



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

*Προσδιορισμός δεικτών οξειδωτικού στρες σε αθλητές
υπερμαραθωνίου βουνού*

*Assessment of oxidative stress markers in mountain ultra
marathon runners*



Μαρίνα Ορφανού

Λάρισα 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημήτριος Στάγκος: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αθανάσιος Τζιαμούρτας: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας της Άσκησης του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής & Αθλητισμού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κουρέτα, επιβλέπων καθηγητή, για την εμπιστοσύνη και τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετέχω στην παρούσα μελέτη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον κύριο Στάγκο που με βοήθησε με τις συμβουλές του στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας, καθώς και το τρίτο μέλος της τριμελούς επιτροπής τον κύριο Τζιαμούρτα για τη συμμετοχή του σε αυτήν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου, τον Αλέξανδρο και την Σωτηρίνα αλλά και τον πλέον διδάκτορα κύριο Κώστα για την βοήθεια τους κατά τη διάρκεια του πειραματικού τμήματος της μελέτης που ήταν πάντα στο εργαστήριο και έλυναν κάθε μου απορία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τον υποψήφιο διδάκτορα Άκη, που με ανέλαβε και μαζί φέραμε εις πέρας την παρούσα εργασία.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που μου δίνει τη δυνατότητα να σπουδάζω τόσα χρόνια για ένα "καλύτερο" μέλλον αλλά και για την ψυχολογική στήριξη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Νίκο ο οποίος ήταν πάντα στο εργαστήριο και συνέβαλε όπου μπορούσε σε οποιαδήποτε εργασία, σε οποιαδήποτε απορία και σε οποιοδήποτε πρόβλημα, καθώς και στην ψυχολογική μου ευημερία.

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	7
Abstract	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	10
1.2 Κατηγορίες ελευθέρων ριζών.....	12
1.3 Οξειδωτικό στρες	13
1.4 Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	14
1.4.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση	14
1.4.2. Κυτόχρωμα P 450 – Ενζυμικό σύστημα P 450.....	16
1.4.3. Υπεροξειδιοσώματα.....	17
1.4.4. Αιμοσφαιρίνη	17
1.4.5. Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ	17
1.4.6 Φλεγμονή	18
1.5 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	18
1.6 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών	19
1.6.1 Λιπίδια.....	20
1.6.2 Πρωτεΐνες.....	20
1.6.3 DNA.....	20
1.6.4 Δράση στην επικοινωνία των κυττάρων	21
1.7 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	21
1.7.1 Ενζυμικοί μηχανισμοί	22
1.7.2 Μη ενζυμικοί μηχανισμοί.....	26
1.8 Άσκηση και οξειδωτικό στρες.....	31
Σκοπός.....	34
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
2.1 Πειραματική διαδικασία	35
2.2 Συλλογή αίματος και επεξεργασία	35
2.3. Αξιολόγηση του sORP και cORP με τη χρήση του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS	36
2.4 Αξιολόγηση των δεικτών: 1.TAC, 2.TBARS, 3.CARB, 4.CAT, 5.GSH	38
2.4.1. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του πλάσματος ..	38

2.4.2 Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στο πλάσμα	41
2.4.3 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στο πλάσμα	42
2.4.4 Κατάληση στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα	45
2.4.5 Ανηγγμένη Γλουταθειόνη (GSH) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα	47
2.5 Στατιστική ανάλυση	49
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	50
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	73

Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1: Ο Όλυμπος και στο βάθος τα Ζωνάρια στο πρώτο φως της ανατολής.....	10
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση ελεύθερης ρίζας	11
Εικόνα 3: Δραστικές μορφές οξυγόνου	12
Εικόνα 4: Οξειδωτικό στρες	13
Εικόνα 5: Ενδογενείς πηγές παραγωγής ROS και RNS	14
Εικόνα 6: Παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την οξειδωτική φωσφορλίωση	16
Εικόνα 7: Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	19
Εικόνα 8: Δράση αντιοξειδωτικών ουσιών σε ελεύθερες ρίζες	22
Εικόνα 9: Σχέση σύνδεσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης.....	24
Εικόνα 10: Σχέση G6PD με την Αναγωγάση της γλουταθειόνης.....	24
Εικόνα 11: Μηχανισμός δράσης της υπεροξειδάσης της θειρεδοξίνης	25
Εικόνα 12: Δομή Τοκοφερολών.....	26
Εικόνα 13: Δομή ασκορβικού οξέος	27
Εικόνα 14: Δομή β-καροτενίου.....	27
Εικόνα 15: Ηλεκτρονιακή δομή σεληνίου	28
Εικόνα 16: Δομή γλουταθειόνης	29
Εικόνα 17: Δομή ουρικού οξέος	29
Εικόνα 18: Δομή Συνενζύμου Q10	30
Εικόνα 19: Αντίδραση της μαλονδιαλδεΰδης με το θειοβαρβιτουρικό οξύ.....	41
Εικόνα 20: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης	47

Πίνακας Σχημάτων

Σχήμα 1: Ποσοστιαία επίπεδα (%) του στατικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού (<i>sORP</i>) στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου). *Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).	51
Σχήμα 2: Ποσοστιαία επίπεδα (%) της δυνητικής ικανότητας οξείδωσης-αναγωγής (<i>cORP</i>) στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου). *Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).	51
Σχήμα 3: Ποσοστιαία επίπεδα (%) της <i>GSH</i> στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου). *Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).	52
Σχήμα 4: Ποσοστιαία επίπεδα (%) της δραστικότητας της <i>CAT</i> στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).	52
Σχήμα 5: Ποσοστιαία επίπεδα (%) των <i>TBARS</i> στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).	53
Σχήμα 6: Ποσοστιαία επίπεδα (%) των <i>CARB</i> στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).	53
Σχήμα 7: Ποσοστιαία επίπεδα (%) της <i>TAC</i> στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).	54
Σχήμα 8: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του <i>sORP</i> ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.	56
Σχήμα 9: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του <i>cORP</i> ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.	56
Σχήμα 10: Ποσοστιαία μεταβολή (%) των <i>TBARS</i> ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.	57
Σχήμα 11: Ποσοστιαία μεταβολή (%) των <i>CARB</i> ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.	57
Σχήμα 12: Ποσοστιαία μεταβολή (%) της <i>TAC</i> ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.	58
Σχήμα 13: Ποσοστιαία μεταβολή (%) της δραστικότητας της <i>CAT</i> ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.	58
Σχήμα 14: Ποσοστιαία μεταβολή (%) της <i>GSH</i> ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.	59

Περίληψη

Ο κύριος σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να αποκτηθεί μια λεπτομερή εικόνα για τις αλλαγές που συμβαίνουν στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των δρομέων υπερμαραθωνίου βουνού τις επόμενες μέρες μετά τον αγώνα. Για το λόγο αυτό, δείγματα αίματος από 12 έμπειρους δρομείς υπερ-μαραθωνίου που συμμετείχαν στην έρευνα, συλλέχθηκαν πριν από τον αγώνα και 24, 48 και 72 ώρες μετά τον αγώνα. Ο αγώνας που επιλέχθηκε είναι ένας πολύ απαιτητικός και επίπονος υπερ-μαραθώνιος 100 χιλιομέτρων στο βουνό ο οποίος ονομάζεται "Olympus Mythical Trail". Στα ερυθροκύτταρα και στο πλάσμα του αίματος των δειγμάτων προσδιορίστηκαν δείκτες οξειδωτικού στρες. Στο πλάσμα μετρήθηκαν τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB), οι ουσίες που αντιδρούν με τοθειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Στα ερυθροκύτταρα μετρήθηκαν τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και η δραστηριότητα καταλάσης (CAT). Επιπλέον, ένα νέο διαγνωστικό σύστημα χρησιμοποιήθηκε μετρώντας δύο νέες τιμές, έναν δείκτη στατικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού (sORP) και τη δυναμική ικανότητα οξείδωσης-αναγωγής (cORP), στο πλάσμα. Από τους 12 δρομείς τελικά οι 8 κατάφεραν να τερματίσουν τον αγώνα. Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε έδειξε ότι τα επίπεδα sORP αυξήθηκαν σημαντικά κατά 14,29% 72 ώρες μετά τον αγώνα σε σύγκριση με πριν από τον αγώνα. Επιπλέον, τα επίπεδα cORP μειώθηκαν σημαντικά 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα σε σύγκριση με πριν από τον αγώνα κατά 22,26% και 23,29% αντίστοιχα. Ομοίως, τα επίπεδα της GSH μειώθηκαν σημαντικά σε όλα τα χρονικά σημεία μετά τον αγώνα σε σύγκριση με πριν από τον αγώνα κατά 26,78%, 29,04% και 23,19% αντίστοιχα. Επιπλέον ακολούθησε ατομική ανάλυση για κάθε αθλητή σε κάθε χρονικό σημείο. Από τις αναλύσεις φάνηκε ότι η GSH, η sORP και η cORP είχαν μία παρόμοια ανταπόκριση μεταξύ των αθλητών (εκτός από έναν). Στην sORP η τεράστια πλειοψηφία των δειγμάτων έδειξε αύξηση μετά τον αγώνα, ενώ στην cORP και στην GSH έδειξε μείωση. Αντίθετα, στους υπόλοιπους δείκτες παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις υποδεικνύοντας την αναγκαιότητα να μελετηθούν οι μεταβολές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των αθλητών ατομικά καθώς το δυναμικό οξειδοαναγωγής μπορεί να ποικίλει μεταξύ των ατόμων μετά από επίπονη άσκηση. Παρατηρώντας τελικώς τα ληφθέντα αποτελέσματα φαίνεται ότι η εξαντλητική και επίπονη άσκηση, δημιουργεί στρεσογόνο περιβάλλον στον οργανισμό, το οποίο θα μπορούσε να προωθεί την παραγωγή ROS, η οποία οδηγεί ως εκ τούτου σε οξειδωτικό στρες.

Abstract

The main purpose of this study was to obtain a detailed picture of the changes occurring in the redox status of mountain marathon runners the following days after the race. For this reason, blood samples from 12 experienced marathon runners that participated in the survey, collected before the race and 24, 48 and 72 hours after the race. The race chosen is a very demanding and painful 100 km mountain ultra-marathon named " Olympus Mythical Trail ". The Samples were analyzed by using conventional oxidative stress markers in plasma and erythrocytes. In plasma protein carbonyls (CARB), substances that react with thiobarbituric acid (TBARS) and total antioxidant capacity (TAC) were measured. At erythrocytes levels of glutathione (GSH) and catalase activity (CAT) were measured. In addition, a new diagnostic system was used measuring two new values, the static oxidation-reduction potential marker (sORP) and the capacity oxidation-reduction potential (cORP), in plasma. Out of the 12 participants runners the eight managed to finish the race. The analysis that performed showed that sORP levels increased significantly by 14.29% in 72 hours after the race compared to pre-race. Moreover, cORP levels decreased significantly in 24 and 48 hours after the race compared to pre-race by 22.26% and 23.29% respectively. Similarly, GSH levels decreased significantly at all time points after the race compared to pre-race by 26.78%, 29.04% and 23.19% respectively. Moreover an inter-individual analysis for each athlete in each time point was followed. The analysis showed that GSH, sORP and cORP had a similar response among athletes (except one). In sORP the huge majority of the samples demonstrated an increase after the race, while in cORP and GSH demonstrated reduction. In contrast, in the rest markers significant variations were observed indicating the need to study the changes in the redox status of the athletes individually as the redox potential can vary among people after strenuous exercise. finally observing the results obtained shown that the exhaustive and painful exercise, creates a stressful environment in the body, that could promote ROS production, which leads therefore to oxidative stress.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι υπερμαραθώνιοι αγώνες έχουν αποκτήσει μεγάλη δημοτικότητα τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της απαιτητικής και δυναμικής φύσης τους, γνωρίσματα που τους προσδίδουν την έννοια της πρόκλησης. Ως υπερμαραθώνιος χαρακτηρίζεται ένας αγώνας, που περιλαμβάνει τρέξιμο και περπάτημα για απόσταση μεγαλύτερη από εκείνη ενός Μαραθωνίου (42,195 m).

Olympus Mythical Trail

Πρόκειται για έναν αγώνα 100χιλ. σε βουνό που λαμβάνει χώρα στην Ελλάδα, στον Όλυμπο, στο περίφημο «Βουνό των Θεών». Για τέταρτη χρονιά πραγματοποιήθηκε στις 4 Ιουλίου 2015 για 102 δρομείς που πέρασαν τη γραμμή της εκκίνησης, με τους 76 από αυτούς να περνούν και τη γραμμή του τερματισμού. Ο αγώνας απευθύνεται σε έμπειρους αθλητές, καθώς απαιτεί προηγμένες δεξιότητες λόγω του βαθμού υψηλής δυσκολίας του. Η διαδρομή εκτείνεται σε μία απόσταση περίπου 100 χιλιομέτρων συγκεκριμένα αυτή τη χρονιά ήταν 103 χιλιόμετρα και καλύπτει συνολικά 6450 μέτρα θετικής υψομετρικής διαφοράς. Από τα 103 χιλιόμετρα τα 40 βρίσκονται σε υψόμετρο άνω των 2.000 μέτρων. Η μορφή της άσκησης που έφεραν εις πέρας οι αθλητές ήταν κυρίως αερόβια, με πολλά τμήματα έκκεντρης άσκησης εξαιτίας της κατάβασης σε πολλά σημεία του αγώνα. Το μονοπάτι περνά μέσα από μοναδικό τοπίο που προσφέρει θαυμάσια θέα στο διάσημο βουνό, ενώ παράλληλα, αποτελεί μια σκληρή δοκιμασία για τους δρομείς βουνού, σε ένα απαιτητικό τεχνικό έδαφος.



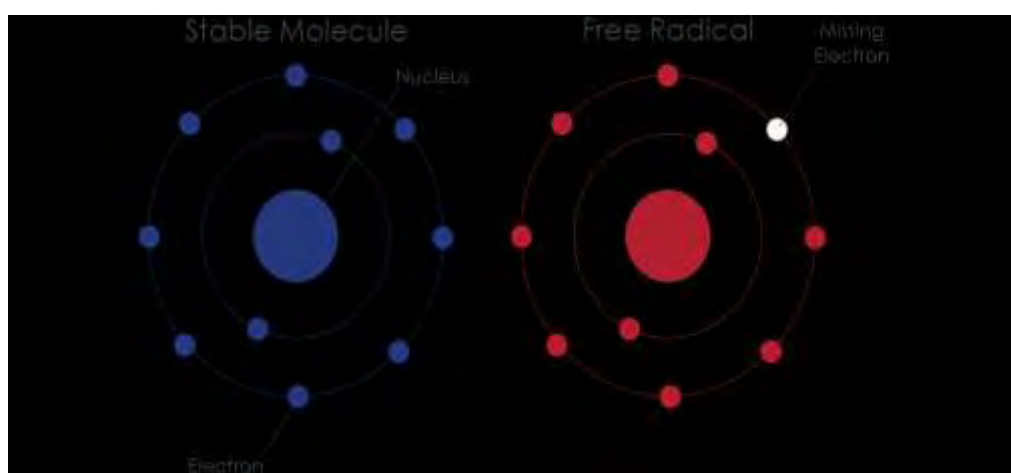
Εικόνα 1: *Ο Όλυμπος και στο βάθος τα Ζωνάρια στο πρώτο φως της ανατολής.*

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ένα ηλεκτρόνιο χαρακτηρίζεται κατά μοναδικό τρόπο από μία τετράδα κβαντικών αριθμών, οι οποίοι δηλώνουν την ηλεκτρική δυναμική ενέργεια του ηλεκτρονίου στο άτομο, αλλά και προσδιορίζουν την τροχιά του.

