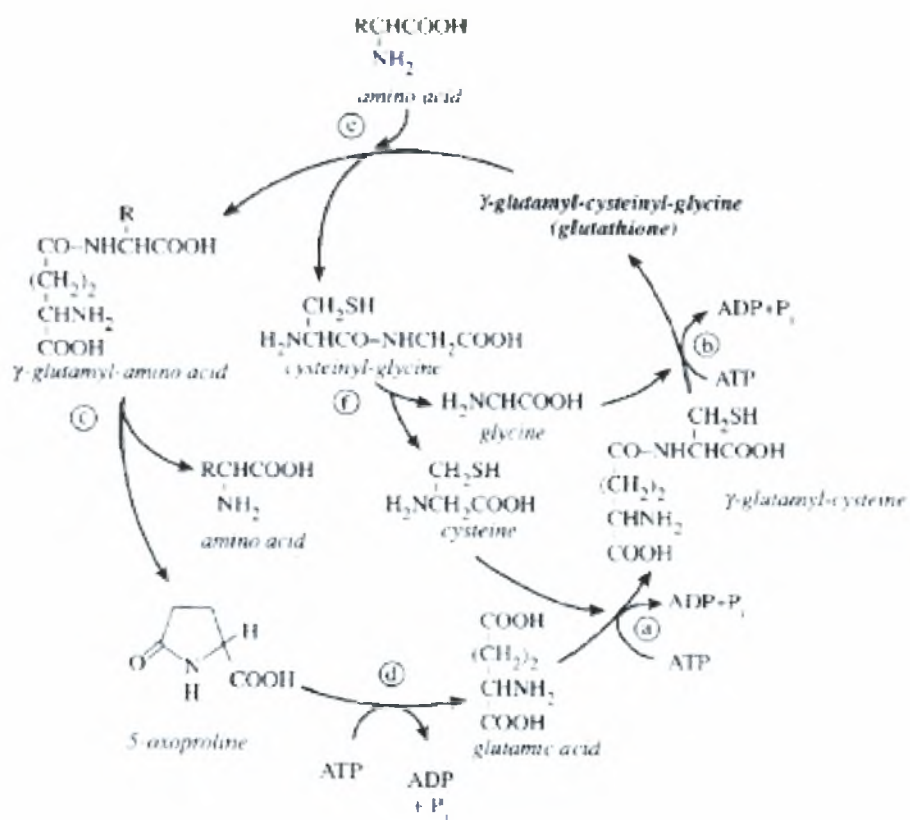


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
 ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
 ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΗΓΜΕΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΑΝΗΛΙΚΩΝ ΑΘΛΗΤΩΝ



ΣΑΜΑΡΑΣ ΛΕΩΝΙΔΑΣ



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

Αριθ. Εισ.: 4980/1

Ημερ. Εισ.: 14-11-2006

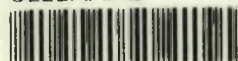
Δωρεά: Π.Θ.

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2006

ΣΑΜ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



00400008775 1

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες προς τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κουρέτα που μου έδωσε την δυνατότητα να ασχοληθώ με ένα τόσο σημαντικό και ενδιαφέρον θέμα.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Μιχάλη Νικολαΐδη για την αμέριστη βοήθεια, καθοδήγηση και υπομονή του αλλά και για τις ενδεδειγμένες και ουσιαστικές παρατηρήσεις του καθ'όλη την διάρκεια της διεκπαιρέσεως της διπλωματικής μου εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αντώνη Κυπάρο για τις πολύ χρήσιμες επιστημονικές συμβουλές όπως επίσης και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου.

Θα ήτανε μέγιστη παράλειψη μου εάν δεν ευχαριστούσα τις φίλες και συναδέλφους Πάνου Νεράϊδα και Χατζηϊωάννου Μαρίνα για την ανιδιοτελή συνεισφορά τους αλλά και για την αρμονική και ευχάριστη συνεργασία.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

7	ΠΕΡΙΛΗΨΗ
8	ΕΙΣΑΓΩΓΗ/ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ
9	ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS) – ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΑΖΩΤΟΥ (RNS)
10,11,12	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ
12,13	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ ΤΩΝ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΑΠΟ ROS ΚΑΙ RNS (Βλάβες στο πυρηνικό και στο μιτοχονδριακό DNA)
13	Βλάβες στις πρωτεΐνες και στα αμινοξέα
14	Υπεροξειδωση των λιπιδίων
15	ROS, ασθένειες και γήρανση
16	ΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥΣ (Ενζυμικά αντιοξειδωτικά/ Διομοτάση του υπεροξειδίου[SOD])
17	Καταλάση (CAT)
18	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-PX), Ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GR)
19	Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά/ Βιταμίνη C
20	Βιταμίνη E
21	Ουρικό οξύ/ Μελατονίνη/ α-λιποϊκό οξύ
22	Συνένζυμο Q-10, Καροτενοειδή, Φλαβονοειδή
23	Γλουταθειόνη (GSH)
24	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ
24, 25, 26	ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΑΣΚΗΣΗ
27	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ/ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ/ Ποσοτικός προσδιορισμός GSH
28,29	Ποσοτικός προσδιορισμός GSSG
30	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (GSH, GSSG)

31	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (GSH/GSSG)
32	ΣΥΖΗΤΗΣΗ
33	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ
34, 35	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## ΕΙΚΟΝΕΣ

1	Απώλεια ηλεκτρονίου σθένους από άτομο οξυγόνου με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ελεύθερης ρίζας (Από <a href="http://www.healingdaily.com/conditions/free-radicals.htm">http://www.healingdaily.com/conditions/free-radicals.htm</a> )
2	Οι reactive oxygen species μπορεί να είναι ρίζες ή μη ρίζες, ιόντα ή μόρια ((Από: Gabi Nindl, Cellscience Reviews, Vol 1, No 2, 2004)
3	Σχηματική απεικόνιση του καταλυτικού κύκλου του κυτοχρώματος P-450 (Από Richard C. Zangar, Dimitri R. Davydov, Seema Verma, Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P-450, Toxicology and Applied Pharmacology 199 316– 331, 2004)
4	Η δομή της NADPH οξειδάσης των ουδετερόφιλων (Από Wulf Droge, Free radicals in the physiological control of cell function, Phsiol Rev., Vol.82, January 2002)
5	Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει την αντίδραση μετατροπής της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ (Από Ling Li, Free radicals in Biology and Medicine, 77:222, 2001)
6	Αντίδραση της υδροξυλικής ρίζας με την γουανίνη από την οποία προκύπτει η 8-υδροξυγουανίνη (Από M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress - induced cancer, Chemico- Biological interactions, 1-40, 2006)
7	Η υπεροξειδωση των λιπιδίων (Από <a href="http://www.ehponline.org/members/1998/106p375-384kelly/kelly-full.html">http://www.ehponline.org/members/1998/106p375-384kelly/kelly-full.html</a> )
8	ROS, οξειδωτικές βλάβες, ασθένειες και γήρανση (Από <a href="http://www.google.com/Εικόνες/ROS and aging">www.google.com/Εικόνες/ROS and aging</a> )
9	Προτεινόμενος καταλυτικός μηχανισμός της κυτταροπλασματικής SOD (Από Lubert Stryer, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2 <sup>η</sup> έκδοση, 1997, σελ. 445)
10	Τρισδιάστατη δομή της καταλάσης στην <i>E. Coli</i> (Από <a href="http://www.genomenewsnetwork.org/articles/08_01/Catalase_snp.shtml">http://www.genomenewsnetwork.org/articles/08_01/Catalase_snp.shtml</a> )
11	Προτεινόμενος καταλυτικός μηχανισμός της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Από Lubert Stryer, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2 <sup>η</sup> έκδοση, 1997, σελ. 647)
12	Σχηματικό διάγραμμα των δομικών περιοχών της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης (Από Lubert Stryer, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2 <sup>η</sup> έκδοση, 1997, σελ. 462)
13	Η δομή του ασκορβικού οξέος (Από <a href="http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/vit_0264.shtml">http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/vit_0264.shtml</a> )
14	Η δομή της α-τοκοφερόλης
15	Αντίδραση της βιταμίνης E με ρίζα
16	Χημική δομή του ουρικού οξέος (Από <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/Uric_acid">http://en.wikipedia.org/wiki/Uric_acid</a> )
17	Χημική δομή της μελατονίνης (Από <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/Melatonin">http://en.wikipedia.org/wiki/Melatonin</a> )
18	Οι χημικές δομές των ALA και DHLA (Από M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress - induced cancer, Chemico- Biological interactions, 1-40, 2006)

19	Χαρακτηριστικές δομές καρτενοειδών (Από M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress - induced cancer, Chemico- Biological interactions, 1-40, 2006)
20	Οι δομές της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης (Από M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress - induced cancer, Chemico- Biological interactions, 1-40, 2006)
21	Οξείδωση και αναγωγή της γλουταθειόνης (Από Susan M. Deneke, Barry L. Fanburg, Regulation of cellular glutathione, American Physiological society, 1989)

## ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

1	Διάγραμμα 1. Ραβδόγραμμα σύγκρισης της GSH στα αγόρια και στα κορίτσια
2	Διάγραμμα 2. Ραβδόγραμμα σύγκρισης της GSSG στα αγόρια και στα κορίτσια
3	Διάγραμμα 3. Ραβδόγραμμα σύγκρισης του λόγου GSH/GSSG στα αγόρια και στα κορίτσια

## ΠΙΝΑΚΕΣ

1	Πίνακας 1. Χρόνοι ημίσειας ζωής ορισμένων ελευθέρων ριζών
2	Πίνακας 2. Ρίζες και μη ρίζες που ανήκουν στις δραστικές ενώσεις αζώτου
3	Πίνακας 3. Ποσότητες των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για τον προσδιορισμό της GSSG

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AA - ασκορβικό οξύ  
AH - α-τοκοφερόλη  
ALA - α-λιποϊκό οξύ  
ATP - τριφωσφορική αδενοσίνη  
CAT - καταλάση  
CoQ10 - συνένζυμο Q10  
DHA - διϋδροασκορβικό οξύ  
DHHA - διυδρολιποϊκό οξύ  
DTNB - 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)  
EDTA - αιθυλενοδιάμινο τετραοξικό οξύ  
FAD - φλάβινο-αδένινο δινουκλεοτίδιο  
GPX - υπεροξειδάση της γλουταθειόνης  
GRX - ρεδουκτάση της γλουταθειόνης  
GSH - ανηγμένη μορφή γλουταθειόνης  
GSSG - οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης  
HPLC - υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης  
IL-6 - ιντερλευκίνη 6  
NADPH - φωσφορικό νικοτινάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο  
PMN - πολυμορφοουδετερόφιλα  
PUFAs - πολυακόρεστα λιπαρά οξέα  
RNS - δραστικές ενώσεις αζώτου  
ROS - δραστικές ενώσεις οξυγόνου  
SOD - δισμουτάση του υπεροξειδίου  
TCA - τριχλωροοξικό οξύ  
XOD - οξειδάση της ξανθίνης



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φαινόμενο του οξειδωτικού στρες έχει γίνει αντικείμενο μεγάλου αριθμού επιστημονικών ερευνών. Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται το αποτέλεσμα της υπερίσχυσης των προοξειδωτικών ουσιών έναντι των αντιοξειδωτικών που οδηγεί σε κυτταρικές βλάβες που οφείλονται στην δράση των ελευθέρων ριζών και που πολλές φορές είναι μη αναστρέψιμες. Η αναγκαιότητα της αντιμετώπισης των ελευθέρων ριζών γίνεται μεγαλύτερη λαμβάνοντας υπόψιν την συσχέτιση της δράσης τους με την παθογένεση διαφόρων ασθενειών μερικές εκ των οποίων είναι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, ο καρκίνος και ορισμένες καρδιαγγειακές νόσοι. Η αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών γίνεται με σωστή και ισορροπημένη διατροφή και κυρίως με την άσκηση. Η άσκηση ενισχύει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού αλλά ταυτόχρονα παράγει ελεύθερες ρίζες. Αυτή άλλωστε η ιδιαιτερότητα της άσκησης καθιστά ενδιαφέρουσα την συσχέτιση της άσκησης με το οξειδωτικό στρες και αιτιολογεί την πληθώρα των επιστημονικών ερευνών που αφορούν αυτό το θέμα. Στην συγκεκριμένη έρευνα μελετήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα παιδιών που ασχολούνται συστηματικά με την κολύμβηση πριν και μετά την άσκηση κι'αυτό έγινε μετρώντας δείκτες του οξειδωτικού στρες όπως η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) και η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH). Η άσκηση προκάλεσε σημαντικές μεταβολές στους δείκτες του οξειδωτικού στρες που μετρήθηκαν και απ'ότι αποδείχθηκε το φύλο δεν επηρεάζει την επίδραση της άσκησης στους δείκτες του οξειδωτικού στρες με συνέπεια τόσο στα αγόρια όσο και στα κορίτσια να παρατηρούνται σχεδόν οι ίδιες μεταβολές. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά την άσκηση μειώθηκε η GSH, αυξήθηκε η GSSG και συνεπώς μειώθηκε η αναλογία GSH/GSSG με στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο στα αγόρια όσο και στα κορίτσια.

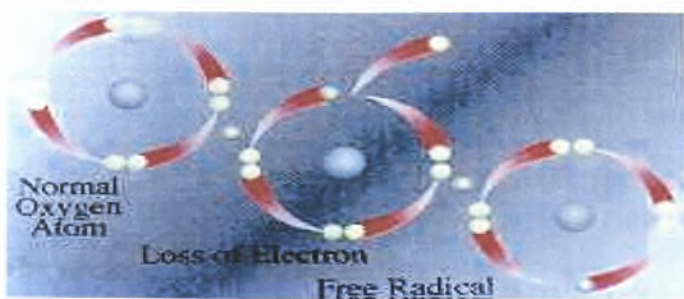
## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε χημικό είδος που διαθέτει περιττό αριθμό ηλεκτρονίων σθένους και επομένως διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα [1]. Μια τέτοια ηλεκτρονιακή δομή είναι εξαιρετικά ασταθής με συνέπεια το συγκεκριμένο μόριο ή άτομο να αντιδρά με άλλα μόρια ή άλλες ρίζες [2]. Το ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθείς δομές εξηγεί και τους μικρούς χρόνους ημιζωής τους (Πίνακας 1). Η αυξημένη δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών οφείλεται στην πρόκληση αλυσιδωτών αντιδράσεων εξαιτίας της μεταπήδησης των ηλεκτρονίων μεταξύ διαφόρων μορίων (εικόνα 1) [2]. Καθίσταται λοιπόν σαφές ότι από την δράση μιας ελεύθερης ρίζας μπορούν να προκύψουν πολλές άλλες διαφορετικές ρίζες. Επίσης, αν δύο ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν μεταξύ τους, ζευγαρώνουν τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια τους με αποτέλεσμα να πάνε να υφίστανται ως ρίζες. Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που διαθέτει ένα μόνο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο.

