλάχιστον 3 ώρες πριν και απείχαν από την άσκηση 24-26 ώρες πριν την αιμοληψία.

Ανάμεσα σε άλλους δείκτες, μετρήθηκαν η ανηγμένη και η οξειδωμένη γλουταθειόνη, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η καταλάση και τα TBARS του αίματος. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων αλλά ούτε και στο κάθε φύλλο ξεχωριστά σε σχέση με το χρόνο. Όσον αφορά το χρόνο, παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της ανηγμένης γλουταθειόνης και του λόγου GSH/GSSG στα δείγματα από τη μέτρηση της 13^{ης} και της 23^{ης} εβδομάδας. Αντίθετα παρατηρήθηκε μια μικρή πτώση στη συγκέντρωση της καταλάσης και των TBARS στην ίδια μέτρηση ενώ η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη (Kabasakalis et al, 2009).

Χρήσιμες πληροφορίες έχουν ληφθεί και από την μελέτη των Canas και Tarhan του 2004. Στην μελέτη τους αυτή διερευνήθηκε η δραστηριότητα των ενζύμων των καρδιακών δεικτών, το αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα καθώς και τα επίπεδα μαλονδιαλδεύδης των ερυθροκυτταρικών μεμβρανών μετά την επίδραση βιταμινών και μεταλλικών συμπληρωμάτων, στην κολύμβηση. Η μελέτη αυτή έγινε επίσης σε κολυμβητές ηλικίας 11-13 ετών.

Τα παιδιά χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ώστε να υπάρχει και η ομάδα ελέγχου (μάρτυρες). Πήραν μέρος σε ένα μηνιαίο πρόγραμμα κολύμβησης με την προπόνηση να επαναλαμβάνεται 4 φορές την εβδομάδα. Κάθε φορά η απόσταση κολύμβησης αντιστοιχούσε περίπου σε 2-2.5 χλμ. Μετρήθηκαν καρδιακοί δείκτες, όπως κινάση, κρεατινική κινάση, αλλά και αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), καταλάση (CAT) και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px). Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις τους ήταν σημαντικά αυξημένες στα δείγματα μετά την άσκηση σε σχέση με τα δείγματα που λήφθηκαν πριν την

άσκηση. Η δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων έδειξε ότι αυξάνεται στην ομάδα των αγοριών που υποβλήθηκε σε συμπληρώματα βιταμινών και μετάλλων συγκριτικά ως προς τις άλλες ομάδες. Τα επίπεδα της μαλονδιαλδεύδης ήταν επίσης μεγαλύτερα στα δείγματα που λήφθηκαν μετά την άσκηση σε σχέση με αυτά πριν της άσκησης στα άτομα της ομάδας ελέγχου, ωστόσο δεν φάνηκαν ιδιαίτερες διαφορές στα δείγματα των ατόμων που έλαβαν τα συμπληρώματα (Cavas L, Tarhan L., 2004).

Ως αερόβιο άθλημα, η υδατοσφαίριση μπορεί να συγκριθεί και με άλλες αερόβιες ασκήσεις όσον αφορά το οξειδωτικό στρες και τη μεταβολή σε οξειδωτικούς δείκτες. Με βάση αυτή τη σύγκριση αντλήθηκαν πληροφορίες για αλλαγές σε οξειδωτικούς δείκτες και από μελέτη του Bloomer et al (1995) και των συνεργατών του. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν να συγκρίνει την οξείδωση λιπιδίων, πρωτεϊνών, DNA και της γλουταθειόνης εντός 24 ωρών μετά την αερόβια και την αναερόβια άσκηση στην οποία υποβάλλονται παρόμοιες μυϊκές ομάδες.

Σε 10 πολύπλευρα γυμνασμένους άντρες (ηλικίας 24.3 ± 3.8 ετών), πραγματοποιήθηκε με τυχαία σειρά 30 λεπτά συνεχής ποδηλασία στο 70% της $VO_2\max$ και διακοπτόμενο «κάθισμα» (μια επανάληψη) με ελεύθερα βάρη στο 70% της μέγιστης δύναμης με χρονική απόσταση 1-2 εβδομάδων. Λήφθηκαν δείγματα αίματος πριν την άσκηση και 1, 6 και 24 ώρες μετά από την άσκηση. Τα δείγματα αναλύθηκαν για τη μέτρηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC), της μαλονδιαλδεύδης, της ολικής γλουταθειόνης, της οξειδωμένης (GSSG) και της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH). Τα δείγματα που λήφθηκαν πριν και 24 ώρες μετά την άσκηση, μετρήθηκαν για τα επίπεδα της 8-υδροξυ-29-γουανοσίνης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ήταν μεγαλύτερη στα δείγματα που λήφθηκαν 6 και 24 ώρες μετά την άσκηση «κάθισμα» με ελεύθερα βάρη σε σχέση με την ποδηλασία (0.634 ± 0.053 έναντι 0.359 ± 0.018 nM/mg protein⁻¹). Δεν παρουσιάστηκαν ιδιαίτερες αλλαγές στα επίπεδα της μαλονδιαλδεύδης ή της υδροξυγουανοσίνης, ενώ η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης παρουσίασε μια μικρής διάρκειας αύξηση. Αντίθετα, η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης παρουσίασε μια παροδική μείωση αμέσως μετά το πέρας και των δύο ασκήσεων (Bloomer et al., 1995).

Μελέτη για το οξειδωτικό στρες που έχει γίνει σε αθλητές ποδοσφαίρου (Fatouros et al, 2009), έχει φανεί επίσης αρκετά χρήσιμη για την παρούσα εργασία καθώς και το ποδόσφαιρο είναι κατά βάση αερόβιο άθλημα με αυξομειώσεις στην ένταση αλλά και στη διάρκειά του. Η καταστροφή των μυών που επέρχεται από την άσκηση, συνδυάζεται με μια σφοδρή απόκριση φλεγμονής η οποία χαρακτηρίζεται από τη δράση φαγοκυττάρων και την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Αν και οι ποδοσφαιριστές διαθέτουν έντονη μυϊκή δράση που προκαλεί την μυϊκή καταστροφή, η απόκριση στο οξειδωτικό στρες μετά από έναν αγώνα ποδοσφαίρου είναι συγχρόνως και άγνωστη.

Η μελέτη λοιπόν αυτή, επιχείρησε να προσδιορίσει τις αποκρίσεις σε διαφορετικά επίπεδα του οξειδωτικού στρες και την κατάσταση αντιοξειδωτικών δεικτών, μετά από έναν ποδοσφαιρικό αγώνα. Για την εκπόνησή της χρησιμοποιήθηκαν 22 παίκτες ποδοσφαίρου, ως πειραματική ομάδα, οι οποίοι και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες που θα ανταγωνίζονταν η μία την άλλη. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 10 επιπλέον παίκτες που δε συμμετείχαν στον αγώνα, ως ομάδα ελέγχου (μάρτυρες). Μεταξύ άλλων συγκεντρώσεων, μετρήθηκαν η μαλονδιαλδεΐδη, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, η ανηγμένη και η οξειδωμένη γλουταθειόνη, η καταλάση και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, πριν τον αγώνα, αμέσως μετά τη λήξη του, 24, 48 και 72 ώρες μετά από αυτόν.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), πρωτεϊνικά καρβονύλια και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αυξήθηκαν κατά τη διάρκεια της ανάκαμψης μετά τον αγώνα, αν και η και η συγκέντρωση της καταλάσης αυξήθηκε μόνο αμέσως μετά τη λήξη του. Αντίθετα, ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH/GSSG) μειώθηκε κατά τη διάρκεια της ανάκαμψης (Fatouros et al, 2009).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Εξετάστηκαν 8 ενήλικες (18-35 ετών) αθλήτριες υδατοσφαίρισης υψηλού επιπέδου, μέλη της ελληνικής εθνικής ομάδας. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε επιλεγμένα χρονικά σημεία στη διάρκεια του προπονητικού κύκλου, τα οποία είτε οριοθετούσαν αλλαγές στην προπονητική επιβάρυνση είτε αναμενόταν σε αυτά υψηλή αγωνιστική απόδοση από τις αθλήτριες. Συγκεκριμένα, μετρήσεις έγιναν στην αρχή της προετοιμασίας και στην έναρξη της αγωνιστικής περιόδου.

Κατά τις χρονικές αυτές στιγμές έγινε λήψη δείγματος αίματος, όπου εξετάστηκαν η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG), του λόγου τους, και της καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, καθώς και η συγκέντρωση των αντιδρώντων ουσιών με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) ως δείκτης υπεροξειδωσης λιπιδίων, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ως δείκτης οξειδωσης πρωτεϊνών και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του πλάσματος.

2.1 Επεξεργασία του αίματος μετά από αιμοληψία

Για τον προσδιορισμό όλων των παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε:

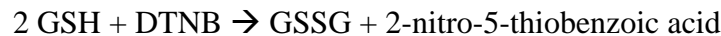
Ολικό αίμα, για τον προσδιορισμό αιματολογικών παραμέτρων, όπως ο αιματοκρίτης και η αιμοσφαιρίνη.

Ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, για τον προσδιορισμό της ανηγμένης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH και GSSG), της καταλάσης, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των TBARS.

Πλάσμα, για τον προσδιορισμό των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).

2.2 Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

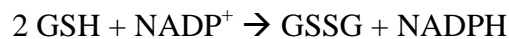
Αρχή μεθόδου: Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται σε αιμόλυμα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm.



Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.