Στα περισσότερα μόρια τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε στοιβάδα τείνουν να ζευγαρώνουν ανά δύο. Τα ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις, έτσι το μόριο χαρακτηρίζεται σχετικά σταθερό και λιγότερο δραστικό. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο αλλάζει ενεργειακή κατάσταση, γίνεται ασταθές και συνεπώς πιο δραστικό από άλλα μόρια. Τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια ασκούν τεράστια έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων οξείδωσης (απώλεια ηλεκτρονίων), ή αναγωγής (απόκτηση ηλεκτρονίων) μεταξύ ατόμων ή μορίων.

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Jenkins, 1988). Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, μετατρέποντας και τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες διαταράσσοντας έτσι την μοριακή τάξη αποσπώντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο για να ζευγαρώσουν με το δικό τους. Αυτή η αλυσιδωτή αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη (Mylonas & Kouretas, 1999).



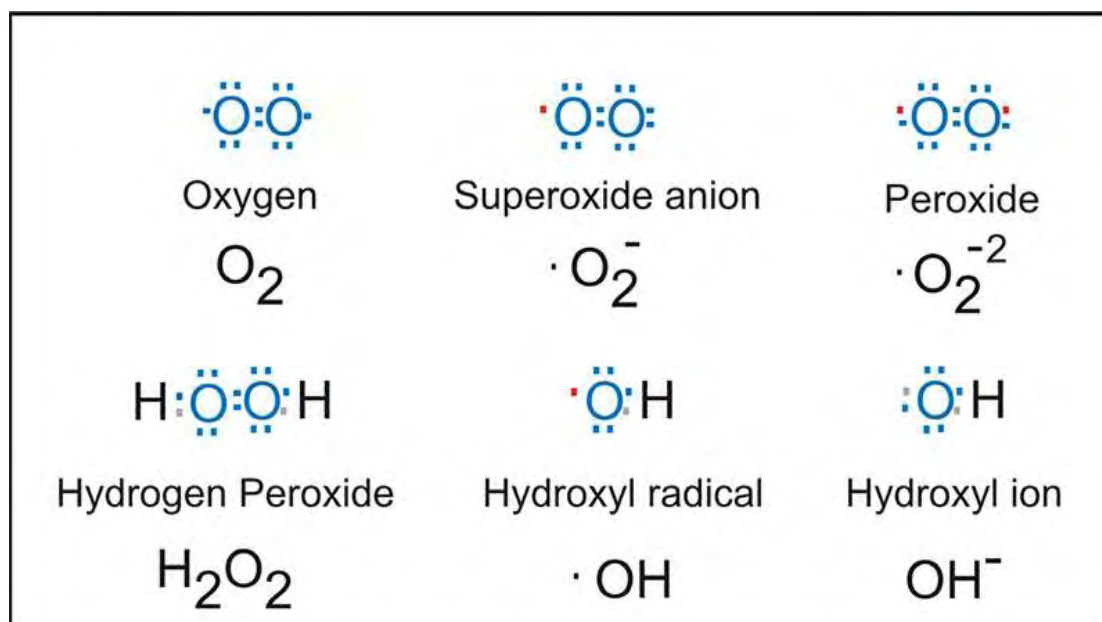
Εικόνα 2: Σχηματική αναπαράσταση ελεύθερης ρίζας

Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους. Ο πιο σύνηθες τρόπος για τα βιολογικά συστήματα είναι με **οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις** καθώς και με **ομοιοπολική διάσπαση**.

1.2 Κατηγορίες ελευθέρων ριζών

Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου ενώ στο εσωτερικό των κυττάρων οι πιο συνήθεις ρίζες είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) στις οποίες ανήκουν οι ρίζες:

- ανιόν σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$),
- ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-2}$),
- υδροξυλίου (OH^{\cdot}),
- αλκοξειδίου (RO^{\cdot}),
- υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot}).



Εικόνα 3: Δραστικές μορφές οξυγόνου

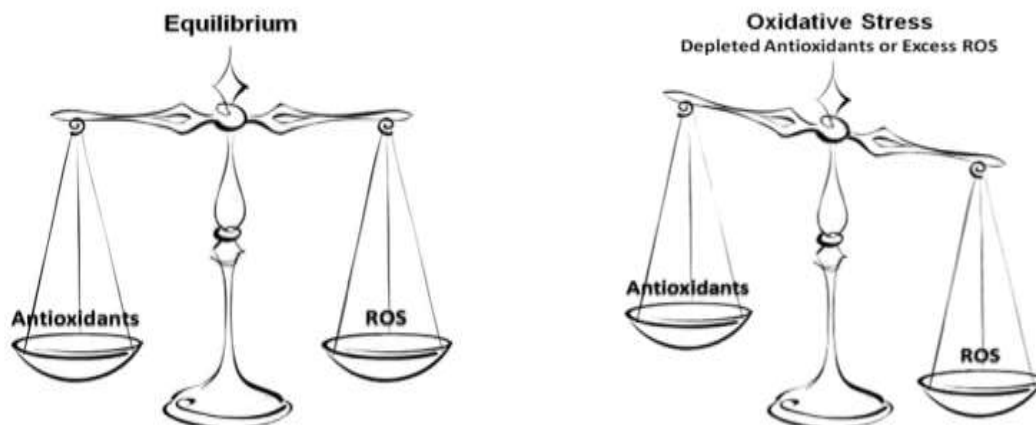
Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις, που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman & Slater, 1993). Στις **ROS** επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ ($COCl$) αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Halliwell, 2015).

Στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται και οι δραστικές μορφές αζώτου (**RNS**) που προέρχονται από το άζωτο, με πιο κοινή στο εσωτερικό των κυττάρων τη

ρίζα $\text{NO}\cdot$, οι δραστικές μορφές θείου (**RSS**) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (**RCS**) που προέρχονται από το χλώριο. Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέρθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles et al., 2002).

1.3 Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και των αναγωγικών ουσιών του κυττάρου και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Sies, 1991).

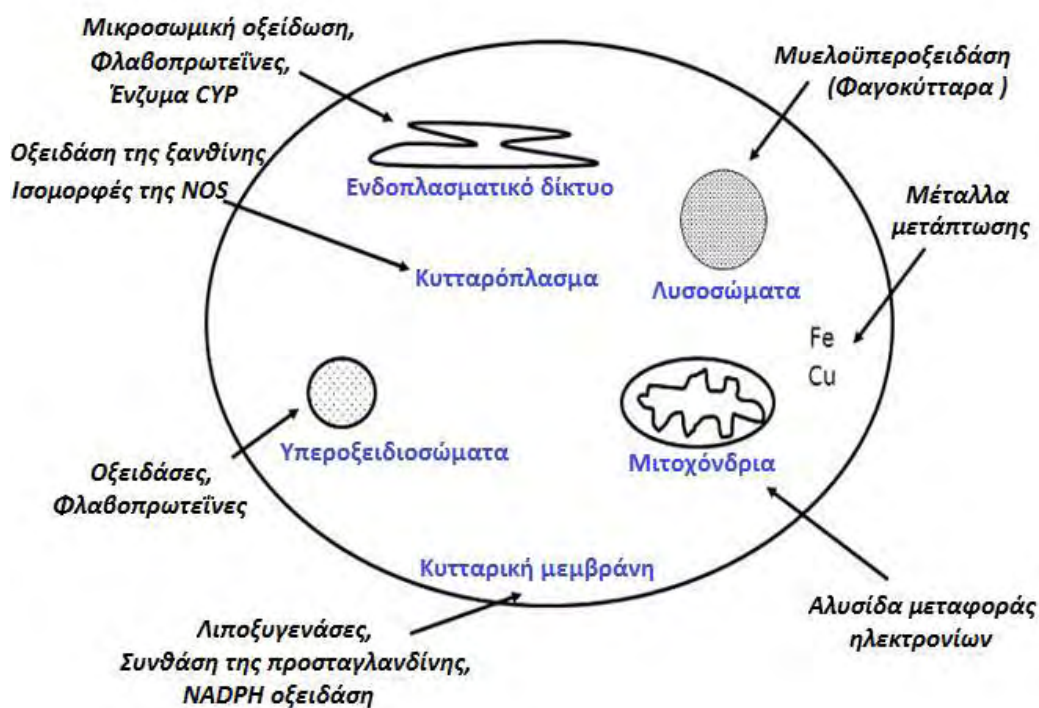


Εικόνα 4: Οξειδωτικό στρες

Η εμφάνισή του μπορεί να οφείλεται σε ενδογενείς αλλά και σε εξωγενείς παράγοντες. Η ύπαρξη οξειδωτικού στρες συνεπάγεται παραγωγή και συσσώρευση οξειδωτικών προϊόντων που εμπλέκονται στην παθογένεια, κατά κύριο λόγο εκφυλιστικών νοσημάτων και φλεγμονών. Χαρακτηρίζεται από τις μεταβολές που προκαλεί στα βιομόρια του οργανισμού (Dotan et al., 2004). Για το λόγο αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον η προσπάθεια φαρμακολογικής τροποποίησης της απόκρισης των οργανισμών στο οξειδωτικό στρες.

1.4 Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών προέρχεται από τον μεταβολισμό των κυττάρων. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από το οξυγόνο το οποίο σε συγκεντρώσεις πάνω από 21% είναι τοξικό. Αν και κατά βάση οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται επιβλαβείς, σε χαμηλές συγκεντρώσεις εξασφαλίζουν τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων και εξυπηρετούν σε συγκεκριμένες διεργασίες όπως: η μεταγωγή σήματος, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η φαγοκυττάρωση, η κυτταρική διαφοροποίηση και η αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, διαδικασία που απαιτεί την ύπαρξη ενός οξειδωμένου περιβάλλοντος.



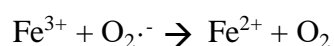
Εικόνα 5: Ενδογενείς πηγές παραγωγής ROS και RNS

1.4.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η διεργασία στην οποία παράγεται το μεγαλύτερο μέρος ATP που συνθέτουν οι περισσότεροι οργανισμοί. Λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και πιο συγκεκριμένα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων.

Περιλαμβάνει την αναγωγή του O₂ σε H₂O με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και το FADH₂ δια μέσου μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-ουβικινόνης, η οξειδοαναγωγή του ζεύγους ουβικινόνης-κυτοχρώματος c και η οξειδάση του κυτοχρώματος c αποτελούν τα βασικά σύμπλοκα μέσω των οποίων μεταφέρονται τα ηλεκτρόνια που καταλύουν την αναγωγή του O₂. Ωστόσο η μερική αναγωγή του O₂ οδηγεί στην παραγωγή O₂^{·-} (Berg et al., 2010). Το O₂^{·-} ανάγεται σε H₂O₂ από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD). Μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο O₂^{·-} και στο H₂O₂ δημιουργείται OH[·].

Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή:



Το δεύτερο βήμα είναι η αντίδραση Fenton:

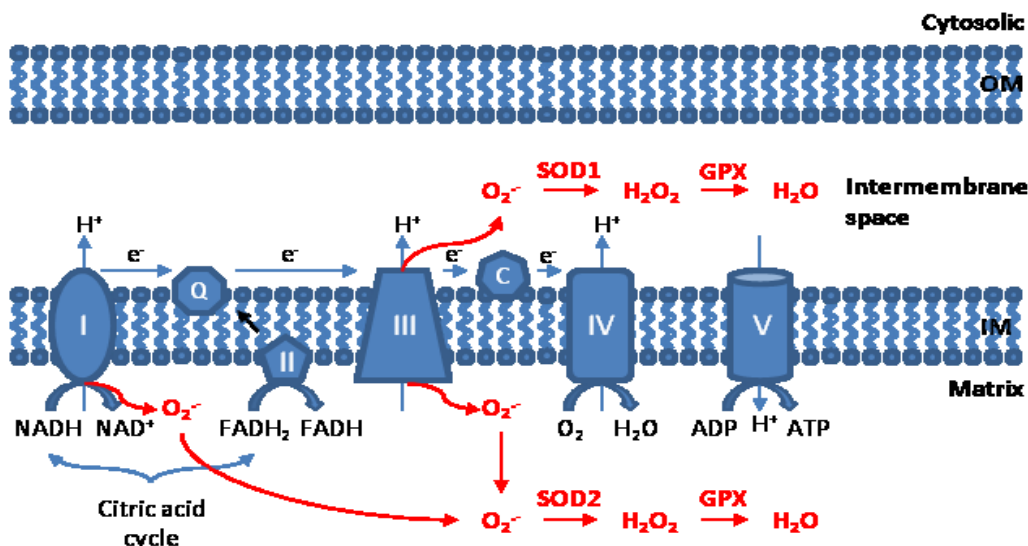


Η πλήρης αντίδραση:



Επομένως, κατά την αναγωγή του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια παράγονται δραστικές ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα, οι οποίες είναι επικίνδυνες για τα κύτταρα καθώς προκαλούν βλάβες στις πρωτεΐνες, στα μεμβρανικά λιπίδια και στα νουκλεϊκά οξέα.

Κατά την έντονη αερόβια άσκηση, όμως, η συνολική πρόσληψη οξυγόνου είναι αυξημένη κατά 20 φορές και τα επίπεδα οξυγόνου σε μια μυϊκή ίνα είναι αυξημένα κατά 100 φορές (Ji, 1999). Έτσι, άμεσα αυξάνεται η παραγωγή ριζών οξυγόνου που ξεφεύγουν από την οξειδωτική φωσφορυλίωση και κατά συνέπεια προκαλείται οξειδωτικό στρες (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001).

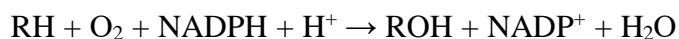


Εικόνα 6: Παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την οξειδωτική φωσφορλίωση

1.4.2. Κυτόχρωμα P 450 – Ενζυμικό σύστημα P 450

Το ενζυμικό σύστημα P450 κατέχει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των ξενοβιοτικών ουσιών για τον οργανισμό, τα ένζυμα του περιέχουν μια αίμη ως συμπαράγοντα και ως εκ τούτου χαρακτηρίζονται ως αιμοπρωτεΐνες, βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο ενδοπλασματικό δίκτυο των κυττάρων του ήπατος. Ο κύριος μηχανισμός λειτουργίας του είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH και NADPH στο μοριακό οξυγόνο, οξειδώνοντας έτσι το υπόστρωμα.

Η αντίδραση που πραγματοποιείται σε ένα ξενοβιοτικό RH είναι η ακόλουθη:



Η υδροξυλίωση των ξενοβιοτικών ουσιών τις καθιστά περισσότερο υδατοδιαλυτές και επιτρέπει την απέκκρισή τους στα ούρα, ωστόσο ορισμένες φορές η υδροξυλίωση μερικών ενώσεων τις μετατρέπει στους τοξικούς μεταβολίτες τους (Zangar et al., 2004).