Species	Symbol	Half-Life at 37°C, s
Superoxide	$O_2^{\bullet}$	$1 \times 10^{-6}$
Hydroxyl	$\bullet OH$	$1 \times 10^{-9}$
Alkoxy	$RO\bullet$	$1 \times 10^{-6}$
Peroxy	$ROO\bullet$	$1 \times 10^{-2}$
Singlet oxygen	$O_2$	$1 \times 10^{-6}$
Molecular oxygen	$O_2$	$> 10^2$

Πίνακας 1. Χρόνοι ημίσειας ζωής ορισμένων ελευθέρων ριζών (Από Florence, T.M., Free radicals, antioxidants and cancer prevention. Proc. Nutr. Soc. Aust. Annu. Conf. 15: 88-93, 1990).

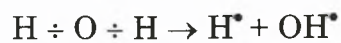


Εικόνα 1. Απόλεια ηλεκτρονίου σθένους από άτομο οξυγόνου με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ελεύθερης ρίζας (Από <http://www.healingdaily.com/conditions/free-radicals.htm>).

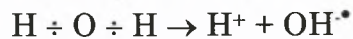
Οι αντιδράσεις μέσω των οποίων μπορεί να προκύψει μια ελεύθερη ρίζα είναι οι ακόλουθες :

1. Απόλεια ενός ηλεκτρονίου από μια μη ρίζα  $X \rightarrow e^- + X^{\bullet+}$
2. Απόκτηση μονήρους ηλεκτρονίου από μια μη ρίζα  $Y + e^- \rightarrow Y^{\bullet-}$

3. Ομολυτική διάσπαση



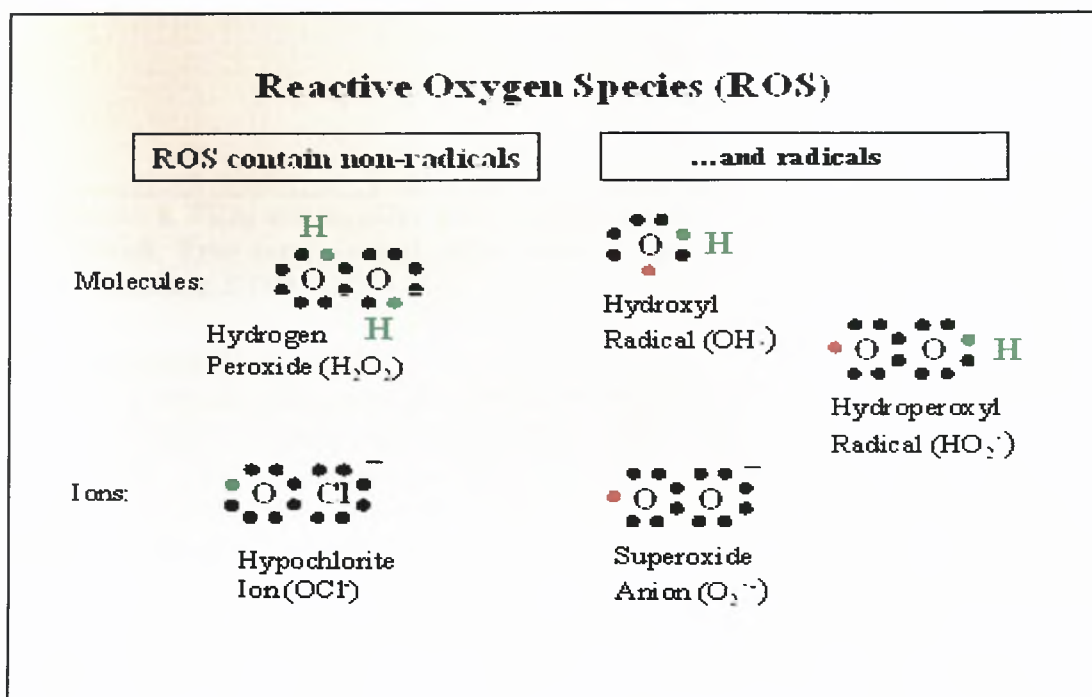
4. Ετερολυτική διάσπαση



Η ομολυτική διάσπαση περιλαμβάνει συμμετρική κατανομή των ηλεκτρονίων που προκύπτουν από διάσπαση του ομοιοπολικού δεσμού ενώ στην ετερολυτική διάσπαση συνβαίνει μη συμμετρική κατανομή των δεσμικών ηλεκτρονίων [3].

### Reactive oxygen species (ROS) – Δραστικές ενώσεις οξυγόνου

Ο όρος reactive oxygen species (ROS) χρησιμοποιείται πολύ συχνά στην βιβλιογραφία και περιλαμβάνει όχι μόνο τις προερχόμενες από το οξυγόνο ρίζες αλλά και παράγωγα του που δεν αποτελούν ρίζες, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ), το υποβρωμιώδες οξύ ( $HOBr$ ), το όζον ( $O_3$ ) και το Singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) [4]. Το ανιόν του υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) είτε προερχόμενο από μεταβολικές διαδικασίες είτε προερχόμενο από την δράση διαφόρων ειδών ακτινοβολίας στο μοριακό οξυγόνο, θεωρείται το πρωτογενές ROS από την αντίδραση του οποίου με άλλα μόρια προκύπτουν τα δευτερογενή ROS είτε αμέσως είτε εμμέσως μέσω ενζυμο ή μέταλλο-καταλυόμενων αντιδράσεων[5].



Εικόνα 2. Οι reactive oxygen species μπορεί να είναι ρίζες ή μη ρίζες, ιόντα ή μόρια ((Από: Gabi Nindl, Cellscience Reviews, Vol 1, No 2, 2004).

### Reactive nitrogen species (RNS) – Δραστικές ενώσεις αζώτου

Ο όρος reactive nitrogen species (RNS) χρησιμοποιείται επίσης πολύ συχνά και περιλαμβάνει μόρια ή ιόντα που προέρχονται από το άζωτο και μπορεί να είναι ρίζες ή μη ρίζες. Οι δραστικές ενώσεις αζώτου είναι λιγότερο δραστικές σε σχέση με τις δραστικές ενώσεις οξυγόνου. Για παράδειγμα, το νιτρικό ανιόν αντιδρά με πολύ λίγα μόρια, ενώ η υδροξυλική ρίζα αντιδρά σχεδόν με όλα τα μόρια. Στις δραστικές ενώσεις αζώτου ανήκουν το νιτρώδες οξύ ( $HNO_2$ ), το νιτρικό ανιόν ( $NO^-$ ), το νιτρικό κατιόν ( $NO^+$ ), το τριοξειδίο του αζώτου ( $N_2O_3$ ) και το τετροξειδίο του αζώτου ( $N_2O_4$ ) [4]. Το πιο

διαδεδομένο RNS είναι το μονοξειδίο του αζώτου ( $\text{NO}\cdot$ ) που παράγεται στους ιστούς χάρη στην δράση εξειδικευμένων συνθασών μονοξειδίου του αζώτου (NOSs) οι οποίες μεταβολίζουν την αργινίνη σε κιτρουλλίνη [4]. Το μονοξειδίο του αζώτου ( $\text{NO}\cdot$ ) συμμετέχει σε πολλές σημαντικές βιολογικές διαδικασίες μια εκ των οποίων είναι η ρύθμιση της πίεσης του αίματος, συμμετέχει σε μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού ενώ δρά και ως νευροδιαβιβαστής [4]. Δεν είναι τυχαίο ότι το 1992 χαρακτηρίστηκε ως μόριο της χρονιάς από το περιοδικό Science [4]. Επίσης, το  $\text{NO}\cdot$  χαρακτηρίζεται από χρόνο ημιζωής μερικών δευτερολέπτων σε υδάτινο περιβάλλον ενώ σε περιβάλλον χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου ο χρόνος ημιζωής του αυξάνεται σε 15sec [4].

Reactive Nitrogen Species (RNS)	
<i>Radicals</i>	<i>Nonradicals</i>
Nitric oxide (nitrogen monoxide), $\text{NO}\cdot$	Nitrous acid, $\text{HNO}_2$
Nitrogen dioxide, $\text{NO}_2\cdot$	Nitrosyl cation, $\text{NO}^+$
	Nitroxyl anion, $\text{NO}^-$
	Dinitrogen tetroxide, $\text{N}_2\text{O}_4$
	Dinitrogen trioxide, $\text{N}_2\text{O}_3$
	Peroxynitrite, $\text{ONOO}^-$
	Peroxynitrous acid, $\text{ONOOH}$
	Nitronium (nitryl) cation, $\text{NO}_2^+$
	(e.g. as nitryl chloride, $\text{NO}_2\text{Cl}$ )
	Alkyl peroxynitrites, $\text{ROONO}$

Πίνακας 2. Ρίζες και μη ρίζες που ανήκουν στα δραστικά είδη αζώτου ( Από Barry Halliwell, Free radicals and other reactive species in disease, Encyclopedia of Life Sciences, 2001).

### Παραγωγή ελευθέρων ριζών

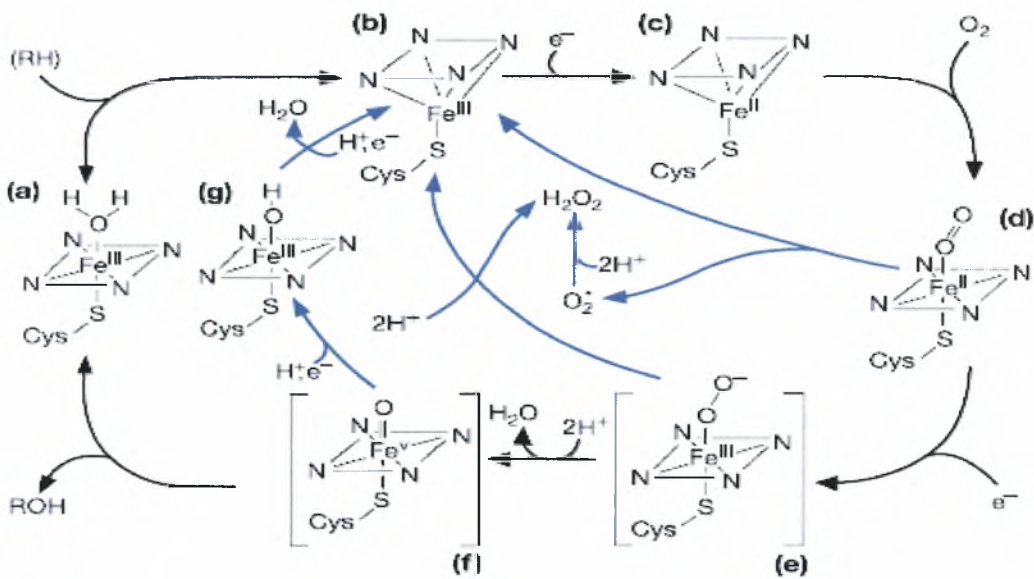
Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών μπορεί να οφείλεται :

1. Στην διαρροή ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Στην αναπνευστική αλυσίδα πραγματοποιείται μεταφορά των ηλεκτρονίων του  $\text{NADH}$  και του  $\text{FADH}_2$  (που προέκυψαν από τον κύκλο του Krebs) στο μοριακό οξυγόνο με την διαμεσολάβηση τριών ενζυμικών συμπλεγμάτων ( $\text{NADH-Q}$  ρεδουκτάση, κυτοχρωμική ρεδουκτάση και κυτοχρωμική αναγωγάση) και δύο μεταφορέων ηλεκτρονίων (ουβικινόνη Q και κυτόχρωμα c). Η διαρροή των ηλεκτρονίων συμβαίνει διότι δεν μεταφέρονται και τα δύο ηλεκτρόνια των  $\text{NADH}$  και  $\text{FADH}_2$  στην ουβικινόνη και στην ημικινόνη αλλά μόνο το ένα. Εξ'αιτίας της διαρροής των ηλεκτρονίων, σχηματίζεται υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), και υπεροξειδίο ( $\text{O}_2^-$ ) τόσο από την δράση της  $\text{NADH-Q}$  ρεδουκτάσης (γνωστή και ως σύμπλεγμα I) όσο και από την δράση της κυτοχρωμικής αναγωγάσης (γνωστή και ως σύμπλεγμα III) [6]. Το υπεροξειδίο ( $\text{O}_2^-$ ) μπορεί να μετατραπεί σε υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) χάρη στην δράση της μιτοχονδριακής Mn-SOD (διμοουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου) [3]. Επίσης, αυτές οι δύο ρίζες μπορούν να παράγουν την υδροξυλική ρίζα ( $\text{OH}\cdot$ ) μέσω της αντίδρασης Fenton και μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss [3]. Η ιδιαιτερότητα των μιτοχονδρίων να είναι η κύρια πηγή ελευθέρων ριζών εξηγεί την άυξημένη περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικά μόρια όπως η ανηγμένη γλουταθειώνη (GSH), η διμοουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (SOD) και η υπεροξειδάση της γλουταθειώνης (GPx). Όσον αφορά το παραγόμενο ανιόν του υπεροξειδίου ( $\text{O}_2^-$ ),

εξουδετερώνεται με μετατροπή του σε  $H_2O_2$  και κατόπιν σε  $H_2O$  είτε από την Cu, Zn – SOD ή SOD-1 που εντοπίζεται στον διαμεμβρανικό χώρο είτε από την Mn-SOD ή SOD-2 που εντοπίζεται στην μιτοχονδριακή μήτρα [7]. Σχετικά με το σύμπλεγμα III αυτό που γνωρίζουμε είναι ότι η αυτοοξειδωση της ρίζας του ανιόντος της ουβινημικίνης ( $UQ\cdot^-$ ) επιτρέπει την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου με συνέπεια τον σχηματισμό ανιόντος του υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και στις δύο πλευρές της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης [8]. Αντιθέτως, για το σύμπλεγμα I γνωρίζουμε πολύ λιγότερα πράγματα για τον ακριβή τρόπο σχηματισμού του ανιόντος του υπεροξειδίου, πιθανώς λόγω της πολυπλοκότητας του συμπλέγματος αφού αποτελείται από 46 διαφορετικές υπομονάδες [6].

2. Στην αυτοοξειδωση ορισμένων βιομορίων όπως οι κατεχολαμίνες, οι φλαβίνες, η αιμοσφαιρίνη και το ασκορβικό οξύ και χάρη στην οποία παράγεται ανιόν του υπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) [5,6].