2.3 Προσδιορισμός οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG)

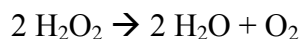
Αρχή μεθόδου: Η GSSG παράγεται από την οξείδωση της GSH, με τη χρήση του διθειο-2-νιτροβενζοϊκού οξέος (DTNB). Για αυτό και προστίθεται NADPH ώστε το DTNB να αναχθεί από την GSH. Η αντίδραση αυτή προκαλεί δημιουργία χρώματος:



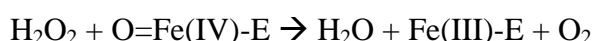
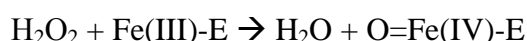
Σε 50 μL αιμόλυματος, προσθέτουμε σταδιακά σε ποσότητες 1-2 μL κάθε φορά, 1M NaOH μέχρι το pH να φτάσει στην τιμή 7.0-7.5. κάθε φορά που προσθέτουμε NaOH, αναδεύουμε και ελέγχουμε το pH χρησιμοποιώντας πεχαμετρικό χαρτί, το οποίο πρέπει να πάρει ένα πρασινωπό χρώμα σύμφωνα με την κλίμακα που βρίσκεται πάνω στη συσκευασία του. Συνήθως μια ποσότητα 4-8 μL από το NaOH 1M είναι αυτή που απαιτείται για να φτάσει το pH στην τιμή 7.0-7.5. Κατόπιν, κάτω από τον απαγωγό, προσθέτουμε 1 μL 2-vinyl pyridine και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Το 2-vinyl pyridine εμποδίζει την οξείδωση της GSH σε GSSG χωρίς να παρεμποδίζει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της GSSG. Κατά τη διάρκεια της επώασης αναδεύουμε κάθε 30 λεπτά.

2.4 Προσδιορισμός καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Αρχή μεθόδου: Η μέθοδος στηρίζεται στη δραστικότητα της καταλάσης κατά την αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από αυτή. Η αντίδραση αυτή είναι η ακόλουθη:



Και πραγματοποιείται σε δύο στάδια:



Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεμένη στο ένζυμο.

Η απορρόφηση του H_2O_2 στα 240 nm μας πληροφορεί για την ποσότητα του υπεροξειδίου που διασπάστηκε. Συνεπάγεται λοιπόν και η δραστικότητα της καταλάσης που κατέλυσε την αντίδραση αυτή.

Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξειδοσώματα, στα μιτοχόνδρια και στο κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν τέσσερις πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο.

Επίσης η καταλάση μπορεί να χρησιμοποιήσει το H_2O_2 για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H_2A) με τη χρησιμοποίηση υποστρώματος (αιθανόλη), σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



2.5 Προσδιορισμός ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ στο πλάσμα (TBARS)

Αρχή μεθόδου: Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη. Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσίας των λιπιδίων.

Το Na₂SO₄ χρησιμοποιείται σαν αφυδατικός παράγοντας.

Το TCA προστίθεται στον ορό ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες του (αλβουμίνη, ανοσοσφαιρίνες κτλ.)

2.6 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα

Αρχή μεθόδου: Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4- δινιτροφαινυλδραζονίου). Το DNP- hydrazone είναι έγχρωμο προϊόν, η απορρόφηση του οποίου μας δίνει πληροφορίες για την ποσότητα των καρβονυλίων που αντέδρασαν και συνεπώς για τη συγκέντρωσή τους στο πλάσμα.

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε οξειδωτικές βλάβες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας γενικός δείκτης της οξειδωσίας των πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Είναι αξιόπιστος δείκτης οξειδωσίας των πρωτεϊνών διότι τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες. Η καρβονυλίωση οδηγεί στην απώλεια της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Οι

καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ δριμείς βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους. Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επισκευάζουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα.

2.7 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Αρχή μεθόδου: Η TAC του ορού στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH·) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm (Janaszewska and Bartosz, 2002)

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό του πλάσματος έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της ποσοτικοποίησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος. Ο πρώτος είναι το άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού του πλάσματος ξεχωριστά. Αυτός είναι ο πιο επίπονος τρόπος επειδή υπάρχουν πολλά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο.

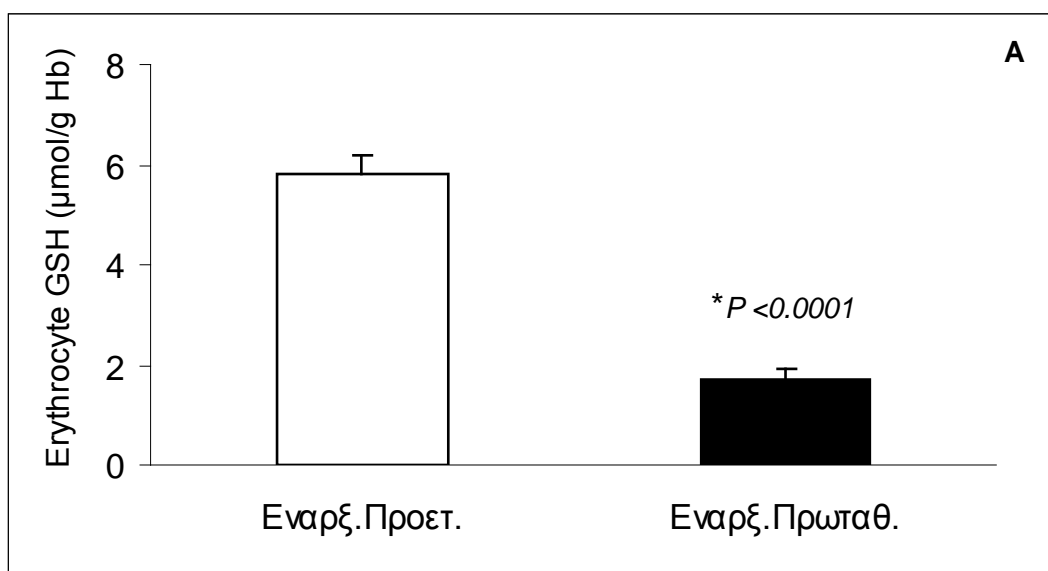
Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο που έχει τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC στο πλάσμα προκαλώντας μεγάλη αύξησή της όταν η

συγκέντρωσή του αυξάνεται. Το ουρικό οξύ βρίσκεται σε πολύ πιο υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε σχέση με άλλα μόρια με εξαίρεση τις θειόλες. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι το δεύτερο πιο ισχυρό μόριο στον καθορισμό της τιμής της TAC και ακολουθούν κατά σειρά οι βιταμίνες E και A. Οι βιταμίνες C και E μάλιστα είναι πιο πιθανό να αποτελούν το 25% της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

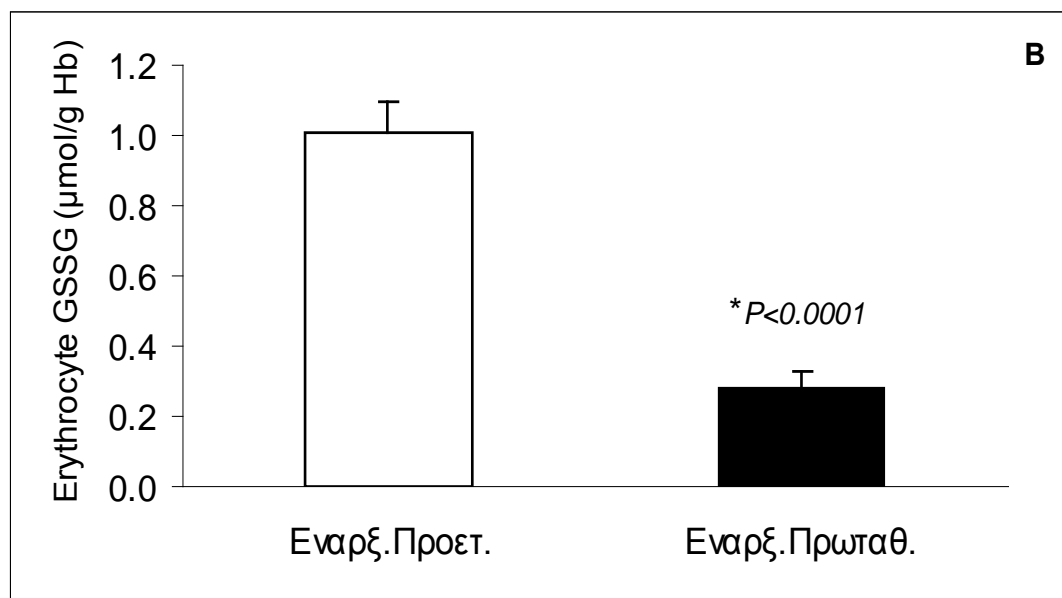
Κατά την έναρξη της προετοιμασίας των υδατοσφαιριστριών η μέση συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης είναι 5.81 $\mu\text{mol/g Hb}$ (αιμοσφαιρίνης) με ένα τυπικό σφάλμα ± 0.37 . Η μέτρηση του ίδιου δείκτη κατά την έναρξη του πρωταθλήματος, φανερώνει ότι η μέση τιμή της GSH μειώνεται στα 1.69 $\mu\text{mol/g Hb}$ με ένα τυπικό σφάλμα ± 0.23 .



Γράφημα 1Α. Η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) των ερυθροκυττάρων στο αίμα των υδατοσφαιριστριών. Η πρώτη στήλη απεικονίζει τις μετρήσεις κατά την έναρξη της προετοιμασίας και η δεύτερη κατά την έναρξη του πρωταθλήματος.