1.4.3. Υπεροξειδιοσώματα

Είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα, όπως η καταλάση, για τη διάσπαση διαφόρων ουσιών επικίνδυνων για το κύτταρο. Τα υπεροξειδιοσώματα συμμετέχουν στην αποδόμηση των λιπιδίων μέσω οξείδωσης. Κατά την διάρκεια της οξείδωσης των οποίων παράγεται υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το λιπαρό οξύ στο FAD προς σχηματισμό $FADH_2$ και από αυτό στο μοριακό οξυγόνο O_2 (Berg et al., 2010).

1.4.4. Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη μεταφέρει οξυγόνο στα κύτταρα με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης οι απαιτήσεις για οξυγόνο είναι μεγάλες. Σε τέτοιες συνθήκες, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει στην παραγωγή ROS. Συγκεκριμένα η αυτοοξείδωση της οξυαιμοσφαιρίνης και οξυμυοσφαιρίνης οδηγεί στο σχηματισμό $O_2^{\cdot-}$ και στην συνέχεια σε σχηματισμό H_2O_2 (Cooper et al., 2002).

1.4.5. Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

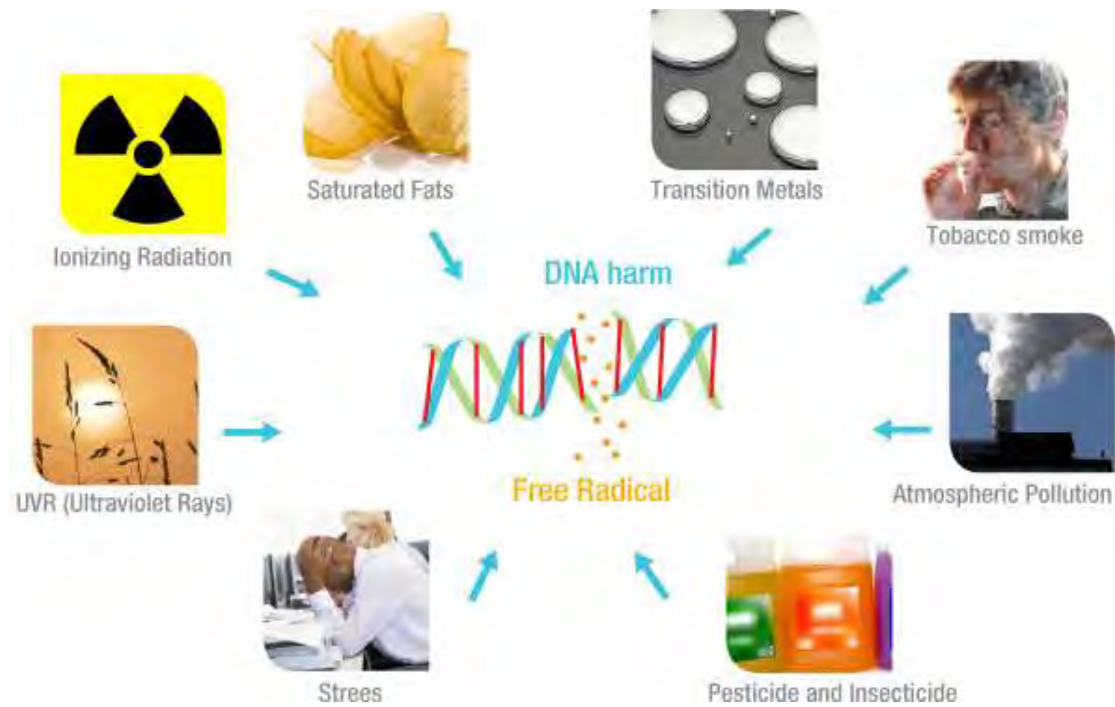
Κατά την αναερόβια άσκηση παρατηρείται το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών. Κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης λόγω της άμεσης ενέργειας που χρειάζεται ο οργανισμός το ATP διασπάται σε ADP και αυτό σε AMP. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Τα δύο στάδια της αντίδραση αυτής, η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και η μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύονται από σχηματισμό $O_2^{\cdot-}$. Τα επίπεδα της οξειδάσης της ξανθίνης και υποξανθίνης τόσο στο πλάσμα όσο και σε ιστούς αυξάνονται μετά από αναερόβια άσκηση (Radak et al., 1999; Vina et al., 2000). Κάτω από αερόβιες συνθήκες το ATP αναπληρώνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.

1.4.6 Φλεγμονή

Η φλεγμονή είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος παράγουν ουσίες που σκοπό έχουν να προστατεύσουν τον οργανισμό από κάποια μόλυνση και από "ξένα σώματα", όπως βακτηρία και ιούς. Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN) αποτελούν τον μεγαλύτερο πληθυσμό των λευκών αιμοσφαιρίων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον ανοσοποιητικό μηχανισμό του οργανισμού (Pyne, 1994; Slauch, 2011). Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς (Meydani et al., 1992). Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύνονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το $O_2^{\cdot-}$ κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Φλεγμονή μπορεί να προκληθεί κατά τη διάρκεια έκκεντρης άσκησης εξαιτίας της καταστροφής μυϊκών ινών.

1.5 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

- Έκθεση σε ακτινοβολία (ακτίνες X, υπεριώδης ακτινοβολία)
- Κάπνισμα
- Ατμοσφαιρική ρύπανση
- Υπεροξεία
- Βιομηχανικά απόβλητα
- Φυτοφάρμακα και εντομοκτόνα
- Ιόντα βαρέων μετάλλων
- Φάρμακα και ξενοβιοτικά
- Αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ
- Στρες
- Κορεσμένα λιπαρά



Εικόνα 7: Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.6 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Είναι πλέον καλά αναγνωρισμένος ο διπλός ρόλος των ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου (ROS, RNS). Η υπερβολική παραγωγή τους οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, ενώ οι χαμηλές συγκεντρώσεις των ROS και RNS έχουν ευεργετικά για τον οργανισμό αποτελέσματα καθώς διαδραματίζουν ενδοκυτταρικούς ρόλους. Όπως αναφέρθηκε οι ελεύθερες ρίζες είναι αρκετά δραστικά μόρια με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν με βασικά δομικά και λειτουργικά στοιχεία του οργανισμού. Προκαλούν μεταλλάξεις στο DNA αλληλεπιδρώντας με τις βάσεις, αλλοιώνουν τις κυτταρικές μεμβράνες, έχουν σχέση σε ένα βαθμό με παθήσεις όπως ο διαβήτης, η αρτηριοσκλήρυνση, οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Alzheimer, Parkinson) και η γήρανση (Halliwell & Gutteridge 1998; Halliwell, 2001).

1.6.1 Λιπίδια

Όλες οι μεμβράνες, κυτταρικές και κυτταρικών οργανιδίων, αποτελούνται από λιπίδια, τα οποία είναι ευαίσθητα σε οξείδωση και μπορούν να υποστούν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Κυρίως προσβάλλονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ως δομικά συστατικά των μεμβρανών. Η οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών υπεροξειδίου ROO·, συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεϋδης (MDA). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητάς τους. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny, 2001).

1.6.2 Πρωτεΐνες

Οι δομικές πρωτεΐνες μπορούν να οξειδωθούν από τις ROS με αποτέλεσμα να τροποποιηθεί η δομή και η λειτουργία τους. Αποτέλεσμα της οξείδωσής τους είναι η δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων, που συχνά χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού στρες. Η καταστροφή των πρωτεϊνών έχει σημαντικές κυτταρικές επιπτώσεις, όπως απώλεια ενζυμικής λειτουργίας. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεάσωμα και τα λυσοσώματα. Τα καρβονύλια μεγάλου μοριακού βάρους, όμως, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα (Levine & Stadtman, 2001; Levine, 2002).

1.6.3 DNA

Το DNA είναι γενικά ένα σταθερό μόριο ωστόσο οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να το αλλοιώσουν. Οι βλάβες που μπορούν να προκληθούν είναι τροποποιήσεις στις βάσεις, θραύσεις στο DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στην πεντόζη αλλά και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA.

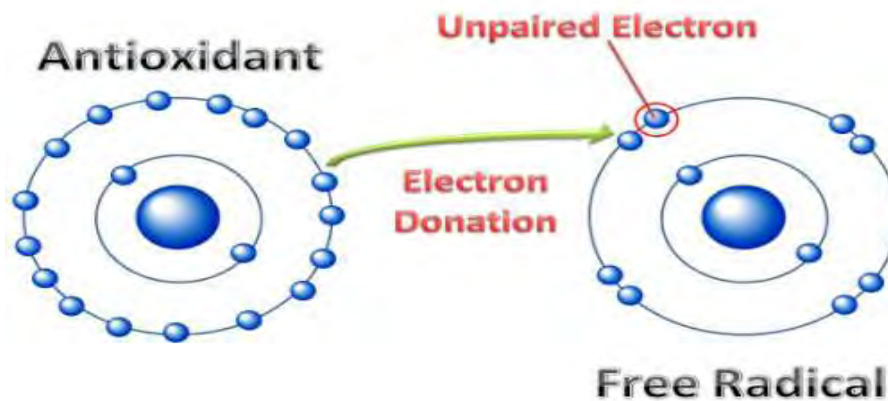
Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση (Radak et al., 1999).

1.6.4 Δράση στην επικοινωνία των κυττάρων

Η σημαντικότερη μάλλον δράση των ελευθέρων ριζών είναι η διαταραχή που επέρχεται στην έκφραση μεταγραφικών παραγόντων. Οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία των κυττάρων. Για να επιτευχθεί ομοιόσταση του κυττάρου είναι απαραίτητο να υπάρχει ισορροπία μεταξύ παραγωγής και κατανάλωσης ελευθέρων ριζών. Ένας μεγάλος αριθμός μορίων όπως κινάσες, φωσφατάσες και άλλοι μεταγραφικοί παράγοντες φαίνεται να επηρεάζονται από την ενδοκυττάρια οξειδωτική κατάσταση (Latimer & Veal, 2016). Η έκθεση κυττάρων σε οξειδωτικές ουσίες που εξαντλούν τα αποθέματα της γλουταθειόνης, επάγει την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου και οδηγεί σε πληθώρα αλλαγών σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο.

1.7 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell & Gutteridge, 1999). Οι οργανισμοί για να προστατευτούν από τις βλαβερές επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών, έχουν αναπτύξει μια σειρά από προστατευτικούς μηχανισμούς. Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί. Χαρακτηριστικά τους είναι ότι μπορούν να εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών, να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά στοιχεία και να βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.



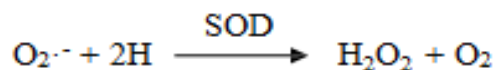
Εικόνα 8: Δράση αντιοξειδωτικών ουσιών σε ελεύθερες ρίζες

1.7.1 Ενζυμικοί μηχανισμοί

Στους ενζυμικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR), αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης (Prx) και η αναγωγάση της θειορεδοξίνης (TrxR).

1.7.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

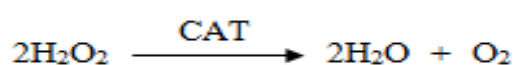
Από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα που καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 , όπως φαίνεται παρακάτω:



Το $O_2^{\cdot-}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD) ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD (Cu-Zn-SOD), ή οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα (Valko et al., 2006).

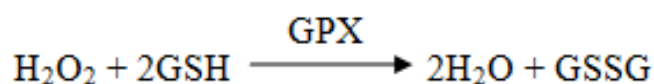
1.7.1.2 Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς που εκτίθενται σε οξυγόνο (όπως βακτήρια, φυτά και ζώα). Είναι ένα πολύ σημαντικό ένζυμο στην προστασία του κυττάρου από οξειδωτικές βλάβες από δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Η καταλάση βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδιοσώματα ενώ εντοπίζεται και στα μιτοχόνδρια των σκελετικών μυών και του ήπατος, στους χλωροπλάστες και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 (Antunes et al., 2002).



1.7.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο. Όπως και η καταλάση, έτσι και η GPX καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η γλουταθειόνη οξειδώνεται (Antunes et al., 2002).

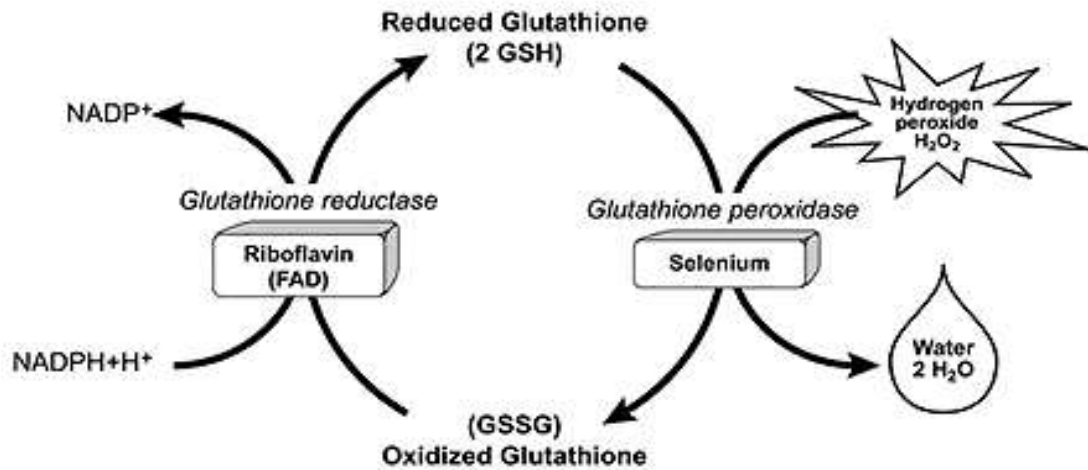


όπου: GSH → ανηγμένη γλουταθειόνη

GSSG → οξειδωμένη γλουταθειόνη

1.7.1.4 Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

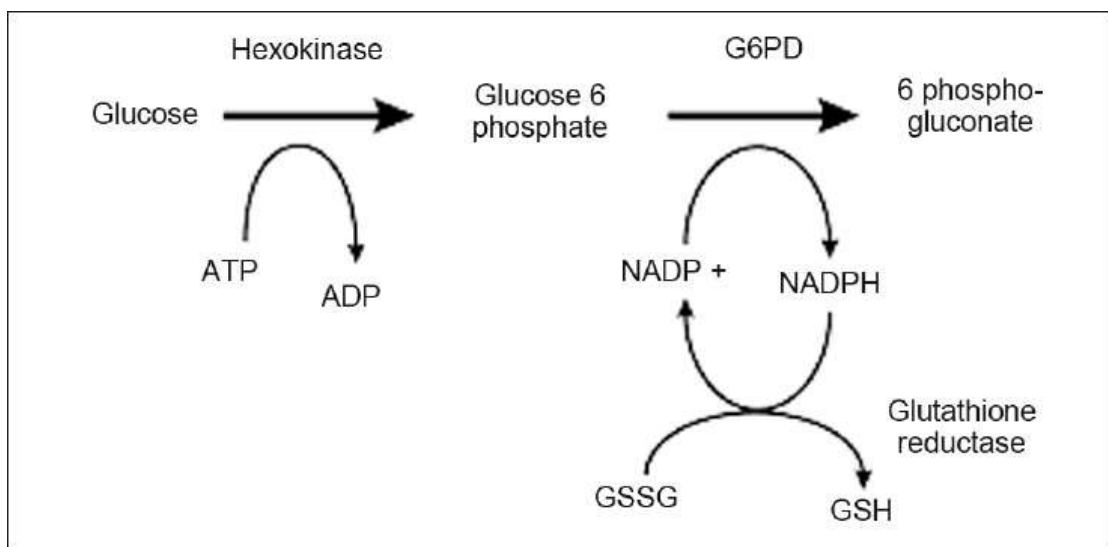
Η αναγωγή της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σα συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH (Antunes et al., 2002).



