

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΤΩΝ ΤΒΑΡS
ΚΑΙ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΩΝ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΩΝ ΣΕ ΑΝΗΛΙΚΑ
ΑΤΟΜΑ



Χατζιωάννου Μαρίνα

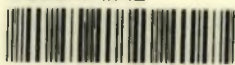
Λάρισα 2006



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

Αριθ. Εισ.: 4979/1
Ημερ. Εισ.: 14-11-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΧΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087750

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο για την ανάθεση της διπλωματικής εργασίας, την πολύτιμη βοήθεια του και την καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια αυτής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Νικολαΐδη Μιχάλη για την υπομονή του, τις γνώσεις που μου προσέφερε, τις συμβουλές του και την πολύτιμη βοήθεια του τόσο κατά τη διάρκεια του εργαστηριακού πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της διπλωματικής αυτής εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κύπαρο Αντώνη για τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια του εργαστηριακού πειράματος και την ευχάριστη συνεργασία.

Ευχαριστώ τους κ. Στάγκο Δημήτρη και κ. Καραγιάννη Άννα για την ευχάριστη συνεργασία και βοήθεια κατά την εκπόνηση του εργαστηριακού πειράματος καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου Πανοπούλου Ευαγγελία, Πάνου Νεραΐδα και Σαμαρά Λεωνίδα για την ευχάριστη συνεργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	7
Εισαγωγή.....	8
Οξυγόνο.....	8
Το ενεργό οξυγόνο στον οργανισμό.....	9
Ελεύθερες ρίζες.....	10
Παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	11
α. Προγραμματισμένη παραγωγή.....	11
β. Μη προγραμματισμένη παραγωγή.....	12
1. Παραγωγή ROS κατά το μεταβολισμό του οξυγόνου.....	12
2. Παραγωγή ROS στην ισχαιμία.....	12
3. Παραγωγή ROS κατά την οξείδωση της αιμοσφαιρίνης και της μυοσφαιρίνης.....	12
4. Άλλες οδοί παραγωγής των ROS.....	12
Θετικές επιδράσεις.....	13
Αρνητικές επιδράσεις.....	13
Πως οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες στα κύτταρα;.....	13
Αντιοξειδωτικά.....	16
A. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	17
1. Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD).....	17
2. Καταλάση (CAT).....	17
3. Περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPX).....	18
B. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	18
1. Βιταμίνη E (τοκοφερόλη).....	18
2. Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ).....	19
3. β-καροτένιο και βιταμίνη A (ρετινόλη).....	20
4. Φλαβονοειδή.....	21
5. Θειόλες.....	21
6. Συνένζυμο Q ₁₀	22
7. Ουρικό οξύ.....	23
8. Heat Shock Proteins (HSP).....	24
9. Φερριτίνη.....	24
Οξειδωτικό stress.....	25
Άσκηση και οξειδωτικό stress.....	26
Σκοπός της εργασίας.....	28
Υλικά και μέθοδοι.....	29
Υλικά.....	29
Συμμετέχοντες.....	29
Σωματομετρικά χαρακτηριστικά.....	29
Δίαιτα.....	29
Πρωτόκολλο άσκησης.....	29
Συλλογή αίματος και χειρισμός.....	30
Όγκος αίματος.....	30
Μέθοδοι.....	30
Μαλοναλδεϋδη- TBARS (ThioBarbituric Reactive Substances).....	30

Πρωτεϊνικά καρβονύλια.....	31
Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση.....	33
Αποτελέσματα.....	34
Ατομικά χαρακτηριστικά, διαίτα και ταχύτητα κολύμβησης.....	34
Όγκος αίματος.....	34
TBARS.....	34
Πρωτεϊνικά καρβονύλια.....	35
Συζήτηση.....	36
Σύγκριση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του αίματος μεταξύ αγοριών και κοριτσιών κατά την ηρεμία.....	36
Σύγκριση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του αίματος μεταξύ αγοριών και κοριτσιών μετά την άσκηση.....	36
Το μέγεθος των επαγόμενων από την άσκηση αλλαγών στο οξειδοαναγωγικό status του αίματος.....	37
Σύγκριση με μελέτες που χρησιμοποίησαν την κολύμβηση σαν πρότυπο άσκησης.....	38
Συμπεράσματα.....	38
Βιβλιογραφία.....	39

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η μοριακή δομή του ατόμου του οξυγόνου.	8
Εικόνα 2: Η σταδιακή μονοσθενής αναγωγή του οξυγόνου (ROS).	9
Εικόνα 3: Σταδιακή αναγωγή του οξυγόνου προς δραστικά είδη οξυγόνου (ROS).	11
Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση των παραγόντων που προκαλούν παραγωγή ελευθέρων ριζών.	16
Εικόνα 5: Τρισδιάστατη δομή της κυτταροπλασματικής SOD.	17
Εικόνα 6: Τρισδιάστατη δομή της καταλάσης.	18
Εικόνα 7: Τρισδιάστατη δομή της GPX.	18
Εικόνα 8: Τρισδιάστατη δομή του ασκορβικού οξέος.	20
Εικόνα 9: Τρόπος δράσης των HSP.	24
Εικόνα 10: Τρισδιάστατη δομή της φερριτίνης και των υπομονάδων της.	25
Εικόνα 11: Οξειδωτικό stress, η διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ παραγωγής δραστικών ειδών κι αντιοξειδωτικών, προς όφελος των πρώτων.	26
Εικόνα 12: Αντίδραση του TBA με την MDA προς σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος.	30

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων.	14
Σχήμα 2: Η χημική δομή της α-τοκοφερόλης (Βιταμίνη E).	19
Σχήμα 3: Χημική δομή του ασκορβικού οξέος (Βιταμίνη C) και των μεταβολιτών του.	19
Σχήμα 4: Η χημική δομή του β-καροτενίου.	20
Σχήμα 5: Από ένα μόριο β-καροτενίου προκύπτουν δύο μόρια ρετινόλης.	20
Σχήμα 6: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης των φλαβονοειδών.	21
Σχήμα 7: Η χημική και η τρισδιάστατη δομή της γλουταθειόνης (GSH).	22
Σχήμα 8: Το συνένζυμο Q ₁₀ (CoQ ₁₀) μπορεί να υπάρξει σε 3 καταστάσεις.	23
Σχήμα 9: Η χημική δομή του 9-μέθυλο ουρικού οξέος.	23
Σχήμα 10: Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (ανοσολογικής και φασματοφωτομετρικής).	32

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Η ονομασία καθώς και η χημική δομή των διαφόρων δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS).	8
Πίνακας 2: Επιδράσεις της οξειδωσης από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου σε ζωτικά όργανα.	10

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Ραβδόγραμμα 1: Το μέγεθος επίδρασης της άσκησης στα TBARS σε αγόρια και κορίτσια.	34
Ραβδόγραμμα 2: Το μέγεθος επίδρασης της άσκησης στην παραγωγή καρβονυλίων σε αγόρια και κορίτσια.	35

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADP: διφωσφορική αδενοσίνη
AMP: μονοφωσφορική αδενοσίνη
ATP: τριφωσφορική αδενοσίνη
CAT: καταλάση
CoQ10: συνένζυμο Q10
DPPH: 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl
DTNB: 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)
FR: ελεύθερη ρίζα
GPX: περοξειδάση της γλουταθειόνης
GSH: ανηγμένη μορφή γλουταθειόνης
GSSG: οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης
Hsp: πρωτεΐνη θερμικού σοκ
L[•]: λιπιδιακή ρίζα
LOO[•]: λιποϋπεροξειδική ρίζα
MDA: μαλονδυαλδεΐδη
NADPH: φωσφορικό νικοτινάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο
Q: ουβικινόνη
QH[•]: ημικινόνη
QH₂: ουβικινόλη
ROO[•]: λιποϋπεροξειδική ρίζα
ROOH: λιποϋπεροξειδίο
ROS: δραστικά είδη οξυγόνου
SOD: δισμουτάση του υπεροξειδίου
TBARS: ενώσεις που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ
TCA: τριχλωροξικό οξύ
XO: οξειδάση ξανθίνης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα έρευνες είναι γνωστό πως η φυσική άσκηση αποτελεί σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό. Κατ' επέκταση, η άσκηση αποτελεί σημαντική πηγή οξειδωτικού stress. Ωστόσο, οι έρευνες αυτές απευθύνονται κυρίως σε ενήλικες. Άγνωστος μέχρι στιγμής είναι ο τρόπος με τον οποίο η άσκηση επιδρά στον οργανισμό των παιδιών και πιο συγκεκριμένα σε παιδιά που ασχολούνται συστηματικά με κάποιο άθλημα αντοχής. Σκοπός λοιπόν της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη δεικτών οξειδωτικού stress σε παιδιά 9-11 ετών που ασχολούνται με την κολύμβηση. Για το λόγο αυτό μετρήθηκαν πριν και μετά την κολύμβηση τα επίπεδα της μαλονδυαλδεϋδης (MDA) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, τα οποία αποτελούν δείκτες υπεροξειδωσης των λιπιδίων και πρωτεϊνικής βλάβης αντίστοιχα, σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία.

Οι μετρήσεις μας έδειξαν στατιστικά σημαντική αύξηση της MDA (κατά +1.59 και +2.14 για τα αγόρια και τα κορίτσια αντίστοιχα) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (κατά +2.22 και +4.61 για τα αγόρια και τα κορίτσια αντίστοιχα). Ταυτόχρονα, υπήρξε συνεργασία με άλλες δύο διπλωματικές εργασίες που προσδιόρισαν την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού (TAC, Total Antioxidant Capacity), τη δραστικότητα της καταλάσης, τα επίπεδα της ανηγμένης (GSH) και οξειδωμένης (GSSG) γλουταθειόνης καθώς και του λόγου αυτών (GSH/GSSG) για να επιτευχθεί μία ολοκληρωμένη εικόνα γύρω από το πώς αντιδρά ο παιδικός οργανισμός στο οξειδωτικό stress. Και στις δύο αυτές εργασίες επίσης παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αυξήσεις των εν λόγω δεικτών. Τα αποτελέσματα των τριών εργασιών συγκλίνουν στο γεγονός ότι η άσκηση αυξάνει σημαντικά το οξειδωτικό stress στα παιδιά.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

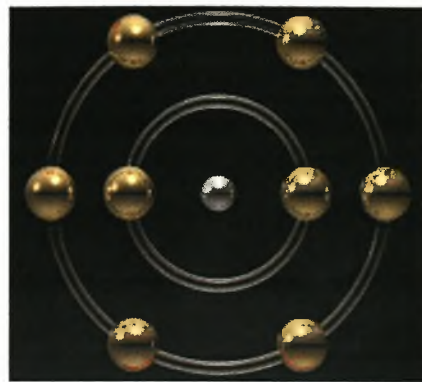
Οξυγόνο

Η εμφάνιση του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα χρονολογείται περίπου πριν 2,5 δισεκατομμύρια χρόνια και ήταν ανάμεσα στα πρώτα μολυσματικά γεγονότα που συνέβησαν στη γη, λόγω του ότι μέχρι τότε οι ζωντανοί οργανισμοί ήταν αναερόβιοι. Φαίνεται πως συνέβη λόγω της εξέλιξης της φωτοσύνθεσης από κυανοβακτήρια, πράγμα το οποίο αύξησε σημαντικά τα επίπεδα του οξυγόνου. Η αντίδραση του με τα ιόντα σιδήρου, που ήταν άφθονα στην πρώιμη αναγωγική ατμόσφαιρα, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό βλαβερών ριζών υπεροξειδίου και υδροξυλίου, οι οποίες προσβάλλουν όλα τα μακρομόρια (νουκλεικά οξέα, λιπίδια και πρωτεΐνες). Οι ζωντανοί οργανισμοί έπρεπε να αναπτύξουν μηχανισμούς ούτως ώστε να προστατευτούν από το οξειδωτικό stress.

Το ατμοσφαιρικό οξυγόνο στη βασική του μορφή έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια γιατί αποτελείται από δύο ριζες. Αυτό το χαρακτηριστικό κάνει το οξυγόνο παραμαγνητικό και μη δραστικό με οργανικά μόρια, εκτός κι αν «ενεργοποιηθεί». Η ανάγκη ενεργοποίησης του επέρχεται λόγω του ότι τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια του έχουν παράλληλα spin. Η ενεργοποίηση του οξυγόνου μπορεί να συμβεί με δύο μηχανισμούς:

1. Απορρόφηση ενέργειας

Η δι-ριζική μορφή του οξυγόνου (triplet oxygen, πίνακας 1) απορροφώντας επαρκή ενέργεια για να αντιστρέψει το spin του ενός από τα δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια σχηματίζει ένα μόριο οξυγόνου (ατομικό οξυγόνο), στο οποίο τα δύο ηλεκτρόνια έχουν αντίθετα spin. Αυτή η ενεργοποίηση υπερνικά τον περιορισμό λόγω spin και το οξυγόνο μπορεί να συμμετάσχει σε αντιδράσεις με ταυτόχρονη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων (δισθενής αναγωγή). Με τον τρόπο αυτό μπορεί να αντιδράσει με οργανικά μόρια.



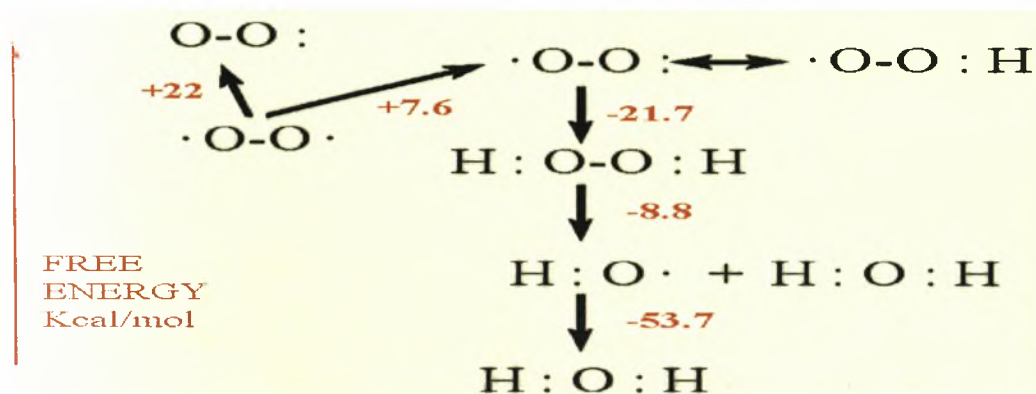
Εικόνα 1: Η μοριακή δομή του ατόμου του οξυγόνου (από www.webelements.com).