3.2 Προσδιορισμός οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG)

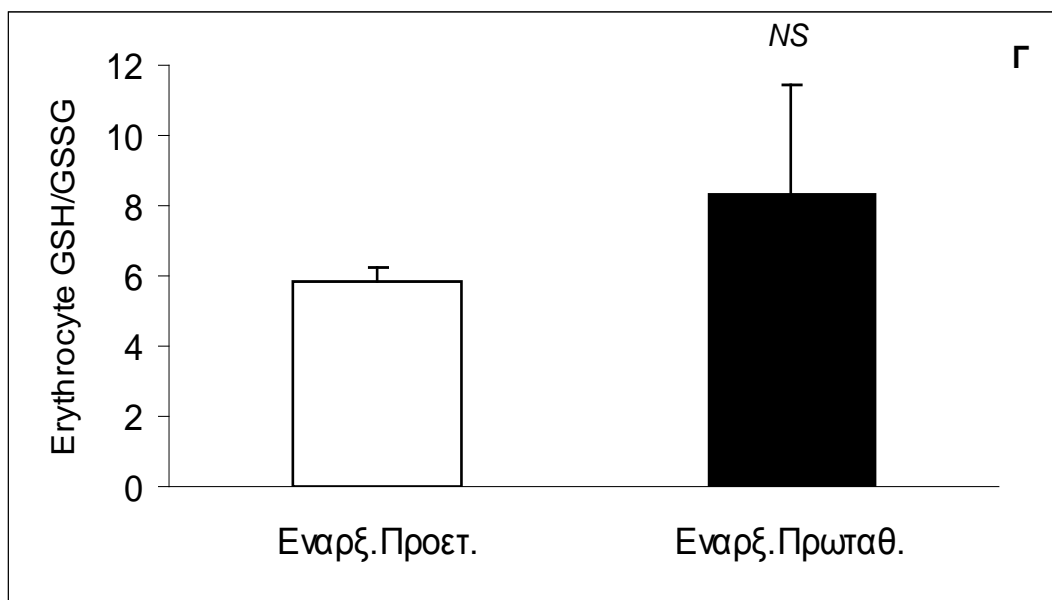
Κατά την έναρξη της προετοιμασίας των υδατοσφαιριστιών η μέση συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης είναι 1.01 $\mu\text{mol/g Hb}$ (αιμοσφαιρίνης) με ένα τυπικό σφάλμα ± 0.09 . Η μέτρηση του ίδιου δείκτη κατά την έναρξη του πρωταθλήματος, φανερώνει ότι η μέση τιμή της GSSG μειώθηκε στα 0.28 $\mu\text{mol/g Hb}$ με ένα τυπικό σφάλμα ± 0.04 .



Γράφημα 1B. Η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) των ερυθροκυττάρων στο αίμα των υδατοσφαιριστιών. Η πρώτη στήλη απεικονίζει τις μετρήσεις κατά την έναρξη της προετοιμασίας και η δεύτερη κατά την έναρξη του πρωταθλήματος.

3.3 Προσδιορισμός του λόγου GSH/GSSG

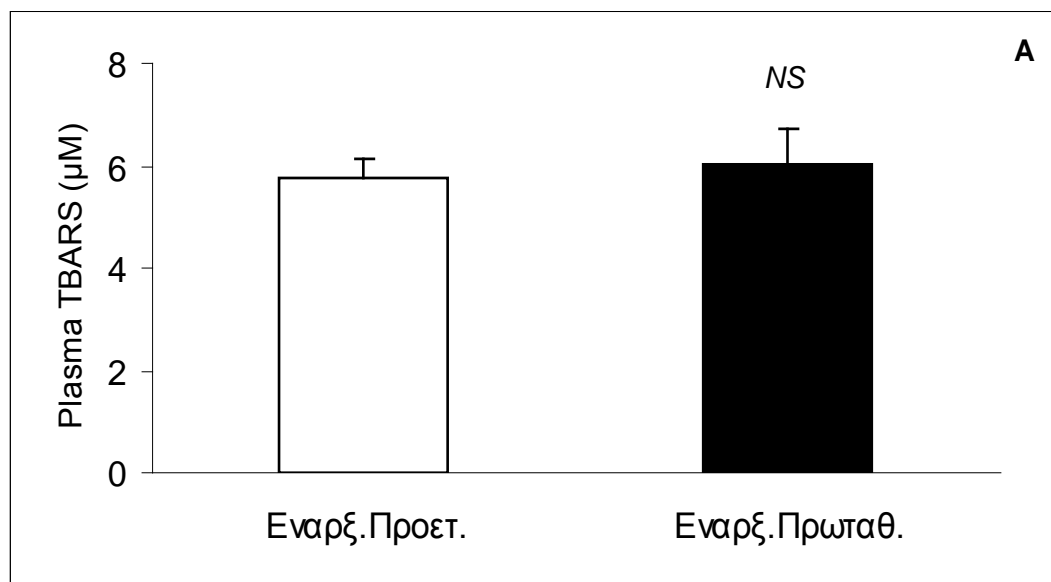
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ανηγμένης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης ξεχωριστά, υπολογίζεται και ο λόγος τους κατά την έναρξη της προετοιμασίας αλλά και κατά την έναρξη του πρωταθλήματος. Η μέση τιμή του είναι 5.88 με τυπικό σφάλμα ± 0.33 και 8.28 με τυπικό σφάλμα ± 3.15 , αντίστοιχα.



Γράφημα 1Γ. Ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH/GSSG). Η πρώτη στήλη απεικονίζει τις μετρήσεις κατά την έναρξη της προετοιμασίας και η δεύτερη κατά την έναρξη του πρωταθλήματος.

3.4 Προσδιορισμός των TBARS

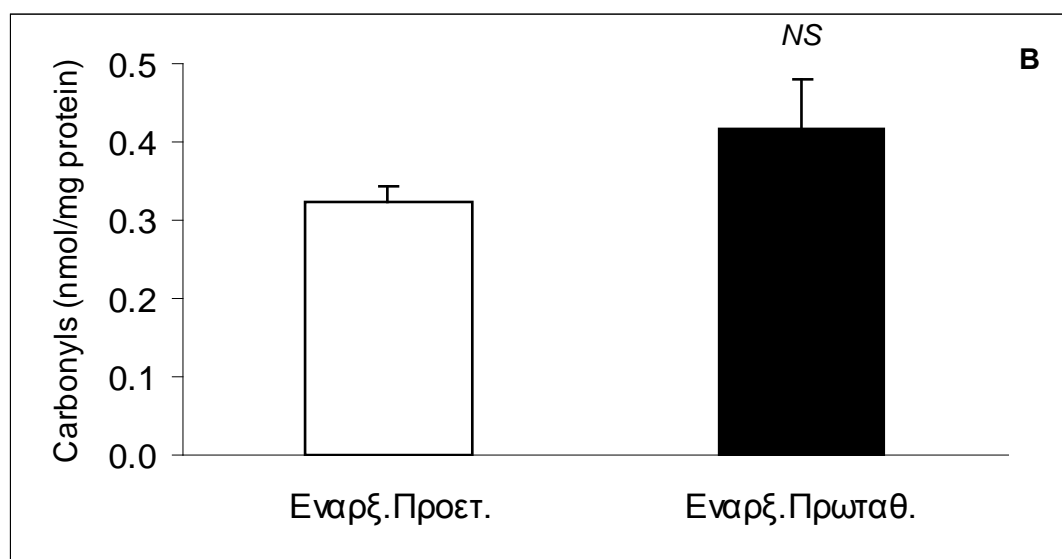
Κατά την έναρξη της προετοιμασίας των υδατοσφαιριστριών η μέση συγκέντρωση των TBARS είναι 5.76 $\mu\text{mol/L}$ (πλάσματος) με ένα τυπικό σφάλμα ± 0.36 . Η μέτρηση του ίδιου δείκτη κατά την έναρξη του πρωταθλήματος, φανερώνει ότι η μέση τιμή των TBARS δε μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά και ανέρχεται στα 6.04 $\mu\text{mol/L}$ με ένα τυπικό σφάλμα ± 0.66 .



Γράφημα 2Α. Η συγκέντρωση των TBARS στο πλάσμα αίματος των υδατοσφαιριστριών. Η πρώτη στήλη απεικονίζει τις μετρήσεις κατά την έναρξη της προετοιμασίας και η δεύτερη κατά την έναρξη του πρωταθλήματος.

3.5 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων

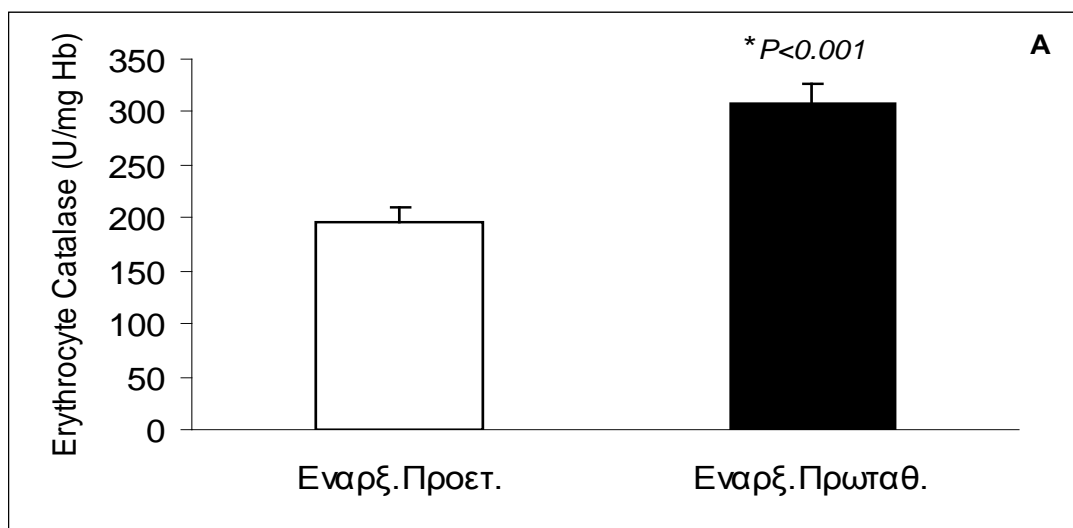
Κατά την έναρξη της προετοιμασίας των υδατοσφαιριστριών η μέση συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων είναι 0.32 nmol/mg (πρωτεΐνης πλάσματος) με ένα τυπικό σφάλμα ± 0.02 . Η μέτρηση του ίδιου δείκτη κατά την έναρξη του πρωταθλήματος, φανερώνει ότι η μέση τιμή των πρωτεϊνικών καρβονυλίων δε μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά και ανέρχεται στα 0.42 nmol/mg με ένα τυπικό σφάλμα ± 0.06 .