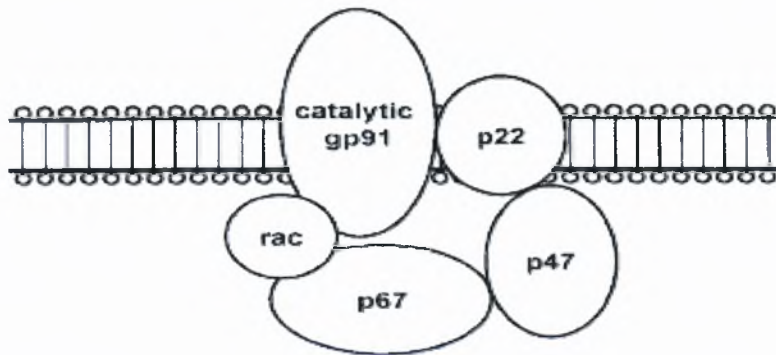
3. Σε αντιδράσεις εξαρτώμενες από το κυτόχρωμα P-450 στο ήπαρ, στον γαστρεντερικό σωλήνα, στους νεφρούς και στους πνεύμονες από τις οποίες παράγονται σημαντικές ποσότητες ROS (Εικόνα 3) [9]. Το κυτόχρωμα P-450 είναι το κύριο μέλος της κλάσης των ενζύμων που εντοπίζονται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων και τα οποία παίζουν κύριο ρόλο στον μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών. Το P-450 μπορεί να επαχθεί και να ανασταλλεί από διάφορες ουσίες [10]. Οι ROS που παράγονται εξαιτίας του κυτοχρώματος P-450 προκαλούν υπεροξειδωση των λιπιδίων.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση του καταλυτικού κύκλου του κυτοχρώματος P-450 (Από Richard C. Zangar, Dimitri R. Davydov, Seema Verma, Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P-450, Toxicology and Applied Pharmacology 199 316– 331, 2004).

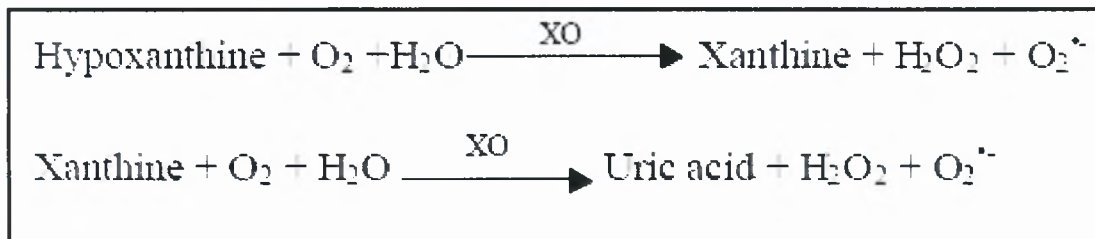
4. Στα υπεροξειδισώματα, στα οποία παράγονται ROS σε σημαντικές ποσότητες και τα οποία περιέχουν μεγάλες ποσότητες καταλάσης η οποία διασπά το κυτταροπλασματικό υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Είναι αξιοσημείωτο ότι η γήρανση μειώνει τα επίπεδα του  $H_2O_2$  και καθιστά τα υπεροξειδισώματα σπουδαία πηγή ROS [11]. Σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών είναι και τα μικροσώματα, στα οποία παράγεται  $H_2O_2$ .

5. Στις αντιδράσεις της φλεγμονής από την δράση της NADPH οξειδάσης των ενεργοποιημένων ουδετερόφιλων (Εικόνα4) και μακροφάγων απ'όπου προκύπτει  $O_2^{\cdot-}$  το οποίο με την δράση της SOD3 μετατρέπεται σε  $H_2O_2$  που με την δράση της μυελοπεροξειδάσης μετατρέπεται σε  $HOCl$  [4,6,8].



Εικόνα 4. Η δομή της NADPH οξειδάσης των ουδετερόφιλων (Από Wulf Droge, Free radicals in the physiological control of cell function, Phsiol Rev., Vol.82, January 2002).

6. Στην δράση της οξειδάσης της ξανθίνης που απαντώνται σε πολλά είδη (από τα βακτήρια μέχρι τον άνθρωπο) και σε πολλούς ιστούς [12]. Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει την αντίδραση μετατροπής της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ (Εικόνα 5). Και στις δύο αντιδράσεις ανάγεται το μοριακό οξυγόνο με συνέπεια να παράγεται  $O_2^{\cdot-}$  στην πρώτη αντίδραση και  $H_2O_2$  στην δεύτερη [12].



Εικόνα 5. Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει την αντίδραση μετατροπής της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ (Από Ling Li, Free radicals in Biology and Medicine, 77:222, 2001).

7. Σε εξωγενείς παράγοντες όπως το stress, το κάπνισμα, καταστάσεις υποξίας, η ιονίζουσα ακτινοβολία, η UV ακτινοβολία, η κακή διατροφή, το άγχος, τα αλκοολούχα ποτά και η άσκηση [12].

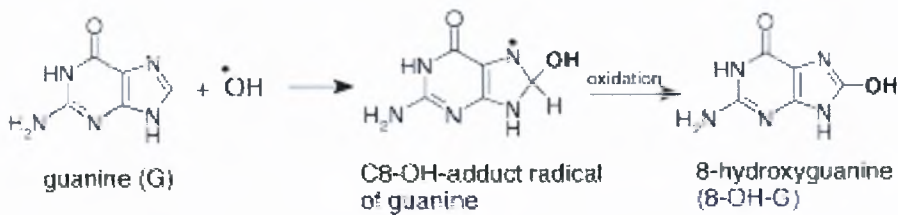
### Οξειδωτικές βλάβες των βιομορίων από ROS και RNS

Οι δραστικές ενώσεις οξυγόνου και αζώτου (ROS, RNS) προκαλούν σημαντικές βλάβες στην δομή και στην λειτουργία του DNA, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων.

### Βλάβες στο πυρηνικό και στο μιτοχονδριακό DNA

Οι ROS τροποποιούν το DNA ποικιλοτρόπως προκαλώντας σπασίματα στον έναν ή και στους δύο κλώνους, τροποποίηση των πουρινών και των πυριμιδινών ή τροποποίηση της δεσοξυριβόζης που μπορούν να σημάνουν μη έναρξη της μεταγραφής του DNA, μη

επιδιόρθωση των λαθών που γίνονται κατά την αντιγραφή του DNA και εμφάνιση γενετικής αστάθειας [12]. Η ρίζα με τις πιο βλαβερές επιδράσεις στο DNA είναι η υδροξυλική αφού μπορεί να διασπά διπλούς δεσμούς των βάσεων αποσπώντας ένα άτομο H από την μεθυλοομάδα της θυμίνης και από καθένα από τα 5 άτομα άνθρακα της δεσοξυριβόζης έχοντας ως συνέπεια την παραγωγή αλλυλικών ριζών της θυμίνης και των σακχάρων που προκύπτουν από αντιδράσεις απόσπασης. Περαιτέρω αντιδράσεις των ριζών των βάσεων και των σακχάρων συνεπάγονται παραγωγή τροποποιημένων βάσεων και σακχάρων με τις αναμενόμενες δυσμενείς συνέπειες για το DNA [12]. Η υδροξυλική ρίζα αντιδρά επίσης με την γουανίνη (Εικόνα6) σχηματίζοντας την 8-υδροξυγουανίνη (8-OH-G) που αποτελεί μεταλλαξιγόνο προϊόν της οξείδωσης του DNA αλλά και καλό δείκτη του οξειδωτικού στρες.



Εικόνα 6. Αντίδραση της υδροξυλικής ρίζας με την γουανίνη από την οποία προκύπτει η 8-υδροξυγουανίνη (Από M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress - induced cancer, Chemico- Biological interactions, 1-40, 2006).

Σημαντικές βλάβες στο DNA προκαλούνται όχι μόνο από τις ROS αλλά και από τις RNS με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα οξειδία του αζώτου αλλά και το υπεροξυνιτρικό που αντιδρώντας με την γουανίνη σχηματίζει την 8- νιτρογουανίνη που προκαλεί μεταπτώσεις GC-AT.

Εκτός όμως από το πυρηνικό DNA, σημαντικές τροποποιήσεις υφίσταται και το μιτοχονδριακό. Μάλιστα, το μιτοχονδριακό DNA είναι περισσότερο ευαίσθητο απέναντι στην δράση των ελευθέρων ριζών για τους ακόλουθους λόγους : α) τα μιτοχόνδρια αποτελούν κύρια πηγή ελευθέρων ριζών και συνεπώς το DNA τους εκτίθεται σε μεγαλύτερες ποσότητες ελευθέρων ριζών σε σχέση με το πυρηνικό, β) τα μιτοχόνδρια δεν διαθέτουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA στον βαθμό που τους διαθέτει ο πυρήνας, γ) το μιτοχονδριακό DNA δεν προστατεύεται από ιστόνες, δ) τα μιτοχόνδρια αποτελούν συχνό στόχο πολλών ξеноβιοτικών καρκινογόνων ουσιών [12]. Για την εκτίμηση της ζημιάς που υφίσταται το DNA έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές με πιο διαδεδομένη αυτήν που περιλαμβάνει ενζυμική αποικοδόμηση του DNA ώστε τα οξειδωμένα προϊόντα του να μελετηθούν κατόπιν με HPLC (High Performance Liquid Chromatography) και ηλεκτροχημική ανίχνευση [12].

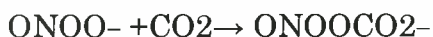
#### Βλάβες στις πρωτεΐνες και στα αμινοξέα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αρκετών ερευνών, η υδροξυλική ρίζα (κυρίως) και το  $\text{O}_2\cdot^-$  αντιδρούν με πρωτεΐνες αποσπώντας ένα άτομο H, σχηματίζοντας έτσι άλλες ρίζες που κάτω από αερόβιες συνθήκες αντιδρούν με το dioxygen για να προκύψουν υπεροξειδικές ρίζες (peroxyl radicals) που μετατρέπονται σε αλκυλιωμένη μορφή ύστερα από αντίδραση με την πρωτονιωμένη μορφή του υπεροξειδίου. Οι υδροξυλικές ρίζες επιδρούν βλαβερά στις πρωτεΐνες είτε παράγονται ύστερα από επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας είτε παράγονται in vivo μέσω της αντίδρασης Fenton [12]. Η οξείδωση των πρωτεϊνών εξαιτίας των ROS οδηγεί στον σχηματισμό ορισμένων ενδο ή διά - πρωτεϊνικών σταυρο-

συνδέσεων με τους εξής τρόπους : α) προσθήκη λυσίνης στην αμινική περιοχή των καρβονυλοομάδων των οξειδωμένων πρωτεϊνών, β) οξείδωση των σουλφουδρυλικών ομάδων των κυστεϊνικών καταλοίπων σχηματίζοντας σταυροσυνδέσμους τύπου S-S, γ) οξείδωση των καταλοίπων τυροσίνης σχηματίζοντας σταυροσυνδέσμους τύπου tyr – tyr. Τα κατάλοιπα κυστεΐνης και μεθειονίνης των πρωτεϊνών είναι εν μέρει επιδεκτικά σε οξείδωση από ROS [12]. Συγκεκριμένα, τα κατάλοιπα της κυστεΐνης σχηματίζουν ενδο ή διά – πρωτεϊνικούς σταυροσυνδέσμους που επιδιορθώνονται με αντιδράσεις ανταλλαγής δισουλφιδίου και οι οποίες καταλύονται από θειολοτρανοσφεράσες, ενώ τα κατάλοιπα μεθειονίνης με την οξείδωση τους σχηματίζουν μίγμα R και S ισομερών του σουλφοξειδίου της μεθειονίνης σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση :



Οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει από το ONOO<sup>-</sup> που προκύπτει ύστερα από αντίδραση του NO με το O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. Το ONOO<sup>-</sup> μπορεί να νιτροσουλιώσει τα κατάλοιπα κυστεΐνης, τυροσίνης, τρυπτοφάνης και μεθειονίνης. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή μπορεί να ανασταλλεί ύστερα από αντίδραση του ONOO<sup>-</sup> με CO<sub>2</sub> σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση :

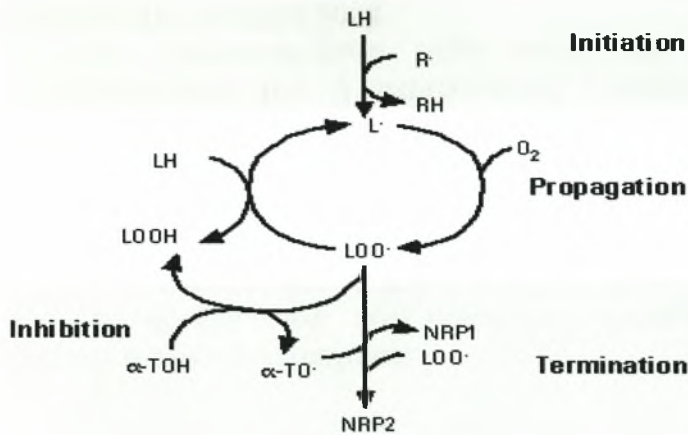


Η λόγω ROS οξείδωση των πρωτεϊνών θεωρείται σημαντική αιτία γήρανσης και πρόκλησης διαφόρων ασθενειών. Η εμπλοκή της οξείδωσης των πρωτεϊνών στην γήρανση πιστεύεται ότι οφείλεται στην συσσώρευση των οξειδωμένων μορφών των πρωτεϊνών που με τη σειρά της μπορεί να οφείλεται α) σε αύξηση των επιπέδων ROS και RNS του οργανισμού, β) σε μείωση της ικανότητας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, γ) σε μείωση της ικανότητας του οργανισμού να αποικοδομεί οξειδωμένες πρωτεΐνες, δ) σε μειωμένες συγκεντρώσεις πρωτεασών, ε) σε αυξημένες συγκεντρώσεις αναστολέων των πρωτεασών [12]. Η εκτίμηση της οφειλόμενης σε ROS οξείδωσης των πρωτεϊνών γίνεται με ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών καρβονυλοομάδων.

#### Υπεροξείδωση των λιπιδίων

Η υπεροξείδωση των λιπιδίων είναι μια αλυσιδωτή αντίδραση που ξεκινά από μια ελεύθερη ρίζα και κατά την οποία μια ρίζα μπορεί να επάγει την οξείδωση μεγάλου αριθμού λιπιδιακών μορίων, κυρίως φωσφολιπιδίων που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Τα μονοακόρεστα και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα δεν συμμετέχουν συνήθως στην υπεροξείδωση. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων διακρίνεται σε 3 στάδια : έναρξη, διάδοση και τερματισμός (Εικόνα7). Στην έναρξη, παράγεται λιπιδιακή ρίζα ύστερα από αντίδραση μιας ελεύθερης ρίζας με ένα PUFA. Στην συνέχεια η ασταθής λιπιδιακή ρίζα αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο σχηματίζοντας ρίζα υπεροξυλίου. Κατά την διάδοση, η ασταθής ρίζα υπεροξυλίου αντιδρά με ένα άλλο PUFA αποσπώντας του ένα άτομο H και σχηματίζοντας λιπιδιακό υπεροξείδιο που είναι το πρώτο σχετικά σταθερό προϊόν της σειράς των αντιδράσεων της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Ο τερματισμός της υπεροξείδωσης των λιπιδίων συμβαίνει με αντίδραση μεταξύ δύο ριζών. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων δεν εμπλέκεται μόνο στην καταστροφή των μεμβρανικών λιπιδίων αλλά με παραπέρα διάσπαση των λιπιδιακών υπεροξειδίων μπορεί να παράγει τοξικές ενώσεις που είναι συνήθως αλδεύδες με χαρακτηριστικό παράδειγμα την μαλοναλδεύδη [12].