Εικόνα 9: Σχέση σύνδεσης της αναγωγής της γλουταθειόνης με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

1.7.1.5 Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD)

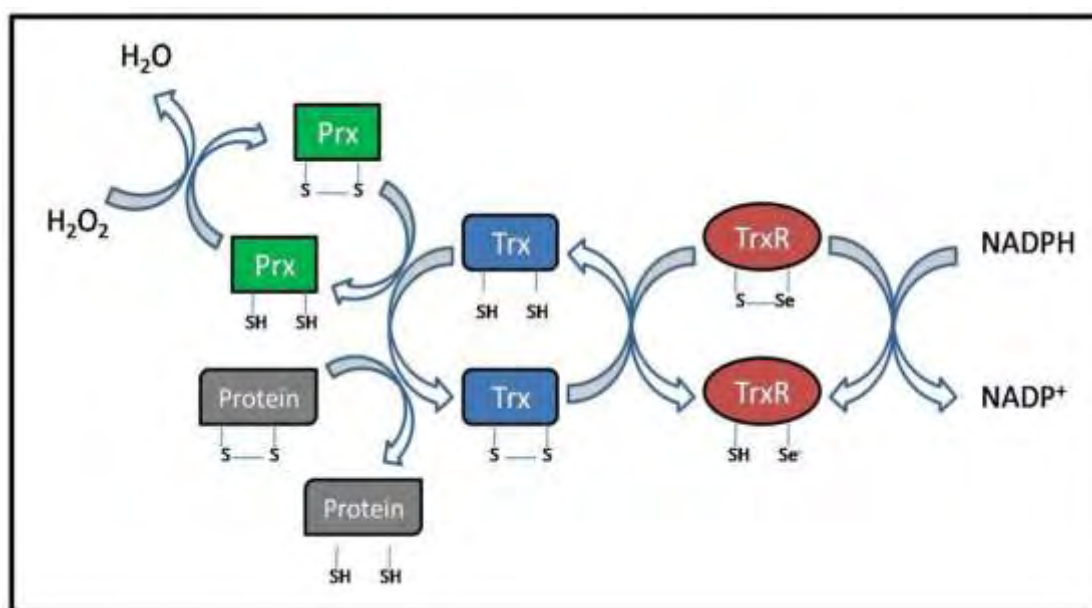
Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης είναι ένα ένζυμο στο μονοπάτι φωσφορικής πεντόζης. Το G6PD μετατρέπει την 6-φωσφορική γλυκόζη σε 6-φωσφογλύκανο-δ-λακτόνη. Η οδός της G6PD/NADPH είναι η μόνη πηγή του ανηγμένης γλουταθειόνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια (ερυθροκύτταρα). Ο ρόλος των ερυθρών αιμοσφαιρίων ως φορείς οξυγόνου τα θέτει σε ουσιαστικό κίνδυνο βλάβης από τις οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες χωρίς την προστατευτική επίδραση της G6PD / NADPH / γλουταθειόνης (Berg et al., 2010).



Εικόνα 10: Σχέση G6PD με την Αναγωγή της γλουταθειόνης

1.7.1.6 Υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης (Prx)

Η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης είναι ικανή να μειώσει τη συγκέντρωση του H_2O_2 προστατεύοντας το κύτταρο από οξειδωτική βλάβη, αλλά και να συμμετάσχει στην κυτταρική σηματοδότηση μέσω της ρύθμισης της συγκέντρωσής του. Η Prx μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από την ανηγμένη θειορεδοξίνη. Η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης οξειδώνεται τότε σχηματίζοντας έναν ενδομοριακό δισουλφιδικό δεσμό (Rhee et al., 2001).



Εικόνα 11: Μηχανισμός δράσης της υπεροξειδάσης της θειορεδοξίνης

1.7.1.7 Αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR)

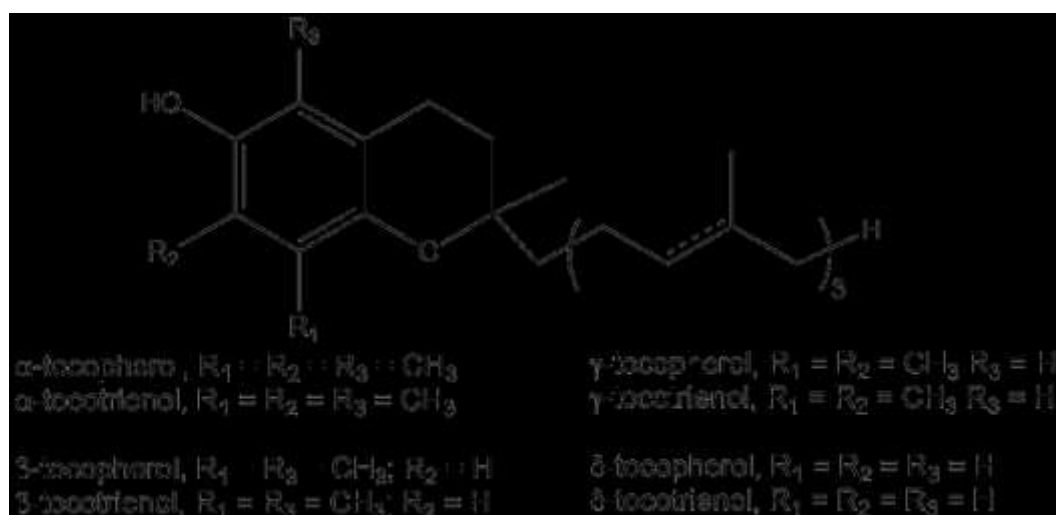
Η αναγωγή της θειορεδοξίνης χρησιμοποιεί σα συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD), έχοντας ανάλογη δομή με αυτή της αναγωγής της γλουταθειόνης (Hirt et al., 2002; Mustacich & Powis, 2000). Το NADPH ανάγει το FAD οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στον δισουλφιδικό δεσμό της θειορεδοξίνης δημιουργώντας μια ροή ηλεκτρονίων από το NADPH μέχρι το Prx. Η θειορεδοξίνη μπορεί να αναγάγει δισουλφιδικούς δεσμούς οξειδωμένων πρωτεϊνών.

1.7.2 Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Στους μη ενζυμικούς μηχανισμούς περιλαμβάνονται μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, η β-καροτίνη, το σελήνιο, η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ και το συνένζυμο Q-10.

1.7.2.1 Βιταμίνη E

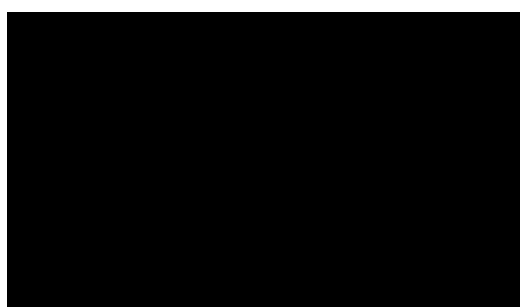
Είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες. Από τις πολλές διαφορετικές μορφές της βιταμίνης E, η γ-τοκοφερόλη είναι η πιο κοινή, ενώ η α-τοκοφερόλη είναι η περισσότερο βιολογικά δραστική και η δεύτερη συνηθέστερη μορφή της βιταμίνης E. Καθώς έχει λιποδιαλυτή φύση ενσωματώνεται σε κυτταρικές μεμβράνες και τις προστατεύει από οξειδωτικές βλάβες. Ως αντιοξειδωτικό, σταματά την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου που σχηματίζονται κατά την λιπιδική υπεροξείδωση δημιουργώντας μια ρίζα τοκοφερόλης, η οποία στη συνέχεια ανάγεται από μια άλλη αντιοξειδωτική ουσία. Επίσης, προστατεύει από την οξείδωση την βιταμίνη A (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Εικόνα 12: Δομή Τοκοφερολών

1.7.2.2 Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

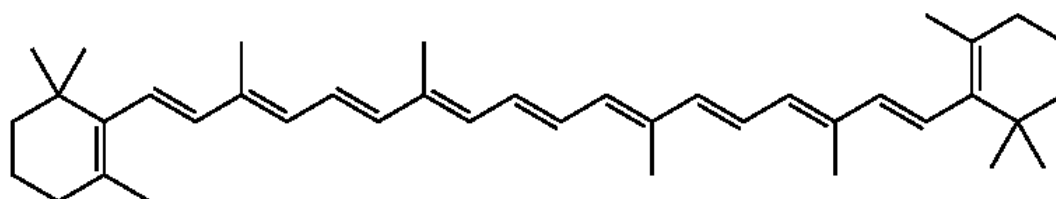
Η βιταμίνη C είναι η πιο γνωστή βιταμίνη και είναι υδατοδιαλυτής φύσης. Ονομάζεται και ασκορβικό οξύ. Ο βιολογικός της ρόλος είναι να δρα ως αναγωγικό μέσο, δωρίζοντας ηλεκτρόνια σε ενζυμικές και μη αντιδράσεις. Αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS. Οι οξειδωμένες μορφές της μπορούν να ανάγονται από την γλουταθειόνη και από μη ενζυμικούς εξαρτώμενους από το NADPH μηχανισμούς. (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Εικόνα 13: Δομή ασκορβικού οξέος

1.7.2.3 Β-καροτίνη

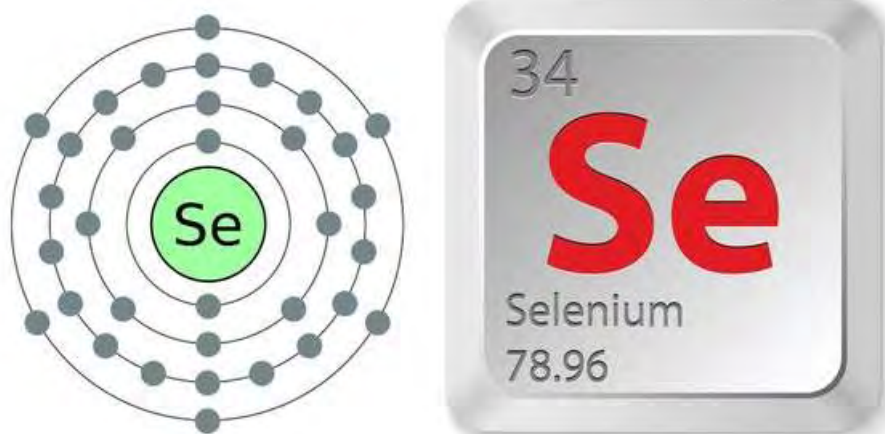
Το β-καροτένιο αποτελεί προβιταμίνη καθώς μπορεί να μετατραπεί στην βιταμίνη A. Το β-καροτένιο είναι από τα πλέον ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία δεσμεύουν το μονήρες οξυγόνο (Pham-Huy et al., 2008). Είναι λιποδιαλυτό μόριο και κατανέμεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Πιστεύεται ότι μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξείδωση των λιπιδίων. (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Εικόνα 14: Δομή β-καροτενίου

1.7.2.7 Σελήνιο (Se)

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία και είναι αναγκαίο για την κυτταρική λειτουργία πολλών οργανισμών. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Το σελήνιο αποτελεί συστατικό των αντιοξειδωτικών ενζύμων: υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και αναγωγάση της θειορεδοξίνης, που εμμέσως μειώνουν τις συγκεντρώσεις ορισμένων οξειδωμένων μορίων στα ζώα και σε κάποια φυτά. Λειτουργεί δηλαδή ως συμπαράγοντας των συγκεκριμένων ενζύμων συμμετέχοντας στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 1999).

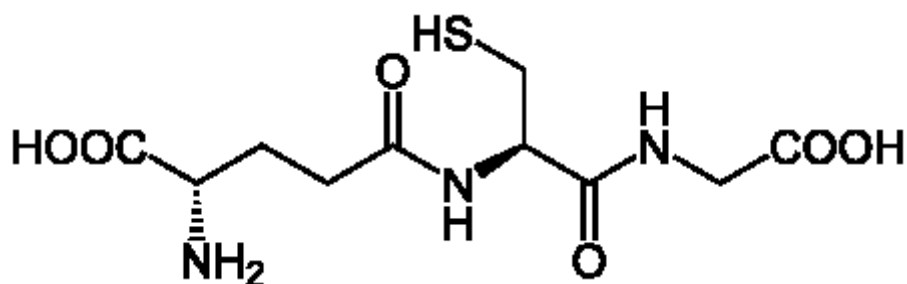


Εικόνα 15: Ηλεκτρονιακή δομή σεληνίου

1.7.2.5 Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό, καθώς προλαμβάνει τις βλάβες σε σημαντικά κυτταρικά συστατικά. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Συντίθεται από την συνθετάση της γ-γλουταμυλο-κυστεΐνης (GCS) και την συνθετάση της γλουταθειόνης (GSS). Είναι υδατοδιαλυτό μόριο και παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη προς την ανηγμένη μορφή και το αντίστροφο. Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς συμμετέχει σε αντιδράσεις που αναφέρθηκαν

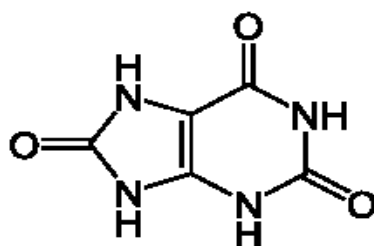
παραπάνω (Halliwell & Gutteridge, 1999; Mendoza-Cozatl et al., 2005). Σε υγιή κύτταρα και ιστούς, περισσότερο από το 90% της συνολικής γλουταθειόνης βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή (GSH) και λιγότερο από το 10% υπάρχει με τη μορφή δισουλφιδίου (GSSH). Μία αυξημένη αναλογία GSSG προς GSH θεωρείται ενδεικτική οξειδωτικού στρες (Halprin & Ohkawara, 1967).



Εικόνα 16: Δομή γλουταθειόνης

1.7.2.4 Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και να συμβάλει στην προστασία από τις ROS. Το ουρικό οξύ μπορεί να λειτουργήσει ως αντιοξειδωτικό κυρίως στο πλάσμα (Sautin & Johnson, 2008).