Γράφημα 2B. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα αίματος των υδατοσφαιριστριών. Η πρώτη στήλη απεικονίζει τις μετρήσεις κατά την έναρξη της προετοιμασίας και η δεύτερη κατά την έναρξη του πρωταθλήματος.

3.6 Προσδιορισμός καταλάσης (CAT)

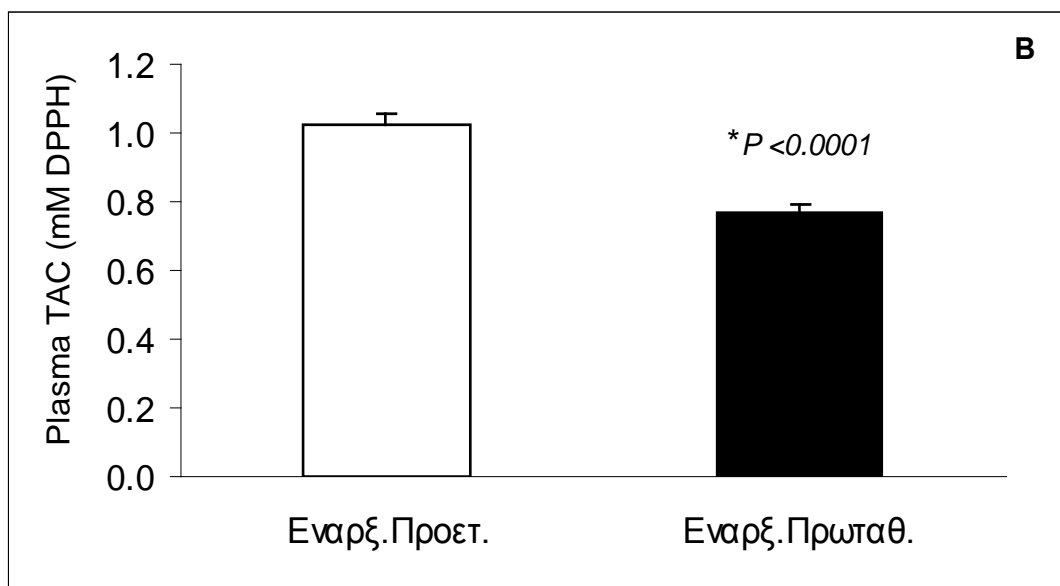
Κατά την έναρξη της προετοιμασίας των υδατοσφαιριστιών η μέση δραστικότητα της καταλάσης είναι 195 U/mg Hb (αιμοσφαιρίνης) με ένα τυπικό σφάλμα ± 14 . Η μέτρηση του ίδιου δείκτη κατά την έναρξη του πρωταθλήματος, φανερώνει ότι η μέση τιμή της δραστικότητας της καταλάσης αυξήθηκε σημαντικά και ανέρχεται στα 309 U/mg Hb με ένα τυπικό σφάλμα ± 18 .



Γράφημα 3Α. Η συγκέντρωση της καταλάσης των ερυθροκυττάρων στο αίμα των υδατοσφαιριστιών. Η πρώτη στήλη απεικονίζει τις μετρήσεις κατά την έναρξη της προετοιμασίας και η δεύτερη κατά την έναρξη του πρωταθλήματος.

3.7 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Κατά την έναρξη της προετοιμασίας των υδατοσφαιριστριών η μέση τιμή της TAC είναι 1.03 mmol DPPH/L (πλάσματος) με ένα τυπικό σφάλμα ± 0.03 . Η μέτρηση του ίδιου δείκτη κατά την έναρξη του πρωταθλήματος, φανερώνει ότι η μέση τιμή της TAC μειώθηκε στατιστικά σημαντικά στα 0.77 DPPH/L με ένα τυπικό σφάλμα ± 0.02 .



Γράφημα 3B. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων στο αίμα των υδατοσφαιριστριών. Η πρώτη στήλη απεικονίζει τις μετρήσεις κατά την έναρξη της προετοιμασίας και η δεύτερη κατά την έναρξη του πρωταθλήματος.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν να εξετάσει εάν η προπονητική επιβάρυνση των αθλητριών υδατοσφαίρισης υψηλού επιπέδου κατά την περίοδο βασικής προετοιμασίας είναι ικανή να προκαλέσει αλλαγή της οξειδοαναγωγικής κατάστασης και να αυξήσει συγκεκριμένους δείκτες οξειδωτικού στρες του αίματος των αθλητριών.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει μεταβολή σε ορισμένους δείκτες οξειδωτικού στρες κατά την περίοδο από την έναρξη της προετοιμασίας ως την έναρξη του πρωταθλήματος του ετήσιου προπονητικού κύκλου. Συγκεκριμένα παρουσιάζεται πτώση στη συγκέντρωση της ανηγμένης (GSH) και της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) των ερυθροκυττάρων από την έναρξη της προετοιμασίας ως την έναρξη του πρωταθλήματος στις αθλήτριες υδατοσφαίρισης. Ωστόσο, ο λόγος της GSH προς την GSSG αυξάνεται λίγο αλλά όχι σημαντικά κατά την έναρξη του πρωταθλήματος. Μη στατιστικά σημαντική αύξηση παρατηρείται και στις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των TBARS κατά την έναρξη του πρωταθλήματος. Από την άλλη σημαντική αύξηση παρατηρείται στη συγκέντρωση της καταλάσης, ενώ μείωση παρατηρείται στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος κατά την έναρξη του πρωταθλήματος.

Η σύγκριση με άλλες μελέτες απέδειξε ότι η άσκηση δεν έχει πάντα τον ίδιο αντίκτυπο στο οξειδωτικό στρες σε όλα τα άτομα, είτε γιατί τα άτομα αυτά διαφέρουν ηλικιακά, είτε γιατί ο οργανισμός τους έχει διαφορετικό τρόπο προσαρμογής όσον αφορά το αντιοξειδωτικό του σύστημα. Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο είναι ότι το είδος της άσκησης καθορίζει σε μεγάλο βαθμό αν επέλθει παραγωγή ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια οξειδωτικό στρες, επηρεάζει το μέγεθός του καθώς και τη διάρκειά του.

Οι δύο μελέτες (Kabasakalis et al, 2009; Cavas L, Tarhan L., 2004) είναι και οι πιο συναφείς με την παρούσα εργασία για το είδος της άσκησης διότι αναφέρονται στην κολύμβηση. Η διαφοροποίησή τους έγκειται στο γεγονός ότι μελετήθηκαν παιδιά ηλικίας 10-13 ετών και προφανώς ο οργανισμός του έχει άλλη προσαρμογή στο οξειδωτικό στρες σε σχέση με αυτόν των ενηλίκων. Παρόλα αυτά η άσκηση ήταν χρόνια και τα αποτελέσματα των μετρήσεων των όμοιων δεικτών (GSH, GSSG, TAC, CAT, TBARS) φάνηκαν χρήσιμα για τη σύγκριση με τα αποτελέσματα των μετρήσεων στις υδατοσφαιρίστριες. Ομοιότητα στα αποτελέσματα παρουσίασε μόνο

ο λόγος GSH/GSSG της μελέτης των Kabasakalis et al, ο οποίος εμφάνισε μια μικρή αύξηση. Η μελέτη των Canas L, Tarhan L. δείχνει ομοιότητες στην αύξηση των TBARS και αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η αύξηση στη συγκέντρωση της καταλάσης που έδωσαν τα αποτελέσματα της εργασίας μας. Ωστόσο, επειδή η μελέτη αυτή ερεύνησε τη δράση μετάλλων και βιταμινών, είναι εύλογο το γεγονός ότι στα δείγματα που λήφθηκαν από παιδιά στα οποία χορηγήθηκαν τα συμπληρώματα αυτά, το οξειδωτικό στρες να μην είναι ιδιαίτερα αυξημένο. Αυτό είναι φυσική συνέπεια των βιταμινών και των μετάλλων που ως γνωστό είναι αντιοξειδωτικά μέσα. Φάνηκε ότι τα συμπληρώματα αυτά μειώνουν τον καρδιακό και μυϊκό κάματο, ενώ ενδυναμώνουν τα αντιοξειδωτικά επίπεδα του οργανισμού μετά από ένα μήνα κολύμβησης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης του Bloomer και των συνεργατών του δείχνουν ότι 30 λεπτά αερόβιας και αναερόβιας άσκησης, που επιτελείται από νεαρά γυμνασμένα άτομα, μπορούν να: α) αυξήσουν τους δείκτες του οξειδωτικού στρες στο αίμα, β) να επηρεάσουν ξεχωριστά τους δείκτες αυτούς και γ) να οδηγήσουν σε μια διαφορετικής έκτασης οξείδωση στα μακρομόρια που έχουν μελετηθεί. Συγκεκριμένα, παρουσιάστηκε μια μικρή αύξηση στα πρωτεϊνικά καρβονύλια παρόμοια με την αύξηση των δικών μας μετρήσεων. Ομοιότητα παρατηρήθηκε και στην παροδική μείωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.