Δραστικό είδος οξυγόνου (ROS)	Χημική δομή
Triplet oxygen	$\cdot\text{O}-\text{O}\cdot$
Ατομικό οξυγόνο	$\text{O}-\text{O}:$
Υπεροξείδιο	$\cdot\text{O}-\text{O}:$
Ρίζα perhydroxyl	$\cdot\text{O}-\text{O}-\text{H}$
Υπεροξείδιο υδρογόνου	$\text{H}:\text{O}-\text{O}:\text{H}$
Ρίζα υδροξυλίου	$\text{H}:\text{O}\cdot$
Ιόν υδροξυλίου	$\text{H}:\text{O}:$
Νερό	$\text{H}:\text{O}:\text{H}$

Πίνακας 1: Η ονομασία καθώς και η χημική δομή των διαφόρων δραστικών ειδών του οξυγόνου (ROS).

2. Μονοσθενής αναγωγή του οξυγόνου

Ο δεύτερος μηχανισμός ενεργοποίησης είναι η σταδιακή μονοσθενής αναγωγή του οξυγόνου προς σχηματισμό υπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου, ρίζας υδροξυλίου και τέλος νερού. Το πρώτο στάδιο αναγωγής είναι ενδόθερμο ενώ όλα τα επακόλουθα είναι εξώθερμα.



Εικόνα 2: Η σταδιακή μονοσθενής αναγωγή του οξυγόνου οδηγεί τελικά στο σχηματισμό νερού. Το πρώτο στάδιο, που είναι ενδόθερμο, έχει ως προϊόν το υπεροξείδιο ενώ οι επόμενες σταδιακές αναγωγές, που είναι εξώθερμες, οδηγούν στο σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου, ρίζας υδροξυλίου και τέλος νερού.

Ένα από τα παράδοξα της ζωής στον πλανήτη μας είναι ότι το μόριο που διατηρεί τους αερόβιους οργανισμούς εν ζωή, το οξυγόνο, δεν είναι μόνο απαραίτητο στον μεταβολισμό και την αναπνοή αλλά εμπλέκεται και σε πολλές ασθένειες κι εκφυλιστικές νόσους (Marx, 1985).

Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την επιβίωση. Είναι σχετικά σταθερό στην ατμόσφαιρα αλλά όταν απορροφηθεί σε μεγάλες ποσότητες από τον οργανισμό μπορεί να γίνει ενεργό κι έχει μία τάση να προσκολλά τον εαυτό του σε κάθε βιολογικό μόριο, συμπεριλαμβανομένων και μορίων υγιών κυττάρων. Η χημική δραστικότητα αυτών των δραστικών ειδών οφείλεται σε ένα ή περισσότερα ζεύγη ασύζευκτων ηλεκτρονίων.

Περίπου το 2% του οξυγόνου που φυσιολογικά αναπνέουμε μετατρέπεται σε ενεργό οξυγόνο κι αυτή η ποσότητα αυξάνεται σε 20% με την αερόβια άσκηση. Τέτοιες ελεύθερες ρίζες με ασύζευκτα ηλεκτρόνια είναι ασταθείς κι έχουν ένα υψηλό οξειδωτικό δυναμικό, το οποίο σημαίνει ότι είναι ικανά να αποσπούν ηλεκτρόνια από άλλα κύτταρα. Αυτός ο χημικός μηχανισμός είναι πολύ χρήσιμος για τα απολυμαντικά, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου και το όζον που χρησιμοποιούνται για την αποστείρωση τραυμάτων και ιατρικών εργαλείων. Μέσα στον οργανισμό αυτά τα δραστικά είδη αποτελούν σημαντικό πλεονέκτημα εξαιτίας της ικανότητας τους να επιτίθενται και να εξοντώνουν βακτήρια, ιούς κι άλλα άχρηστα προϊόντα.

Το ενεργό οξυγόνο στον οργανισμό

Προβλήματα προκύπτουν, ωστόσο, όταν μεγάλες ποσότητες δραστικών ειδών παράγονται στον οργανισμό, όπου μπορούν επίσης να βλάψουν

υγρή κύτταρα και ιστούς. Αυτό συμβαίνει γιατί οι ελεύθερες ρίζες αποσπούν ηλεκτρόνια από τα υγρή βιολογικά μόρια με αποτέλεσμα την οξειδωση τους, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες ασθένειες.

Οξειδωμένος ιστός	Οδηγεί σε :
Ήπαρ	Ηπατίτιδα, κίρρωση, καρκίνο
Πάγκρεας	Παγκρεατίτιδα, διαβήτη, καρκίνο
Νεφρός	Νεφρίτιδα, νέφρωση, καρκίνο

Πίνακας 2: Επιδράσεις της οξειδωσης από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου σε ζωτικά όργανα.

Ελεύθερες ρίζες (Free Radicals)

Οι ελεύθερες ρίζες, γνωστές από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για την περιγραφή των ενδιάμεσων ενώσεων στην οργανική κι ανόργανη χημεία. Διάφοροι χημικοί ορισμοί τους έχουν αποδοθεί, όμως μόνο το 1954 με την εργασία των Daniel Gilbert και Rebecca Gersham προτάθηκε ότι οι ρίζες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο σε βιολογικά περιβάλλοντα και είναι υπεύθυνες για δηλητηριώδεις διαδικασίες μέσα στο κύτταρο. Αργότερα, το 1956, ο Herman Denham διατύπωσε ότι ίσως να παίζουν κάποιο ρόλο σε φυσιολογικές διαδικασίες και συγκεκριμένα στη διαδικασία της γήρανσης. Η υπόθεση του ενέπνευσε πολλές εργασίες κι ερευνητικές προσπάθειες και συνεισέφερε σημαντικά στις μέχρι τώρα γνώσεις μας για τις ελεύθερες ρίζες και συγκεκριμένα για τις ρίζες που προέρχονται από το οξυγόνο, διότι οι μεταβολίτες αυτοί είναι πρωταγωνιστές σε βιοχημικές αντιδράσεις, κυτταρική απόκριση και σε κλινικά αποτελέσματα.

Ως ελεύθερη ρίζα ή δραστικό είδος (FR: Free Radical ή RS: Reactive Species) καθορίζεται «**κάθε μόριο ικανό ανεξάρτητης ύπαρξης, που περιέχει ένα η περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια**». Γενικά, τα δραστικά είδη αντιδρούν περισσότερο με άλλα μόρια από τα μη δραστικά είδη (αν κι ένα μόριο O₂, που κατηγοριοποιείται στα δραστικά είδη, δεν είναι ιδιαίτερα δραστικό). Ωστόσο δραστικά και μη είδη αντιδρούν μεταξύ τους και παράγουν νέα δραστικά είδη με μία αλυσιδωτή αντίδραση. Αυτές οι αλυσιδωτές αντιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν σε βλάβη των μακρομορίων του σώματος. Αντίθετα μία αντίδραση μεταξύ δύο δραστικών ειδών οδηγεί στο ζευγάρωμα των ασύζευκτων ηλεκτρονίων τους παράγοντας ένα μη δραστικό είδος.

Τα δραστικά είδη εντοπίζονται ενδο- κι έξω-κυτταρικά και μπορούν να παραχθούν ενδογενώς ή εξωγενώς (π.χ. προερχόμενα από το περιβάλλον).

Παραγωγή ελευθέρων ριζών

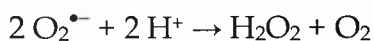
α. Προγραμματισμένη παραγωγή ελευθέρων ριζών

Σαν μέρος της φυσιολογικής λειτουργίας του το σώμα παράγει πολλά δραστικά είδη. Για παράδειγμα, ηλεκτρόνια, που ρέουν στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, παράγουν ελεύθερες ρίζες καθώς επίσης δραστικά είδη μπορούν να παραχθούν ως μέρος της λειτουργίας αποτοξίνωσης από τοξίνες.

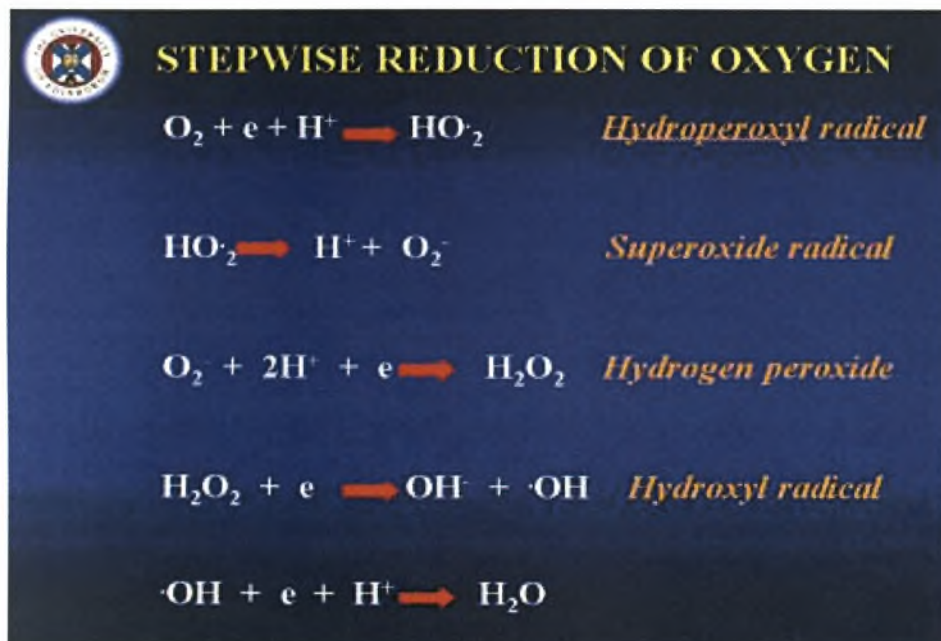
Στο ανοσοποιητικό σύστημα τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα έχουν ως ρόλο την καταστροφή των αντιγόνων. Αυτά τα κύτταρα του ανοσοποιητικού παράγουν $O_2^{\bullet-}$ με το σύστημα της ανηγμένης NADPH οξειδάσης, που είναι παρόν στα λευκοκύτταρα. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας απαιτούνται δύο μόρια οξυγόνου, όπως φαίνεται και στην αντίδραση:



Το $O_2^{\bullet-}$ μπορεί να μετατραπεί σε H_2O_2 σύμφωνα με την αντίδραση Fenton:



Στη συνέχεια το H_2O_2 μετατρέπεται σε $HOCl$, το οποίο δραστηριοποιείται κυρίως στην αποικοδόμηση των αντιγόνων. Συνεπώς, μία σημαντική ποσότητα ROS μπορεί να παραχθεί με αντιδράσεις του ανοσοποιητικού και παίζει θεμελιώδη βιολογικό ρόλο στον έλεγχο της ομοιόστασης.



Εικόνα 3: Σταδιακή αναγωγή του οξυγόνου προς δραστικά είδη οξυγόνου (ROS).

β. Μη προγραμματισμένη παραγωγή ελευθέρων ριζών

1) Παραγωγή ROS κατά το μεταβολισμό του οξυγόνου

Είναι γενικώς αποδεκτό πως ο μεταβολισμός του οξυγόνου, ο οποίος συμβαίνει στα μιτοχόνδρια, σχετίζεται με την γένεση των ROS. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ATP. Η οξείδωση των υποστρωμάτων συμβαίνει κατά τη διάρκεια του κύκλου του Krebs καθώς και στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, με το οξυγόνο να αποτελεί τον αποδέκτη αυτών. Στην αναπνευστική αλυσίδα το 95-99% του οξυγόνου που καταναλώνεται ανάγεται σε νερό. Ωστόσο, 1-5% θα μετασχηματιστεί σε $O_2^{\bullet-}$.

2) Παραγωγή ROS στην ισχαιμία

Η δεύτερη κύρια πηγή των ROS είναι οι καταστάσεις ισχαιμίας, που λαμβάνουν χώρα μετά από χειρουργικές επεμβάσεις, μετά από καταστάσεις σοκ και μετά από φυσική άσκηση. Κατά τη διάρκεια έντονης ή αναερόβιας άσκησης, η αιματική ροή φτάνει σε ενεργές περιοχές, όπως οι σκελετικοί μύες, ενώ άλλοι ιστοί μπορούν να βρεθούν σε κατάσταση υποξίας. Μετά την άσκηση αυτοί οι ιστοί λαμβάνουν μεγάλη ποσότητα οξυγόνου. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται ισχαιμική επανοξυγόνωση (ischemia reperfusion). Η δεϋδρογενάση της ξανθίνης (HDX) παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του ουρικού οξέος από την αποικοδόμηση του ATP και του AMP. Σε ιστούς που βρίσκονται σε ισχαιμική κατάσταση η HDX μετατρέπεται σε οξειδάση της ξανθίνης (XO). Κατά τη διάρκεια της επανοξυγόνωσης σχηματίζεται $O_2^{\bullet-}$ σε μία αντίδραση που καταλύεται από την XO. Ωστόσο ο ρόλος της XO στους μύες συζητείται γιατί μόνο μία μικρή ποσότητα αυτής υπάρχει μέσα τους.

3) Παραγωγή ROS κατά την οξείδωση της αιμοσφαιρίνης και της μυοσφαιρίνης

Η οξείδωση της αιμοσφαιρίνης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ROS. Στον ανθρώπινο οργανισμό το 3% της ολικής αιμοσφαιρίνης (περίπου 750g) μετασχηματίζεται από αυτοοξείδωση. Αυτή η αντίδραση, η οποία αυξάνεται κατά τη διάρκεια της άσκησης, παράγει μεθαιμοσφαιρίνη και $O_2^{\bullet-}$.

Η μυοσφαιρίνη μπορεί επίσης να οξειδωθεί με αυτοοξείδωση ή από ελεύθερες ρίζες κατά την ισχαιμική επανοξυγόνωση με ταυτόχρονη παραγωγή H_2O_2 . Στη συνέχεια, η μυοσφαιρίνη αντιδρά με το H_2O_2 παράγοντας άλλες ελεύθερες ρίζες.

4) Άλλες οδοί παραγωγής των ROS

Άλλες διαδικασίες που εμπλέκονται στην παραγωγή των ROS κατά τη διάρκεια της άσκησης χρησιμοποιούν κατεχολαμίνες και ουρικό οξύ, το οποίο έχει την ιδιότητα να μετατρέπει το $O_2^{\bullet-}$ σε OH^{\bullet} .