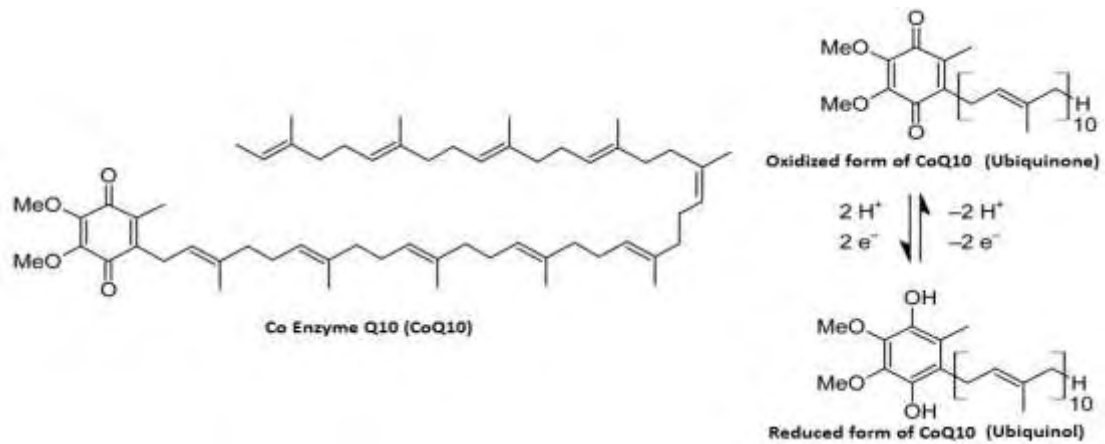


Εικόνα 17: Δομή ουρικού οξέος

1.7.2.6 Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης και συμμετέχει στην αερόβια

κυτταρική αναπνοή κατά την οποία παράγεται ATP. Το 95% της ενέργειας του ανθρώπινου σώματος παράγεται με αυτόν τον τρόπο (Ernster & Dallner, 1995). Βρίσκεται στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα, κυρίως στα μιτοχόνδρια. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Εικόνα 18: Δομή Συνενζύμου Q10

1.8 Άσκηση και οξειδωτικό στρες

Η άσκηση είναι μια διαδικασία που φέρνει τον οργανισμό σε εγρήγορση. Κατά την άσκηση εκκρίνονται κατεχολαμίνες και ενεργοποιείται το συμπαθητικό νευρικό σύστημα. Αυτό έχει ως επακόλουθο την αύξηση της πίεσης του αίματος, την αύξηση της συχνότητας σύσπασης της καρδιάς, την αύξηση πρόσληψης οξυγόνου, την βρογχοδιαστολή, τη μείωση των εκκρίσεων, την γλυκογονόλυση με επακόλουθο την υπεργλυκαιμία, τη λιπόλυση και την εγρήγορση του εγκεφάλου. Η αύξηση της πίεσης του αίματος και η αύξηση της συχνότητας σύσπασης της καρδιάς απαιτούνται για την γρήγορη αιμάτωση των μυών που συμμετέχουν στην άσκηση. Η αύξηση της πρόσληψης οξυγόνου και η βρογχοδιαστολή συμβάλουν στην μεγαλύτερη ανάγκη του οργανισμού για οξυγόνωση κατά τη διάρκεια της άσκησης. Η γλυκογονόλυση και η λιπόλυση εφοδιάζουν τον οργανισμό με ενέργεια μέσω παροχής υποστρωμάτων για την παραγωγή ενέργειας με τη μορφή του ATP. Ωστόσο, οι παραπάνω μεταβολές οδηγούν σε υπερλειτουργία συστημάτων.

Το μεγαλύτερο μέρος του ATP παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια. Για την παραγωγή του ATP, δότες ηλεκτρονίων (NADH, FADH₂) παρέχουν ηλεκτρόνια στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων με την δημιουργία εν τέλει μιας πρωτονιοκίνητης δύναμης που θα περιστρέφει την αντλία ATPάσης για την παραγωγή ATP. Ο τελικός αποδέκτης ηλεκτρονίων είναι το οξυγόνο το οποίο ανάγεται σε H₂O. Κανένα σύστημα δεν λειτουργεί τέλεια με αποτέλεσμα ένα 2 έως 5 % του οξυγόνου να μην ανάγεται σε H₂O αλλά να παράγει σουπεροξειδίου (O₂^{·-}). Κατά τη διάρκεια της άσκησης η απώλεια του συστήματος της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αυξάνεται λόγω αύξησης της έντασης λειτουργίας του.

Ακόμα, κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης λόγω της άμεσης ενέργειας που χρειάζεται ο οργανισμός, το ATP διασπάται σε ADP και αυτό σε AMP, καθώς οι φωσφορικοί δεσμοί που διασπώνται είναι υψηλής ενέργειας. Το AMP στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε ουρικό οξύ με τη δράση της οξειδάσης της ζανθίνης με παράλληλο σχηματισμό O₂^{·-}.

Επιπλέον, κατά τη διάρκεια έκκεντρης άσκησης με επακόλουθη καταστροφή μυϊκών ινών δημιουργείται φλεγμονή κατά την οποία απελευθερώνονται ρίζες σουπεροξειδίου από τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα κύτταρα. Έκκεντρη σύσπαση ονομάζεται η σύσπαση, κατά την οποία ο μυς επιμηκύνεται αντενεργώντας

στην εξωτερική επιβάρυνση, που είναι πέρα της δύναμης του. Οπότε, το έργο που παράγεται χαρακτηρίζεται αρνητικό, λόγω του ότι η μετατόπιση έχει αντίθετη φορά από την δύναμη των μυών που συμμετέχουν στη συστολή (Κλεισούρας, 2011). Θεωρείται πλέον δεδομένο ότι η έκκεντρη άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες. Ωστόσο παρουσιάζονται μεγάλες διαφορές στη έκτασή του ανάμεσα στα άτομα μετά την έκκεντρη άσκηση (Margaritelis et al., 2014).

Όλες οι παραπάνω λειτουργίες έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών, καθώς το $O_2^{\cdot-}$ μπορεί να μετατραπεί σε H_2O_2 μέσω μιας σειράς αντιδράσεων, το οποίο στη συνέχεια μέσω της αντίδρασης Fenton μπορεί να μετατραπεί στην ιδιαίτερα δραστική ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot}), η οποία μπορεί να αντιδρά με διάφορα βιομόρια του οργανισμού οξειδώνοντας τα. Παρ' όλα αυτά το σώμα φαίνεται πως είναι σε θέση να αντέξει μια περιορισμένη αύξηση των ελευθέρων ριζών και έρευνες δείχνουν ότι η αύξηση των ROS είναι απαραίτητη για να συμβεί η προσαρμογή των μυών (Urso & Clarkson, 2003).

Η πρώτη μελέτη που έδειξε αυτή τη σχέση μεταξύ άσκησης και οξειδωτικού στρες πραγματοποιήθηκε το 1982 (Davies et al., 1982). Στη συνέχεια υπήρξαν πολλές μελέτες, που συσχέτισαν την άσκηση με το οξειδωτικό στρες.

Οι πιο πολλές μελέτες έχουν μελετήσει την επίδραση της αερόβιας άσκησης (τρέξιμο, ποδηλασία, κολύμπι), η οποία έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών στους σκελετικούς μυς και την καρδιά (Davies, 1992; Kumar et al., 1992). Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξαν και έρευνες στην αναερόβια άσκηση, τέτοιου είδους ασκήσεις είναι τα άλματα, τα σπριντ και η άρση βαρών (Groussard et al., 2003). Όμως και στην διαλειμματική άσκηση, η οποία αποτελείται από διαστήματα πολύ έντονης προσπάθειας που εναλλάσσονται με διαλείμματα ανάπαυσης ή ενεργητικής ανάπαυσης, δηλαδή πολύ ηπιότερης προσπάθειας, στα οποία το σώμα ξεκουράζεται και ανακτά δυνάμεις για να συνεχίσει, έχει βρεθεί αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (Svensson et al., 2002).

Επιπλέον, έχει βρεθεί αυξημένη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, GPX) στο σκελετικό μυ, την καρδιά και το ήπαρ μετά από χρόνια άσκηση (Jenkins, 1988; Ji, 1999). Η αυξημένη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων λειτουργεί ως ένας μηχανισμός προσαρμογής και προστασίας από τις παραγόμενες κατά την άσκηση ελεύθερες ρίζες.

Ακόμα, βρέθηκε ότι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξάνονται στο πλάσμα και το γαστροκνήμιο μυ μετά από εξαντλητική άσκηση (Gomez-Cabrera et al., 2005;

Veskoukis et al., 2008). Η άσκηση αύξησε και τη λιπιδική υπεροξειδωση στο πλάσμα και το σκελετικό μυ, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες εργασίες (Ajmani et al., 2003; Alessio, 1993).

Σε μελέτες όμως που το πρωτόκολλο δεν περιελάμβανε έντονη άσκηση, αλλά άσκηση όπου η μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου ήταν μικρότερη από το 50% της μέγιστης, δεν εμφανίστηκε οξειδωτικό στρες. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού επαρκεί για την αντιμετώπιση των παραγόμενων ελευθέρων ριζών (Lovlin et al., 1987).

Υπάρχουν όμως και κάποιες μελέτες στη βιβλιογραφία που δε βρίσκουν οξειδωτικό στρες μετά από έντονη αερόβια άσκηση (Vasankari et al., 1997). Αυτό, πιθανόν, οφείλεται στην ένταση και τον τύπο της άσκησης αλλά και στην εξοικείωση του αθλητή πριν από αυτή.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης αθλητών τις επόμενες μέρες έπειτα από έναν απαιτητικό υπερμαραθώνιο βουνού. Μέχρι τώρα δεν έχουν αναφερθεί παρόμοιες μελέτες, όσον αφορά τη διερεύνηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης αθλητών τις επόμενες μέρες από έναν τέτοιο αγώνα. Ακόμα θέλαμε να δούμε πως ένας τόσο απαιτητικός αγώνας που περιλαμβάνει αερόβια και έκκεντρη άσκηση αλλά και ένα μεγάλο μέρος του (40%) βρίσκεται σε υψόμετρο άνω των 2.000 μέτρων επηρεάζει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Η οξειδοαναγωγική κατάσταση εξετάστηκε με τη μέτρηση δεικτών οξειδωτικού στρες στους οποίους περιλαμβάνονται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και η δραστικότητα καταλάσης (CAT). Επιπλέον, ένα νέο διαγνωστικό σύστημα χρησιμοποιήθηκε μετρώντας δύο νέες τιμές, έναν δείκτη στατικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού (sORP) και τη δυνητική ικανότητα οξείδωσης-αναγωγής (cORP).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματική διαδικασία

Στην παρούσα έρευνα συμμετείχαν δώδεκα άντρες αθλητές (ηλικίας: $41,1 \pm 3,2$ έτη, ύψους: $1,78 \pm 0,02$ m, βάρους: $72,9 \pm 2,0$ kg) εθελοντικά. Οι αθλητές παρείχαν γραπτή συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους στην μελέτη. Οι διαδικασίες ήταν, σύμφωνα με τη δήλωση του Ελσίνκι του 1975, όπως αναθεωρήθηκε το 2000 και η έγκριση ελήφθη από την επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιπλέον, οι αθλητές δεν έπαιρναν αντιφλεγμονώδη ή άλλα φάρμακα. Όλοι είχαν προγενέστερες εμπειρίες ορεινού τρεξίματος σε μονοπάτια, καθώς ήταν προαπαιτούμενος ένας αγώνας 80 χιλιομέτρων σε βουνό, τον οποίον θα είχαν τερματίσει μέσα στα τρία τελευταία χρόνια για να μπορέσουν να υποβάλουν τη συμμετοχή τους στον συγκεκριμένο αγώνα.

Οι συμμετέχοντες επισκέφθηκαν το Κέντρο Υγείας του Λιτοχώρου, που βρίσκεται κοντά στο σημείο εκκίνησης του αγώνα, προκειμένου να ολοκληρώσουν ένα ερωτηματολόγιο για την υγεία και τις δραστηριότητές τους, ενώ ελήφθησαν οι ανθρωπομετρικές παράμετροι τους. Η μάζα σώματος μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5kg (Beam Balance 710, Seca, UK) με τα άτομα ελαφρά ντυμένα και ξυπόλητα. Το ύψος μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5 cm (Υψόμετρο 208, Seca).

Μετά την ολοκλήρωση του αγώνα, 8 από τους 12 συμμετέχοντες είχαν καταφέρει να τον τερματίσουν, ενώ 2 από αυτούς εγκατέλειψαν στο 70ο χλμ και τα άλλοι 2 στο 60ο χλμ. Ο μέσος χρόνος τρεξίματος των αθλητών ήταν $19,57 \pm 1,09$ ώρες.

2.2 Συλλογή αίματος και επεξεργασία

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές χρονικές στιγμές, πριν τον αγώνα και 24, 48 και 72 ώρες μετά τον αγώνα. Τα δείγματα (10 ml) ελήφθησαν από φλέβα του αντιβραχίου με τα άτομα να βρίσκονται σε καθιστή θέση. Το αίμα συλλέχθηκε σε σωλήνες αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) και

σωλήνες ηπαρίνης. Ο διαχωρισμός αυτός έγινε για την μέτρηση διαφορετικών δεικτών. Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν αμέσως στα 1370 g (όπου g η σχετική φυγοκεντρική δύναμη (RCF) ή G-Force) για 10 λεπτά στους 4 °C για το διαχωρισμό του πλάσματος, το οποίο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε σε μικρά σωληνάκια. Συγκεκριμένα το πλάσμα από τους σωλήνες με EDTA χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB), των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Το πλάσμα από τους σωλήνες ηπαρίνης χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των καινοτόμων δεικτών οξειδοαναγωγής cORP και sORP. Χρησιμοποιήθηκαν σωλήνες ηπαρίνης καθώς το EDTA θα επηρέαζε τις τιμές των ORP. Στη συνέχεια, τα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα στο κάτω μέρος των σωλήνων λύθηκαν με τη χρήση απεσταγμένου νερού 1:1 (v/v), έντονης ανάδευσης και φυγοκέντρισης στα 4020 g για 15 λεπτά στους 4 °C. Το προϊόν της λύσης των ερυθροκυττάρων χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης και της δραστηριότητας του ενζύμου καταλάσης. Το πλάσμα και το προϊόν λύσης των ερυθροκυττάρων φυλάχθηκε στους -80 °C πριν τις βιοχημικές αναλύσεις.

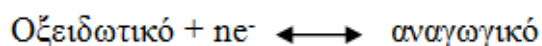
2.3. Αξιολόγηση του sORP και cORP με τη χρήση του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS

Οι τιμές sORP και cORP προσδιορίστηκαν με τη χρήση του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS (Luoxis Diagnostics, Inc., Englewood, Κολοράντο, Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής) (Spanidis et al., 2015; Stagos et al., 2015b; Stagos et al., 2015a). Το RedoxSYS είναι ένα διαγνωστικό σύστημα της εταιρίας Luoxis. Το διαγνωστικό αυτό σύστημα μετρά το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (ORP) το οποίο είναι ένα ολοκληρωμένο μέτρο της ισορροπίας μεταξύ των συνολικών οξειδωτικών ουσιών και των συνολικών αναγωγικών. Το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS επιτρέπει μια ισχυρή και γρήγορη εκτίμηση του οξειδωτικού στρες μετρώντας, μέσω μιας σταγόνας αίματος, ειδικότερα 20 μl πλάσματος, μέσα σε τέσσερα περίπου λεπτά, δύο διαφορετικά στοιχεία για τον προσδιορισμό του ORP. Το διαγνωστικό αυτό σύστημα μετρά δύο διαφορετικά δυναμικά, το sORP και το cORP. Ο δείκτης στατικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού (sORP) αντιπροσωπεύει την ολοκληρωμένη ισορροπία των οξειδωτικών και αναγωγικών σε ένα δείγμα και μετριέται σε millivolt (mV).