Στη μελέτη των Fatouros et al, που έγινε σε παίκτες ποδοσφαίρου, υποδηλώνεται ότι το οξειδωτικό στρες αυξάνεται μετά από έναν ποδοσφαιρικό αγώνα, πιθανόν λόγω της σφοδρής απόκρισης στη φλεγμονή που επέρχεται από το μυϊκό κάματο και συνοδεύεται από μια έκδηλη μείωση της αναερόβιας λειτουργίας για 72 ώρες. Τα αποτελέσματα δείχνουν αύξηση στις συγκεντρώσεις των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της καταλάσης, όμοια με τα αποτελέσματα στους ίδιους δείκτες της εργασίας μας.

Η σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων καθώς και της οξειδωμένης και ανηγμένης γλουταθειόνης μεταξύ της υδατοσφαίρισης και της γενικής αερόβιας άσκησης, εμφανίζουν παρεμφερείς τιμές και αλλαγές. Παρόλο αυτά δεν βρέθηκε κάποια μελέτη μέτρησης οξειδωτικών δεικτών όσον αφορά το άθλημα της υδατοσφαίρισης ώστε να συγκρίνουμε επακριβώς την επίδραση της άσκησης στους δείκτες οξειδωτικού στρες που εμείς μελετήσαμε.

Οι αθλήτριες που εξετάσθηκαν, κατά την έναρξη της προετοιμασίας εκτέλεσαν άσκηση χαμηλής έντασης αλλά μεγαλύτερης διάρκειας, ενώ κατά την έναρξη του πρωταθλήματος η διάρκεια της άσκησης μειώθηκε καθώς αυξήθηκε η έντασή της. Έτσι λοιπόν μεγάλης έντασης άσκηση προκαλεί αύξηση του οξειδωτικού στρες. Το ίδιο συμπέρασμα βγήκε και από μία πιο πρόσφατη μελέτη (Munoz et al, 2010), που έγινε σε ποδηλατιστές, στην οποία τονίζεται ότι μικρής διάρκειας αλλά μεγάλης έντασης άσκηση οδηγεί σε πρόκληση οξειδωτικού στρες.

Επομένως, σε γενικές γραμμές η αερόβια άσκηση αυξάνει το οξειδωτικό στρες. Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τυχόν διαφοροποιήσεις είναι η ηλικία των ατόμων που υποβάλλονται στην άσκηση, η διάρκεια αυτής και η έντασή της. Οι παράγοντες αυτοί διαμορφώνουν και την προσαρμογή του αμυντικού αντιοξειδωτικού συστήματος κάθε ατόμου ξεχωριστά.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

5.1 Υπολογισμοί συγκεντρώσεων δεικτών οξειδωτικού στρες

5.1.1 Προετοιμασία ολικού αίματος

Βάζουμε περίπου 1 mL αίματος σε σωληνάρια με EDTA (αντιπηκτικό), το ανακινούμε και το τοποθετούμε στο ψυγείο ως τη χρησιμοποίησή του για τους αιματολογικούς προσδιορισμούς.

5.1.2 Συλλογή πλάσματος και ερυθροκυτταρικού αιμόλυματος

Συλλέγουμε το αίμα σε σωληνάρια falcon (15 mL) με 200 μl EDTA 7.5% και το ανακινούμε μερικές φορές (20 μL 7.5% EDTA για κάθε 1 mL αίματος). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1370 g, για 10 λεπτά, στους 4 °C. συλλέγουμε το υπερκείμενο (πλάσμα) και το χωρίζουμε σε φιαλίδια erpendorf, ανάλογα με τις μετρήσεις που ακολουθούν. Προσθέτουμε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρηση βρίσκονται στο κάτω μέρος του falcon. Ανακινούμε βίαια και φυγοκεντρούμε στα 4020 g, για 15 λεπτά, στους 4 °C. Στη συνέχεια συλλέγεται το υπερκείμενο που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι μεμβράνες των κυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου (10-20 μL). Το αιμόλυμα χωρίζεται σε erpendorf ανάλογα με τις μετρήσεις στις οποίες θα χρησιμοποιηθεί και διατηρείται στους -20 °C.

5.1.3 Καθαρισμός αιμόλυματος για τον προσδιορισμό της GSH και της GSSG

Προσθέτουμε 500 μL αιμόλυματος σε 500 μL 5% TCA σε erpendorf. Ανακινούμε σε vortex και φυγοκεντρούμε στα 28620 g (16000 rpm) για 5 λεπτά στους 5 °C. Συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 5% TCA με την αναλογία 300 μL αιμόλυματος / 90 μL 5% TCA ή 200 μL αιμόλυματος / 60 μL 5% TCA. Ανακινούμε στο vortex και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 28620 g (16000 rpm) για 5 λεπτά στους 5 °C. Το καθαρό υπερκείμενο μεταφέρεται σε erpendorf, 100 μL για την GSH και 50 μL για την GSSG και διατηρείται στους -20 °C.

5.1.4 Ανηγγεμένη γλουταθειόνη (GSH)

Phosphate buffer 67 mM (pH 7.95)

MB (KH₂PO₄): 136

MB (Na₂HPO₄): 178

Για να φτιάξουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 500 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 5.94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH ή HCl, 1N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.95.

DTNB (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο σε νερό

MB (DTNB): 396.35

MB (κιτρικό νάτριο): 294.10

Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH. Φτιάχνουμε πρώτα το διάλυμα κιτρικού νατρίου, διαλύοντας 0.2 g κιτρικού νατρίου σε 20 mL νερού και στη συνέχεια διαλύουμε σε αυτό 0.008 g DTNB.

Έπειτα προσθέτουμε τις ποσότητες των αντιδραστηρίων στα erpendorf σύμφωνα με το παρακάτω πίνακα:

	Τυφλό	Δείγμα
Posphate buffer 67 mM	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL	-
Αιμόλυμα	-	20 μL

Αναδεύουμε τα erpendorf και τα επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά. Η διατήρησή τους στο σκοτάδι έχει ως στόχο την πραγματοποίηση της αντίδρασης μεταξύ του DTNB και της GSH. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm.

Υπολογισμοί: Δραστικότητα της GSH (mmol/L) = $(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta\text{Abs}_{\text{τυφλού}} / 13.6) \times 262.6$, όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (20 μL) ($1010 / 20 = 50.5$), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2×1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μL αιμολ. / 500 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390 μL / 300 μL ή 260 μL / 200 μL) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10^2 , τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραίωση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

5.1.5 Οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG)

NaOH 1M

MB: 40

Διαλύουμε 4 g NaOH σε 100 mL νερού.

Phosphate buffer (143 mM Na-P, 6.3 mM EDTA, pH 7.5)

MB (Na_2HPO_4): 177.99

MB (NaH_2PO_4): 156.01

MB (EDTA): 372.24

Για να φτιάξουμε 475 mL phosphate buffer παίρνουμε 400 mL Na_2HPO_4 , 143 mM (10.18 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4/400$ mL H_2O) και προσθέτουμε 75 mL NaH_2PO_4 , 143 mM (1.67 g

NaH₂PO₄/75 mL H₂O). Το pH θα πρέπει να είναι περίπου στο 7.5. μετά διαλύουμε σε αυτά 1.11 g EDTA. Το pH θα πρέπει να μειωθεί στο 7.35. Το ανεβάζουμε στο 7.5 με προσθήκη NaOH.

Διάλυμα GSSG 10 μmol/L

MB: 612.6

Ζυγίζουμε 0.0061 g σκόνης GSSG και τα διαλύουμε σε 10 mL phosphate buffer. Αραιώνουμε 100 φορές με το phosphate buffer ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος της GSSG να είναι 10 μmol/L. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται την ημέρα του πειράματος. Καλύπτουμε το ποτήρι ζέσεως, μέσα στο οποίο βρίσκεται το διάλυμα, με αλουμινόχαρτο διότι είναι φωτοευαίσθητο, ώστε να αποφύγουμε τη φωτόλυση.

NADPH 3 mM

MB: 833.4

Διαλύουμε 0.015 g NADPH σε 6 mL phosphate buffer. Το βάζουμε σε ένα φιαλίδιο erpendorf και το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο για να αποφύγουμε τη φωτόλυση. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται την ημέρα του πειράματος.

DTNB 10 mM

MB: 396.3

Διαλύουμε 0.04 g DTNB σε 10 mL phosphate buffer. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται επίσης την ημέρα του πειράματος.

Έπειτα προσθέτουμε τις ποσότητες των αντιδραστηρίων σε erpendorf σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Τυφλό	Πρότυπο (0.75nmol/mL)	Δείγμα
Phosphate buffer	600 μL	600 μL	600 μL
NADPH	100 μL	100 μL	100 μL
DTNB	100 μL	100 μL	100 μL
Απεσταγμένο νερό	199 μL	124 μL	194 μL
GSSG	-	75 μL	-
Αιμόλυμα	-	-	5 μL

Αναδεύουμε τα erpendorf και επωάζουμε για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μεταφέρουμε το περιεχόμενό τους σε μία πλαστική κυψελίδα. Προσθέτουμε 1 μL αναγωγάσης της γλουταθειόνης, ανακινούμε τα erpendorf 2-3 φορές (χρησιμοποιώντας παραφίλμ) και μετράμε την απορρόφηση στα 412 nm για 70 δευτερόλεπτα. Από την ποσότητα της αναγωγάσης που υπάρχει στο φιαλίδιο του εργαστηρίου μεταφέρουμε όση χρειαζόμαστε σε ένα erpendorf, το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο και το διατηρούμε στον πάγο. Η GSSG μετατρέπεται σε GSH μέσω της αναγωγάσης και η αύξηση στην απορρόφηση κατά τη διάρκεια των 70 δευτερολέπτων οφείλεται στην αντίδραση μεταξύ της GSSG και του ενζύμου.