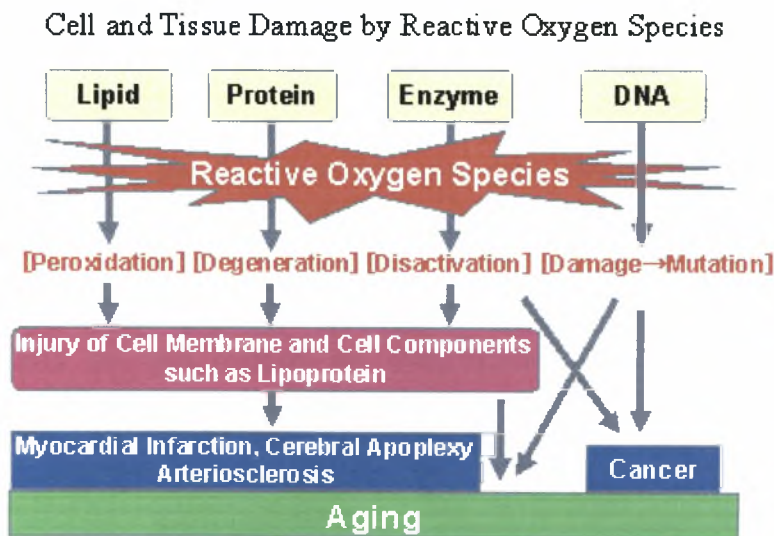




Εικόνα 7. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων (Από <http://www.ehponline.org/members/1998/106p375-384kelly/kelly-full.html>).

### ROS, άσθένειες και γήρανση

Για το φαινόμενο της γήρανσης έχουν διατυπωθεί περισσότερες από 300 θεωρίες αλλά αυτή που βρίσκεται πιο κοντά στην πραγματικότητα είναι η θεωρία των ελευθέρων ριζών σύμφωνα με την οποία η γήρανση είναι το αποτέλεσμα της συσσώρευσης των οξειδωτικών βλαβών [13]. Οι ρίζες που φαίνεται να προκαλούν περισσότερο την γήρανση είναι το NO και το O $_2$  $\cdot^-$  [14]. Σύμφωνα και με τα αποτελέσματα των πιο πρόσφατων σχετικών ερευνών, η βασική εστία οξειδωτικών βλαβών εντοπίζεται στο μιτοχονδριακό DNA λόγω της ευπάθειας του αλλά και της ελλιπούς επιδιορθωτικής ικανότητας των μιτοχονδρίων. Συνεισφορά στην πρόκληση της γήρανσης έχουν οι συσσωρεύσεις των βλαβών του πυρηνικού DNA, των λιπιδίων αλλά και των πρωτεϊνών (Εικόνα 8). Σημαντική είναι και η εμπλοκή των ROS στην παθογένεση πολλών και σημαντικών ασθενειών όπως ηπατίτιδα, καταράκτης, αρθρίτιδα, καρκίνος και νευροεκφυλιστικές νόσοι (νόσος Parkinson, νόσος Huntington, νόσος Alzheimer).



©JalCA, 1998

Εικόνα 8. ROS, οξειδωτικές βλάβες, ασθένειες και γήρανση (Από [www.google.com/Εικόνες/ ROS and aging](http://www.google.com/Εικόνες/ROS%20and%20aging)).

### Τα αντιοξειδωτικά και η δράση τους

Ως αντιοξειδωτικό χαρακτηρίζεται κάθε ουσία που μέσω μιας ή περισσότερων αντιδράσεων αδρανοποιεί μια ή περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ενζυμικά και σε μη ενζυμικά. Στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά ανήκουν η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-PX) και η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GR). Στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συγκαταλέγονται η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η βιταμίνη E, το συνένζυμο Q10, το ουρικό οξύ, η μελατονίνη, η γλουταθειόνη, το α-λιποϊκό οξύ, τα καρτενοειδή, τα φλαβονοειδή και ορισμένες πρωτεΐνες του πλάσματος όπως η τρανσφερρίνη και η σερουλοπλασμίνη.

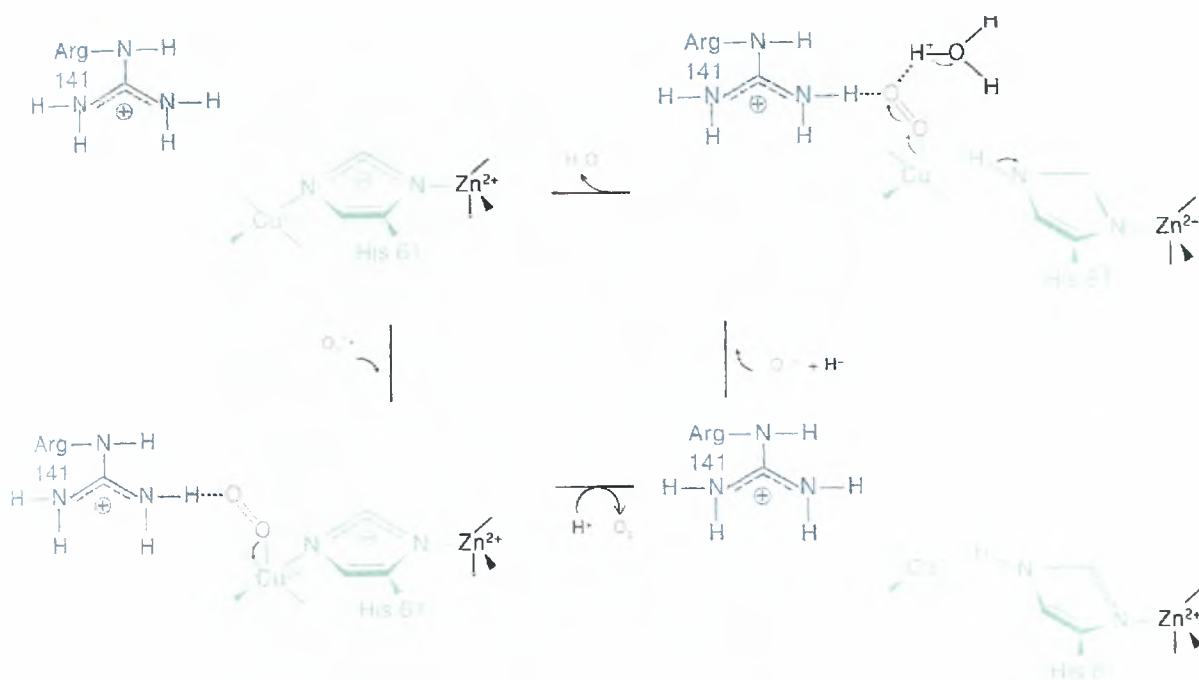
### Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

#### Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)

Ένα από τα πιο αποτελεσματικά ενδοκυτταρικά ενζυμικά αντιοξειδωτικά είναι η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) που καταλύει την ακόλουθη αντίδραση :



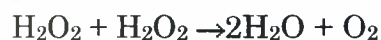
Διακρίνεται σε 3 είδη : α) την κυτταροπλασματική Cu-Zn SOD, β) την μιτοχονδριακή Mn-SOD και γ) την εξωκυτταρική EC-SOD. Η κυτταροπλασματική SOD (Εικόνα 9) είναι ένα ομοδιμερές ένζυμο μοριακού βάρους 32 kDa, στο οποίο η ενεργή περιοχή εντοπίζεται και στις δύο υπομονάδες και συγκροτείται από ιόντα Cu και Zn. Το ενεργό κέντρο αυτού του ενζύμου περιέχει ένα ιόν Cu και ένα ιόν Zn σε σύμπλοκο συναρμογής με την πλευρική αλυσίδα ενός καταλοιπίου ιστιδίνης. Το αρνητικά φορτισμένο υπεροξείδιο οδηγείται ηλεκτροστατικά σε μια θετικά φορτισμένη καταλυτική θέση στο βάθος ενός καναλιού. Το υπεροξείδιο συνδέεται με το Cu<sup>+2</sup> και με την ομάδα της γουανιδίνης που ανήκει σε μια αργινίνη. Από το υπεροξείδιο μεταφέρεται ένα ηλεκτρόνιο στο ιόν του χαλκού για να σχηματιστεί Cu<sup>+</sup> και οξυγόνο που απελευθερώνεται. Ένα δεύτερο υπεροξείδιο εισέρχεται στο ενεργό κέντρο και δεσμεύεται από το Cu<sup>+</sup>, την αργινίνη και το H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>. Το δεσμευμένο υπεροξείδιο αποκτά ένα ηλεκτρόνιο από το Cu<sup>+</sup> και δύο πρωτόνια από τους άλλους δύο δεσμευμένους προσδέτες σχηματίζοντας H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και αναγεννώντας την Cu<sup>+2</sup> κατάσταση του ενζύμου. Η δραστηριότητα της Cu-Zn SOD είναι σταθερή όταν το pH κυμαίνεται από 5 - 9.5 [15]. Η μιτοχονδριακή SOD είναι ομοτετραμερές ένζυμο μοριακού βάρους 96 kDa με ένα άτομο Mn σε κάθε μια από τις υπομονάδες του. Η αντίδραση που καταλύεται από την Mn-SOD πραγματοποιείται σε δύο στάδια με ανακύκλωση του Mn (III). Όσον αφορά την εξωκυτταρική SOD, είναι τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 135 kDa με ένα άτομο Cu και ένα άτομο Zn σε κάθε υπομονάδα [12].



Εικόνα 9. Προτεινόμενος καταλυτικός μηχανισμός της κυτταροπλασματικής SOD (Από Lubert Stryer, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2<sup>η</sup> έκδοση, 1997, σελ. 445).

### Καταλάση (CAT)

Η καταλάση βρίσκεται στα κύτταρα των φυτών, των ζώων και των αερόβιων βακτηρίων (Εικόνα 10). Συγκεκριμένα βρίσκεται στα υπεροξειδιοσώματα ενώ έχει βρεθεί σε μικρές ποσότητες στα μικροσώματα και στο κυτταρόπλασμα. Καταλύει την παρακάτω αντίδραση :



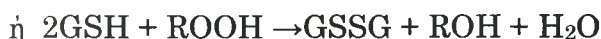
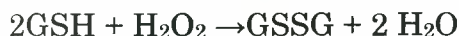
Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 6.000.000 μόρια  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε  $\text{H}_2\text{O}$  και  $\text{O}_2$  σε 1 min [22]. Επίσης, η καταλάση είναι ομοτετραμερής και κάθε υπομονάδα της περιέχει μια προσθετική ομάδα αίμης στο καταλυτικό κέντρο και στο μέσο της κάθε ομάδας αίμης βρίσκεται ένα άτομο σιδήρου που χρησιμεύει στην καταλάση για το σπάσιμο των δεσμών στα δύο μόρια του  $\text{H}_2\text{O}_2$  [16].



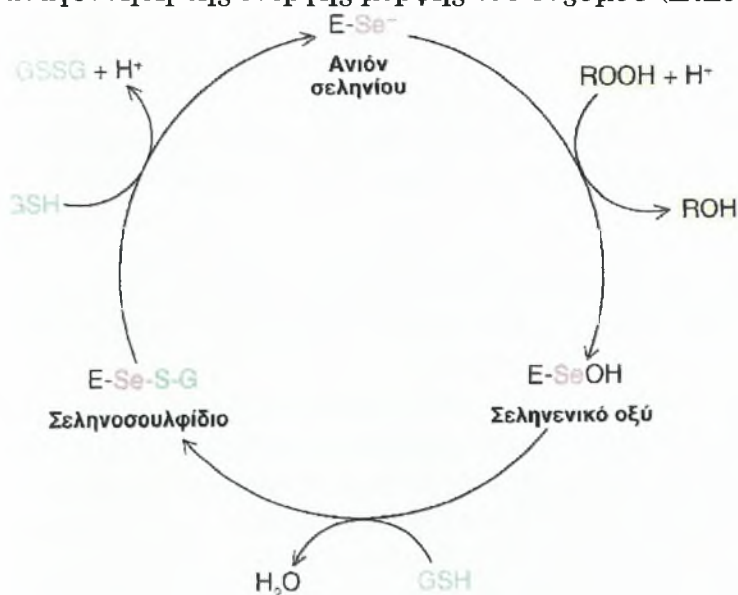
Εικόνα 10. Τρισδιάστατη δομή της καταλάσης στην *E. Coli* (Από [http://www.genomenetwork.org/articles/08\\_01/Catalase\\_snp.shtml](http://www.genomenetwork.org/articles/08_01/Catalase_snp.shtml)).

### Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-PX)

Η διάσπαση του  $H_2O_2$  μπορεί να επιτευχθεί όχι μόνο με την καταλυτική δράση της καταλάσης αλλά και χάριν στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-PX). Υπάρχουν δύο ισομορφές της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης : η σεληνιο-εξαρτώμενη και η σεληνιο-ανεξάρτητη. Αυτές οι δύο ισομορφές διαφέρουν ως προς τον αριθμό των υπομονάδων, ως προς τους καταλυτικούς τους μηχανισμούς και ως προς τα υποστρώματα που χρησιμοποιούν (η πρώτη χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα  $H_2O_2$ , ενώ η δεύτερη υπεροξειδία λιπιδίων) [12]. Οι αντίστοιχες αντιδράσεις έχουν ως εξής :



Η σεληνιο-εξαρτώμενη GSH-PX φέρει ομοιοπολικά συνδεδεμένο ένα άτομο Se. Το ενεργό της κέντρο περιέχει το ανάλογο της κυστεινης με Se, στο οποίο το Se έχει αντικαταστήσει το S. Η ιοντισμένη μορφή του καταλοίπου ( $E-Se^-$ ) αυτού ανάγει το υπόστρωμα του υπεροξειδίου προς μια αλκοόλη και συνεπώς οξειδώνεται προς σεληνενικό οξύ ( $E-SeOH$ ). Η είσοδος της GSH σχηματίζει σεληνοσουλφίδιο ( $E-Se-S-G$ ) που εν συνεχεία προσβάλλεται και από άλλο μόριο GSH με αποτέλεσμα τον σχηματισμό GSSG και την αναγέννηση της ενεργής μορφής του ενζύμου (Εικόνα 11) [15].