Ο οργανισμός μπορεί επίσης να έρθει σε επαφή με ελεύθερες ρίζες προερχόμενες από το περιβάλλον, όπως το κάπνισμα και ο αμιάντος, που εκθέτουν τους πνεύμονες σε δραστικά είδη.

Θετικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου επιδρούν στο ανοσοποιητικό σύστημα και συγκεκριμένα δρουν ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης. Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονής. Φλεγμονή μπορεί να προκληθεί και από φυσική άσκηση και συγκεκριμένα από έντονη και τραυματική άσκηση, όπως η έκκεντρη άσκηση. Αν και οι περισσότερες έρευνες έχουν επικεντρωθεί στις αρνητικές επιδράσεις των δραστικών ειδών, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου παίζουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία και στη γένεση των κυττάρων γιατί δρουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι ή τροποποιούν το οξειδοαναγωγικό status. Οι ROS επίσης είναι γνωστό ότι εμπλέκονται σε ενζυμική ενεργοποίηση, σε αποτοξίνωση από φάρμακα, στην ενεργοποίηση της αναπλήρωσης του γλυκογόνου καθώς επίσης και στη μυϊκή σύσπαση. Ο τελευταίος τους ρόλος έχει επιδειχθεί ιδιαίτερα διότι αναστολή της παραγωγής των ROS έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της συσταλτικότητας ορισμένων μυϊκών ινών. Αντίθετα αύξηση των επιπέδων των ROS αυξάνει τη δύναμη συστολής των ινών.

Αρνητικές επιδράσεις

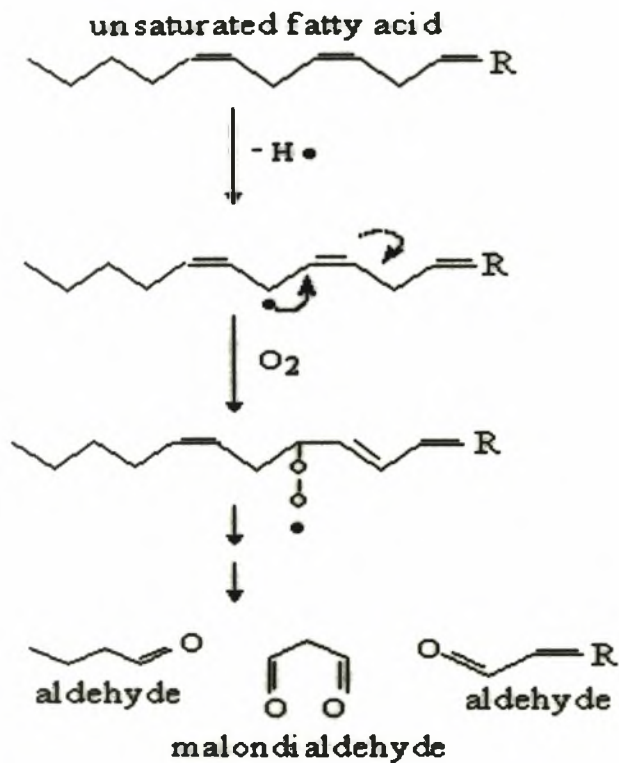
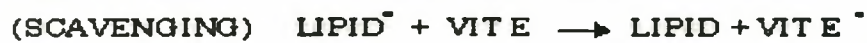
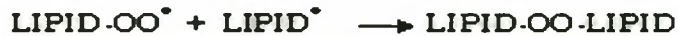
Παρά τις ορισμένες θετικές επιδράσεις οι ROS έχουν και κάποιες βλαβερές συνέπειες γιατί μπορούν να αλλάζουν το μέγεθος και το σχήμα των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρούν. Συγκεκριμένα, οι ROS μπορούν να επάγουν απόπτωση σε υγιή κύτταρα και να αναστείλουν τη φλεγμονή ή να διαφοροποιήσουν άλλες κυτταρικές λειτουργίες. Όλες αυτές οι επιπλοκές ανιχνεύονται σε εκφυλιστικές νόσους όπως ο καταρράκτης, διάφορες μορφές καρκίνου, το Alzheimer, η νόσος του Parkinson και η κυτταρική γήρανση.

Πως οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες στα κύτταρα:

Οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται κυρίως σε τρία κυτταρικά συστατικά:

Λιπίδια: υπεροξειδωση των λιπιδίων, που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες, μπορεί να τους προκαλέσει βλάβες διαρρηγνύοντας την ρευστότητα και τη διαπερατότητα τους. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων μπορεί επίσης να επηρεάσει τη λειτουργία των πρωτεϊνών και των υποδοχέων που είναι προσδεμένοι με την κυτταρική μεμβράνη.

STEPS OF LIPID PEROXIDATION



Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Αφορμή εκκίνησης της συγκεκριμένης αλυσιδωτής αντίδρασης στις μεμβράνες των κυττάρων αποτελεί η επίθεση από ελεύθερες ρίζες. Στη συνέχεια, η αντίδραση αυτοπολλαπλασιάζεται (δηλαδή συνεχίζεται με αντιδράσεις μεταξύ λιπιδίων) καταλήγοντας στην παραγωγή κυρίως αλδεϋδών, οι οποίες ανιχνεύονται εύκολα στο πλάσμα του αίματος και χρησιμεύουν ως δείκτες οξειδωτικού stress (κυρίως η μαλοναλδεϋδη).

Η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην παθογένεση της αθηροσκλήρυνσης. Είναι γεγονός πως οι ROS είναι υπεύθυνες για την εκκίνηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων και συγκεκριμένα της LDL λιποπρωτεΐνης. Αυτή η υπεροξειδωση εξαρτάται από την αντιοξειδωτική ικανότητα του αίματος και μπορεί να αυξηθεί κάτω από καταστάσεις οξειδωτικού stress οφειλομένου σε φυσική άσκηση. Ωστόσο αυτή η επίδραση εξισοροπείται σε αθλητές διότι η φυσική άσκηση

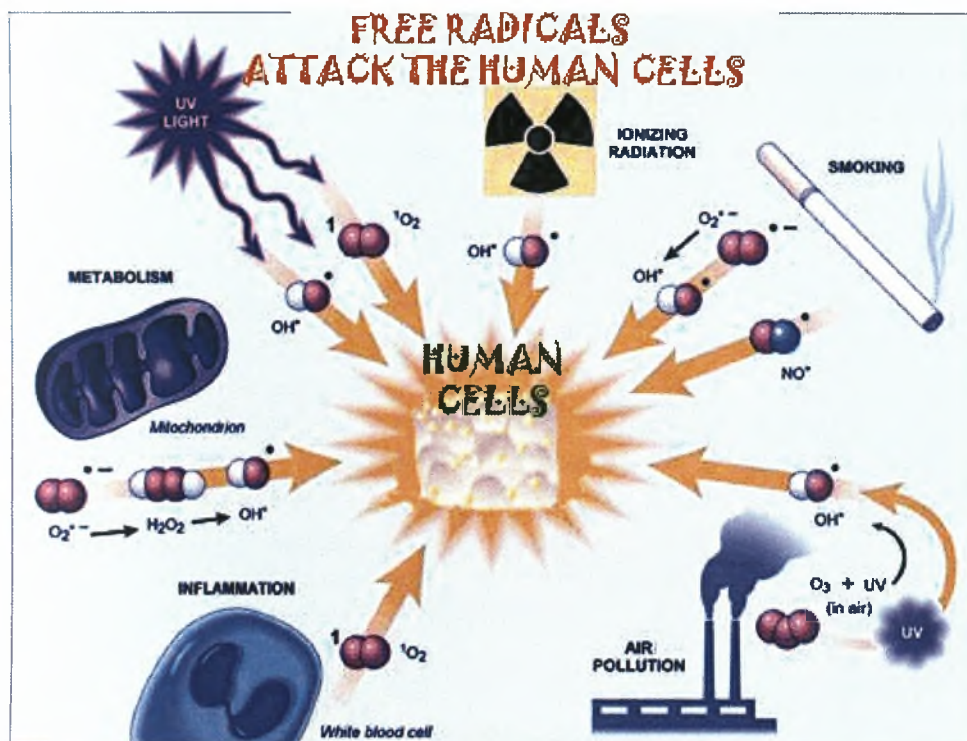
προσδίδει την ικανότητα προσαρμογής στο οξειδωτικό stress μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Οι ROS επίσης οξειδώνουν τα πολυακόρεστα ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία παίρνουν μέρος στη σύσταση των κυτταρικών μεμβρανών. Αυτή η αντίδραση ξεκινά την υπεροξειδωση των λιπιδίων, μία αλυσιδωτή αντίδραση που παράγει άλλα δραστικά είδη όπως ROO^{\bullet} ή $ROOH^{\bullet}$ και ουσίες όπως συζευγμένα διένια ή μαλοναλδεϋδη (MDA). Η υπεροξειδωση των λιπιδίων αλλάζει τη ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών, μειώνει την ικανότητα τους να περιέχουν ισορροπημένες συγκεντρώσεις συστατικών κι επίσης αυξάνει τη διαπερατότητα τους. Συνεπώς, είναι πιθανό να ανιχνευθεί απώλεια ενδοκυτταρικών συστατικών, υποβάθμιση της μεταφοράς ασβεστίου στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αλλαγές των μιτοχονδριακών λειτουργιών και κυτταρικές αλλαγές με ταυτόχρονη απώλεια πρωτεϊνών κι ενζύμων. Όλοι οι τύποι κυττάρων μπορούν να τραυματιστούν από την επίδραση των ROS ανάμεσα τους και τα μυϊκά κύτταρα αλλά και τα ερυθροκύτταρα.

Πρωτεΐνες: οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν άμεσες βλάβες στις πρωτεΐνες που έχουν είτε ενζυμικό είτε δομικό ρόλο. Οι ROS οξειδώνουν δομικές πρωτεΐνες, πρωτεΐνες του αίματος καθώς επίσης κι αναστέλλουν το πρωτεολυτικό σύστημα. Κατά τη διάρκεια της οξειδωσης οι πρωτεΐνες μπορούν να χάσουν αμινοξέα ή να θρυμματιστούν. Αυτές οι αντιδράσεις οδηγούν σε αλλαγές των δομικών πρωτεϊνών ή της λειτουργίας των ενζύμων. Η οξειδωση των πρωτεϊνών ή των αμινοξέων συνοδεύεται από συνολικές αυξήσεις των σχετικών επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των οξειδωμένων αμινοξέων, τα οποία χρησιμοποιούνται ως γενικοί δείκτες της εμφανιζόμενης οξειδωτικής βλάβης. Η πρωτεϊνική οξειδωση μπορεί να είναι συνέπεια φλεγμονής, φυσικής άσκησης ή ισχαιμίας. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες καταβολίζονται προκειμένου να επανασχηματιστούν αμινοξέα αλλά τα προϊόντα που προέρχονται από καρβονύλια δεν μπορούν να εισέλθουν σε αυτή τη διαδικασία. Ωστόσο αυτά τα προϊόντα μπλοκάρουν το πρωτεολυτικό σύστημα και προκαλούν συσσώρευση των οξειδωμένων πρωτεϊνών. Σαν αποτέλεσμα, η ανακύκλωση των πρωτεϊνών, η μεταγραφή γονιδίων και η ακεραιότητα του κυττάρου ελαττώνονται κάτω από την επίδραση των ROS. Οι ROS επίσης έχουν την ικανότητα να αλλάζουν τα συστήματα των λυσοσωμάτων και των πρωτεοσωμάτων, τα οποία αποτελούν τις δύο κύριες οδούς αποικοδόμησης των πρωτεϊνών.

DNA: οι ROS προκαλούν σπάσιμο των ελίκων του DNA και αντικατάσταση των βάσεων τους. Θρυμματισμός του DNA προερχόμενος από επίθεση των ελευθέρων ριζών ενεργοποιεί την πολυ (ADP-ριβόζη) συνθετάση, η οποία χρησιμοποιεί το NAD^+ για να βοηθήσει την επιδιόρθωση του DNA. Ωστόσο εάν η βλάβη είναι εκτενής, τα επίπεδα NAD^+ μπορεί να εξαντληθούν σε βαθμό που το κύτταρο δε μπορεί πλέον να λειτουργήσει και πεθαίνει. Κάθε τμήμα του DNA είναι επιδεκτικό σε

επίθεση από ελεύθερες ρίζες. Το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA λειτουργεί συνεχώς αλλά η ικανότητα του αυτή μπορεί να εξασταθεί ή να τροποποιηθούν οι λειτουργίες του. Σαν συνέπεια, η οξείδωση του DNA μπορεί να προκαλέσει μεταλλαξιογένεση και συμβάλλει σημαντικά στην εμφάνιση του καρκίνου και στη γήρανση των κυττάρων. Διάφορες πηγές που προκαλούν σημαντικές βλάβες στο DNA έχουν προσδιοριστεί κι οφείλονται στο κάπνισμα, σε χρόνιες φλεγμονές και σε διαρροές από τα μιτοχόνδρια, οι οποίες αυξάνονται με τη φυσική άσκηση.



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση των παραγόντων που προκαλούν παραγωγή ελεύθερων ριζών. Ελεύθερες ρίζες παράγονται κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού μεταβολισμού με τη διαδικασία της αναπνοής, σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις, κατά την άσκηση καθώς και από εξωγενείς παράγοντες όπως το κάπνισμα, η περιβαλλοντική μόλυνση, χημικά, διατροφή, ηλιακή ακτινοβολία, ραδιενέργεια, φάρμακα, αλκοόλ.

Αντιοξειδωτικά

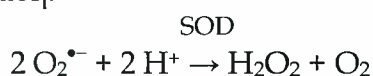
Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία η οποία βοηθά στον περιορισμό της σοβαρότητας του οξειδωτικού stress είτε με σχηματισμό λιγότερο δραστικών ριζών είτε με καταστολή της βλαβερούς αλυσιδωτής αντίδρασης των ελεύθερων ριζών σε υποστρώματα όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια, οι υδρογονάνθρακες ή το DNA. Ένα εύρος αντιοξειδωτικών υπάρχει ενεργό στον ανθρώπινο οργανισμό συμπεριλαμβανομένων ενζυμικών (ενδογενών) και μη ενζυμικών (κυρίως προερχόμενων από την τροφή) αντιοξειδωτικών. Κάθε ένα από αυτά μπορεί να εντοπίζεται ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά. Αντιοξειδωτικά ένζυμα αποτελούν η

δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η καταλάση (CAT) και η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPX). Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά αποτελούν μία ποικιλία ουσιών όπως η βιταμίνη Α (ρετινόλη), η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη), τα φλαβονοειδή, θειόλες [συμπεριλαμβανομένης της γλουταθειόνης (GSH), της ουβικινόνης Q₁₀, του ουρικού οξέος, της φερριτίνης] και ιχνοστοιχείων (σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο, σελήνιο), τα οποία δρουν ως συνένζυμα. Η αποδοτικότητα του αντιοξειδωτικού συστήματος εξαρτάται από τα θρεπτικά αποθέματα (βιταμίνες και ιχνοστοιχεία) και από την ενδογενή παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων, τα οποία μπορούν να τροποποιηθούν από την άσκηση, την προπόνηση, τη διατροφή και τη γήρανση. Επιπλέον, η αποδοτικότητα του αντιοξειδωτικού συστήματος είναι σημαντική κατά την άσκηση διότι κατά τη διάρκεια αυτής παράγονται μεγάλα ποσά ελευθέρων ριζών.