*Από την ποσότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης που υπάρχει στο φιαλίδιο μεταφέρουμε όση χρειαζόμαστε σε ένα erpendorf, το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο και το διατηρούμε στον πάγο.

Υπολογισμοί: Η συγκέντρωση της GSSG (mmol/L) = $\{[(Abs_{\text{δείγματος}} - \Delta Abs_{\text{τυφλού}}) \times 0.75] / [\Delta A_{\text{προτύπου}} - \Delta A_{\text{τυφλού}}] \times 936\} / 2/1000$, όπου το 936 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000 μL) προς τον όγκο του αιμόλυματος (5μL) ($1000/5 = 200$), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2×1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μL αιμολ./ 500 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390 μL/ 300 μL ή 260 μL/ 200 μL) που έγιναν από το TCA 5%, πολλαπλασιάζοντας με 0.9 για να λάβουμε υπόψη την αραίωση από το NaOH και το 2-vinyl pyridine στη διόρθωση του pH. Ακολούθως διαιρούμε με 2 για να συνυπολογίσουμε τη στοιχειομετρία της αντίδρασης οξείδωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης ($2 \text{ GSH} \rightarrow 1 \text{ GSSG}$) και διαιρούμε με 1000 για να μετατρέψουμε τα μL σε mmol. Το 0.75 είναι η συγκέντρωση του προτύπου.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSSG εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSSG που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων

Συγκέντρωση GSSG ανά g αιμοσφαιρίνης: GSSG (mmol/g Hb)

5.1.6 Ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Tris-HCl 200 mM (pH 7.4)

MB (Tris): 121.14

MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N]

Το Tris είναι συντομογραφία του τρισυδροξυμεθυλαμινομεθανίου και είναι κατάλληλο για τη δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH από 6.5 μέχρι 9.7. Για να φτιάξουμε ≈ 100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0.1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0.61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0.42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7.4.

Διάλυμα Na_2SO_4 (2 M) – TBA (55 mM)

MB (TBA): 144.1

MB (Na_2SO_4): 142.04

Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται την ημέρα του πειράματος. Ζυγίζουμε 11.36 g Na_2SO_4 και 0.32 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 40 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως. Το Na_2SO_4 χρησιμοποιείται σαν αφυδατικός παράγοντας.

TCA 35%

Ζυγίζουμε 35 g TCA και τα διαλύουμε σε απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

TCA 70%

Ζυγίζουμε 70 g TCA και τα διαλύουμε σε απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος να φτάσει τα 100 mL νερού (σε θερμοκρασία δωματίου).

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 mL) προσθέτουμε 100 μ L πλάσματος για τα δείγματα και 100 μ L απεσταγμένο νερό για το τυφλό. Προσθέτουμε 500 μ L TCA 35% και 500 μ L Tris-HCl και αναδεύουμε. Επωάζουμε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 1 mL Na_2SO_4 – TBA και επωάζουμε στους 95 $^{\circ}\text{C}$ για 45 λεπτά σε υδατόλουτρο που έχουμε ρυθμίσει πριν την έναρξη της διαδικασίας του πειράματος. Μεταφέρουμε τους σωλήνες στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 λεπτά. Κατόπιν, προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε. Μεταφέρουμε 1 mL σε erpendorf και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25 $^{\circ}\text{C}$ για 3 λεπτά. Τέλος, μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μ L από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει εκτός από το πλάσμα και στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Η ποσότητα αιμολύματος που χρησιμοποιείται είναι όση και αυτή του πλάσματος. Τα βήματα της μεθόδου παραμένουν ίδια. Η μόνη διαφοροποίηση έγκειται στους υπολογισμούς της συγκέντρωσης των TBARS στα ερυθροκύτταρα.

Υπολογισμοί: Η συγκέντρωση των TBARS ($\mu\text{mol/L}$) = $(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}) / 0.156 \times 31$, όπου το 31 είναι συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με το όγκο του πλάσματος (100 μL) ($3100/100 = 31$). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της μαλονδιαλδεΐδης (MDA) που είναι το 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να ετατραπούν τα mol/L σε $\mu\text{mol/L}$.

*Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L .

5.1.7 Πρωτεϊνικά καρβονόλια

Διάλυμα HCl 2.5 N

MB (HCl): 36.46 (stock 37%, 10.1 N)

Για να φτιάξουμε 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (ίσο με 10.1 N HCl) σε ≈ 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνοθμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2.5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του 37% είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

DNPH 14 mM (MB: 198.1)

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0.2833 g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα την ημέρα του πειράματος. Όταν ετοιμαστεί, καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Για κάθε δείγμα φτιάχνουμε και ένα τυφλό. Από το διάλυμα του DNPH απαιτούνται 0.5 mL για κάθε δείγμα.

Ουρία 5 M (pH 2.3) (MB: 60.06)

Για να φτιάξουμε 100 mL 5 M ουρίας (pH 2.3, το οποίο ρυθμίζεται με 2 N HCl), διαλύουμε 30 g ουρίας σε ≈ 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL απεσταγμένο νερό.

Σε 50 μ L πλάσματος προσθέτουμε 50 μ L 20% TCA σε eppendorf και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του). Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Το TCA (τριχλωροοξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA. Στη συνέχεια, επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCl) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCl για τα τυφλά. Διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5

λεπτά στους 4 °C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1 mL TCA 10%, αναδεύουμε και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v). Αναδεύουμε στο vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναλαμβάνουμε το ξέπλυμα με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα καθώς και την φυγοκέντρωση μετά από αυτό, δύο φορές. Προσθέτουμε 1 mL ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4 °C. Τέλος, μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 μL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

Η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει εκτός από το πλάσμα και στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται είναι στην ποσότητα του αιμολύματος (50 μL αραιωμένα 1/10 σε αντίθεση με το πλάσμα που δεν υπάρχει αραιώση) και στους υπολογισμούς της συγκέντρωσης των καρβονυλίων στα ερυθροκύτταρα.

Υπολογισμοί: Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων: (nmol/mL) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000/50$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000 μL στην κυψελίδα/50 μL δείγματος).

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανά πρωτεΐνη πλάσματος μπορεί να γίνει μέσω της εξίσωσης:

Συγκ. πρωτ. καρβ. (nmol/mg) – συγκ. πρωτ. καρβ. nmol/mL / συγκ. πρωτεΐνης mg/mL

Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70 mg/mL

5.1.8 Καταλάση (CAT)

Phosphate buffer 67 mM (pH 7.4)

MB (KH₂PO₄): 136

MB (Na₂HPO₄): 178

Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε πρώτα 100 mL KH₂PO₄ (67 mM) και 400 mL Na₂HPO₄ (67 mM). Για το KH₂PO₄ ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na₂HPO₄ ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl 1N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂)

Το διάλυμα H₂O₂ είναι έτοιμο προς χρήση.

Έπειτα προσθέτουμε τις ποσότητες των αντιδραστηρίων σε πλαστικούς κυλίνδρους σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2991 μL
Αιμόλυμα αραιωμένο	4 μL

Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 οC για 10 λεπτά. Κατόπιν, μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε μία κυψελίδα για μέτρηση στο υπεριώδες (UV). Τέλος, προσθέτουμε 3 μL 30% H₂O₂ στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί: Δραστηκότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = $\Delta Abs_{\text{δείγματος}} \text{ per min} / 40$ x (750 x 1000 x 2) / συγκ. Hb (mg/mL), όπου το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/L. Το 750 είναι ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μL) (3000/4 = 750), το 10 προκύπτει από την αραιώση 1:10 αραιώση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

Ο υπολογισμός της δραστηριότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση των TBARS που υπολογίστηκε προηγουμένως ($\mu\text{mol/L}$). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με 10×2 , τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

$\Delta\text{Abs (min)}$ = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι 16 mM.

$$U = \mu\text{mol/min}$$

Η $\Delta\text{Abs}_{\text{τυφλού}}$ είναι πάντα μηδέν οπότε δεν χρειάζεται να υπολογιστεί.

5.1.9 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4)

MB (KH_2PO_4): 136

MB (Na_2HPO_4): 178

Για να φτιάξουμε ≈ 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH_2PO_4 (10 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (10 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 0.712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε ≈ 350 mL Na_2HPO_4 και προσθέτουμε το KH_2PO_4 μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.

DPPH 0.1 mM, MB: 394.32

Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται την ημέρα του πειράματος. Διαλύουμε 0.02 g DPPH σε 5 mL μεθανόλης και τα αναμιγνύουμε με μαγνητάκι (10 mM). Μετά αραιώνουμε 100 φορές με μεθανόλη και τα αναμιγνύουμε ξανά με μαγνητάκι. Για παράδειγμα, αραιώνουμε 200 μL του 10 mM διαλύματος του DPPH σε 19.8 mL μεθανόλης. Εξαιτίας της αραιώσης, ο αρχικός όγκος των 5 mL είναι πάντα αρκετός για πολλούς προσδιορισμούς. Καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο το ποτήρι ζέσεως στο οποίο φτιάχνουμε το DPPH για να αποφύγουμε τη φωτόλυση.

Ασκορβικό οξύ 10 mM

Το διάλυμα αυτό είναι έτοιμο προς χρήση.

Έπειτα προσθέτουμε τις ποσότητες των αντιδραστηρίων στα erpendorf σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Τυφλό	Θετικός έλεγχος	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	495 μL	480 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL	500 μL
Ασκορβικό οξύ	-	5 μL	-
Ορός	-	-	20 μL

Ανακινούμε τα erpendorf μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25 °C, ώστε να καταβυθιστούν σωματίδια που θα αυξήσουν την απορρόφηση. Μεταφέρουμε 900 μL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm.