Επίσης, ο δείκτης δυναμικής ικανότητας οξείδωσης-αναγωγής (cORP) αντιπροσωπεύει το αντιοξειδωτικό διαθέσιμο απόθεμα του οργανισμού και εκφράζεται σε microcoulombs (μC). Χαμηλές τιμές sORP δείχνουν ότι το βιολογικό δείγμα είναι στο εύρος των φυσιολογικών ορίων της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, ενώ τιμές πάνω από το κανονικό δείχνουν οξειδοαναγωγική ανισορροπία με αυξημένη ποσότητα οξειδωτικών έναντι αναγωγικών, που υποδεικνύουν οξειδωτικό στρες. Οι υψηλές τιμές cORP δείχνουν ότι το βιολογικό δείγμα έχει αντιοξειδωτικά αποθέματα εντός των φυσιολογικών ορίων, ενώ χαμηλές τιμές δείχνουν μειωμένα αποθέματα αντιοξειδωτικών.

Τρόπος λειτουργίας του RedoxSYS

Όπως είπαμε το διαγνωστικό αυτό σύστημα μετρά δύο διαφορετικά δυναμικά, το sORP και το cORP. Η μέτρηση βασίζεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων με μια οξειδοαναγωγική αντίδραση. Ένα σύστημα οξείδωσης-αναγωγής ή αντίδραση οξειδοαναγωγής, περιλαμβάνει τη μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα αναγωγικό σε ένα οξειδωτικό σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση.



Σε ισορροπία, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (E), ή το δυναμικό οξείδωσης-αναγωγής (ORP), υπολογίζεται σύμφωνα με την εξίσωση Nernst:

$$E \text{ (ORP)} = E_0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{\text{αναγωγικά}}{\text{οξειδωτικά}}$$

όπου το R (σταθερά αερίων), T (θερμοκρασία σε βαθμούς Kelvin), και F (Faraday σταθερά) είναι σταθερές. E₀ είναι το τυπικό δυναμικό ενός οξειδοαναγωγικού συστήματος μετρημένο σε σχέση με ένα ηλεκτρόδιο υδρογόνου, η οποία αποδίδεται αυθαίρετα μία E₀ ίση με 0 volts, και n είναι ο αριθμός των ηλεκτρονίων που μεταβιβάζονται.

2.4 Αξιολόγηση των δεικτών: 1.TAC, 2.TBARS, 3.CARB, 4.CAT, 5.GSH

Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, ένας από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσης των λιπιδίων είναι οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ ενώ για την οξείδωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστηριότητα της καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος του αίματος.

Εκτός από το πλάσμα και το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα οι παραπάνω δείκτες μπορούν να προσδιοριστούν σε αιώρημα κυττάρων που έχουν διαρρηχθεί με υπερήχους. Να σημειωθεί ακόμα, ότι σε κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις σε κάθε δείκτη, κάτι που προσδίδει μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματα.

2.4.1. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του πλάσματος

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της TAC βασίζεται στο πειραματικό πρωτόκολλο των Janaszewska & Bartosz, (2002). Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό του πλάσματος έχει αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

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

αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως σύνολο.

Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο που έχει τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC στο πλάσμα (55-60%) προκαλώντας μεγάλη αύξηση της όταν η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Το ουρικό οξύ βρίσκεται σε πολύ πιο υψηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα σε σχέση με άλλα μόρια με εξαίρεση τις θειόλες. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι το δεύτερο πιο ισχυρό μόριο στον καθορισμό της τιμής της TAC και ακολουθούν κατά σειρά οι βιταμίνες E και A. Οι βιταμίνες C και E μάλιστα είναι πιθανό να αποτελούν το 25 % της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος.

Η TAC του ορού στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδραζυλο ρίζα). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH[•]) ανάγεται προς σχηματισμό της αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδραζίνης). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες σε erpendorf σωλήνες χωρητικότητας 1,5 ml:

	Blank	Δείγμα
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	480 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL
Πλάσμα	—	20 μL

Ανακινούμε τα Erpendorfs μερικές φορές και τα επωάζουμε στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης η αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη.

Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900 μL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520

nm, αφού προηγουμένως έχουμε μηδενίσει με αέρα. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ, % Abs μείωση = $(\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} \times 100$

ii) $\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL πλάσματος} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \times 50 \times 50] / 1000$

α) Διαιρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/L}$ της κυψελίδας.

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η αραιώση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 20 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50).

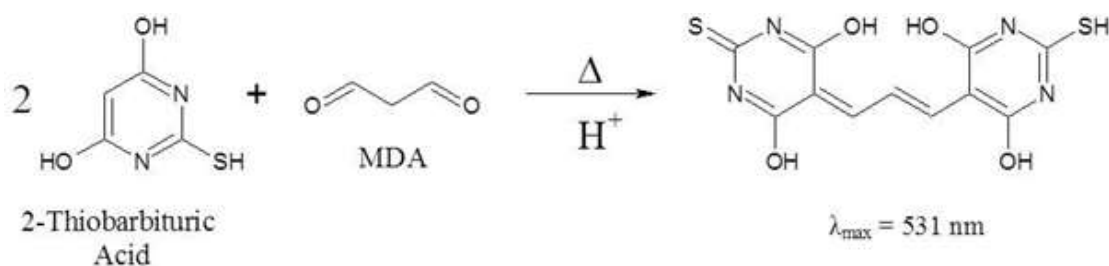
δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

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

2.4.2 Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στο πλάσμα

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός των TBARS βασίζεται στο πειραματικό πρωτόκολλο των Keles et al., (2001). Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρων ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μαλονδιαλδεΐδη (MDA). Η μαλονδιαλδεΐδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Έτσι, τα TBARS εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μαλονδιαλδεΐδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) με αναλογία μαλονδιαλδεΐδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων.



Εικόνα 19: Αντίδραση της μαλονδιαλδεΐδης με το θειοβαρβιτουρικό οξύ

Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95 °C.

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μ L πλάσματος (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό).
2. Προσθέτουμε 500 μ L TCA 35% και 500 μ L Tris-HCl και αναδεύουμε.
3. Επιάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

¹ Το TCA προστίθεται στον ορό ώστε να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες του (αλβουμίνη, ανοσοσφαιρίνες κτλ).

4. Προσθέτουμε 1 mL Na₂SO₄ – TBA και επωάζουμε στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο.
5. Μεταφέρουμε τους Falcon στον πάγο και τους αφήνουμε να κρυώσουν για 5 min.
6. Προσθέτουμε 1 mL TCA 70% και αναδεύουμε.
7. Μεταφέρουμε 1 mL σε Eppendorfs και φυγοκεντρούμε στα 11200 g (10000 rpm) στους 25 °C για 3 min.
8. Μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0.156 × 31, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) (3100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L το μmol/L.

2.4.3 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στο πλάσμα

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός των CARB βασίζεται στο πειραματικό πρωτόκολλο των Patsoukis et al., (2004). Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε οξειδωτικές βλάβες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας γενικός δείκτης της οξείδωσης των πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεϋδες και κετόνες) παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Είναι αξιόπιστος δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών διότι τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

^I Το Na₂SO₄ χρησιμοποιείται σαν αφυδατικός παράγοντας σε οργανικά διαλύματα.

^{II} Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

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

Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου).

Πειραματικό πρωτόκολλο

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

¹ Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0.5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται 0.5 mL HCL 2.5 N.

5. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
6. Προσθέτουμε 1 mL από το 10% TCA, αναδεύουμε (διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
7. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
8. Προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει.
9. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7 και 8 δύο ακόμα φορές.
10. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
11. Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους.
12. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4 °C.
13. Μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 μL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000/50$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$. Το $1000/50$ είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000 μL στην κυψελίδα / 50 μL δείγματος). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανά πρωτεΐνη πλάσματος μπορεί να γίνει μέσω της εξίσωσης:

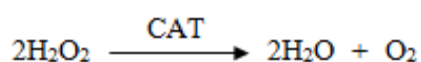
Συγκ. πρωτ. καρβ. (nmol/mg) = συγκ. πρωτ. καρβ. nmol/mL / συγκ. πρωτ mg/mL

Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70 mg/mL

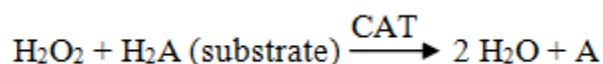
2.4.4 Καταλάση στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT βασίζεται στο πειραματικό πρωτόκολλο του Aebi, (1984). Η καταλάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και οξυγόνο. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



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



Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Δείγμα
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2991 μ L
Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10	4 μ L

1. Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση.

2. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε κυψελίδα χαλαζία για μέτρηση στο υπεριώδες (UV).
3. Προσθέτουμε 5 μL 30% H_2O_2 στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 125 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) = $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample per min}} / 40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2) / \text{Conc. Hb (mg/mL)}$.

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε $\mu\text{mol/mL}$. Το 750 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μL) ($3000 / 4 = 750$), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραίωση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

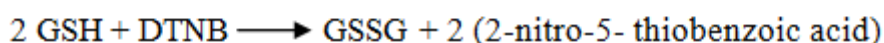
Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση των TBARS που υπολογίστηκε προηγουμένως ($\mu\text{mol/L}$). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση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

$\Delta \text{ Abs (min)}$ = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. $U = \mu\text{mol/min}$. Το $\Delta \text{ Abs}_{\text{blank}}$ είναι πάντα μηδέν, για αυτό δεν χρειάζεται να μετρήσουμε το τυφλό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι 16 mM.

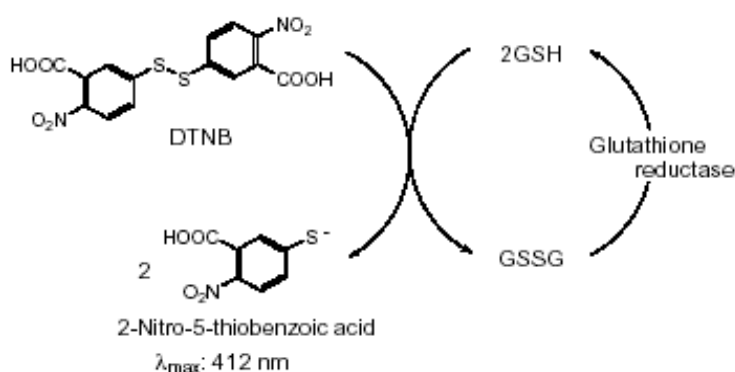
2.4.5 Ανηγγμένη Γλουταθειόνη (GSH) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της GSH βασίζεται στο πειραματικό πρωτόκολλο των Reddy et al., (2004). Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειοδνο νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται σε αιμόλυμα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm.



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



Εικόνα 20: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης

Καθαρισμός αιμόλυματος για την προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης

1. Προσθέτουμε 500 μL αιμόλυματος σε 500 μL 5% TCA σε erpendorf. Ανακινούμε στο vortex.
2. Φυγοκεντρούμε στα 28620 g (16000 rpm) για 5 min στους 5 °C.
3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε erpendorf και προσθέτουμε 5% TCA με την εξής αναλογία: 300 μL αιμόλυματος / 90 μL 5% TCA ή 260 μL αιμόλυματος / 60 μL 5% TCA. Ανακινούμε στο vortex.

4. Φυγοκεντρούμε στα 28620 g (16000 rpm) για 5 min στους 5 °C.
5. Μεταφέρουμε 100 μL του καθαρού υπερκειμένου σε erpendorf για τον προσδιορισμό της GSH. Διατήρηση στους -20 °C.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε Eppendorfs:

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL	—
Αιμόλυμα	—	20 μL

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

Υπολογισμοί

Δραστηκότητα της GSH (mmol/L) = $(Ab_{\text{δείγματος}} - \Delta Ab_{\text{τυφλού}} / 13.6) \times 262.6$, όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμόλυματος (20 μL) ($1010 / 20 = 50.5$), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραιώση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2×1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μL αιμολ. / 500 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραιώση ($390 \mu\text{L} / 300 \mu\text{L}$ ή $260 \mu\text{L} / 200 \mu\text{L}$) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

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

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

Συγκέντρωση GSH ανά g αιμοσφαιρίνης, GSH (mmol/ g Hb).

2.5 Στατιστική ανάλυση

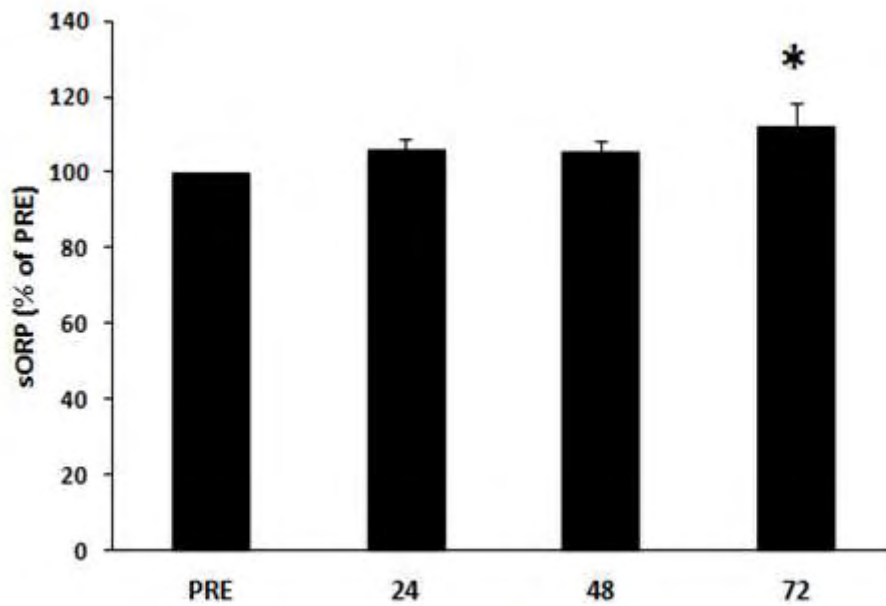
Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της one-way ANOVA ακολουθούμενα από το Dunnett's test για πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0,05$. Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

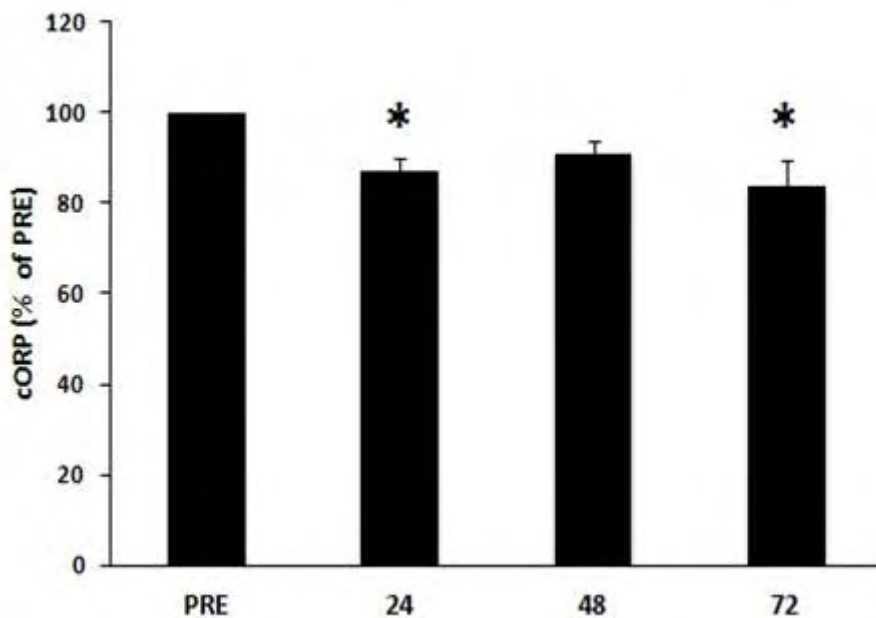
Από τις δύο παραμέτρους που μετρήθηκαν από το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS, ο δείκτης sORP που αντιπροσωπεύει την παρούσα οξειδοαναγωγική κατάσταση, ήταν σημαντικά αυξημένος ($P < 0,05$) κατά 14,29% στις 72 ώρες σε σχέση με τα δείγματα πριν τον αγώνα (Σχήμα 1). Αυτή η αύξηση υποδεικνύει ένα αυξημένο οξειδωτικό δυναμικό την παρούσα χρονική στιγμή. Όσον αφορά τον δείκτη cORP που αντιπροσωπεύει το αντιοξειδωτικό απόθεμα, ήταν σημαντικά μειωμένος ($P < 0,05$) στις 24 ώρες και στις 72 ώρες κατά 22,26% και 23,29% αντίστοιχα σε σχέση με τα δείγματα πριν τον αγώνα (Σχήμα 2). Αυτή η μείωση υποδεικνύει μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών σε αυτές τις χρονικές στιγμές.