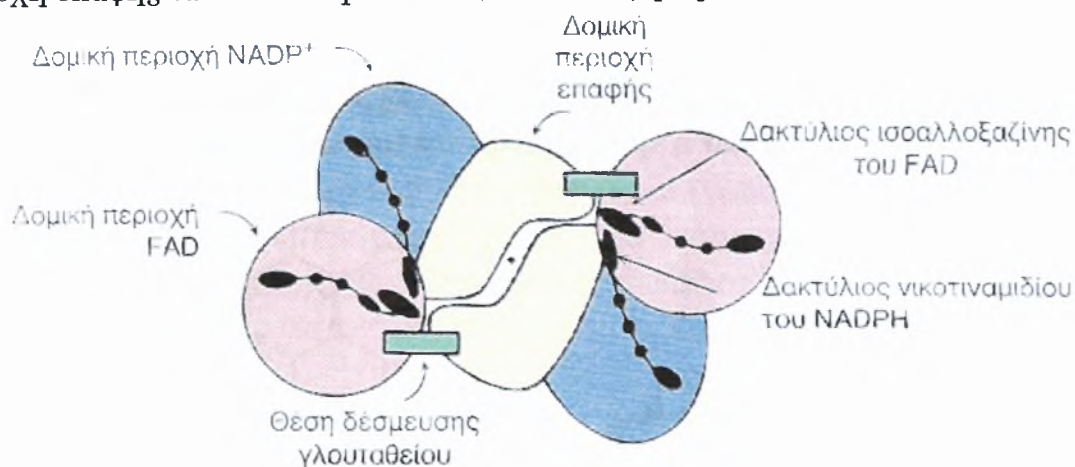
Εικόνα 11. Προτεινόμενος καταλυτικός μηχανισμός της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (Από Lubert Stryer, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2<sup>η</sup> έκδοση, 1997, σελ. 647).

### Ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR)

Η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη (GSH) έτσι ώστε να αναγεννάται η ανηγμένη γλουταθειόνη και να διατηρείται υψηλός ο λόγος GSH:GSSG. Η GR που είναι διμερές υπομονάδων 50kd καταλύει την ακόλουθη αντίδραση :



Τα ηλεκτρόνια του NADPH (που προέρχεται από το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών) δεν μεταφέρονται απευθείας στον δισουλφιδικό δεσμό της οξειδωμένης γλουταθειόνης αλλά το πιθανότερο είναι να μεταφέρονται από το NADPH σε ένα ισχυρά δεσμευμένο FAD (φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο), ακολούθως να μεταφέρονται στην δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ δύο καταλοίπων κυστεΐνης της υπομονάδας και να καταλήγουν στην οξειδωμένη γλουταθειόνη. Κάθε υπομονάδα της GR αποτελείται από τρεις δομικές περιοχές : την περιοχή σύνδεσης του NADPH, την περιοχή σύνδεσης του FAD και την περιοχή επαφής των δύο υπομονάδων (Εικόνα 12) [15].

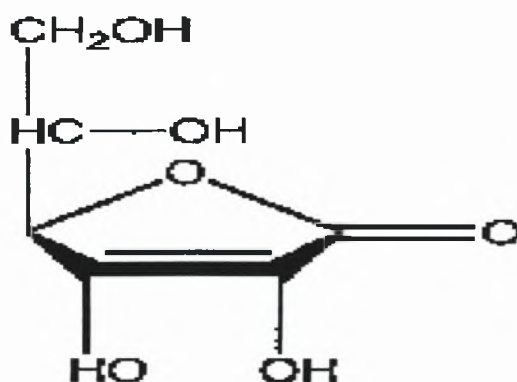


Εικόνα 12. Σχηματικό διάγραμμα των δομικών περιοχών της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης (Από Lubert Stryer, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2<sup>η</sup> έκδοση, 1997, σελ. 462).

### Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

#### Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ·AA (Εικόνα 13) είναι ένα υδρόφιλο αντιοξειδωτικό που εξουδετερώνει κυρίως την υδροξυλική ρίζα, το υπεροξειδίο και τα λιπιδιακά υπεροξειδία. Επίσης έχει την ικανότητα να αναγεννά την α-τοκοφερόλη από τις ρίζες α-τοκοφερόλης των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών με την συνεργετική δράση της GSH·PX. Αποτελεί το πιο διαδεδομένο αντιοξειδωτικό, το οποίο όμως δεν συντίθεται ενδογενώς και πρέπει να λαμβάνεται μέσω της διατροφής. Κατά την αντίδραση του με τις ρίζες παράγεται διυδροασκορβικό οξύ (DHA) που με την δράση της ρεδουκτάσης του διυδροασκορβικού οξέος αναγεννά το ασκορβικό οξύ [17,18].

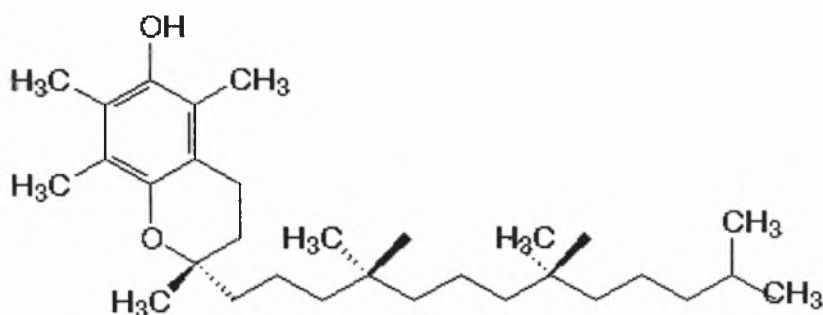


Εικόνα 13. Η δομή του ασκορβικού οξέος (Από [http://www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/vit\\_0264.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/vit_0264.shtml)).

Πέραν της αντιοξειδωτικής του δράσης το AA συμμετέχει σε πολλές σημαντικές βιοχημικές διαδικασίες όπως ο μεταβολισμός του κολλαγόνου (παίζει τον ρόλο του συμπαραγόντα των υδροξυλασών λυσίνης και προλίνης), η έκφραση ορισμένων γονιδίων, και η βιοσύνθεση διαφόρων μορίων όπως η φιμπρονεκτίνη, η ελαστίνη, η αλδοστερόνη και οι πρωτεογλυκάνες [17,18].

### Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E αποτελεί μια οικογένεια αντιοξειδωτικών που περιλαμβάνει 8 ισομερή που ονομάζονται τοκοφερόλες με πιο δραστική την α-τοκοφερόλη (Εικόνα 14).

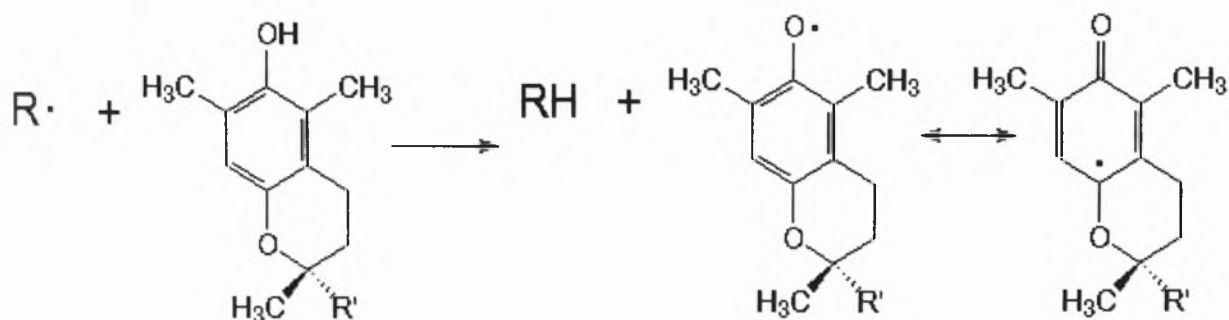


Vitamin E (α-tocopherol)

Εικόνα 14. Η δομή της α-τοκοφερόλης

(Από [http://www.uic.edu/classes/phar/phar332/Clinical\\_Cases/vitamin%20cases/vitamin%20E/Vitamin%20E%20intro%202.htm](http://www.uic.edu/classes/phar/phar332/Clinical_Cases/vitamin%20cases/vitamin%20E/Vitamin%20E%20intro%202.htm)).

Η βιταμίνη E είναι λιπόφιλο αντιοξειδωτικό και προστατεύει τις μεμβράνες από την υπεροξείδωση των λιπιδίων τους αντιδρώντας με τις λιπιδιακές ρίζες (Εικόνα 15). Η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης E οφείλεται στην υδροξυλοομάδα του αρωματικού της δακτυλίου [19].

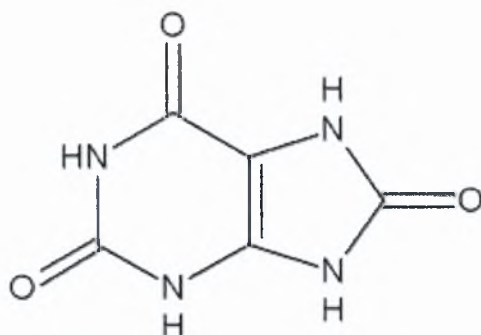


Resonance-stabilized radical

Εικόνα 15. Αντίδραση της βιταμίνης E με ρίζα  
(Από [http://www.uic.edu/classes/phar/phar332/Clinical\\_Cases/vitamin%20cases/vitamin%20E/Vitamin%20E%20intro%202.htm](http://www.uic.edu/classes/phar/phar332/Clinical_Cases/vitamin%20cases/vitamin%20E/Vitamin%20E%20intro%202.htm)).

### Ουρικό οξύ

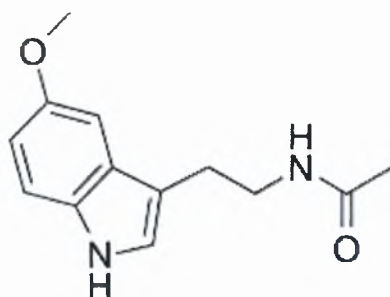
Το ουρικό οξύ (Εικόνα 16) είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών, ενώ προκύπτει και από την ξανθίνη ή την υποξανθίνη με την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης (Εικόνα 5). Ως αντιοξειδωτικό, είναι τόσο σημαντικό όσο είναι και το ασκορβικό οξύ. Τα επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό του ανθρώπου είναι δέκα φορές μεγαλύτερα σε σχέση με αυτά των υπολοίπων ζωικών ειδών, κάτι που αποδεικνύει ότι κατά την εξέλιξη έλαβε χώρα μια σημαντική αύξηση του επιπέδου του ουρικού οξέος στον άνθρωπο ακριβώς λόγω της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ουρικού οξέος [15].



Εικόνα 16. Χημική δομή του ουρικού οξέος (Από [http://en.wikipedia.org/wiki/Uric\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Uric_acid)).

### Μελατονίνη

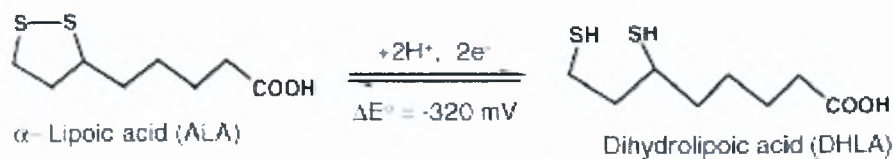
Η μελατονίνη ή 5-μεθοξυ – ακετυλοτρυπταμίνη (Εικόνα 17) είναι ορμόνη και συντίθεται στην επίφυση από το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Ο συνηθισμένος της ρόλος είναι να ρυθμίζει τις εποχιακές επιδράσεις στην αναπαραγωγική λειτουργία, στον μεταβολισμό και στο σωματικό βάρος [20]. Εκτός όμως από την προαναφερθείσα λειτουργία, η μελατονίνη αποτελεί εξαιρετικό αντιοξειδωτικό αφού αδρανοποιεί αρκετές ελεύθερες ρίζες και ενεργοποιεί αντιοξειδωτικά ένζυμα (SOD, CAT, GR, GSH-PX). Διαφέρει ως προς τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά στο ότι δεν μπορεί να αναγεννηθεί αφού κατά την αντίδραση της με μια ελεύθερη ρίζα παράγονται σταθερά προϊόντα [21].



Εικόνα 17. Χημική δομή της μελατονίνης (Από <http://en.wikipedia.org/wiki/Melatonin>).

### α-Λιποϊκό οξύ

Το α-λιποϊκό οξύ (ALA) είναι και υδατοδιαλυτό και λιποδιαλυτό με συνέπεια να κατανέμεται τόσο στις κυτταρικές μεμβράνες όσο και στο κυτταρόπλασμα. Το ALA προσλαμβάνεται μέσω της διατροφής και μετατρέπεται σε διυδρολιποϊκό οξύ (DHLA) (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Οι χημικές δομές των ALA και DHLA (Από M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress - induced cancer, Chemico- Biological interactions, 1-40, 2006).

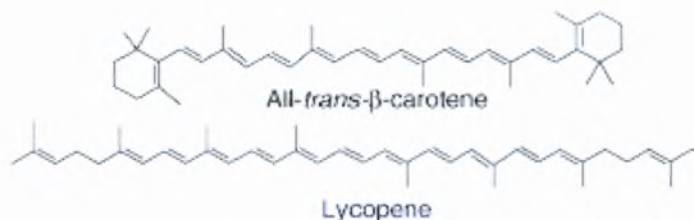
Τόσο το ALA όσο και το DHLA αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά και η αντιοξειδωτική τους δράση αφορά : α) την αδρανοποίηση αρκετών ROS, β) την αναγέννηση αρκετών ενδογενών και εξωγενών αντιοξειδωτικών όπως οι βιταμίνες E και C και η GSH, γ) την επιδιόρθωση οξειδωμένων πρωτεϊνών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της σημασίας του ALA είναι η αισθητή βελτίωση της λειτουργίας του ήπατος και των νεφρών σε παιδιά θύματα του Τοξόνομιπλ ύστερα από χορήγηση τους με ALA για ένα μόνο μήνα [12].

### Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 (ουβικινόνη) συμμετέχει στην μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα και περιέχει 10 μονάδες ισοπρενίου. Η αντιοξειδωτική ικανότητα της ουβικινόνης εστιάζεται στην παρεμπόδιση της οξείδωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων [15].

### Καροτενοειδή

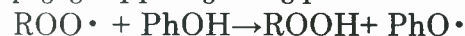
Τα καροτενοειδή είναι χρωστικές με αντιοξειδωτικές ικανότητες που προκύπτουν από την πλούσια σε διπλούς δεσμούς δομή τους (Εικόνα 19). Γενικά έχουν προταθεί 3 μηχανισμοί για την αντίδραση των καροτενοειδών με τις ελεύθερες ρίζες : α) προσθήκη ρίζας, β) απόσπαση ενός ατόμου H από το καροτενοειδές, γ) αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα καροτενοειδούς με αντιοξειδωτική δράση είναι το β-καροτένιο που αντιδρά κυρίως με υπεροξείδιο, υδροξυλική ρίζα και με ρίζα υπεροξυλίου [12].