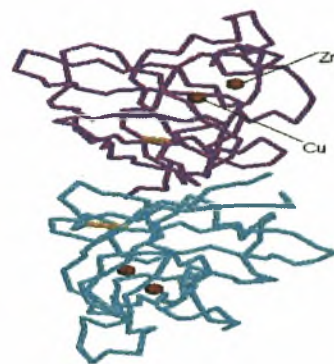
A) Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

1) Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)

Η SOD αποτελεί την κύρια άμυνα έναντι των ριζών υπεροξειδίου και είναι η πρώτη γραμμή άμυνας κατά του οξειδωτικού stress. Η SOD αντιπροσωπεύει μία ομάδα ενζύμων που καταλύουν την αυτοοξείδωση του O₂^{•-} και το σχηματισμό του H₂O₂ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



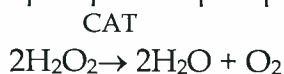
Σε όλα τα κύτταρα, κατά την ηρεμία, το μεγαλύτερο μέρος του μιτοχονδριακώς παραγόμενου O₂^{•-} ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mt-SOD) ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα. Στα μυϊκά κύτταρα το 65-85% της δραστηριότητας της SOD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Cu-Zn SOD).

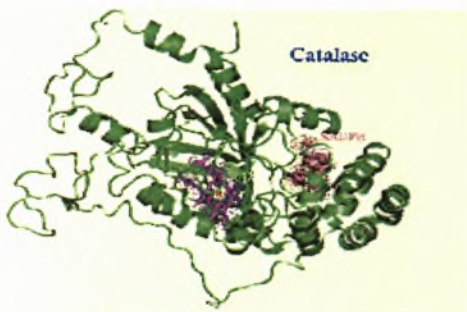


Εικόνα 5: Τρισδιάστατη δομή της κυτταροπλασματικής SOD. Διακρίνονται οι δύο υπομονάδες, από τις οποίες η μία φέρει ένα άτομο Zn²⁺ και η άλλη ένα άτομο Cu²⁺.

2) Καταλάση (CAT)

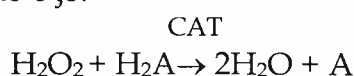
Η καταλάση είναι παρούσα σε όλα τα κύτταρα και συγκεκριμένα εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα, τα οποία είναι κυτταρικές δομές που χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την αποτοξίνωση διαφόρων τοξικών ουσιών και παράγουν H₂O₂. Η καταλάση μετατρέπει το H₂O₂ σε H₂O και O₂ σύμφωνα με την αντίδραση:





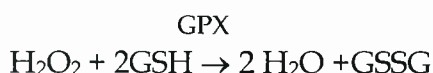
Εικόνα 6: Τρισδιάστατη δομή της καταλάσης. Αποτελείται από 4 υπομονάδες κάθε μία από τις οποίες περιέχει μια ομάδα αίμης στο ενεργό κέντρο. Επιπλέον, κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH, το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου.

Η καταλάση μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει το υπεροξειδίο για την αποτοξίνωση ορισμένων ουσιών διαμέσου μίας αντίδρασης υπεροξειδωσής με υποστρώματα όπως η φαινόλη, η αλκοόλη (η αιθανόλη;) ή το φορμικό οξύ:

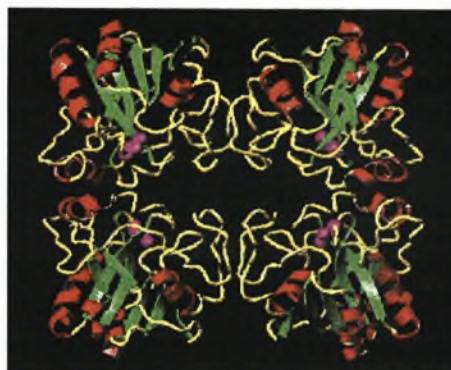


3) Περοξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Η GPX που είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια έχει την ικανότητα να μετατρέπει το υπεροξειδίο σε νερό. Αυτή η αντίδραση χρησιμοποιεί τη γλουταθειόνη και τη μετατρέπει στην οξειδωμένη μορφή της:



Η GPX και η CAT έχουν την ίδια δράση πάνω στο υπεροξειδίο, όμως η απόδοση της GPX εξαρτάται από την παρουσία μεγάλων επιπέδων ROS ενώ η CAT λειτουργεί και με μικρά ποσά αυτών.

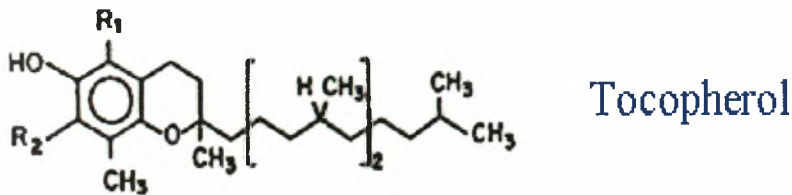


Εικόνα 7: Τρισδιάστατη δομή της GPX. Αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες περιέχει ένα άτομο σεληνίου, και το σταθερό υπόστρωμα της είναι η γλουταθειόνη (GSH).

B) Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

1) Βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη)

Η βιταμίνη Ε είναι μία λιποδιαλυτή πρωτεΐνη που αποτελείται από διάφορες ισομορφές τοκοφερολών. Ανάμεσα τους η α-τοκοφερόλη είναι η περισσότερο ενεργή και άφθονη μορφή. Η βιταμίνη Ε θεωρείται το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό λόγω της αφθονίας της στα κύτταρα και στις μιτοχονδριακές μεμβράνες καθώς επίσης κι επειδή δρα απευθείας πάνω στα ROS.



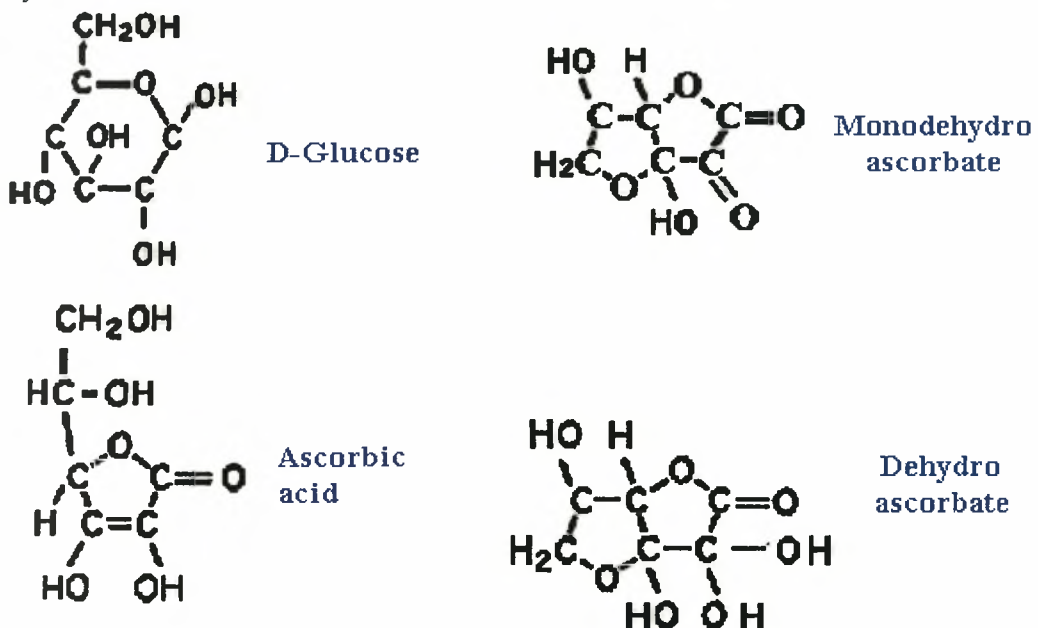
Σχήμα 2: Η χημική δομή της α-τοκοφερόλης (Βιταμίνη Ε).

Η βιταμίνη Ε αλληλεπιδρά με πληθώρα αντιοξειδωτικών όπως η βιταμίνη C, η GSH, το β-καροτένιο και το λιποϊκό οξύ. Τα παραπάνω αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να την αναγεννούν από την οξειδωμένη της μορφή.

Η βιταμίνη Ε παίζει σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές μεμβράνες διότι σταματά την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Η μοριακή της δομή επιτρέπει την απενεργοποίηση των ROS σε λιπιδικό περιβάλλον και ιδιαίτερα των ριζών υπεροξειδίου, που προέρχονται από την οξείδωση της LDL στις κυτταρικές μεμβράνες ή στο αίμα.

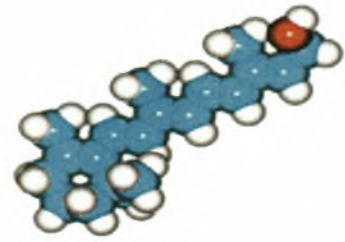
2) Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C είναι μία υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη κι αποτελεί πιθανότατα το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό των εξωκυτταρικών υγρών, είναι όμως δραστική και στο κυτταρόπλασμα. Είναι περισσότερο άφθονη σε ιστούς, στους οποίους η παραγωγή ROS είναι σημαντική. Αυτό το φαινόμενο καθορίζεται ως μία προσαρμογή στο οξειδωτικό stress.



Σχήμα 3: Χημική δομή του ασκορβικού οξέος (Βιταμίνης C) και των μεταβολιτών του. Η σύνθεση του ασκορβικού οξέος λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα. Συντίθεται από σάκχαρο με 6 άτομα άνθρακα. Στα ανώτερα φυτά η D-γλυκόζη μετατρέπεται σε ασκορβικό οξύ με οξείδωση του C1 και ακόλουθο σχηματισμό διπλών δεσμών στους C2 και C3.

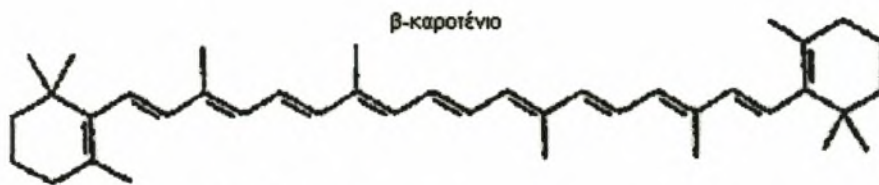
Στα υγρά των ιστών η βιταμίνη C έχει την ικανότητα να ουδετεροποιεί τα ROS (OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, LOO^\bullet , RO^\bullet). Αντίθετα στο εσωτερικό των κυττάρων ενισχύει τη δράση της βιταμίνης E και της GSH αναγεννώντας τις ενεργές τους μορφές μετά την αλληλεπίδραση τους με τα ROS. Τέλος, η βιταμίνη C έχει την ικανότητα να παγιδεύει τα ιόντα χαλκού, τα οποία έχουν δυναμική οξειδωτική δράση.



Εικόνα 8: Τρισδιάστατη δομή του ασκορβικού οξέος.

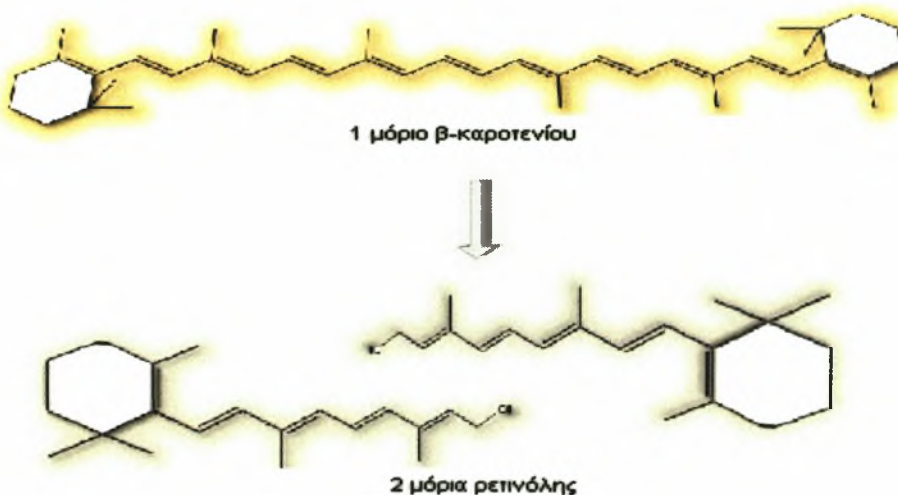
3) β-καροτένιο και βιταμίνη A (ρετινόλη)

Η βιταμίνη A είναι μία λιποδιαλυτή πρωτεΐνη που περιέχεται σε πολλές λιπιδικές ουσίες.



Σχήμα 4: Η χημική δομή του β-καροτενίου.