Όσον αφορά τους συμβατικούς δείκτες οξειδωτικού στρες, τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα ήταν σημαντικά μειωμένα ($P < 0,05$) παράλληλα στις 24, στις 48 και στις 72 ώρες κατά 26,78%, 29,04% και 23,19% αντίστοιχα, σε σχέση με πριν τον αγώνα (Σχήμα 3).

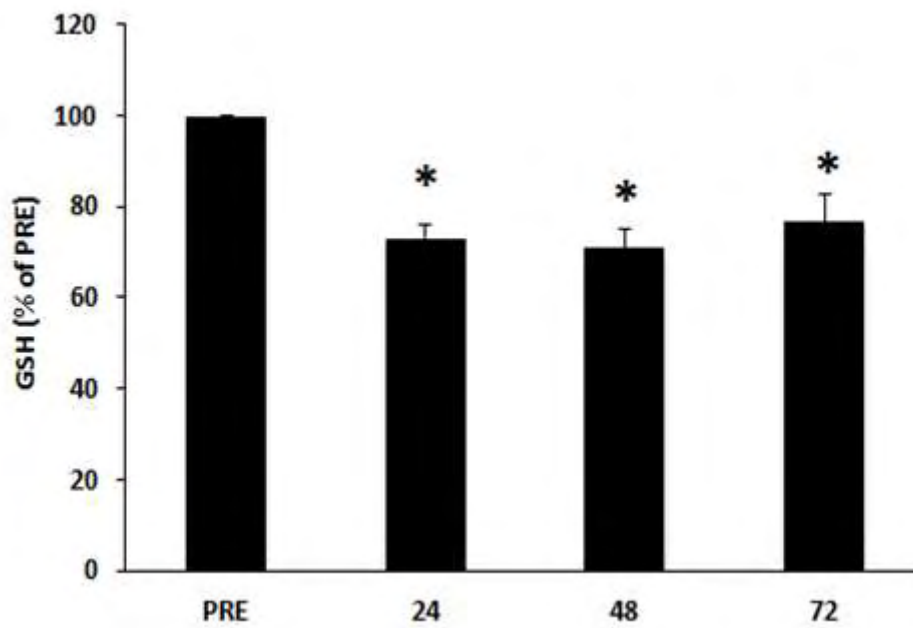
Αντίθετα, κανένας άλλος δείκτης (CAT, TBARS, CARB, TAC) δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$) σε καμία χρονική στιγμή (Σχήματα 4, 5, 6, 7). Αυτή η έλλειψη στατιστικά σημαντικών διακυμάνσεων των δεικτών του οξειδωτικού στρες μετά την άσκηση μπορεί να εξηγηθεί από την μεγάλη ποικιλομορφία που παρουσιάζουν ανά άτομο.



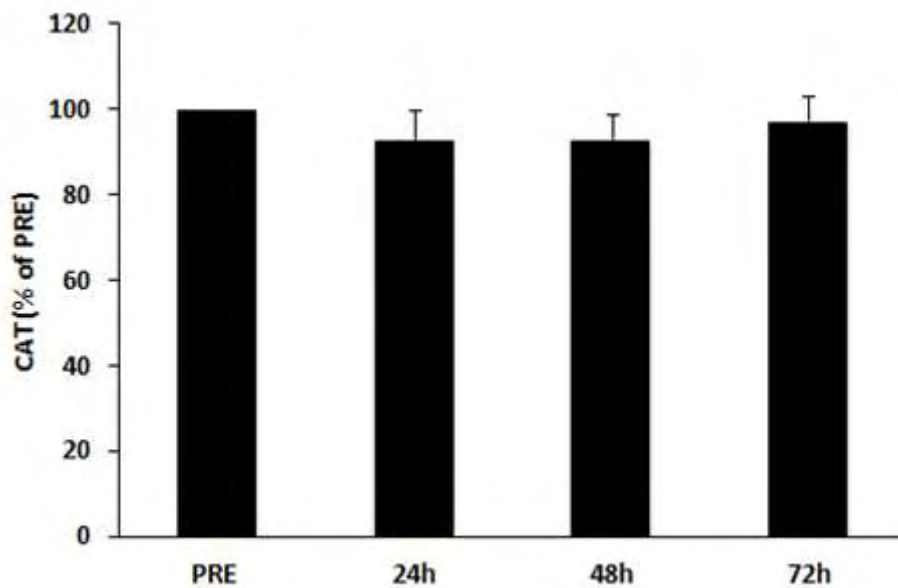
Σχήμα 1: Ποσοστιαία επίπεδα (%) του στατικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού (sORP) στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου). *Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).



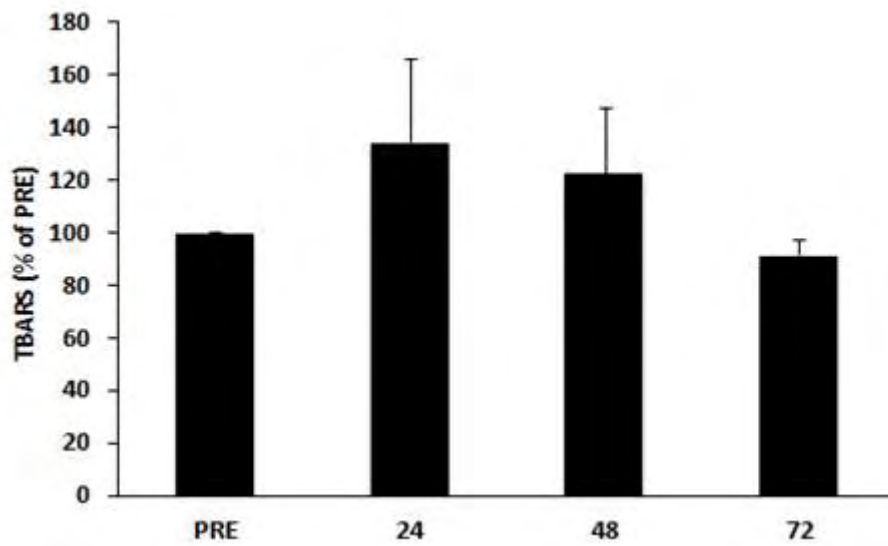
Σχήμα 2: Ποσοστιαία επίπεδα (%) της δονητικής ικανότητας οξείδωσης-αναγωγής (cORP) στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου). *Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).



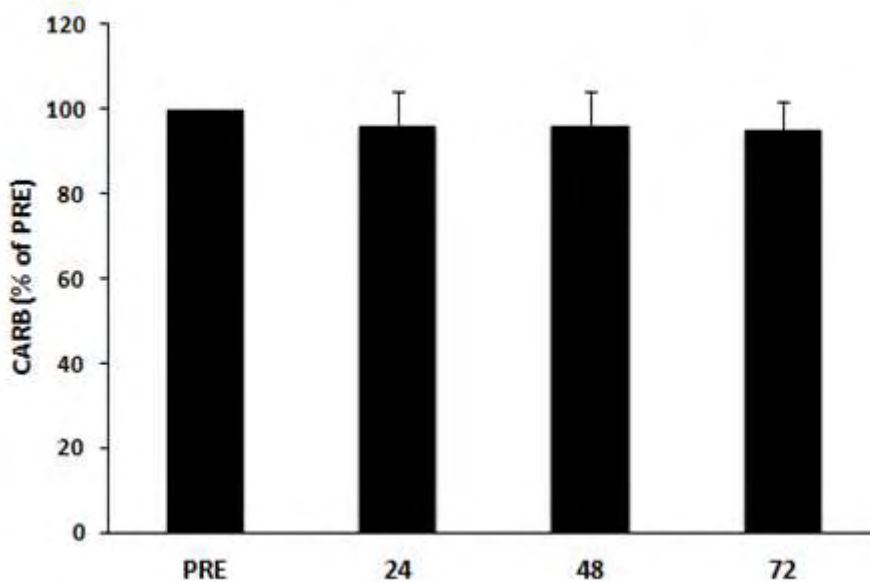
Σχήμα 3: Ποσοστιαία επίπεδα (%) της GSH στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου). *Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).



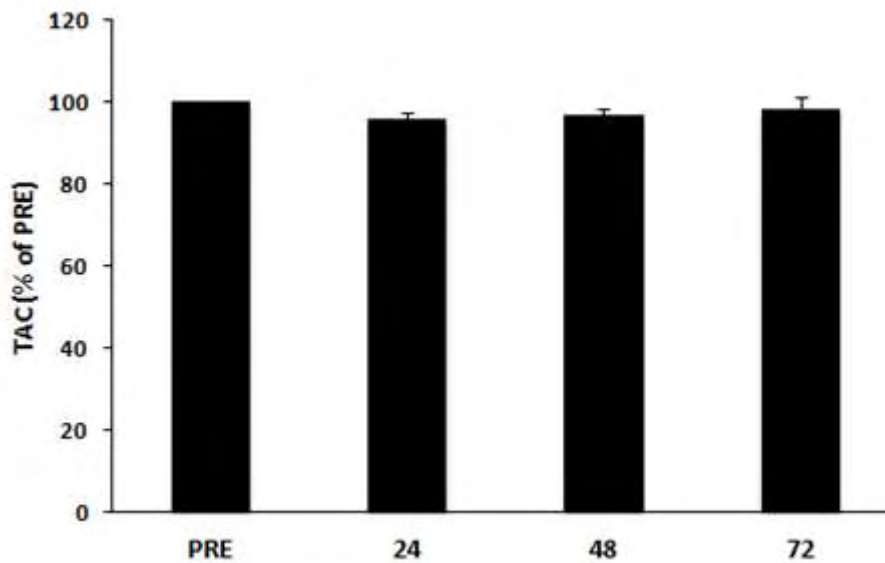
Σχήμα 4: Ποσοστιαία επίπεδα (%) της δραστηριότητας της CAT στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).



Σχήμα 5: Ποσοστιαία επίπεδα (%) των TBARS στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).



Σχήμα 6: Ποσοστιαία επίπεδα (%) των CARB στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).



Σχήμα 7: Ποσοστιαία επίπεδα (%) της TAC στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).

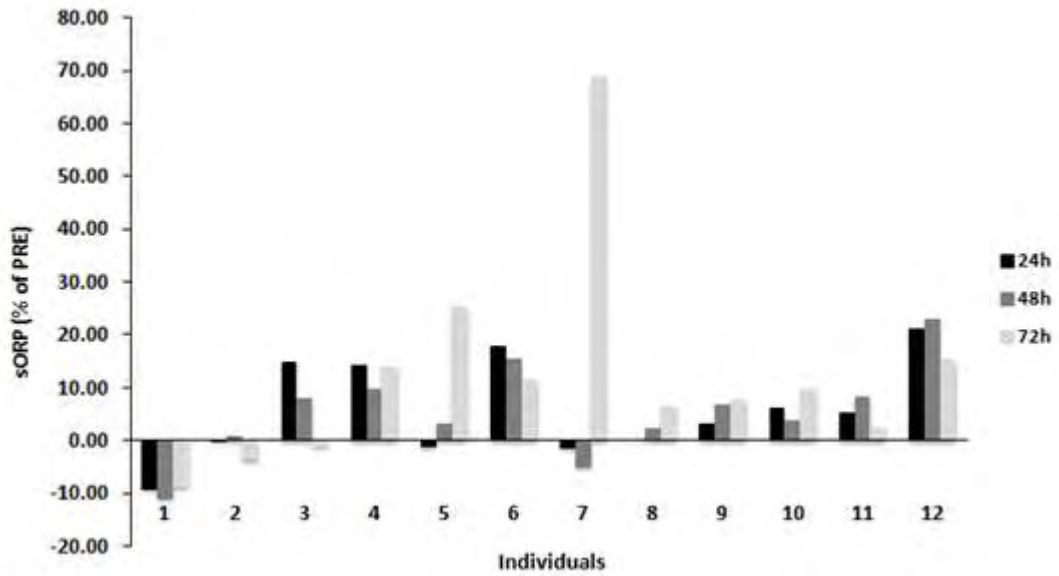
Στη συνέχεια, καθώς έχουν αναφερθεί μελέτες που δείχνουν την πιθανή ετερογένεια στην ανταπόκριση μεταξύ διαφορετικών ατόμων ιδιαίτερα σε έκκεντρη άσκηση (Margaritelis et al., 2014; Margaritelis et al., 2015; Stagos et al., 2015a), διότι οι δρομείς μαραθωνίου βουνού αντιμετωπίζουν μεγάλη επιβάρυνση του τετρακέφαλου μυός ιδιαίτερα σε κατηφορικές διαδρομές λόγω έκκεντρης κίνησης, μας δόθηκε το έναυσμα για μια περαιτέρω ανάλυση. Έτσι, εξετάσαμε τις αλλαγές που συμβαίνουν στους δείκτες οξειδωτικού στρες σε όλα τα χρονικά σημεία για κάθε άτομο (Σχήματα 3-4). Παρακάτω παρατίθεται πίνακας με περιγραφή της επίδοσης κάθε αθλητή. Στους αθλητές που δεν τερμάτισαν αναφέρεται το χιλιόμετρο στο οποίο εγκατέλειψαν τον αγώνα.