Εικόνα 19. Χαρακτηριστικές δομές καροτενοειδών (Από M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress - induced cancer, Chemico- Biological interactions, 1-40, 2006).

### Φλαβονοειδή

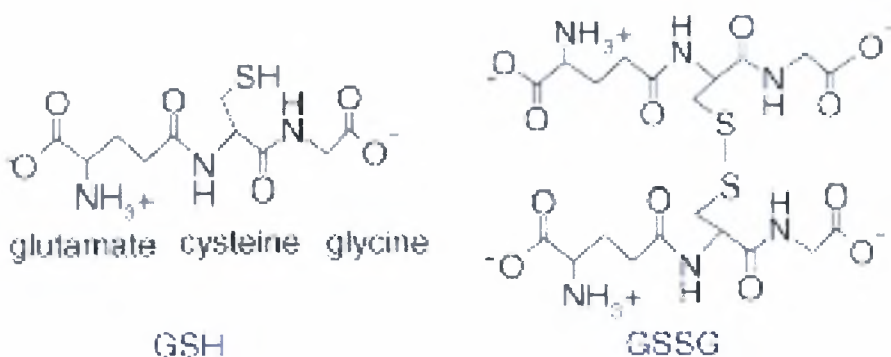
Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Η αντιοξειδωτική ικανότητα αυτών των ενώσεων εκδηλώνεται είτε με τον τερματισμό αντιδράσεων ελευθέρων ριζών είτε με την δέσμευση μετάλλων που έχουν καταλυτικές ιδιότητες και καταλύουν οξειδωτικές διαδικασίες όπως η υπεροξείδωση των λιπιδίων. Τα φλαβονοειδή παρέχουν ένα άτομο H στις ρίζες παράγοντας έτσι ρίζες που είναι σχετικά σταθερές και έτσι δεν ξεκινούν μια νέα σειρά αντιδράσεων ριζών ή αντιδρούν με άλλες ρίζες τερματίζοντας μια αλυσίδα αντιδράσεων οξειδωτικών διαδικασιών [12].





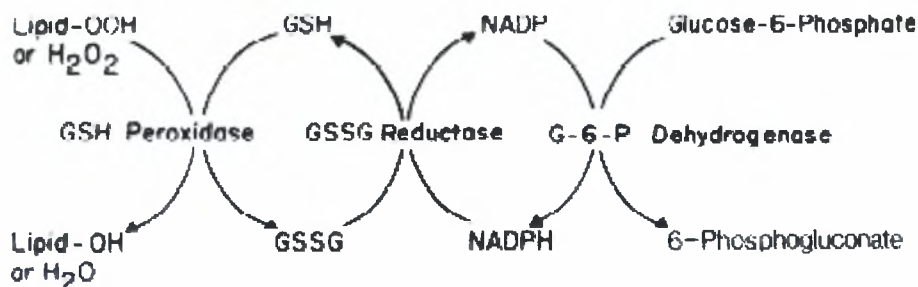
## Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη (GSH) (Εικόνα 20) είναι ένα τριπεπτιδίο που αποτελείται από τα αμινοξέα γλουταμινικό οξύ, κυστείνη και γλυκίνη. Αποτελεί την κυρίαρχη ενδοκυτταρική θειόλη και σε ποσοστό 85-90% εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (το υπόλοιπο 10-15% βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και στα υπεροξειδωσώματα)[22]. Παράγεται σε όλα τα όργανα αλλά κυρίως στο ήπαρ. Εμπλέκεται σε πολύ σημαντικές βιοχημικές διαδικασίες όπως η σύνθεση προσταγλανδινών, η μεταφορά κυστείνης, η έκφραση γονιδίων, η παραγωγή κυτοκινών, η πρωτεόλυση, ο μεταβολισμός αρκετών κυτταρικών συστατικών και η προστασία του οργανισμού από την τοξική δράση ξеноβιοτικών ουσιών [23]. Εκτός όμως από τις πολύ σημαντικές λειτουργίες που αναφέρθηκαν, η GSH είναι και σπουδαίο αντιοξειδωτικό.



Εικόνα 20. Οι δομές της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης (Από M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress - induced cancer, Chemo- Biological interactions, 1-40, 2006).

Η GSH αντιδρά με ελεύθερες ρίζες (κυρίως την υδροξυλική, τις λιπιδιακές και με το  $H_2O_2$ ) και οξειδώνεται σε GSSG η οποία στην συνέχεια μπορεί να αναχθεί σε GSH με την δράση της NADPH-εξαρτώμενης GR (Εικόνα 21).



Εικόνα 21. Οξείδωση και αναγωγή της γλουταθειόνης (Από Susan M. Deneke, Barry L. Fanburg, Regulation of cellular glutathione, American Physiological society, 1989).

Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες της γλουταθειόνης συνοψίζονται στις εξής : α) είναι συμπαραγοντας αντιοξειδωτικών ενζύμων, β) αντιδρά με ελεύθερες ρίζες και εξουδετερώνει τις δυσμενείς για τον οργανισμό συνέπειες τους, γ) μετατρέπει αντιοξειδωτικά όπως οι βιταμίνες C και E στην δραστική τους μορφή.

### Οξειδωτικό στρές

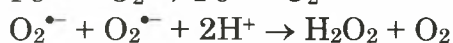
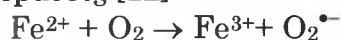
Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα το οξειδωτικό στρές είναι η αυξημένη παραγωγή προοξειδωτικών ουσιών σε τέτοιο βαθμό ώστε αυτές να υπερνικούνε τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Το οξειδωτικό στρές μπορεί να προκληθεί από πολλούς και διάφορους παράγοντες όπως είναι οι ρύποι του περιβάλλοντος, το κάπνισμα (ο καπνός του τσιγάρου περιέχει 1019 ROS), η καθιστική ζωή, η άσκηση, το άγχος, το stress, η άσκηση, η επαφή με διάφορες καρκινογόνες ουσίες, η υπέρμετρη έκθεση σε διαφόρων ειδών ακτινοβολίες μεταξύ των οποίων είναι και η ηλιακή, η υπερβολική κατανάλωση αλκοολούχων ποτών και η μη ισορροπημένη διατροφή[24].

### Οξειδωτικό στρές και άσκηση

Η άσκηση πέραν από την τέρψη και την ευχαρίστηση που προκαλεί στον άνθρωπο είναι και μια ασπίδα απέναντι σε σοβαρά νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και διάφορες καρδιαγγειακές νόσοι. Εκτός όμως από την προστατευτική δράση της άσκησης απέναντι σε ορισμένες νόσους, η άσκηση παράγει ελεύθερες ρίζες που προκαλούν αυτές τις νόσους, φαινόμενο που χαρακτηρίζεται ως "το παράδοξο της άσκησης" [25]. Η πρώτη επιστημονική έρευνα που συσχέτιζε την άσκηση με οξειδωτικές βλάβες βιομορίων έγινε το 1978 και σύμφωνα με αυτήν η μέτριας έντασης άσκηση ( 1 ώρα ποδήλατο στο 25-75% του  $Vo_{2max}$ ) είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση (διπλασιασμό) των επιπέδων του εκπνεόμενου πεντανίου το οποίο είναι προϊόν της υπεροξειδωσης των λιπιδίων [12]. Εξίσου σημαντικά πορίσματα εξήχθησαν και το 1982 όταν βρέθηκε ότι η άσκηση τριπλασίαζε τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες επίμυων. Στην παραπάνω έρευνα χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (electron paramagnetic resonance spectroscopy), μιας τεχνικής που επιτρέπει τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό ελευθέρων ριζών παρά τον εξαιρετικά μικρό χρόνο ημιζωής τους [12]. Ορισμένοι ερευνητές απέτυχαν να προσδιορίσουν το επαγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρές είτε γιατί δεν έλαβαν υπόψη τους παράγοντες όπως η προπονητική κατάσταση, το φύλο και η ηλικία είτε γιατί μετρήσανε δείκτες οξειδωτικού στρές αμέσως μετά την άσκηση ( η συγκέντρωση ορισμένων προϊόντων οξειδωτικών αντιδράσεων δεν αυξάνεται αμέσως μετά την άσκηση αλλά ώρες, ή ακόμα και μέρες μετά από το τέλος της). Από τις μέχρι σήμερα έρευνες εξάγεται το συμπέρασμα ότι μόνο η μεγάλης έντασης ή μακράς διάρκειας άσκηση παράγει τόσες πολλές ελεύθερες ρίζες ώστε να κινητοποιούνται οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί. Για παράδειγμα, οι Lovlin et al. παρατήρησαν ότι το τρέξιμο μεγάλης έντασης αύξανε τα επίπεδα της μαλοναλδιαδεύδης στο αίμα, ενώ το τρέξιμο μέτριας έντασης (70%  $Vo_{2max}$ ) δεν τα επηρέαζε και το τρέξιμο μικρής έντασης (40%  $Vo_{2max}$ ) τα μείωνε [26].

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς που πολλές φορές δρουν συνεργατικά και είναι πολύ πιθανό διαφορετικά είδη άσκησης να ενεργοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς παραγωγής ελευθέρων ριζών. Κύριος μηχανισμός παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση είναι η διαρροή ηλεκτρονίων στην μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα [12]. Επίσης, κατά την άσκηση, παράγονται και εκκρίνονται κατεχολαμίνες οι οποίες αυξάνουν τον οξειδωτικό μεταβολισμό των σκελετικών και των καρδιακών μυών μέσω ενεργοποίησης των β-αδρενεργικών υποδοχέων και ως εκ τούτου αυξάνουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, η αυτοοξειδωση της επινεφρίνης σε αδενοχρώμιο συνοδεύεται από την ταυτόχρονη παραγωγή  $O_2^{\cdot-}$ . Ωστόσο, η σημασία των κατεχολαμινών σαν πηγή παραγωγής

ROS κατά τη διάρκεια της άσκησης δεν έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό και συνεπώς παραμένει αδιευκρίνιστη [12]. Ένας εναλλακτικός μηχανισμός με τον οποίο η άσκηση παράγει ελεύθερες ρίζες είναι η ισχαιμία / επαναοξυγόνωση. Κατά την έντονη άσκηση, ορισμένοι ιστοί υφίστανται υποξία (νεφρά και σπλαχνικά όργανα) η οποία μπορεί να σταματήσει με την επανοοξυγόνωση των συγκεκριμένων ιστών με το πέρας της άσκησης, γεγονός που συντελεί στην παραγωγή ROS. Ένας τρόπος μέσω του οποίου η επανοοξυγόνωση μπορεί να συντελέσει σε αυξημένη παραγωγή ROS είναι μέσω της μετατροπής της αφυδρογονάσης της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης (XOD). Τόσο η αφυδρογονάση της ξανθίνης όσο και η XOD καταλύουν την μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ με την XOD να παράγει  $O_2^{\cdot-}$  στο τελευταίο βήμα της αντίδρασης. Η παραγωγή ROS με αυτό τον μηχανισμό δημιουργεί οξειδωτικό στρές πολλές ώρες μετά την άσκηση. Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, η αλλοπουρινόλη που είναι αναστολέας της XOD μειώνει σημαντικά την συγκέντρωση των δεικτών του οξειδωτικού στρές στο αίμα με συνέπεια να πιθανολογείται ότι η XOD ίσως να είναι πιο σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών εν συγκρίσει με τα μιτοχόνδρια [26]. Ένας άλλος μηχανισμός παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση είναι η αυτοοξειδωση των αιμοπρωτεϊνών, της αιμοσφαιρίνης και της μυοσφαιρίνης σύμφωνα με τις ακόλουθες αντιδράσεις [12] :



Σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση είναι και η ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης. Τα πολυμορφοουδετερόφιλα (PolyMorphoNeutrophils-PMN) αποτελούν μια ομάδα κυττάρων με σημαντικό ρόλο στην άμυνα των ιστών σε μολύνσεις από ιούς ή βακτήρια. Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά ξεκινά με την καταστροφή κάποιου μυός ή ενός μαλακού ιστού και η καταστροφή αυτή προκαλείται είτε από οξειδωτικές διαδικασίες που διεγείρονται από τα ROS, είτε από τέντωμα ή κάποια άλλη μηχανική δύναμη. Έτσι, τα PMN προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που απελευθερώνουν τα κατεστραμμένα κύτταρα και μεταναστεύουν στην πληγείσα περιοχή, όπου εκκρίνουν λυσοζύμη και  $O_2^{\cdot-}$ . Η λυσοζύμη προωθεί τη διάσπαση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και κυτταρικών υπολειμμάτων, ενώ το  $O_2^{\cdot-}$ , που παράγεται από τη μυελοπεροξειδάση και τη NADPH οξειδάση προλαμβάνει την επέκταση της βακτηριακής μόλυνσης. Σήμερα υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης κατά την άσκηση. Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί αυξημένη μετανάστευση ουδετερόφιλων στο σκελετικό μύ μετά από μία ποικιλία ασκήσεων και επομένως, οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τα φαγοκύτταρα στον κατεστραμμένο μυ μπορεί να είναι υπεύθυνες για την οξειδωτική βλάβη που παρατηρείται μετά την άσκηση. Επίσης, βρέθηκε ότι τα επίπεδα της IL-6 και της μυελοπεροξειδάσης - δύο δείκτες της φλεγμονής- είναι αυξημένα μετά την άσκηση κι ότι η δράση της τελευταίας αυξάνεται σημαντικά στους μύες αρσενικών ποντικών μετά από 24 ώρες άσκησης στον τροχό. Επιπλέον, οι Hack et al. έδειξαν ότι μία έντονη άσκηση μέχρι εξάντλησης αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των λευκοκυττάρων, λεμφοκυττάρων και των ουδετερόφιλων, στον άνθρωπο. Επίσης, βρήκαν ότι η ικανότητα φαγοκυττάρωσης αυξάνεται αμέσως μετά την άσκηση και για τις επόμενες 24 ώρες ενώ η παραγωγή  $O_2^{\cdot-}$  αυξάνεται μετά από 24 ώρες.. Οι Meydani et al., παρατήρησαν αύξηση των επιπέδων των κυτοκίνης μετά από έντονη άσκηση σε άντρες με καθιστικό τρόπο ζωής και τέλος οι Smith et al. ανέφεραν ότι μετά

από μία ώρα μέτριας άσκησης αυξάνεται *in vitro* η παραγωγή  $H_2O_2$  από τα ουδετερόφιλα [27]. Άλλες λιγότερο σημαντικές πηγές ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση είναι τα υπεροξειδισώματα και το κυτόχρωμα P-450 [26,27].