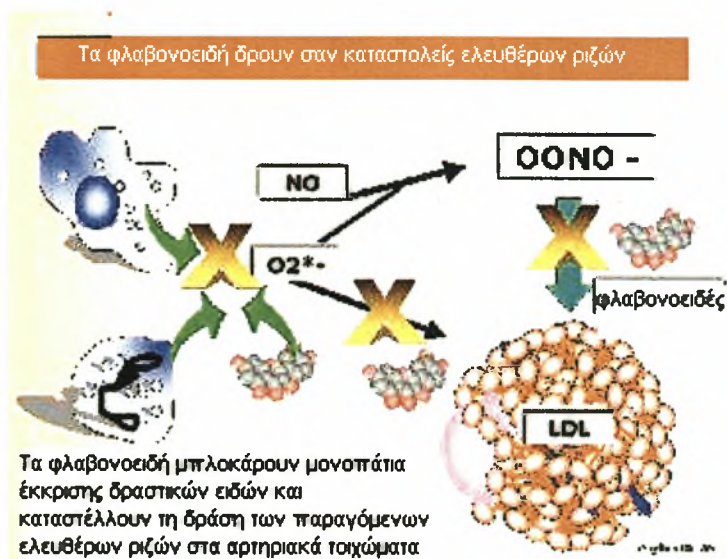
Το β-καροτένιο, το οποίο περιέχεται στις κυτταρικές μεμβράνες, μετατρέπεται σε βιταμίνη A όταν αυτό απαιτείται για τις ανάγκες του οργανισμού. Αν κι ο μηχανισμός της *in vivo* δράσης του είναι ασαφής, έχει προταθεί ότι απενεργοποιεί τα ROS (συγκεκριμένα το ατομικό οξυγόνο και τις ρίζες των λιπιδίων) κι αναστέλλει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Το β-καροτένιο και η βιταμίνη A δρουν σε συνεργασία με τις βιταμίνες E και C ενάντια στα ROS, αν κι έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από αυτές.



Σχήμα 5: Από ένα μόριο β-καροτενίου προκύπτουν δύο μόρια ρετινόλης.

4) Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες που σχηματίζονται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και το μηλονικό. Αν και δεν είναι επαρκείς οι γνώσεις μας για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα in vivo, έχειδειχθεί in vitro ότι καταστέλλουν προ-οξειδωτικά ένζυμα ή ότι δημιουργούν σύμπλοκα με προ-οξειδωτικά ιόντα όπως τα Fe^{2+} , Fe^{3+} και ο Cu^{2+} . Έχουν επίσης την ικανότητα να απενεργοποιούν ορισμένα ROS με παραχώρηση ενός ατόμου υδρογόνου. Σε σχέση με τη βιταμίνη E και το β-καροτένιο θεωρείται ότι έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα. Ωστόσο αναφέρονται σε αυτήν την εργασία διότι υπάρχουν στον ανθρώπινο οργανισμό.



Σχήμα 6: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης των φλαβονοειδών έναντι των ελεύθερων ριζών που προσβάλλουν την LDL, καταστρέφοντας τα αρτηριακά τοιχώματα.

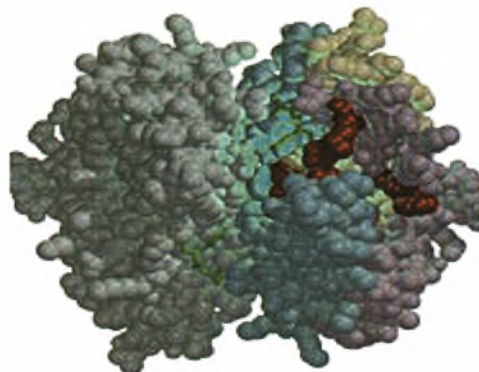
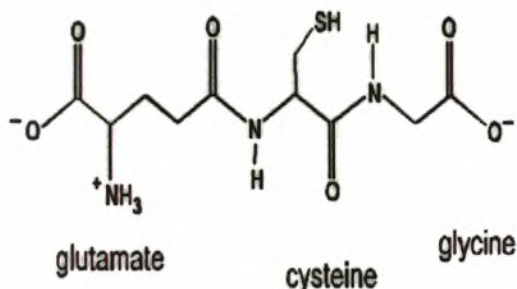
5) Θειόλες

Οι θειόλες είναι μία τάξη μορίων που χαρακτηρίζονται από την παρουσία σουλφυδρυλικών καταλοίπων (-SH) στο ενεργό τους κέντρο. Συντίθενται από τα αμινοξέα κυστεΐνη και μεθειονίνη. Έχουν πληθώρα δράσεων στα βιολογικά συστήματα, όπως η πρωτεϊνοσύνθεση, η κυτταρική αναγέννηση και η ανοσοποίηση. Επίσης, παίζουν σημαντικό ρόλο στο δίκτυο αντιοξειδωτικής άμυνας.

Η GSH είναι η κυριότερη θειόλη παρούσα στον ανθρώπινο οργανισμό. Δρα ως υπόστρωμα της GPX στην αναστολή των ROS. Η GSH μπορεί επίσης να αποτοξινώσει απευθείας τα ROS αλλά ενισχύει και τη λειτουργική δράση των βιταμινών E και C. Κατά τη διάρκεια οξειδωτικού stress είναι πιθανό να παρατηρηθεί μείωση των επιπέδων των θειολών. Αυτό το φαινόμενο φαίνεται ότι εμπλέκεται και στην παθογένεση ορισμένων νευροεκφυλιστικών νόσων, όπως η νόσος του Parkinson και η νόσος του Alzheimer. Επίσης, παρατηρούνται και στη διαδικασία της γήρανσης και μετά από φυσική άσκηση. Μικρές

ποσότητες GSH μπορούν να συσχετιστούν με κυτταρική βλάβη και μειωμένη ικανότητα ανοσοποίησης, οι οποίες μπορούν να εξισορροπηθούν με συμπληρώματα βιταμινών E και C, πράγμα το οποίο επισημαίνει ότι τα παραπάνω αντιοξειδωτικά έχουν τους ίδιους στόχους.

glutathione (GSH)



Σχήμα 7: Η χημική (αριστερά) και η τρισδιάστατη (δεξιά) δομή της γλουταθειόνης (GSH). Η GSH είναι άφθονη στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια και αποτελεί το κυριότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό σε αυτά τα υποκυτταρικά διαμερίσματα.

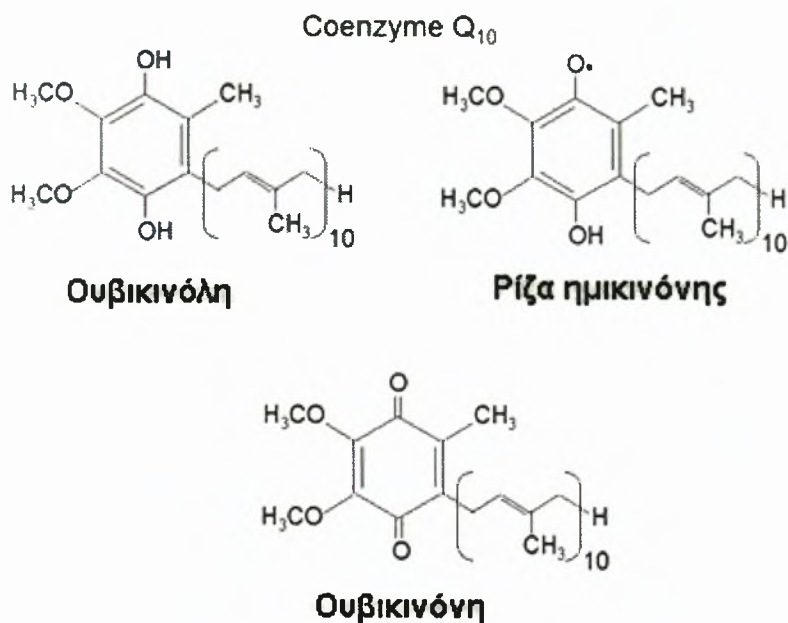
Το λιποϊκό οξύ αποτελεί θειόλη, η οποία συμμετέχει στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξειδωσης και βοηθά στην αναγέννηση των βιταμινών E και C από την οξειδωμένη τους μορφή. Επιπλέον, συμμετέχει στη μετατροπή της κυστίνης σε κυστεΐνη βοηθώντας έτσι στη δημιουργία νέων θειολών.

6) Συνένζυμο Q₁₀

Το συνένζυμο Q₁₀ (CoQ₁₀) αποτελεί ένα ενδογενές λιποδιαλυτό μόριο απαραίτητο για τη σύνθεση του ATP. Είναι παρόν σε όλα τα κύτταρα αλλά βρίσκεται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε κύτταρα με μεγάλες ενεργειακές απαιτήσεις, όπως τα κύτταρα του ήπατος, της καρδιάς, των μυών και στο πάγκρεας και ειδικότερα στις μιτοχονδριακές μεμβράνες αυτών. Σύμφωνα με τη χημική δομή του αποτελεί έναν δακτύλιο ουβικινόλης προσδεμένο σε 10 πλευρικές ομάδες ισοπρενίου, δομικώς παρόμοια με τη βιταμίνη K. Στα ανθρώπινα κύτταρα συντίθεται από το αμινοξύ τυροσίνη ενώ για τη σύνθεση του απαιτούνται επαρκείς ποσότητες φολικού οξέος, νιασίνης, ριβοφλαβίνης και πυριδοξίνης.

Είναι γνωστό πως το CoQ₁₀ έχει άμεση αντιοξειδωτική δράση στις ρίζες υπεροξειδίου κι έμμεση συμμετέχοντας στην αναγέννηση των βιταμινών E και C. Επιπλέον, έχει ευεργετικά αποτελέσματα, όπως η προστασία έναντι καρδιαγγειακών ασθενειών, ο καρκίνος, η κυτταρική γήρανση και η απώπωση. Ωστόσο, λειτουργεί και σαν ενδιάμεσο σε διαδικασίες όπως η έκφραση γονιδίων και η σύνθεση των πρωτεϊνών στους μύες. Σε αυτήν την περίπτωση, το CoQ₁₀ λειτουργεί ως προ-

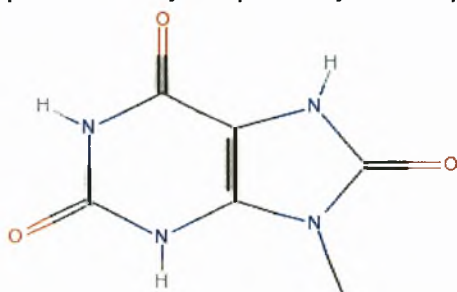
οξειδωτικό δίνοντας γέννηση στις ρίζες $O_2^{\bullet-}$, οι οποίες μετατρέπονται σε υπεροξειδίο από τη SOD. Στη συνέχεια, το υπεροξειδίο δρα ως δεύτερο μήνυμα στην έκφραση γονιδίων.



Σχήμα 8: Το συνένζυμο Q μπορεί να υπάρξει σε 3 καταστάσεις: την πλήρως ανηγμένη ουβικινόλη, την ενδιάμεση κατάσταση ρίζας ημικινόνης και την πλήρως οξειδωμένη ουβικινόνη.

7) Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στους ανθρώπους. Είναι γνωστό πως η φυσική άσκηση

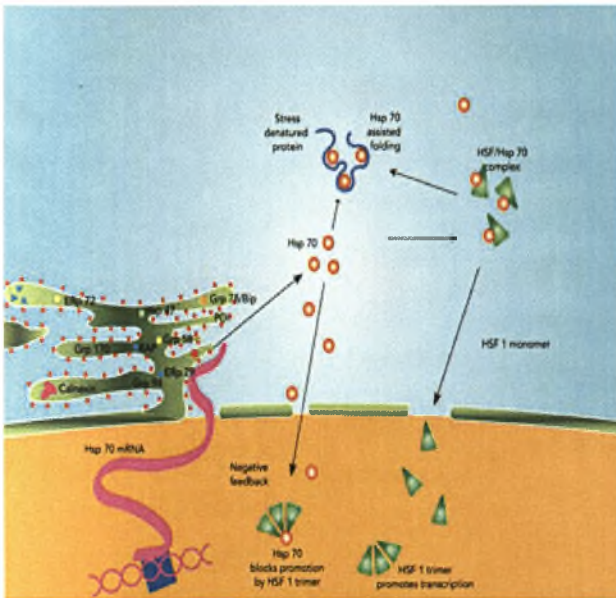


Σχήμα 9: Η χημική δομή του 9-μέθυλο ουρικού οξέος.

συμβάλει στην αύξηση του επιπέδου του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος. Στη συνέχεια αυτό διαχέεται στο εσωτερικό των μυών και τους προστατεύει από την οξείδωση δραστικών ειδών. Μάλιστα συγκαταλέγεται στα απαραίτητα αντιοξειδωτικά έχοντας διαφορετικές δράσεις έναντι των ατομικού οξυγόνου, ρίζας υπεροξειδίου και HOCl. Συγκεντρώνει πάνω από το 50% της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος και προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες και το DNA. Επιπλέον, σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με τα ιόντα σιδήρου αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο την οξείδωση του ασκορβικού οξέος και τη λιπιδική υπεροξείδωση.

8) Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Protein, HSP)

Οι HSP αποτελούν μία ποικιλία πρωτεϊνών που έχουν προστατευτικά αποτελέσματα έναντι διαφόρων ειδών stress. Αυξάνονται σε απάντηση στη φυσική άσκηση, στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας του σώματος, κατά τη διάρκεια φλεγμονής και οξειδωτικού stress. Θεωρούνται αντιοξειδωτικά λόγω της προστατευτικής δράσης που παρέχουν στα κύτταρα και τις ενδοκυττάριας πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια βλάβης που επάγεται από τα δραστικά είδη. Δεδομένα προτείνουν ότι κατά τη διάρκεια οξειδωτικού stress οι HSP αναπληρώνουν κενά της αντιοξειδωτικής άμυνας, όπως αυτά που προκύπτουν από την μείωση των επιπέδων των ήδη υπαρχόντων αντιοξειδωτικών ουσιών.



Εικόνα 9: Οι HSP παράγονται με ουβικουτινίωση ενός πολύ συντηρημένου γονιδίου και διακρίνονται με βάση τη μοριακή τους μάζα (π.χ. Hsp25, Hsp27). Εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα. Ανάμεσα στις λειτουργίες τους διακρίνεται η ικανότητα τους να αποικοδομούν δραστικά είδη, τα οποία προσβάλλουν πρωτεϊνικούς κυρίως μηχανισμούς. Στην εικόνα παρατηρούμε την ιδιότητα της Hsp7 (πορτοκαλί) να προσδένεται σε πρωτεΐνες (μπλε αλληλουχία) που έχουν υποστεί οξειδωτικό stress, τις οποίες οδηγεί σε πρωτεόλυση, βοηθώντας με αυτόν τον τρόπο στον έλεγχο της πρωτεϊνικής ομοιόστασης των κυττάρων.

9) Φερριτίνη

Ο σίδηρος είναι απαραίτητος για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη και μπορεί να έχει αντιοξειδωτική δράση ως συμπαραγοντας της καταλάσης. Ωστόσο, τα ιόντα σιδήρου έχουν προ-οξειδωτικά αποτελέσματα συμμετέχοντας στις αντιδράσεις Fenton αλλά και στην οξείδωση της βιταμίνης C, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την αντιοξειδωτική άμυνα. Συνεπώς η υπερβολική ποσότητα σιδήρου είναι επιβλαβής και η φερριτίνη, μία από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες του μεταβολισμού του σιδήρου, παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων του.