Φυσιολογικά, η τιμή της απορρόφησης για το δείγμα που περιέχει το ασκορβικό οξύ (θετικός έλεγχος) θα πρέπει να είναι χαμηλότερη και από την τιμή των δειγμάτων αλλά και του τυφλού. Ο λόγος είναι η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος που έχουμε επιλέξει, καθώς είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο. Η τιμή της απορρόφησης των δειγμάτων θα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις τιμές απορρόφησης του τυφλού και του θετικού ελέγχου.

Υπολογισμοί: Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

1) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, π.χ.

$$\% \text{ Abs μείωση} = (\text{Abs}_{\text{τυφλού}} - \text{Abs}_{\text{δείγματος}}) / \text{Abs}_{\text{τυφλού}} \times 100$$

2) μmol DPPH που απομακρύνθηκαν /mL ορού = $[(\% \text{ μείωση} / 100) \times 50 \times 50] / 1000$,

όπου διαιρούμε με 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης, πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 μmol/L της κυψελίδας,

πολλαπλασιάζουμε ξανά με το 50 διότι η αραίωση του ορού στην κυψελίδα είναι 50πλάσια ($1000 \mu\text{L}$ στην κυψελίδα / $20 \mu\text{L}$ ορού του δείγματος στην κυψελίδα = 50), διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του ορού σε mL ορού.

Για παράδειγμα: αν η % μείωση της απορρόφησης είναι 20, τα μmol του DPPH που απομακρύνθηκαν / mL ορού είναι: $200 / 100 \times 50 \times 50 / 1000 = 0.5 \mu\text{mol DPPH}$ που απομακρύνθηκαν / mL ορού ή 0.5 mmol DPPH που απομακρύνθηκαν / L ορού ή 0.5 mmol DPPH/L .

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✚ Aguiló A, Tauler P, Fuentespina E, et al. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 2005; 84 (1): 1-7
- ✚ Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25 (2): 218-24
- ✚ Andrade FH, Reid MB, Allen DG, et al. Effect of hydrogen peroxide and dithiothreitol on contractile function of single skeletal muscle fibres from the mouse. *J Physiol* 1998; 509 (2): 565-75
- ✚ Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (9): 1260-7
- ✚ Applegate LA, Scaletta C, Panizzon R, et al. Evidence that ferritin is UV inducible in human skin: part of putative defense mechanism. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 159-63
- ✚ Arosio P, Levi S. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (4): 457-63
- ✚ Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* 1999, 27:936–944
- ✚ Arts MJTJ, Haenen GRMM, Wilms LC, et al. Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 1184-7
- ✚ Ashton T, Rowlands CC, Jones E, et al. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol* 1998; 77 (6): 498-502
- ✚ Ashton T, Young IS, Peters JR, et al. Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J Appl Physiol* 1999; 87 (6): 2032-6
- ✚ Athanasios Kabasakalis, Konstantinos Kalitsis, Michalis G. Nikolaidis, George Tsalis, Dimitris Kouretas, Dimitris Loupos, Vasilis Mougios. Redox, iron and nutritional status of children during swimming training. *Journal of Science and Medicine in Sport* 12 (2009) 691–696
- ✚ Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 1997; 272 (32): 19633-6
- ✚ Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272 (33): 20313-6
- ✚ Bigard AX. Le'sions musculaires induites par l'exercice et surentrainement. *Sci Sports* 2001; 16: 204-15

- ✚ Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, Mc Kenzie MJ, Consitt LA. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *The Journal of Strength & Conditioning Research*. 19(2):276-285, May 2005.
- ✚ Braun B, Clarkson PM, Freedson PS, et al. Effects of coenzyme Q10 supplementation on exercise performance, VO₂ max, and lipid peroxidation in trained cyclists. *Int J Sport Nutr* 1991; 1 (4): 353-65
- ✚ Buettner GR. The pecking order of free-radicals and antioxidants– Lipid-peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993, 300:535–543
- ✚ Cairo G, Recalcati S, Pietrangelo A, et al. The iron regulatory proteins: targets and modulators of free radical reactions and oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (12): 1237-43
- ✚ Cavas L, Tarhan L. Effects of vitamin-mineral supplementation on cardiac marker and radical scavenging enzymes, and MDA levels in young swimmers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2004 Apr;14(2):133-46
- ✚ Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49 (3): 481-93
- ✚ Chevion S, Moran DS, Heled Y, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 (9): 5119-23
- ✚ Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL, et al. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc* 1998; 30 (11): 1603-7
- ✚ Chung WY, Chung JKO, Szeto YT, et al. Plasma ascorbic acid: measurement, stability and clinical utility revisited. *Clin Biochem* 2001; 34: 623-7
- ✚ Clarkson PM. Antioxidants and physical performance. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 35: 131-41
- ✚ Coombes JS, Powers SK, Rowell B, et al. Effects of vitamin E and α -lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1424-30
- ✚ Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2002; 30 (2): 280-5
- ✚ Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem* 2001; 1 (6): 569-90
- ✚ Crane FL. Biochemical functions of coenzyme Q10. *J Am Coll Nutr* 2001; 20 (6): 591-8
- ✚ Criswell D, Powers S, Dodd S, et al. High intensity training induced changes in skeletal muscle anti-oxidant enzyme activity. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25 (10): 1135-40

- ✚ Das KC, Lewis-Molock Y, White CW. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 713-26
- ✚ Davies KJA, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, et al. Uric acid-iron ion complexes: a new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 1986; 235: 747-54
- ✚ Deaton C, Marlin D. Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2003; 2:278-291.
- ✚ Dekkers JC, van Doornen LJ, Kemper HC. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise- induced muscle damage. *Sports Med* 1996; 21 (3): 213-38
- ✚ Depeint F, Gee JM, Williamson G, et al. Evidence for consistent patterns between flavonoids structures and cellular activities. *Proc Nutr Soc* 2002; 61 (1): 97-103
- ✚ Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 2001; 10: 125-40
- ✚ Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (11): 1102-15
- ✚ Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. The carotenoids as antioxidants– A review. *J Photochem Photobiol B* 1997, 41:189–200
- ✚ Erario MA, Gonzales S, Noriega GO, et al. Bilirubin and ferritin as protectors against hemin-induced oxidative stress in liver. *Cell Mol Biol* 2002; 48 (8): 877-84
- ✚ Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72 (S): 647-52
- ✚ Evans, W., Cannon, J., (1991). Metabolic effects of exercise induced muscle damage. In J. O. Holloszy (Ed.), *Exercise and sports sciences reviews* (pp. 99–125). Williams & Wilkins. Baltimore
- ✚ Fang YZ, Yang S, WU GY. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002, 18:872–879
- ✚ Fatouros IG, Chatzinikolaou A, Douroudos II, Nikolaidis MG, Kyparos A, Margonis K, Michailidis Y, Vantarakis A, Taxildaris K, Katrabasas I, Mandalidis D, Kouretas D, Jamurtas AZ. Time-Course of Changes in Oxidative Stress and Antioxidant Status Responses Following a Soccer Game. *J Strength Cond Res.* 2009 Dec 1.
- ✚ Fehrenbach E, Northoff H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev* 2001; 7: 66-89
- ✚ Frederiks WM, Bosch KS. The role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion damage of rat liver. *Histol Histopathol* 1995; 10: 111-6
- ✚ Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell* 2002; 1: 117-23

- ✚ Goldfarb AH. Nutritional antioxidants as therapeutic and pre-ventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol* 1999; 24 (3): 249-66
- ✚ Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20 (2): 55-9
- ✚ Greenwood NN, Earnshaw A: "Chemistry of the Elements", 2nd ed., Butterworth-Heinemann, 1997, p.633 ff.
- ✚ Griffiths HR, Lunec J. Ascorbic acid in the 21st century – More than a simple antioxidant. *Environ Toxicol Pharmacol* 2001, 10:173–182
- ✚ Grootveld M, Halliwell B. Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids: a potential index of free-radical reactions in vivo. *Biochem J* 1987; 243: 803-8
- ✚ Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003; 89: 14-20
- ✚ Gunther MR, Sampath V, Caughey WS. Potential roles of myoglobin autoxidation in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1999; 26 (11-12): 1388-95
- ✚ Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995, 41:1819–1828
- ✚ Halliwell B, Gutteridge J M.C. *Free radicals in biology and chemistry*. Oxford Science Publications, 1991.
- ✚ Halliwell B. Vitamin C: Antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Rad Res* 1996, 25:439–454
- ✚ Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. *Blood* 1998; 92: 3007-17
- ✚ Hellsten Y, Sjödén B, Richter EA, et al. Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am J Physiol* 1998; 274: E600-6
- ✚ Hellsten Y, Tullson PC, Richter EA, et al. Oxidation of urate in human skeletal muscle during exercise. *Free Radic Biol Med* 1997; 22 (1-2): 169-74
- ✚ Heunks LMA, Vina J, Van Herwaarden AV, et al. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol* 1999; 277: R1697-704
- ✚ Hoidal JR: "Reactive oxygen species and cell signaling", *Am J Respir Cell Mol. Biol.* 25:661-663, 2001
- ✚ Hooper DC, Scott GS, Zborek A, et al. Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J* 2000; 14: 691-8