Το επαγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες δεν προκαλεί μόνο την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και την ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μορίων. Η βιταμίνη Ε είναι απαραίτητη για την φυσιολογική κυτταρική διαίρεση κατά την άσκηση. Οι Davies *et al.* παρατήρησαν ότι αραουραίοι με ανεπάρκεια βιταμίνης Ε χαρακτηρίζονταν από υπερβολικά αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών στο ήπαρ και στους μύες, από αυξημένη υπεροξείδωση λιπιδίων και από μιτοχονδριακή δυσλειτουργία ύστερα από έντονη άσκηση, ενώ αραουραίοι με επάρκεια βιταμίνης Ε δεν υπέστησαν τόσο έντονες μεταβολές μετά την άσκηση [27]. Παρόμοιες παρενέργειες προκαλεί κατά την άσκηση και η ανεπάρκεια βιταμίνης C. Επίσης, κατά την άσκηση παρατηρείται σημαντική αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Για παράδειγμα, οξεία άσκηση αυξάνει την δραστηριότητα της SOD σε πολλούς ιστούς όπως το ήπαρ, οι σκελετικοί μύες, η καρδιά και τα ερυθροκύτταρα. Οι περισσότερες έρευνες υποδεικνύουν, μάλιστα, σημαντικότερη αύξηση της CuZnSOD εν συγκρίσει με την MnSOD. Η αύξηση της δραστηριότητας των ισομορφών της SOD κατά την άσκηση οφείλεται πιθανόν σε ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων. Σημαντική αύξηση στην δραστηριότητα παρατηρείται κατά την άσκηση και σε άλλα ένζυμα όπως η GPx (κυρίως στην καρδιά) και η CAT (κυρίως στους σκελετικούς μύες) [27]. Το αντιοξειδωτικό μόριο με την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική προστασία κατά την διάρκεια της άσκησης αλλά και μετά από αυτή είναι η GSH. Η συσχέτιση GSH και επαγόμενου από την άσκηση οξειδωτικού στρες εστιάζεται κυρίως στα ακόλουθα : 1) Κατά την διάρκεια της άσκησης, σημαντικό ποσοστό της GSH οξειδώνεται σε GSSG (στην καρδιά και στους σκελετικούς μύες) εξαιτίας της αυξημένης παραγωγής ROS, 2) η ανεπάρκεια GSH κατά την άσκηση σχετίζεται με μια σειρά από φυσιολογικές και βιοχημικές διαταραχές όπως η μειωμένη αναλογία GSH/GSSG και η αυξημένη υπεροξείδωση των λιπιδίων στους σκελετικούς μύες και στην καρδιά [27].

## Σκοπός της εργασίας

Πάρα την δημοσίευση ολόένα και περισσότερων εργασιών σχετικών με το οξειδωτικό στρές αλλά και εργασιών που συσχετίζουν το οξειδωτικό στρές με την άσκηση γνωρίζουμε λίγα πράγματα για το πώς ανταποκρίνεται ο οργανισμός ενός ανήλικου ατόμου στο οξειδωτικό στρές μετά την άσκηση. Σε μια προσπάθεια να δωθούν κάποιες απαντήσεις για το πώς ανταποκρίνεται ο οργανισμός ενός ανήλικου στο παραγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρές, μετρήθηκαν δύο αντιοξειδωτικοί δείκτες σε παιδιά (κολυμβητές) ηλικίας 10-12 ετών πριν και μετά από οξεία άσκηση (κολύμβηση). Οι δείκτες που προσδιορίστηκαν ήταν η οξειδωμένη και η ανηγμένη γλουταθειόνη και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους έγινε στο αιμόλυμα.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο πείραμα συμμετείχαν 22 παιδιά ηλικίας 9-11 ετών που ασχολούνται συστηματικά με την κολύμβηση. Το συλλεχθέν φλεβικό αίμα τοποθετήθηκε σε Vacutainer που περιείχε EDTA ως αντιπηκτικό και κατόπιν προστέθηκε 1ml TCA 5% και αφού αναδεύτηκε σε vortex, φυγοκεντρήθηκε στις 6000rpm (4020 g) στους 5°C για 20min. Ακολούθως, συλλέχθηκε το υπερκείμενο και μοιράστηκε σε σωλήνες erpendorf (200μl σε κάθε erpendorf) οι οποίοι τοποθετήθηκαν στους -20°C μέχρι να ξεκινήσουν οι ποσοτικοί προσδιορισμοί της GSH και της GSSG. Όταν επρόκειτο να ξεκινήσουν οι προσδιορισμοί τα δείγματα υπέστησαν καθαρισμό με προσθήκη 60 μl ανά erpendorf, ισχυρή ανάδευση σε vortex και φυγοκέντρηση στις 16000rpm (28620g) στους 5°C για 5min. Το συλλεχθέν υπερκείμενο, εφόσον ήταν απόλυτα καθαρό, προστίθετο σε νέο erpendorf. Εάν όμως, το συλλεχθέν υπερκείμενο δεν ήταν απόλυτα καθαρό, τότε επαναλαμβανόταν η διαδικασία του καθαρισμού. Συγκεκριμένα, τα δείγματα των παιδιών πριν την άσκηση καθαρίστηκαν εις διπλούν ενώ τα δείγματα των παιδιών μετά την άσκηση χρειάστηκαν μόνο έναν καθαρισμό. Τα erpendorf με το τελικό υπερκείμενο χρησιμοποιήθηκαν για τους πειραματικούς προσδιορισμούς.

## Ποσοτικός προσδιορισμός GSH

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της GSH έγινε βάσει του πρωτοκόλλου των Reddy et al. (2004) [28]. Συγκεκριμένα, σε 20μl αιμόλυματος προστέθηκαν 660μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 67 mM (pH7,95) και 330μl διαλύματος DTNB 1 mM (που προέκυψε με διάλυση 0,0396g DTNB σε 100ml κιτρικού νατρίου 1%). Για το τυφλό χρησιμοποιήθηκαν 20μl απιονισμένου ύδατος αντί αιμόλυματος. Μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων στους σωλήνες erpendorf έγινε ισχυρή ανάδευση και επώαση τους στο σκοτάδι για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της 15λέπτης επώασης ακολούθησε φωτομέτρηση της απορρόφησης στα 412nm. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH έγινε βάσει του ακόλουθου τύπου :

Συγκέντρωση GSH(mmol/L) = (Abs δείγματος/13,6 – Abs τυφλού/ 13,6) × παράγοντας αραιώσης

Το 13,6 είναι ο μοριακός συντελεστής απαλοιφής του DTNB. Ο παράγοντας αραιώσης για τα πριν την άσκηση δείγματα είναι 170,69 ενώ για τα μετά την άσκηση δείγματα είναι 131,3. Ο παράγοντας αραιώσης προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010μl) με τον όγκο του αιμολύματος, πολλαπλασιάζοντας με 2 ώστε να ληφθεί υπόψη η αρχική αραιώση με 5% TCA (1:1) και πολλαπλασιάζοντας με 1,3 ώστε να ληφθεί υπόψη η δεύτερη αραιώση με 5% TCA (260:200). Η διαφορετική τιμή του παράγοντα αραιώσης μεταξύ των πριν την άσκηση και των μετά την άσκηση δειγμάτων οφείλεται στο γεγονός ότι στα πριν την άσκηση αιμολύματα έγινε καθαρισμός εις διπλούν ενώ στα μετά την άσκηση αιμολύματα έγινε καθαρισμός εις απλούν.

Η αρχή αυτής της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της ανηγμένης γλουταθειόνης στο αιμόλυμα βασίζεται στην απορρόφηση στα 412nm του έγχρωμου προϊόντος που προκύπτει από την στοιχειομετρική αντίδραση της σουλφυδρυλομάδας της GSH με το DTNB (5,5-DiThio-bis 2-NitroBenzoic acid).

### Ποσοτικός προσδιορισμός GSSG

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της GSSG έγινε βάσει του πρωτοκόλλου των Tietze F. et al. (2004) [29]. Συγκεκριμένα, σε 260 μl αιμολύματος προστέθηκαν 20-30 μl 1M NaOH ώστε το pH να γίνει 7-7,5. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 4μl vinyl piridyne (αποκλείει την GSH και επιτρέπει μόνο τον ποσοτικό προσδιορισμό της GSSG) και ακολούθησε επώαση για 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της δίωρης επώασης, 5μl αιμολύματος προστέθηκαν σε νέα erpendorfs, σε καθένα εκ των οποίων προστέθηκαν 194μl απιονισμένου ύδατος, 100μl δ/τος DTNB 10mM (προκύπτει με διάλυση 0,04g DTNB σε 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος 143 mM Na -P, 6,3 mM EDTA, pH 7,5), 100μl διαλύματος NADPH 3mM (προκύπτει με διάλυση 0,0025g NADPH σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος 143 mM Na -P, 6,3 mM EDTA) και 600μl ρυθμιστικού διαλύματος 143 mM Na -P, 6,3 mM EDTA. Για το τυφλό προστίθενται σε erpendorf 600μl buffer, 100μl δ/τος NADPH 3mM, 100μl δ/τος DTNB 10mM και 199μl απιονισμένου ύδατος. Για το πρότυπο προστίθενται σε erpendorf 600μl buffer, 100μl δ/τος NADPH 3mM, 100μl δ/τος DTNB 10mM, 124 μl απιονισμένου ύδατος και 75μl αραιωμένου διαλύματος GSSG 10μmol/L (προκύπτει με αραιώση 100:1 του πυκνού διαλύματος της GSSG το οποίο παρασκευάζεται με διάλυση 0,0061g GSSG σε 10ml buffer). Ο παρακάτω πίνακας συνοψίζει τα παραπάνω δεδομένα :

	Τυφλό (blank)	Πρότυπο(0,75nM)	Δείγμα
Phosphate buffer	600 μl	600 μl	600 μl
NADPH	100 μl	100 μl	100 μl
DTNB	100 μl	100 μl	100 μl
Απιονισμένο ύδωρ	199 μl	124 μl	194 μl
Αραιό δ/μα GSSG	—	75 μl	—
Αιμόλυμα	—	—	5 μl

Πίνακας 3. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για τον προσδιορισμό της GSSG.

Εν συνεχεία, γίνεται ανάδευση των εppendorf και επώαση για 5-10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Πριν την φωτομέτρηση προστίθεται 1μl ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης και ήπια ανάδευση. Η φωτομέτρηση γίνεται στα 412nm για 180sec. Όλες οι μετρήσεις έγιναν εις τριπλούν.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSSG έγινε βάσει του ακόλουθου τύπου :

Συγκέντρωση GSSG (mmol/L) = (Abs δείγματος/Abs προτύπου - Abs τυφλού/Abs προτύπου) × 0,75 × παράγοντας αραιώσης

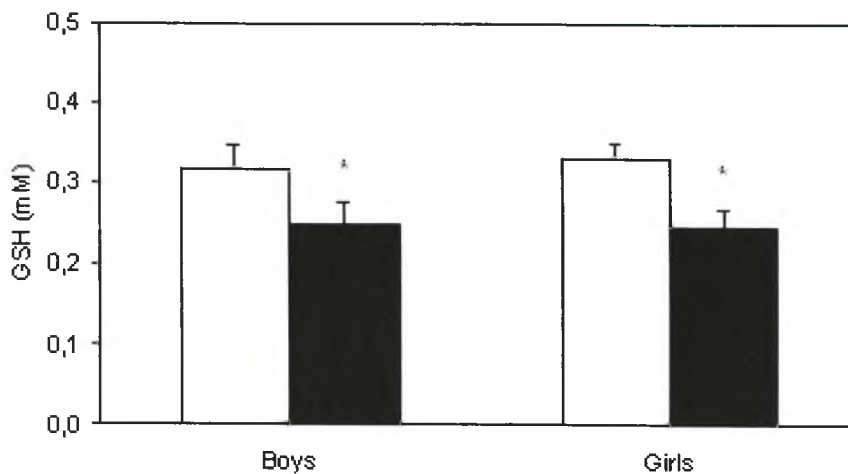
Το 0,75 είναι ο μοριακός συντελεστής απαλοιφής του DTNB. Ο παράγοντας αραιώσης για τα πριν την άσκηση δείγματα είναι 0,68 ενώ για τα μετά την άσκηση δείγματα είναι 0,52. Ο παράγοντας αραιώσης προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000μl) με τον όγκο του αιμολύματος (5μl), πολλαπλασιάζοντας με 2 ώστε να ληφθεί υπόψη η αρχική αραιώση με 5% TCA (1:1), πολλαπλασιάζοντας με 1,3 ώστε να ληφθεί υπόψη η δεύτερη αραιώση με 5% TCA (260:200) και διαιρώντας με 1000 ώστε η μετρήσιμη συγκέντρωση να είναι σε mM. Η διαφορετική τιμή του παράγοντα αραιώσης μεταξύ των πριν την άσκηση και των μετά την άσκηση δειγμάτων οφείλεται στο γεγονός ότι στα πριν την άσκηση αιμολύματα έγινε καθαρισμός εις διπλούν ενώ στα μετά την άσκηση αιμολύματα έγινε καθαρισμός εις απλούν.

Η αρχή αυτής της μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού της οξειδωμένης γλουταθειόνης βασίζεται στο ότι η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης χρησιμοποιώντας ως αναγωγική δύναμη NADPH μετατρέπει την οξειδωμένη γλουταθειόνη σε ανηγμένη και η ανηγμένη γλουταθειόνη αντιδρά με το DTNB δίνοντας το έγχρωμο προϊόν που απορροφά στα 412nm.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

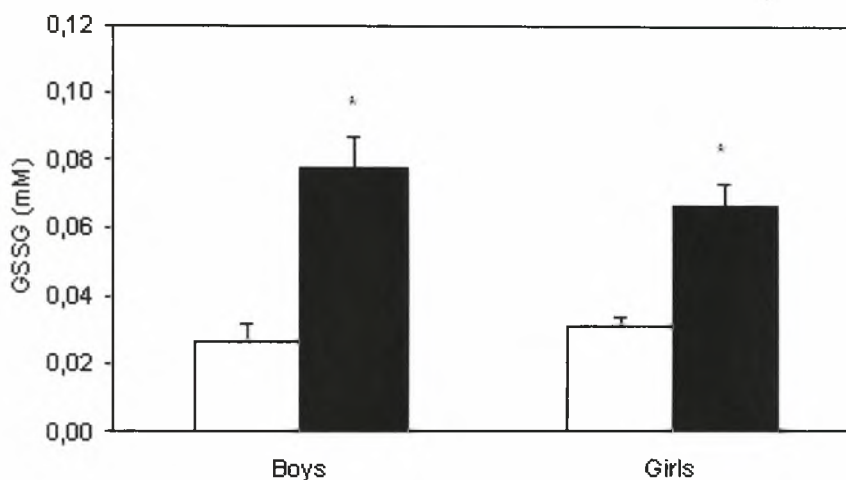
Η άσκηση μείωσε την συγκέντρωση της GSH ( $P=0,017$ ) και αύξησε την συγκέντρωση της GSSG ( $P=0,005$ ). Εξαιτίας αυτών των επιδράσεων, η άσκηση μείωσε την αναλογία GSH/GSSG. Καμιά διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ αγοριών και κοριτσιών μετά την άσκηση όσον αφορά τόσο την GSH όσο και την GSSG.