Το μέταλλο του σιδήρου προσδένεται στο ενεργό κέντρο της φερριτίνης, το οποίο έχει δράση σίδηρο-οξειδάσης



Εικόνα 10: Η φερριτίνη αποτελείται από 24 πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες αυτοσυναρμολογούν τρισδιάστατα, κοίλα σύμπλοκα κάτω από ένα εύρος συνθηκών. Τα ιόντα σιδήρου στη συνέχεια προσδένονται στην κεντρική περιοχή της κοιλότητας. Στην εικόνα αριστερά παρατηρούμε την τρισδιάστατη δομή της φερριτίνης καθώς και το σημείο πρόσδεσης του σιδήρου, ενώ στην εικόνα αριστερά φαίνεται η τρισδιάστατη δομή των υπομονάδων της.

Μεγάλος αριθμός μελετών δείχνουν ότι η φερριτίνη έχει προστατευτικό ρόλο ενάντια στις βλάβες που προέρχονται από δραστικά είδη λόγω του ότι ελαχιστοποιεί το σχηματισμό FR κατακρατώντας το σίδηρο στο αίμα ή στα κύτταρα. Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση των επιπέδων φερριτίνης κατά τη διάρκεια φυσικής άσκησης, βλάβης των κυττάρων και φλεγμονής, διαδικασίες που καταλήγουν σε οξειδωτικό stress.

Οξειδωτικό stress

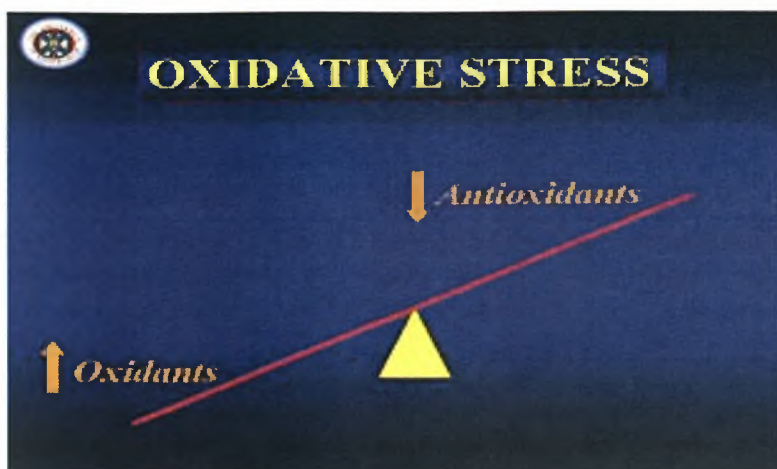
Το οξειδωτικό stress μπορεί να καθοριστεί ως μία διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και αναγωγικών μέσων που υπάρχουν σε έναν οργανισμό. Κάθε κύτταρο ενός οργανισμού εκτίθεται σε οξειδωτικά μέσα προερχόμενα από μία μεγάλη ποικιλία εξωγενών κι ενδογενών πηγών.

Οι εξωγενείς πηγές περιλαμβάνουν:

- χημικά και τοξίνες,
- παθογενή βακτήρια και ιούς,
- φυσικά δηλητηριώδη αέρια (π.χ. όζον και υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου) κι
- επιδράσεις της ιονίζουσας ή μη ιονίζουσας ακτινοβολίας.

Αντίθετα οι ενδογενείς πηγές περιλαμβάνουν:

- ένζυμα που μπορούν άμεσα να παράγουν ελεύθερες ρίζες (π.χ. οξείδωση της ξανθίνης που μετατρέπει την ξανθίνη σε ουρικό οξύ καθώς επίσης και το οξυγόνο σε υπεροξείδιο) και
- κύτταρα όπως τα ουδετερόφιλα που μετά την ενεργοποίησή τους παράγουν ελεύθερες ρίζες εκτός των υπολοίπων προϊόντων τους.



Εικόνα 11: Οξειδωτικό stress, η διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ παραγωγής δραστικών ειδών κι αντιοξειδωτικών, προς όφελος των πρώτων.

Οξειδωτικό stress μπορεί να προκύψει λόγω:

1. Μειωμένων επιπέδων αντιοξειδωτικών που προκύπτουν από:
 - i. μεταλλάξεις
 - ii. τοξικούς παράγοντες
 - iii. κακή διατροφή
2. Αυξημένης παραγωγής δραστικών ειδών

Άσκηση και οξειδωτικό stress

Η πρώτη συσχέτιση μεταξύ άσκησης και οξειδωτικού stress έγινε το 1978 από τους Dillard et al.. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η άσκηση αυξάνει την υπεροξειδωση των λιπιδίων στα κύτταρα. Έκτοτε μεγάλος αριθμός μελετών ασχολήθηκε με τη σύνδεση της άσκησης και του οξειδωτικού stress. Σήμερα γνωρίζουμε πως η φυσική άσκηση αποτελεί αμφιλεγόμενο θέμα.

Όσον αφορά τα οφέλη που προσφέρει η φυσική άσκηση συνοψίζονται στα εξής:

- ✚ συνίσταται ως μέτρο πρόληψης έναντι ορισμένων ασθενειών, όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα κυρίως,
- ✚ αναζωογονεί το ανθρώπινο σώμα,
- ✚ συμβάλλει στη διατήρηση της μυϊκής μάζας και
- ✚ αυξάνει τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων.

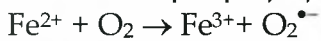
Ωστόσο, από την άλλη πλευρά η φυσική άσκηση αυξάνει, όπως είναι αναμενόμενο, την κατανάλωση του οξυγόνου με αποτέλεσμα την επακόλουθη παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου. Η παραγωγή των ROS οφείλεται κυρίως:

- ⊕ στην αύξηση του ρυθμού αναπνοής και τη διαρροή ηλεκτρονίων από τα μιτοχόνδρια.
- ⊕ στη μετατροπή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης, η οποία καταλύει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα σε

ισχαιμικές κυρίως καταστάσεις κι έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση $O_2^{\bullet-}$.

⊕ στην επαγωγή της φλεγμονώδους αντίδρασης λόγω καταστροφής των μυών κατά την άσκηση. Στη συγκεκριμένη αντίδραση λαμβάνουν μέρος τα ουδετερόφιλα, τα οποία έχουν και σημαντικό ρόλο στην άμυνα των ιστών από ιούς και βακτήρια. Τα ουδετερόφιλα εκκρίνουν λυσοζύμη (διάσπαση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και κυτταρικών υπολειμμάτων) και $O_2^{\bullet-}$ (προλαμβάνει επέκταση βακτηριακής μόλυνσης).

⊕ στη συσσώρευση γαλακτικού οξέος που παράγεται κατά την άσκηση κι έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη. Επίσης, η πτώση του pH οδηγεί σε απελευθέρωση ιόντων σιδήρου από την αιμοσφαιρίνη και τη μυοσφαιρίνη και την επακόλουθη παραγωγή ROS σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



⊕ στην αύξηση των επιπέδων των κατεχολαμινών κατά τη διάρκεια άσκησης. Οι κατεχολαμίνες αυξάνουν τον οξειδωτικό μεταβολισμό των μυών με επακόλουθη αύξηση της παραγωγής ROS από τα μιτοχόνδρια.

Το παράδοξο λοιπόν είναι πως η άσκηση ενώ συντελεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια στην εμφάνιση οξειδωτικού stress ταυτόχρονα προσφέρει προσαρμογές έναντι αυτού με αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι σχετικοί όροι οξειδωτικό stress, οξειδωτική βλάβη, ελεύθερες ρίζες, αντιοξειδωτικά έχουν γίνει αναπόσπαστο κομμάτι του επιστημονικού λεξιλογίου και χρησιμοποιούνται συχνά σε επιστημονικές συζητήσεις. Η βιβλιογραφία είναι υπερπλήρης με άρθρα που αφορούν φαινόμενα οξειδωτικού stress τόσο σε σχέση με ασθένειες όσο και σε υγιή άτομα αλλά και για ενήλικα άτομα που ασχολούνται με τον αθλητισμό. Ωστόσο από την ανασκόπηση στη βιβλιογραφία φαίνεται ότι δεν υπάρχουν σχετικές έρευνες που να αναφέρονται στην απόκριση του παιδικού οργανισμού, που ασχολείται συστηματικά με κάποιο άθλημα αντοχής (όπως η κολύμβηση), στο οξειδωτικό stress. Συνεπώς, σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η μελέτη δεικτών οξειδωτικού stress σε υγιή παιδιά 9-11 ετών που ασχολούνται συστηματικά με την κολύμβηση. Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκε το μέγεθος της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, με μέτρηση της MDA, και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, που σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία αποτελούν δείκτες οξειδωτικού stress. Επίσης, υπήρξε συνεργασία με άλλες δύο διπλωματικές εργασίες, που ασχολήθηκαν με τη μελέτη της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, της δραστηριότητας της καταλάσης, των επιπέδων της GSH και της GSSG καθώς και του λόγου τους GSH/GSSG, για τα ίδια άτομα 9-11 ετών, ούτως ώστε να δημιουργηθεί μία ολοκληρωμένη εικόνα για την απόκριση των παιδιών στο οξειδωτικό stress.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

Για τους φωτομετρικούς προσδιορισμούς που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο Hitachi U-1500. Τα υλικά TBA, TCA, Tris HCl, Na₂SO₄ που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των TBARS προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες SIGMA, Riedel de Haen, MERCK και Fluca αντίστοιχα. Για τον προσδιορισμό των καρβονυλίων χρησιμοποιήθηκαν τα υλικά HCl, DNPH και ουρία που προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Riedel de Haen και Aldrich αντίστοιχα.

Συμμετέχοντες

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έλαβαν μέρος 22 παιδιά (11 αγόρια και 11 κορίτσια) 9-11 ετών που ασχολούνται συστηματικά με την κολύμβηση. Τα συγκεκριμένα άτομα προπονούνταν τουλάχιστον επί ένα χρόνο, 3 ημέρες την εβδομάδα, για μία ώρα ανά ημέρα. Πρόκειται για υγιή άτομα, τα οποία δεν έπασχαν από καμία ασθένεια (χρόνια ή μη) και δεν λάμβαναν καμία θεραπευτική αγωγή. Οι γονείς και τα παιδιά τους μας παρείχαν τη συγκατάθεση τους, αφού τους είχαν γνωστοποιηθεί οι κίνδυνοι καθώς και τα πλεονεκτήματα της συμμετοχής στην μελέτη αυτή. Τέλος, στην εργασία αυτή ακολουθήθηκαν όλες οι προβλεπόμενες πειραματικές διαδικασίες.

Σωματομετρικά χαρακτηριστικά

Τα παιδιά προσήλθαν στο Κλειστό Κολυμβητήριο Σερρών μετά από ολονύκτια νηστεία κι αποχή από αλκοόλ και καφεΐνη για 24 ώρες. Η μάζα του σώματος τους μετρήθηκε με απόκλιση 0,5 Kgr (Beam Balance 710, Seca UK) ενώ οι συμμετέχοντες ήταν ελαφρώς ντυμένοι και ξυπόλυτοι. Μετρήθηκε το ύψος τους με απόκλιση 0,5 cm (Stadiometer 208, Seca UK) και το ποσοστό λίπους.

Δίαιτα

Προκειμένου να είναι συγκρίσιμα τα επίπεδα των θρεπτικών συστατικών ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να καταγράψουν τη διατροφή τους για διάστημα 3 ημερών πριν την άσκηση.

Πρωτόκολλο άσκησης

Η άσκηση περιλάμβανε πρόσθια κολύμβηση κρώουλ για 12x50m με ρυθμό που ανταποκρινόταν στο 70-75% της 50-m μέγιστης ταχύτητας των συμμετεχόντων. Η άσκηση των παιδιών ξεκίνησε μετά από προθέρμανση χαμηλής έντασης (800-1200m) ενώ μεταξύ των γύρων ακολουθούσαν διάλειμμα ενός λεπτού. Η θερμοκρασία του νερού ήταν μεταξύ των 25-26°C.

Συλλογή αίματος και χειρισμός

Έγινε συλλογή φλεβικού αίματος πριν την άσκηση και μέσα σε 5 λεπτά από την τέλεση της. Μέρος του αίματος τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε EDTA (για τον προσδιορισμό του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης) ενώ ένα δεύτερο μέρος σε καθαρούς δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι τοποθετήθηκαν στον πάγο για 20 min έως ότου το αίμα πήξει, αμέσως μετά φυγοκεντρήθηκαν στα 1,500g, για 10 min, στους 4°C, ο ορός μοιράστηκε σε erpendorf, καταψύχθηκε στους -20°C και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των TBARS και των καρβονυλίων.

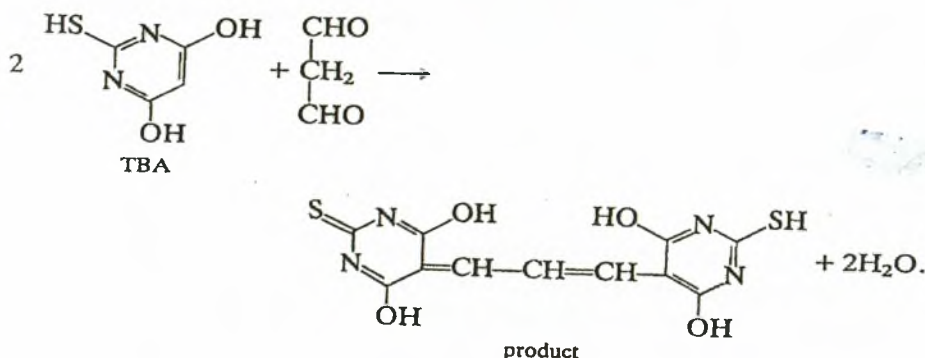
Όγκος αίματος

Ο όγκος αίματος μετά την άσκηση υπολογίστηκε μετά από μέτρηση του αιματοκρίτη με μικροφυγοκέντρηση και της αιμοσφαιρίνης με ένα kit Spinreact (12).