- ✚ Hooper DC, Spitsin S, Kean RB, et al. Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalo- myelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 675-80
- ✚ Inal M, Akyu`z F, Turgut A, et al. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33 (4): 564-7
- ✚ Jackson MJ, O'Farrell S. Free radicals and muscle damage. *Br Med Bull* 1993; 49 (3): 630-41
- ✚ Jaesch, H., (1995) Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 209, 104–111.
- ✚ Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest*. 2002 62: 231-236
- ✚ Jenkins RR, Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med Sci Sport Exerc* 1993; 25 (2): 210-2
- ✚ Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156-70
- ✚ Ji LL, Fu R. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sport Exerc* 1993; 25 (2): 225-31
- ✚ Karlsson J. Radical Formation in Different Cells and Tissues.. In "Antioxidant and Exercise", *Human Kinetics* (1997). pp.69-89
- ✚ Kasai H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (4): 450-6
- ✚ Kaur H, Halliwell B. Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid: identification of uric acid oxidation products. *Chem-Biol Interactions* 1990; 73: 235-47
- ✚ Kean RB, Spitsin SV, Mikheeva T, et al. The peroxynitrite scavenger uric acid prevents inflammatory cell invasion into the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis through maintenance of blood-central nervous system barrier integrity. *J Immunol* 2000; 165: 6511-8
- ✚ Laursen PB. Free radicals and antioxidant vitamins: optimizing the health of the athlete. *Strength Cond J* 2001; 23 (2): 17-25
- ✚ Leewenburgh C, Hansen PA, Holloszy JO, et al. Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (1-2): 186-92
- ✚ Lenaz G, D'Aurelio M, Merlo Pich M, et al. Mitochondrial bioenergetics in aging. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1459: 397-404
- ✚ Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366 (1-2): 53-67

- ✚ Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (9): 790-6
- ✚ Linnane AW, Eastwood H: "Cellular redox regulation and prooxidant signaling system: A new perspective on the free radical theory of aging", *Ann NY Acad Sci* 1067:47-55, 2006
- ✚ Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, et al. Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 396-411
- ✚ Liu ML, Bergholm R, Makimattila S, et al. A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *Am J Physiol* 1999; 276 (6): E1083-91
- ✚ Lovlin R, Cottle W, Pyke I, et al. Are indices of radical damage related to exercise intensity? *Eur J Appl Physiol* 1987; 56: 313-6
- ✚ Ma YS, Stone WL, Leclair IO. The effects of vitamin C and urate on the oxidation kinetics of human low-density lipoprotein. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 206: 53-9
- ✚ Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. *Acta Physiol Scand* 2001; 171: 233-9
- ✚ Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 2001; 31 (7): 911-22
- ✚ May JM, Qu Z, Whitesell RR, et al. Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med* 1996; 20 (4): 543-51
- ✚ Meneghini R. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med* 1997; 23 (5): 783-92
- ✚ Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 1990;8:95-108
- ✚ Morand C, Crespy V, Manach C, et al. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am J Physiol* 1998; 275 (44): R212-9
- ✚ Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res* 1983; 24: 1070-6
- ✚ Munoz A, Olcina G, Timon R, Robles MC, Caballero MJ, Maynar M. Effect of different exercise intensities on oxidative stress markers and antioxidant response in trained cyclists. *J Sports Med Phys Fitness*. 2010 Mar;50(1):93-8
- ✚ Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 1999; 13:295-309
- ✚ Nikolaidis MG, Michailidis Y, Mougios V. Variation of soluble transferrin receptor and ferritin concentrations in human serum during recovery and exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003; 89: 500-2

- ✚ Nindl G: "Hydrogen Peroxide - From Oxidative Stressor to Redox Regulator", *Cellscience Reviews*, 1 (2), 2004
- ✚ Nohl H, Jordan W. The mitochondrial site of superoxide formation. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 138 (2): 533-9
- ✚ Nohl H, Kozlov AV, Gille L, et al. Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artifacts. *BiochemSoc Trans* 2003; 31 (6): 1308-11
- ✚ Ogonovszky, H., Sasvari, M., Dosek, A., Berkes, I., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Goto, S., Radak, Z. (2005). The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. *Canadian Journal of Applied Physiology*. 30: 186-195.
- ✚ Orino K, Lehman L, Tsuji Y, et al. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* 2001; 357: 241-7
- ✚ Packer L (ed), Academic Press, San Diego, *Oxidants and Antioxidants (Part A), Methods in Enzymology* (1999) Vol 299.
- ✚ Packer L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *J Sports Sci* 1997; 15 (3): 353-63
- ✚ Palazzetti S, Richard MJ, Favier A, et al. Overload training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol* 2003; 28 (4): 588-604
- ✚ Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, et al. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol* 2003; 89: 100-7
- ✚ Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63: 1035-42
- ✚ Pincemail J, Lecomte J, Castiau J, et al. Evaluation of autoantibodies against oxidized LDL and antioxidant status in top soccer and basketball players after 4 months of competition. *Free Radic Biol Med* 2000; 28 (4): 559-65
- ✚ Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 2000; 58: 1025-33
- ✚ Radak Z, Kaneko T, Tahara S, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (1-2): 69-74
- ✚ Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001; 90: 724-31
- ✚ Renke J, Popadiuk S, Korzon M, et al. Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthrosis. *Free Radic Biol Med* 2000; 29 (2): 101-4

- ✚ Rhee SG, Chang T-S, Bae YS, Lee S-R, Kang SW: "Cellular Regulation by Hydrogen Peroxide", *J Am Soc Nephrol* 14:S211-S215, 2003.
- ✚ Rhee SG: "Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling" *Science* 312:1882-1883, 2006.
- ✚ Richter C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids* 1987, 44:175-189
- ✚ Rimbach G, Hohler D, Fischer A, et al. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr* 1999; 52 (3): 203-22
- ✚ Rosen G.M., Britigan B.E., Halpern H.J. and Pou S., *Free Radicals. Biology and Detection by Spin Trapping*, Oxford University Press, New York, Oxford, 1999.
- ✚ Rosenfelt FL, Pepe S, Linnane A, et al. Coenzyme Q10 protects the aging heart against stress: studies in rats, human tissues, and patients. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 355-9
- ✚ Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, et al. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* 2000; 267: 4904-11
- ✚ Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996; 10: 709-20
- ✚ Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 653S-69S
- ✚ Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33 (3): 368-70
- ✚ Sevanian A, Davies KJA, Hochstein P. Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 1129S-34S
- ✚ Sjo"din B, Hellsten Westing Y, et al. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 1990; 10: 236-54
- ✚ Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 899: 191-208
- ✚ Sundaresan M, Yu Z-X, Ferrans VJ, et al: "Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signaling transduction", *Science* 270:296-299, 1995.
- ✚ Svensson M, Ekblom B, Cotgreave I, et al. Adaptative stress response of glutathione and acid uric metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiol Scand* 2002; 176: 43-56
- ✚ Svensson M, Malm C, Tonkonogi M, et al. Effect of Q10 supplementation on tissue Q10 levels and adenine nucleotide catabolism during high-intensity exercise. *Int J Sport Nutr* 1999; 9 (2): 166-80
- ✚ Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (1): 29-36

- ✚ Takanami Y, Iwane H, Kawai Y, et al. Vitamin E, supplementation and endurance exercise. *Sports Med* 2000; 29 (2): 73-83
- ✚ Tavazzi B, Di Pierro D, Amorini AM, et al. et al. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *Eur J Biochem* 2000; 267: 684-9
- ✚ Terentis AC, Thomas SR, Burr JA, et al. Vitamin E oxidation in human atherosclerotic lesions. *Circ Res* 2002; 90 (3): 333-9
- ✚ Tessier F, Margaritis I, Richard MJ, et al. Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27 (3): 390-6
- ✚ Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000; 16 (7-8): 716-8
- ✚ Thompson D, Williams C, Garcia-Roves P, et al. Post-exercise vitamin C supplementation and recovery from demanding exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003; 89: 393-400
- ✚ Thompson-Gorman SL, Zweier JL. Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *J Biol Chem* 1990; 265 (12): 6656-63
- ✚ Tiidus, P.M., (1998). Radical species in inflammation and overtraining. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 76: 533-8.
- ✚ Tonks NK: "Redox redux: revisiting PTPs (protein tyrosine phosphatase) and the control of cell signaling", *Cell* 121:667-670, 2006
- ✚ Tsopanakis C. and Tsopanakis A. Stress Hormonal Factors, Fatigue, and Antioxidant Responses to Prolonged Speed Driving. *Pharm. Biochem. Behav.* 60(3): 747-751 (1998)
- ✚ Tsopanakis A., Stalikas A., Sgouraki E. and Tsopanakis C. Stress Adaptation in Athletes: Relation of Lipoprotein Levels to Hormonal Response. *Pharm. Biochem. Behav.*, 48(2):377-382 (1994)
- ✚ Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 2005, 12:1161–1208
- ✚ Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, et al. Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defenses. *Free Radic Biol Med* 1997; 22 (3): 509-13
- ✚ Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T, et al. Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology* 2001; 7: 263-70
- ✚ Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (1): 1-14

- ✚ Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, et al. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 408-19
- ✚ Wedworth SM, Lynch S. Dietary flavonoids in atherosclerosis prevention. *Ann Pharmacother* 1995; 29 (6): 627-8
- ✚ Wei Y, Liu XM, Peyton KJ, Wang H, Johnson FK, Johnson RA, Durante W. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 Jul 22.
- ✚ Willcox JK, Catignani GL, Roberts LJ. Dietary flavonoids fail to suppress F2-isoprostane formation in-vivo. *Free Radic Biol Med* 2002; 34 (7): 795-9
- ✚ Witt EH, Reznick AZ, Viguie CA, et al. Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *J Nutr* 1992; 122 (3 Suppl.): 766-73
- ✚ www.caymaneurop.com/images/myeloperoxidaseAssayKits/figure1.jpg&imgrefurl
- ✚ www.el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%BF:Mitochondrial_electron_transport_chain%E2%80%944.svg
- ✚ www.geriatricsandaging.ca/fmi/xsl/article.xsl
- ✚ www.greenmagazine.gr/askitheite-kanei-kalo/
- ✚ www.sapphirebioscience.com/images/wallcharts/OXIS_Pathways_of_Oxidative_Stress_detail.jpg
- ✚ Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29 (2): 358-62
- ✚ Γιαννακοπούλου Ε. Οξειδωτικό στρες – αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί, κλινική σημασία. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* 2009 26(1):23-35