### GSH (ανηγμένη γλουταθειόνη)



Διάγραμμα 1. Ραβδόγραμμα σύγκρισης της GSH στα αγόρια και στα κορίτσια πριν την άσκηση (ανοιχτόχρωμες ράβδοι) και μετά την άσκηση(σκουρόχρωμες ράβδοι).

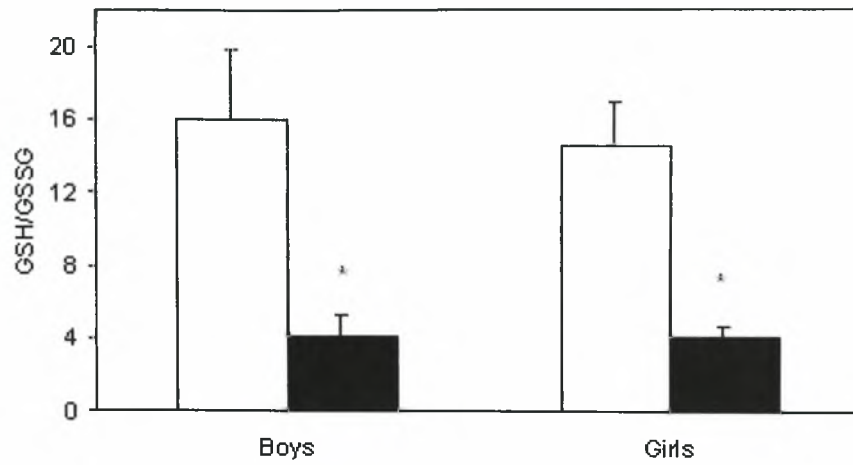
### GSSG (οξειδωμένη γλουταθειόνη)



Διάγραμμα 2. Ραβδόγραμμα σύγκρισης της GSSG στα αγόρια και στα κορίτσια πριν την άσκηση (ανοιχτόχρωμες ράβδοι) και μετά την άσκηση(σκουρόχρωμες ράβδοι).



### GSH/GSSG (ανηγμένη γλουταθειώνη / οξειδωμένη γλουταθειώνη)



Διάγραμμα 3. Ραβδόγραμμα σύγκρισης του λόγου GSH/GSSG στα αγόρια και στα κορίτσια πριν την άσκηση (ανοιχτόχρωμες ράβδοι) και μετά την άσκηση(σκουρόχρωμες ράβδοι).

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα άτομα στα οποία έχει μελετηθεί εκτεταμένα η σχέση οξειδωτικού στρες και άσκησης ανήκουν κυρίως στην ομάδα των ενηλίκων ενώ έχει αγνοηθεί η επίδραση της άσκησης στα παιδιά. Υπάρχουν λίγες ενδείξεις που διαφοροποιούν την απόκριση του οργανισμού στην άσκηση μεταξύ παιδιών και ενηλίκων, αλλά αναφέρονται κυρίως σε μεταβολικό και φυσιολογικό επίπεδο. Πρώτον, στα παιδιά παρατηρείται μεγαλύτερη κατανάλωση οξυγόνου. Δεύτερον, οι μεταβολές του pH και ο ρυθμός μετατροπής του ανόργανου φωσφόρου σε φωσφοκρεατίνη είναι μικρότερος. Τρίτον, η ροή του οξυγόνου στους ασκούμενους μύες είναι υψηλότερη και κατά συνέπεια τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες που εκτίθενται τα παιδιά είναι μεγαλύτερα. Η εργασία αυτή αποτέλεσε την πρώτη προσπάθεια για σύγκριση των επιπέδων δεικτών του οξειδωτικού στρες σε αγόρια και κορίτσια ηλικίας 9-11 που ασχολούνται συστηματικά με την κολύμβηση πριν και μετά από οξεία άσκηση. Βάσει των αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας καθίσταται σαφές ότι τα αγόρια και τα κορίτσια μετά την άσκηση υφίστανται τις ίδιες ποσοτικές μεταβολές στην GSH (μειώθηκε κατά 27% στα αγόρια και κατά 34% στα κορίτσια), στην GSSG (αυξήθηκε κατά 66% στα αγόρια και κατά 54% στα κορίτσια) και στην αναλογία GSH/GSSG (μετά την άσκηση υποετραπλασιάστηκε τόσο στα αγόρια όσο και στα κορίτσια) και επομένως το φύλο δεν επηρεάζει την συγκέντρωση των εν λόγω δεικτών στο αίμα ενός ασκούμενου ατόμου αυτής της ηλικίας. Τα δεδομένα των μέχρι σήμερα δημοσιευμένων εργασιών που συγκρίναν τα επίπεδα GSH, GSSG, GSH/GSSG σε ενήλικα θηλυκά και αρσενικά άτομα πριν και μετά την άσκηση είναι αρκετά αμφιλεγόμενα. Κάποιες μελέτες έδειξαν ότι μετά την άσκηση στα ενήλικα αρσενικά άτομα γινόταν αύξηση των οξειδωμένων μορίων και μείωση των αντιοξειδωτικών μορίων σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι στα ενήλικα θηλυκά άτομα [30,31], άλλες μελέτες βρήκαν τα ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα [32], ενώ άλλες μελέτες δεν παρατήρησαν καμία απολύτως διαφορά ανάμεσα στα θηλυκά και στα αρσενικά άτομα [33,34]. Τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας υποδεικνύουν ότι η επίδραση της άσκησης στο οξειδοαναγωγικό στάτους ενός ανήλικου ατόμου είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την επίδραση της σε ενήλικα άτομα όπως αυτή μελετήθηκε σε αρκετές επιστημονικές εργασίες [35,36,37]. Βέβαια, η σύγκριση αυτή δεν είναι απαραίτητα σωστή λόγω των διαφορετικών μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτές τις εργασίες. Αντίθετα, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα παλαιότερης εργασίας [38] στην οποία χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια πρωτόκολλα και η οποία αφορούσε την επίδραση της άσκησης στους συγκεκριμένους δείκτες του οξειδωτικού στρες σε ενήλικες και όχι σε παιδιά. Συγκρίνοντας, λοιπόν, τα αποτελέσματα των δύο εργασιών εξάγεται το συμπέρασμα ότι η άσκηση πιθανότατα προκαλεί μεγαλύτερες μεταβολές στα επίπεδα των GSH, GSSG, GSH/GSSG στα ανήλικα άτομα εν συγκρίσει με τα ενήλικα άτομα. Αξιοσημείωτα είναι και τα αποτελέσματα μιας εργασίας που δεν έχει δημοσιευτεί ακόμη και βάσει της οποίας παιδιά που ασχολούνται με την κολύμβηση εμφανίζουν μεγαλύτερο οξειδωτικό στρες ύστερα από οξεία άσκηση συγκριτικά με παιδιά της ίδιας ηλικίας που δεν ασχολούνται με την κολύμβηση. Αξίζει να σημειωθεί επίσης ότι στο παρελθόν έχουν γίνει μόνο δύο εργασίες που να μελετούν την επίδραση της οξείας κολύμβησης σε δείκτες του οξειδωτικού στρες σε ενήλικες [35,39] και έδειξαν μείωση της GSH, αύξηση της GSSG και συνεπώς μείωση της αναλογίας GSH/GSSG, δηλαδή αποτελέσματα που είναι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από αυτή την εργασία είναι τόσο γενικού όσο και εξειδικευμένου ενδιαφέροντος. Γενικά, αναδεικνύεται η σημασία της άσκησης στην κινητοποίηση των αντιοξειδωτικών μορίων και επομένως στην καταπολέμηση των ιδιαίτερα επικίνδυνων ελευθέρων ριζών. Όσον αφορά τα πιο εξειδικευμένα συμπεράσματα, μπορούμε να πούμε ότι η οξεία άσκηση προκαλεί σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της ανηγμένης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης που ως γνωστόν είναι πολύ σημαντικός δείκτης του οξειδωτικού στρες και ότι οι μεταβολές αυτές είναι πολύ μεγαλύτερες συγκρινόμενες με τις μεταβολές που υφίστανται οι εν λόγω δείκτες στους ενήλικες ύστερα από παρόμοιας έντασης άσκηση. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι το φύλο δεν επηρεάζει την απόκριση των ανήλικων στο επαγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες και έτσι αγόρια και κορίτσια εμφανίζουν παραπλήσιες συγκεντρώσεις των GSH, GSSG και GSH/GSSG τόσο πριν όσο και μετά την άσκηση. Καθίσταται, λοιπόν, απαραίτητη η διεξαγωγή και άλλων εργασιών που να συσχετίζουν την άσκηση και το οξειδωτικό στρες σε παιδιά αλλά και εργασιών που να συγκρίνουν το επαγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες σε παιδιά και σε ενήλικες.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. John McMurry: Οργανική Χημεία (2<sup>η</sup> έκδοση), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2000.
2. Bulkley Gregory, Free radicals and reactive oxygen species. The evolution of a scientific concept. COSMOS JOURNALS, 2002.
3. Halliwell Barry and Gutteridge John M.C., Free radicals in biology and chemistry, Oxford Science Publications, 1998.
4. Barry Halliwell, Free radicals and other reactive species in disease, Encyclopedia of life sciences, 2001.
5. I. Fridovich, Biological effects of the superoxide radical, Arch. Biochem. Biophys. 247 (1986) 1–11.
6. Chance B., Sies H., Boveris A., Hydroperoxide metabolism in mammalian organs, Physiol Rev 59: 527-605, 1979.
7. Cadenas, K.J.A. Davies, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, Free Rad. Biol. Med. 29, 222–230, 2000.
8. Muller, F. L., Liu, Y., & Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 49064–49073.
9. Caro, A. A., & Cederbaum, A. I. , Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*, 44, 27–42, 2004.
10. Κουρέτας Δημήτριος, Βιοχημική Τοξικολογία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας, 2003.
11. Shrader, M., & Fahimi, H. D., Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochemistry and Cell Biology*, 122, 383–393, 2004.
12. M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress- induced cancer, *Chemico-Biological Interactions* 160 (2006) 1–40
13. Kenneth Beckman, Bruce Ames, The free radical theory of aging matures, *Physiological reviews*, Vol. 78, No. 2, 1998.
14. Igor B. Afanas'ev, Free radical mechanisms of aging processes under physiological conditions, *Biogerontology*, 6 : 283-290, 2005.
15. Lubert Stryer, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2<sup>η</sup> έκδοση, 1997.
16. <http://bioweb.wku.edu/courses/Biol114/online/enzyme/enzyme1.asp>
17. <http://www.garvnull.com/Documents/vitaminc.htm>
18. [http://www.pdrhealth.com/drug\\_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/vit\\_0264.shtml](http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/vit_0264.shtml)
19. [http://www.uic.edu/classes/phar/phar332/Clinical\\_Cases/vitamin%20cases/vitamin%20E/Vitamin%20E%20intro%202.htm](http://www.uic.edu/classes/phar/phar332/Clinical_Cases/vitamin%20cases/vitamin%20E/Vitamin%20E%20intro%202.htm).
20. Αθανάσιος Σμοκοβίτης, Φυσιολογία, Εκδόσεις αδελφών Κυριακίδη, 4<sup>η</sup> έκδοση, 2004.
21. <http://en.wikipedia.org/wiki/Melatonin>
22. Guoyao Wu, Yun-Zhong Fang, Sheng Yang, Joanne R. Lupton, Nancy D. Turner, Glutathione metabolism and its implications for health, American Society for Nutritional Sciences, 2004.
23. Susan M. Deneke, Barry L. Fanburg, Regulation of cellular glutathione, American Physiological society, 1989.
24. <http://www.portfolio.mvm.ed.ac.uk/studentwebs/session2/group31/introduc.htm>

25. Elosua, R., Molina, L., Fito, M., Arquer, A., Sanchez-Quesada, J.L., Covas, M.I., Ordóñez-Llanos, J., Marrugat, J., 2003. Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women.
26. C.E. Cooper, N.B. Vollaard, T. Choueiri, M.T. Wilson, 2002, Exercise, free radicals and oxidative stress, Biochemical Society.
27. Li. Li Ji, Antioxidants and oxidative stress in exercise, P.S.E.N.M., Vol. 222, 1999.
28. Reddy Y.N., Murthy S.V., Krishna D.R., Prabhakar M.C. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Appl Physiol.*, (2004) 73:1805-9.
29. Tietze, Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues, *Analyt. Biochem.*, (1969), 27:502-552.
30. İlhan N, Kamanlı A, Özmerdivenli R, İlhan N 2004 Variable effects of exercise intensity on reduced glutathione, thiobarbituric-acid reactive substance levels, and glucose concentration. *Arch Med Res* 35:294–300.
31. Balog T, Sobocanec S, Sverko V, Krolo I, Rocic B, Marotti M, Marotti T 2006 The influence of season on oxidant–antioxidant status in trained and sedentary subjects. *Life Sci* 78:1441-1447.
32. Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Tuomainen TP, Nyssonen K, Kosonen L, Ristonmaa U, Lakka HM, Salonen R, Korpela H, Salonen JT 2002 Exhaustive exercise increases plasma/serum total oxidation resistance in moderately trained men and women, whereas their VLDL + LDL lipoprotein fraction is more susceptible to oxidation. *Scand J Clin Lab Invest* 62:599-607.
33. Habif S, Mutafa I, Turgan N, Onur E, Duman C, Ozmen D, Bayindir O 2001 Age and gender dependent alterations in the activities of glutathione related enzymes in healthy subjects. *Clin Biochem* 34:667–671.
34. Rodriguez MC, Rosenfeld J, Tarnopolsky MA 2003 Plasma malondialdehyde increases transiently after ischemic forearm exercise. *Med Sci Sports Exerc* 35:1859-1865.
35. İlhan N, Kamanlı A, Özmerdivenli R, İlhan N 2004 Variable effects of exercise intensity on reduced glutathione, thiobarbituric-acid reactive substance levels, and glucose concentration. *Arch Med Res* 35:294–300.
36. Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL 2000 Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 32:1576-1581.
37. Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, Consitt LA 2005 Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res* 19:276-285.
38. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos I, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc*, in press.
39. Ookawara T, Haga S, Ha S, Oh-Ishi S, Toshinai K, Kizaki T, Ji LL, Suzuki K, Ohno H 2003 Effects of endurance training on three superoxide dismutase isoenzymes in human plasma. *Free Radic Res* 37:713-719.