Μέθοδοι

Μαλονδουαλδεΐδη- TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances)

Αρχή της μεθόδου: Ένας από τους βιολογικούς στόχους των ελευθέρων ριζών, και ίσως ο πιο επιδεκτικός, είναι οι λιπιδιακές μεμβράνες. Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των μεμβρανών βάλλονται από τις ρίζες οξυγόνου σε μία αλυσιδωτή αντίδραση, που ονομάζεται υπεροξειδωση λιπών. Τα παραγόμενα υπεροξειδία των λιπών διασπώνται παράγοντας αέριους υδρογονάνθρακες κι αλδεΐδες. Οι τελευταίες, και κυρίως η μαλοναλδεΐδη (MDA), αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) παράγοντας ένα έγχρωμο προϊόν εύκολα ανιχνεύσιμο στα 530 nm σύμφωνα με την αντίδραση:



Εικόνα 12: Αντίδραση του TBA με την MDA προς σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος. (Από: Halliwell and Gutteridge, 1998).

Ο προσδιορισμός της MDA έγινε με τη μέθοδο TBARS των Keles et al. (2001). Συγκεκριμένα σε σωλήνες Falcon προσθέτονταν 100 μl ορού (ή 100 μl απιονισμένο νερό για το τυφλό), 500 μl TCA 35% και 500 μl Tris-HCl pH 7,4. Ακολουθούσε ανάδευση κι επώαση για 10 min σε RT. Στη συνέχεια, προστίθετο 1 mL Na₂SO₄ - TBA, τα δείγματα επωάζονταν για 45 min σε υδατόλουτρο στους 95°C (η αντίδραση αυτή συντελεί στην παραγωγή του έγχρωμου προϊόντος) κι έπειτα ακολουθούσε επώαση για 5 min στον πάγο. Στη συνέχεια, προστίθετο σε κάθε σωλήνα 1 ml TCA 70%, ακολουθούσε ανάδευση κι 1 ml από κάθε δείγμα μεταγγίζονταν σε erpendorf, το οποίο φυγοκεντρώνταν στις 10,000 rpm, για 3 min, σε RT. Τέλος, τα δείγματα φωτομετρούνταν στα 530 nm. Η ποσότητα της MDA σε σχέση με τις συνολικές ενώσεις που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ προσδιορίστηκε με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA, ο οποίος είναι 0,156 (είναι αποτέλεσμα της διαίρεσης του συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA, ο οποίος είναι 156000, διαιρούμενου με το 10⁻⁶ ούτως ώστε να μετατραπούν τα mol/L σε μmol/L) και προσδιοριζόταν από τον τύπο:

$$\text{TBARS } (\mu\text{mol/L}) = (\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}) / 0.156 \times 31,$$

όπου 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από το λόγο του συνολικού όγκου (3100 μl) προς τον όγκο του ορού (100μl).

Οι μετρήσεις για κάθε δείγμα πραγματοποιούνταν εις τριπλούν.

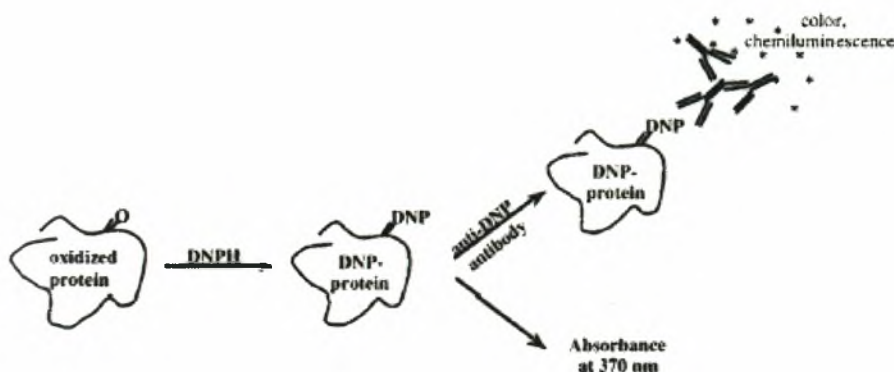
Πρωτεϊνικά καρβονύλια (Protein Carbonyls)

Αρχή της μεθόδου: Πολλές πρωτεΐνες μπορούν να τροποποιηθούν από την επίδραση ελευθέρων ριζών. Οι κυριότερες τροποποιήσεις που έχουν παρατηρηθεί αφορούν απώλεια της καταλυτικής δράσης, τροποποιήσεις αμινοξέων, δημιουργία καρβονυλικών ομάδων, αύξηση της οξύτητας, μείωση της θερμικής σταθερότητας, αλλαγή του ιζώδους, αλλαγή του φθορισμού, θρυμματισμός, δημιουργία γεφυρών S-S κι αυξημένη επιδεκτικότητα σε πρωτεόλυση.

Η πιο κοινή μέθοδος προσδιορισμού της πρωτεϊνικής οξειδωσης σε βιολογικά δείγματα είναι η μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα καρβονύλια, τα οποία είναι χημικά σταθερές ενώσεις, επάγονται in vitro και in vivo από μία ποικιλία παραγόντων, όπως οξειδωση καταλυόμενη από μέταλλα, το όζον, HOCl, ατομικό οξυγόνο και ιονίζουσα ακτινοβολία. Σαν αποτέλεσμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες οξειδωτικού stress για τους περισσότερους τύπους των ROS. Για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιούνται μέθοδοι υψηλής ευαισθησίας, πολλές εκ των οποίων περιέχουν τη χημική ένωση των καρβονυλίων με το DNP (DiNitroPhenylHydrazine).

Το DNP οδηγεί στο σχηματισμό σταθερών προϊόντων, ικανά για αποθήκευση και ποσοτικοποίηση. Απορροφά υπεριώδη ακτινοβολία στα 370 nm και με αυτόν τον τρόπο η ολική ποσότητα των καρβονυλίων,

προερχόμενων από την οξείδωση μίας πρωτεΐνης ή ενός μίγματος πρωτεϊνών, μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό. Η φασματοφωτομετρική μέθοδος μπορεί να συζευχθεί με HPLC για μεγαλύτερη ευαισθησία κι εξειδίκευση από τη μέτρηση της ολικής ποσότητας των καρβονυλίων ενός μίγματος πρωτεϊνών. Άλλες DNPH- σχετιζόμενες μέθοδοι χρησιμοποιούν anti-DNP αντισώματα για την ποσοτικοποίηση των καρβονυλίων με τη μέθοδο ELISA.



Σχήμα 10: Σχηματική απεικόνιση των μεθόδων ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (ανοσολογικής και φασματοφωτομετρικής).

Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων έγινε με τη μέθοδο των Patsoukis et al (2004). Συγκεκριμένα σε 50 μ l ορού, που τοποθετήσαμε σε σωλήνες erpendorf, προστέθηκαν 50 μ l 20% TCA. Ακολούθησε ανάδευση, επώαση σε παγόλουτρο για 15 min, φυγοκέντρηση στα 15,000g, για 5 min, στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Ακολούθως προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 0,5 ml 10mM DNPH, το οποίο είχε προηγουμένως διαλυθεί σε 2,5N HCl, και σε κάθε αντίστοιχο control 0,5 ml HCl (για κάθε δείγμα δημιουργήθηκε και αντίστοιχο δείγμα control). Ακολούθησε ανάδευση κι επώαση στο σκοτάδι για 1hr σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης επώασης γίνονταν ανάδευση κάθε δείγματος ανά 15 min (δηλαδή σύνολο 4 φορές καθόλη τη διάρκεια τής). Την επώαση ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 15,000g, για 5 min, στους 4 °C και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στη συνέχεια προστέθηκε σε κάθε erpendorf 1 ml 10% TCA, οι σωλήνες αναδεύτηκαν, φυγοκεντρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Έπειτα, προστέθηκαν 0,5 ml αιθανόλης και 0,5 ml ethyl acetate (1:1 v/v) σε κάθε erpendorf, οι σωλήνες αναδεύτηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Η προσθήκη αιθανόλης και ethyl acetate καθώς και η ακόλουθη ανάδευση, φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου πραγματοποιήθηκαν ακόμη 2 φορές. Τέλος, το ίζημα που υπήρχε σε κάθε erpendorf διαλύθηκε σε 1 ml 5M ουρίας (pH 2,3), αναδεύτηκε, επώαστηκε για 15 min στους 37°C, φυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες (εκτός του χρόνου, ο οποίος ελαττώθηκε στα 2-3 min) και μετρήθηκε η απορρόφηση του στα 375 nm. Η ποσότητα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων κάθε δείγματος προέκυψε σε

σχέση με την απορρόφηση του control κάθε δείγματος και με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης του DNPH, ο οποίος ισούται με 22 mMc^{-1} , σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/ml)} = \frac{A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{control}}}{0.022 \times 1000 / 50}$$

Ακολούθησε μετατροπή των nmol/ml σε nmol/mg για κάθε δείγμα σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Πρωτεϊνικά καρβονύλια (nmol/mg)} = \frac{\text{[καρβονύλια] σε nmol/ml}}{\text{[πρωτεΐνης] σε mg/ml}}$$

Να σημειωθεί ότι κάθε control περιέχει ορό αλλά όχι DNPH σε αντίθεση με κάθε τυφλό που περιέχει απιονισμένο νερό αντί του ορού. Αυτό έγινε ούτως ώστε κάθε δείγμα να συγκρίνεται με τον εαυτό του επιτυγχάνοντας έτσι μεγαλύτερη ακρίβεια στους υπολογισμούς των καρβονυλίων για κάθε δείγμα ξεχωριστά. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν.

Υπολογισμοί και στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM. Η κατανομή των δεικτών εξετάστηκε σύμφωνα με το Shapiro- Wilk test και δε βρέθηκε σημαντική διαφορά σε σχέση με τις φυσιολογικές τιμές. Για την ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης 2 παραγόντων (φύλο \times χρόνος) ANOVA με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Όταν ανιχνευόταν σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών, συγκρίσεις μεταξύ ζευγών πραγματοποιούνταν με ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων. Διαφορές στα ατομικά χαρακτηριστικά και τη διαίτα μεταξύ αγοριών και κοριτσιών εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας το Student's t test. Το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $\alpha=0.05$. Η SPSS εκδοχή 13.0 χρησιμοποιήθηκε για όλους τους τύπους ανάλυσης (SPSS Ink., USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ατομικά χαρακτηριστικά, διαίτα και ταχύτητα κολύμβησης

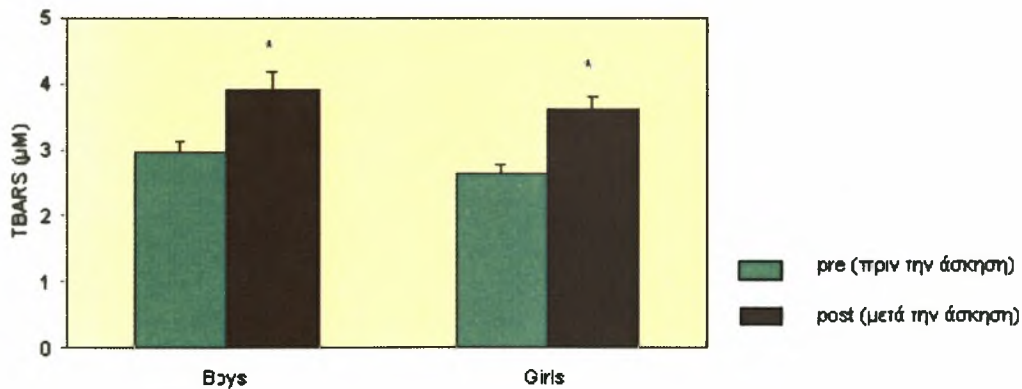
Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα ατομικά χαρακτηριστικά ανάμεσα στους κολυμβητές και τα controls ($P>0.05$), εκτός από το μεγαλύτερο ποσοστό λίπους που βρέθηκε στα κορίτσια σε σχέση με τα αγόρια ($P=0.012$). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην ημερήσια πρόσληψη ενέργειας, θρεπτικών συστατικών και αντιοξειδωτικών μεταξύ αγοριών και κοριτσιών ($P>0.05$). Η ταχύτητα κάθε δοκιμής κυμάνθηκε μεταξύ $74.1 \pm 1.0\%$ της 50-m μέγιστης ταχύτητας για τα αγόρια και $72.4 \pm 1.0\%$ της 50-m μέγιστης ταχύτητας για τα κορίτσια ($P>0.05$).

Όγκος αίματος

Ο όγκος του αίματος μετά την άσκηση σε σχέση με πριν την άσκηση κυμάνθηκε μεταξύ 0.99 ± 0.02 στα αγόρια και 1.02 ± 0.01 στα κορίτσια (και τα δύο με $P>0.05$). Για το λόγο αυτό δεν τροποποιήθηκαν οι μετρούμενες συγκεντρώσεις.

TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances)

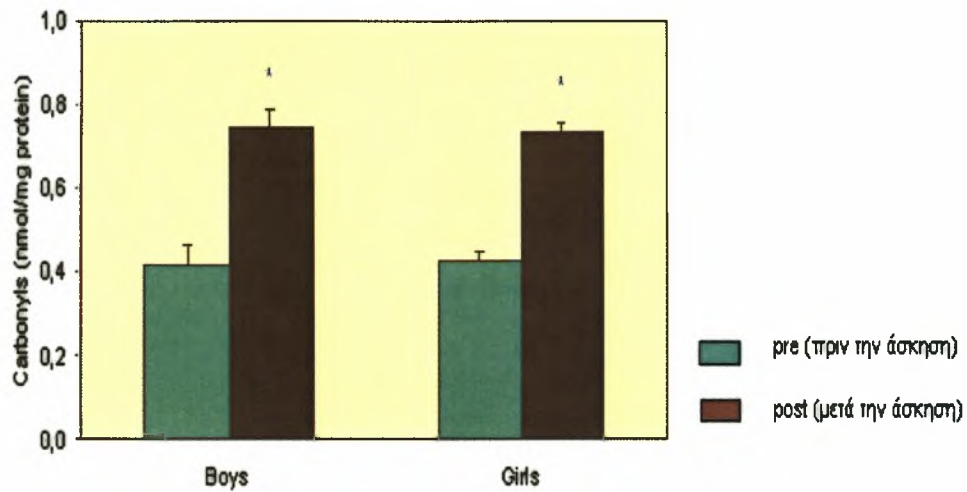
Η άσκηση αύξησε σημαντικά τα επίπεδα των TBARS, όπως παρατηρείται και στο επόμενο ραβδόγραμμα (κύρια επίδραση του χρόνου, $P<0.01$), τόσο στα αγόρια όσο και στα κορίτσια. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές γι' αυτήν την παράμετρο κατά την ηρεμία μεταξύ αγοριών και κοριτσιών ($P>0.05$). Καμία αλληλεπίδραση (φύλο x χρόνος) δεν παρατηρήθηκε γι' αυτόν τον δείκτη. Το μέγεθος επίδρασης της άσκησης για τα TBARS βρέθηκε $+1.59$ για τα αγόρια και 2.14 για τα κορίτσια.



Ραβδόγραμμα 1: Το μέγεθος επίδρασης της άσκησης στα TBARS σε αγόρια και κορίτσια. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Η άσκηση αύξησε επίσης σημαντικά και τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, πράγμα το οποίο παρατηρείται και στο επόμενο ραβδόγραμμα (κύρια επίδραση του χρόνου, $P < 0.001$), τόσο στα αγόρια όσο και στα κορίτσια. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές γι' αυτήν την παράμετρο κατά την ηρεμία μεταξύ αγοριών και κοριτσιών ($P > 0.05$). Καμία αλληλεπίδραση (φύλο x χρόνος) δεν παρατηρήθηκε γι' αυτόν τον δείκτη. Το μέγεθος επίδρασης της άσκησης για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια βρέθηκε +2.22 για τα αγόρια και 4.61 για τα κορίτσια.



Ραβδόγραμμα 2: Το μέγεθος επίδρασης της άσκησης στην παραγωγή καρβονυλίων σε αγόρια και κορίτσια. Ο αστερίσκος υποδηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τις μέχρι τώρα γνώσεις μας αυτή είναι η πρώτη προσπάθεια κατανόησης της επίδρασης της φυσικής άσκησης στο οξειδοαναγωγικό status του παιδικού οργανισμού. Τα δεδομένα αυτής της μελέτης καταδεικνύουν στατιστικά σημαντική αύξηση των επιλεγμένων οξειδωτικών δεικτών, πράγμα το οποίο συντείνει στην αξιοσημείωτη αύξηση του οξειδωτικού stress στα παιδιά.

Σύγκριση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του αίματος μεταξύ αγοριών και κοριτσιών κατά την ηρεμία

Αυτή είναι ίσως η πρώτη προσπάθεια σύγκρισης των επιλεγμένων δεικτών οξειδωτικού stress μεταξύ αγοριών και κοριτσιών 9-11 ετών σε κατάσταση ηρεμίας, ανεξαρτήτως της φυσικής τους κατάστασης (π.χ. προπονημένοι, απροπόνητοι) . Τα δεδομένα που προέκυψαν βασιζόμενα σε αυτήν τη σύγκριση δείχνουν πως η οξειδωτική κατάσταση του αίματος μεταξύ αγοριών και κοριτσιών, που ασχολούνται συστηματικά με την κολύμβηση, είναι παρόμοια σε κατάσταση ηρεμίας.

Πειραματικά δεδομένα από μελέτες σε ενήλικους, οι οποίες έχουν συγκρίνει το οξειδωτικό status του αίματος μεταξύ ανδρών και γυναικών, είναι λιγοστά και ασύμβατα. Κάποιες μελέτες έχουν καταδείξει υψηλότερα επίπεδα οξειδωμένων μορίων και/ή χαμηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικών παραγόντων στους άντρες σε σχέση με τις γυναίκες [10, 20]. Άλλες έχουν δείξει το αντίθετο [21] ενώ μερικές δεν έχουν βρει καμία διαφορά μεταξύ τους [22, 23].

Σύγκριση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του αίματος μεταξύ αγοριών και κοριτσιών μετά την άσκηση

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει πως η έντονη άσκηση αυξάνει το οξειδωτικό stress στο αίμα των ενήλικων [1], αν και υπάρχουν ορισμένες μελέτες που δεν παρατήρησαν κάτι τέτοιο [24, 25]. Σύμφωνα με την πλειοψηφία των μελετών στους ενήλικες, παρατηρήσαμε ότι η έντονη άσκηση στο 50% της μέγιστης έντασης προκάλεσε στατιστικά σημαντικές αυξήσεις των παρατηρούμενων δεικτών καταδεικνύοντας σημαντική αύξηση του οξειδωτικού stress στο αίμα των παιδιών. Αυτά τα δεδομένα προτείνουν πως το οξειδοαναγωγικό status των παιδιών αποκρίθηκε - τουλάχιστον ποιοτικά- σύμφωνα με αυτό των ενήλικων.

Η απόκριση του οξειδοαναγωγικού status του αίματος των παιδιών στην άσκηση ήταν ανεξάρτητη του φύλου και μάλιστα σε μεγάλο ποσοστό παρόμοια. Δυστυχώς δεν υπάρχουν σχετικές πληροφορίες για τους νέους. Οι μελέτες που έχουν συγκρίνει την απόκριση ενήλικων ανδρών με αυτή των γυναικών μετά από επίδραση έντονης άσκησης είναι λιγοστές και αντίθετες μεταξύ τους. Μερικές από αυτές δεν παρατήρησαν διαφορά στην απόκριση ανδρών και γυναικών στην έντονη άσκηση [21, 23], άλλες έδειξαν πως οι άντρες είναι περισσότερο επιδεκτικοί στην επίδραση του

οξειδωτικού stress προερχόμενου από έντονη άσκηση σε σχέση με τις γυναίκες [10] ενώ άλλες το αντίθετο [9]. Τα δικά μας αποτελέσματα αποκάλυψαν πως η άσκηση τροποποίησε ομοιόμορφα τα επίπεδα των επιλεγμένων δεικτών οξειδωτικού stress σε αγόρια και κορίτσια και δεν υπήρξε επίδραση του παράγοντα «φύλο».

Το μέγεθος των επαγόμενων από την άσκηση αλλαγών στο οξειδοαναγωγικό status του αίματος

Παρατηρήθηκαν μεγάλες διακυμάνσεις στα επίπεδα όλων των μετρούμενων δεικτών σύμφωνα με τα μεγέθη επίδρασης πριν και μετά την άσκηση. Ένα παρόμοιο συμπέρασμα μπορεί να παρατηρηθεί με υπολογισμό του ποσοστού διαφοράς μεταξύ των ίδιων τιμών πριν και μετά την άσκηση.

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι η περισσότερο άφθονη μικρού μοριακού βάρους θειόλη και το GSH/GSSG το σημαντικότερο οξειδοαναγωγικό ζεύγος στα ζωικά κύτταρα [26]. Παρατηρήθηκαν αμοιβαίες και ποσοτικώς παρόμοιες -ανάμεσα στα δύο φύλα- αλλαγές στα επίπεδα της GSH και της GSSG μετά την άσκηση (η GSH μειώθηκε κατά 27% στα αγόρια και 34% στα κορίτσια ενώ η GSSG αυξήθηκε κατά 66% στα αγόρια και 54% στα κορίτσια). Σαν αποτέλεσμα ο λόγος GSH/GSSG παρουσίασε μείωση κατά περίπου 4 φορές μετά την άσκηση σε αγόρια και κορίτσια. Ο υπολογισμός των μεγεθών επίδρασης παρήγαγε υψηλές τιμές, οι οποίες εκτείνονταν από λογικές (-0.62 της GSH για τα αγόρια) έως σχεδόν τέλειες (+4.02 για την GSSG για τα κορίτσια). Ο υπολογισμός της μέσης απόλυτης τιμής έδειξε 1.21 (η οποία θεωρείται μεγάλη τιμή). Παρομοίως, η άσκηση αύξησε σημαντικά τα μεγέθη και των άλλων δεικτών, συγκεκριμένα αύξησε κατά 24% και 27% τα TBARS, 44% και 42% τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, 27% και 29% τη δραστικότητα της καταλάσης και 37% και 36% την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού στα αγόρια και στα κορίτσια αντίστοιχα. Τα μεγέθη επίδρασης που υπολογίστηκαν έδειξαν επίσης σημαντικά υψηλές τιμές, οι οποίες εκτείνονται από λογικές (+0.42 για την καταλάση στα αγόρια) έως σχεδόν τέλειες (+4.61 για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια στα κορίτσια). Ο υπολογισμός της μέσης απόλυτης τιμής έδειξε 1.52 (η οποία θεωρείται μεγάλη τιμή).

Μία μικρή ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας δείχνει ότι οι περισσότερες μελέτες σε ενηλίκους έχουν αναφέρει μικρότερα μεγέθη επίδρασης στους οξειδοαναγωγικούς δείκτες του αίματος μετά από άσκηση [10, 27, 28]. Προφανώς, τέτοιες συγκρίσεις είναι αναξιόπιστες εξαιτίας των μεγάλων μεθοδολογικών ανομοιοτήτων μεταξύ των μελετών. Παρ' όλα αυτά, τα δεδομένα της παρούσας εργασίας θα μπορούσαν να συγκριθούν με μεγαλύτερη αξιοπιστία με τα δεδομένα μιας άλλης διπλωματικής εργασίας [29]. Στη συγκεκριμένη εργασία [29], η έντονη μέχρι εξάντλησης άσκηση προκάλεσε πολύ μικρότερες αλλαγές στους ίδιους οξειδοαναγωγικούς δείκτες στα παιδιά (η μέση απόλυτη τιμή για την γλουταθειόνη βρέθηκε 0.50 και για τις άλλες παραμέτρους 0.70).

Σύγκριση με μελέτες που χρησιμοποίησαν την κολύμβηση σαν πρότυπο άσκησης

Η κολύμβηση είναι κατά κάποιο τρόπο αντικαταστάτης των μέχρι τώρα χρησιμοποιούμενων μοντέλων άσκησης λόγω της επίδρασης της στο οξειδοαναγωγικό status του αίματος. Μόνο δύο μελέτες, οι οποίες παρατήρησαν την επίδραση της έντονης κολύμβησης σε ορισμένους οξειδωτικούς δείκτες σε ενήλικες, έχουν βρεθεί [10, 30]. Και οι δύο μελέτες ανέφεραν παρόμοια αποτελέσματα με τα δικά μας, δηλαδή χαμηλότερα επίπεδα GSH, αυξημένη δραστηριότητα της καταλάσης [10] και υψηλότερα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης μετά από έντονης έντασης κολύμβηση [30].

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αυτή είναι πιθανώς η πρώτη μελέτη επίδρασης της έντονης άσκησης στο οξειδοαναγωγικό status των παιδιών για κάθε ιστό. Το κυριότερο εύρημα αυτής της μελέτης είναι ότι η άσκηση προκαλεί μεγάλες και ομοιόμορφες αυξήσεις σε διάφορους δείκτες οξειδωτικού stress στα παιδιά -οι οποίες δηλώνουν οξειδωμένη κατάσταση του αίματος. Επίσης, οι αυξήσεις αυτές είναι συγκρινόμενες μεταξύ αγοριών και κοριτσιών. Σύγκριση της απόκρισης του οξειδωτικού stress, το οποίο οφείλεται σε ερέθισμα άσκησης, μεταξύ ενηλίκων και παιδιών καταδεικνύει πως η άσκηση μπορεί να προκαλεί μεγαλύτερες διακυμάνσεις στις τιμές των δεικτών στα παιδιά απ' ότι στους ενήλικες. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για άμεση σύγκριση των παραπάνω επιδράσεων έντονης άσκησης στο παρατηρούμενο σε αυτήν οξειδωτικό stress σε σχέση με τις επιδράσεις που προκαλεί η χρόνια φυσική άσκηση, τόσο σε ενήλικες όσο και σε παιδιά, με παρόμοιο πειραματικό μέρος.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Finaud J, Lac G, Filaire E 2006 Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 36:327-358
2. Rowland TW 1996 *Developmental Exercise Physiology. Human Kinetics, Champaign.*
3. Armon Y, Cooper DM, Flores R, Zanconato S, Barstow TJ 1991 Oxygen uptake dynamics during high-intensity exercise in children and adults. *J Appl Physiol* 70:841-848
4. Zanconato S, Buchthal S, Barstow TJ, Cooper DM 1993 ³¹P-magnetic resonance spectroscopy of leg muscle metabolism during exercise in children and adults. *J Appl Physiol* 74:2214-2218
5. Cooper DM, Nemet D, Galassetti P 2004 Exercise, stress, and inflammation in the growing child: from the bench to the playground. *Curr Opin Pediatr* 16:286-292
6. Jenkins RR 2000 Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *Am J Clin Nutr* 72:670S-674S
7. Sen CK, Packer L 2000 Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr* 72:653S-669S
8. Viitala P, Newhouse IJ 2004 Vitamin E supplementation, exercise and lipid peroxidation in human participants. *Eur J Appl Physiol* 93:108-115
9. Ginsburg GS, O'Toole M, Rimm E, Douglas PS, Rifai N 2001 Gender differences in exercise-induced changes in sex hormone levels and lipid peroxidation in athletes participating in the Hawaii Ironman triathlon. Ginsburg-gender and exercise-induced lipid peroxidation. *Clin Chim Acta* 305:131-139
10. Ilhan N, Kamanli A, Ozmerdivenlic R, Ilhana N 2004 Variable effects of exercise intensity on reduced glutathione, thiobarbituric-acid reactive substance levels, and glucose concentration. *Arch Med Res* 35:294-300
11. American College of Sports Medicine 2000 ACSM's guidelines for exercise testing and prescription. Philadelphia: Lippinkot Williams & Wilkins, pp 77
12. Dill DB, Costill DL 1974 Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 37:247-248
13. Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC 2004 Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc* 51:213-218
14. Tietze F 1969 Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27:502-522
15. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F 2001 Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 28:141-143
16. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA 2004 Thiol redox state (TRS) and oxidative

- stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett* 357:83-86
17. Aebi H 1984 Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126
 18. Janaszewska A, Bartosz G 2002 Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 62:231-236
 19. Cohen J 1988 *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Hillsdale, NJ, Lawrence Erlbaum
 20. 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
 21. Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Tuomainen TP, Nyysönen 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
 22. Habif S, Mutafa I, Turgan N, Onur E, Duman C, Ozmen D, Bayindira O 2001 Age and gender dependent alterations in the activities of glutathione related enzymes in healthy subjects. *Clin Biochem* 34:667-671
 23. Rodriguez MC, Rosenfeld J, Tarnopolsky MA 2003 Plasma malondialdehyde increases transiently after ischemic forearm exercise. *Med Sci Sports Exerc* 35:1859-1865
 24. Margaritis I, Tessier F, Richard MJ, Marconnet P 1997 No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *Int J Sports Med* 18:186-190
 25. Saxton JM, Donnelly AE, Roper HP 1994 Indices of free-radical-mediated damage following maximum voluntary eccentric and concentric muscular work. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 68:189-193
 26. Mylonas C, Kouretas D 1999 Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13:295-309
 27. 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
 28. 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
 29. 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
 30. 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