Πίνακας 1: Περιγραφή της επίδοσης κάθε αθλητή

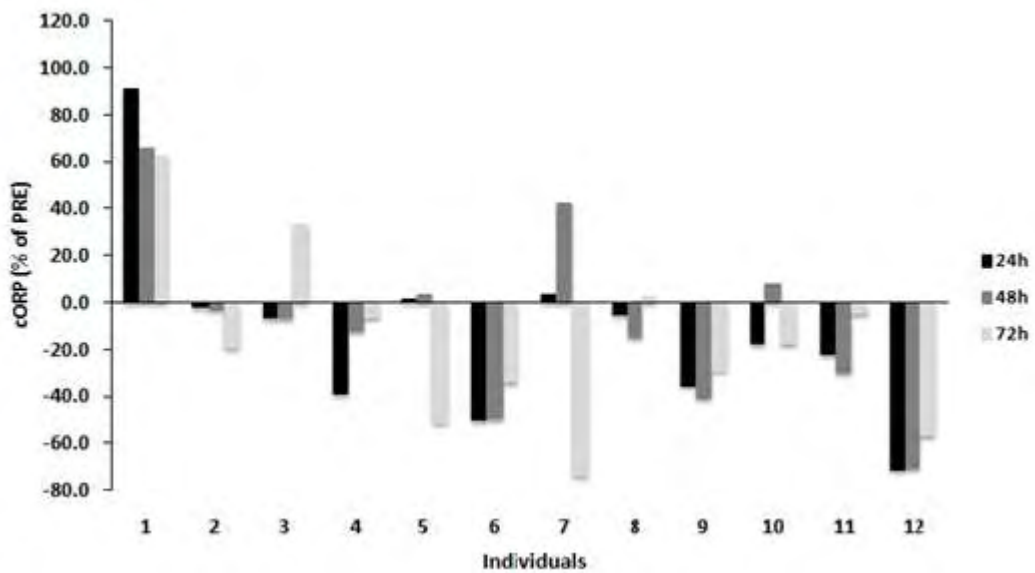
Αθλητής	Αποτέλεσμα
1	Τερμάτισε
2	Τερμάτισε
3	Τερμάτισε
4	Τερμάτισε
5	Τερμάτισε
6	Τερμάτισε
7	Δεν τερμάτισε (σταμάτησε στο 70° χιλ.)
8	Δεν τερμάτισε (σταμάτησε στο 60° χιλ.)
9	Τερμάτισε
10	Δεν τερμάτισε (σταμάτησε στο 70° χιλ.)
11	Τερμάτισε
12	Δεν τερμάτισε (σταμάτησε στο 60° χιλ.)

Αποδείχθηκε ότι σε όλους τους δρομείς, εκτός από έναν, οι τιμές sORP αυξήθηκαν σε όλα τα χρονικά σημεία μετά τον αγώνα (Σχήμα 8). Ομοίως, στις τιμές cORP (Σχήμα 9) όλοι οι δρομείς παρουσίασαν μείωση σε όλα τα χρονικά σημεία μετά τον αγώνα, εκτός από έναν που είχε υψηλότερες τιμές cORP μετά τον αγώνα σε σχέση με πριν. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ίδιο άτομο έδειξε τη διαφορετική συμπεριφορά στα επίπεδα και των δύο δεικτών sORP και cORP (δείγμα 1).

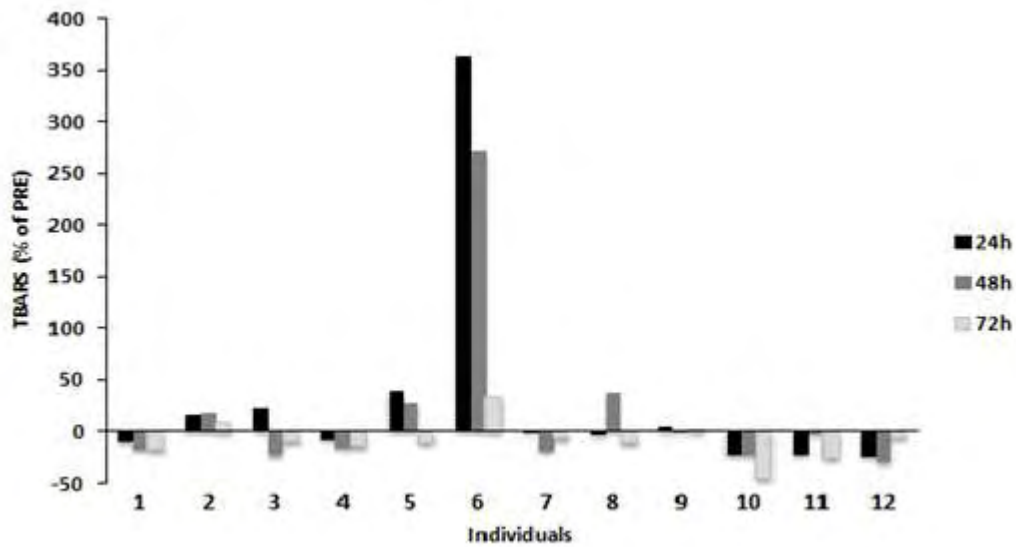
Όσον αφορά τους δείκτες οξειδωτικού στρες που υπολογίζονται φασματοφωτομετρικά στο πλάσμα (TBARS, CARB, TAC) (Σχήματα 10, 11, 12) παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δρομέων υπερ-μαραθωνίου, γεγονός που επίσης εμφανίζεται στη μέτρηση της δραστηριότητας της καταλάσης (CAT) που υπολογίζεται στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (Σχήμα 13). Αντιθέτως, η συγκέντρωση γλουταθειόνης (GSH) μειώθηκε σε όλους τους δρομείς σε όλα τα χρονικά σημεία μετά τον αγώνα σε σύγκριση με πριν (Σχήμα 14).



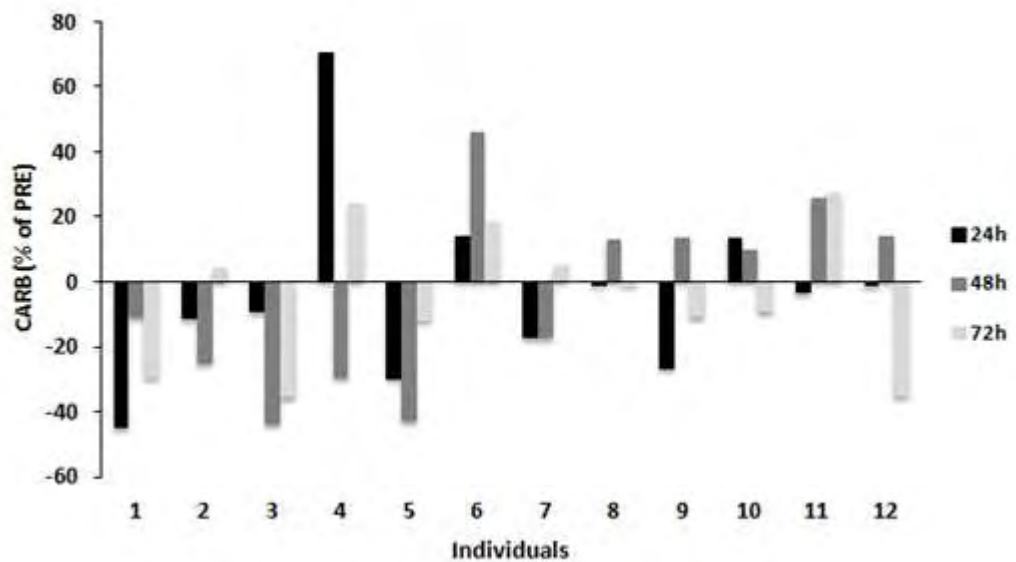
Σχήμα 8: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του sORP ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.



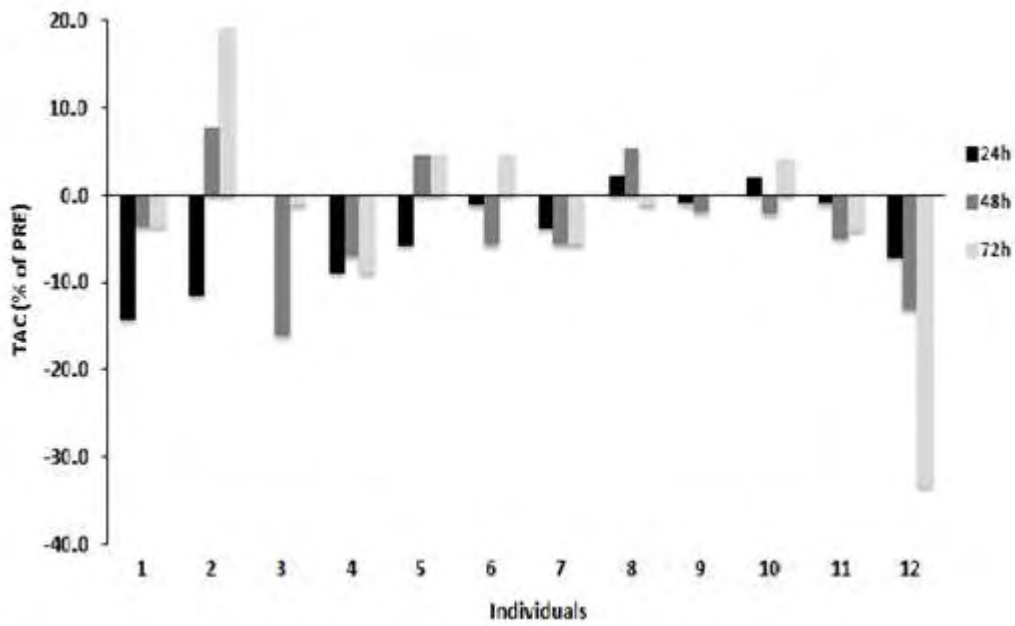
Σχήμα 9: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του cORP ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.



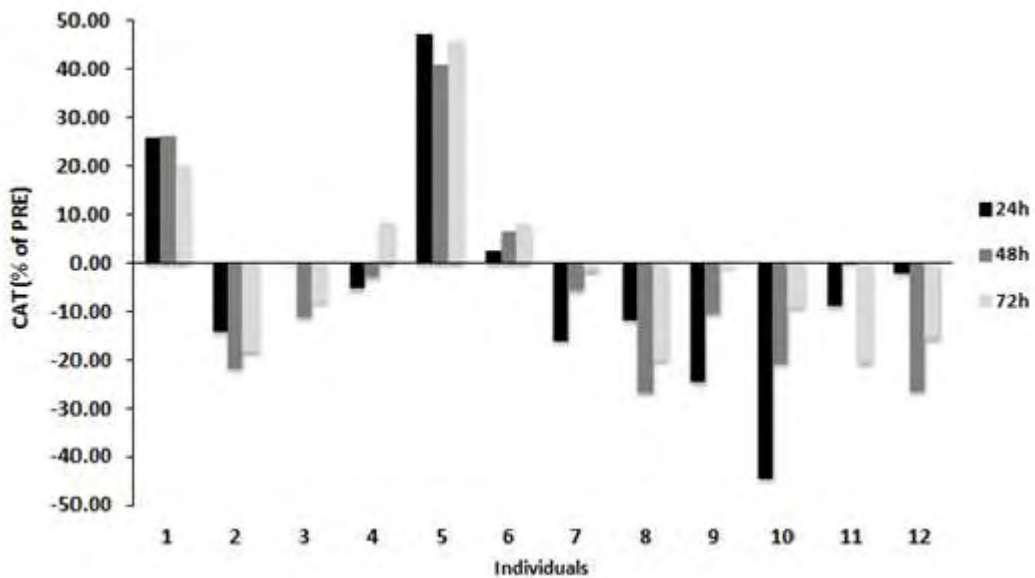
Σχήμα 10: Ποσοστιαία μεταβολή (%) των TBARS ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.



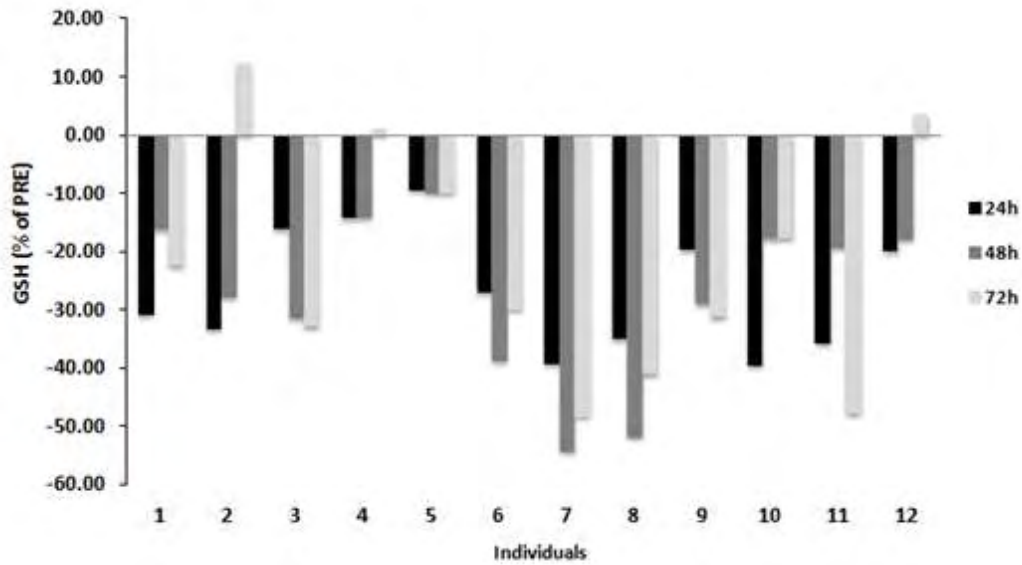
Σχήμα 11: Ποσοστιαία μεταβολή (%) των CARB ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.



Σχήμα 12: Ποσοστιαία μεταβολή (%) της TAC ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.



Σχήμα 13: Ποσοστιαία μεταβολή (%) της δραστηριότητας της CAT ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.



Σχήμα 14: Ποσοστιαία μεταβολή (%) της GSH ανά άτομο στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με πριν τον αγώνα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο διαχωρισμός των αθλητών και η ανάλυση μεταξύ τερματισθέντων και μη δεν παρουσίασε καμία σημαντική μεταβολή σε όλους τους δείκτες για αυτό και εξετάστηκαν σαν μια ομάδα (8 τερματίσαντες, 4 μη τερματίσαντες).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια οι μαραθώνιοι αγώνες και κυρίως οι μαραθώνιοι βουνού έχουν κερδίσει έδαφος χάρη στην απαιτητική τους φύση που τους καθιστά πρόκληση για τον αθλητή. Αξίζει να αναφερθεί ότι μόλις τη δεκαετία του 1970 έγινε ο πρώτος αγώνας υπερ-αντοχής, ενώ σήμερα περίπου 1000 αγώνες υπερ-αντοχής πραγματοποιούνται κάθε χρόνο παγκοσμίως. Η συμμετοχή σε τέτοιας φύσης αγώνες προϋποθέτει την ύπαρξη πολύ καλής φυσικής κατάστασης του νου και του σώματος αλλά και μεγάλης εμπειρίας. Ο λόγος είναι ότι οι αθλητές καλούνται να ξεπεράσουν τον εαυτό τους σωματικά καθώς τέτοιου είδους αγώνες προκαλούν υπέρμετρη μυϊκή καταστροφή και καταπόνηση αλλά και αναπνευστική δυσχέρεια κατά τη διάρκεια του αγώνα, ενώ σημαντική κόπωση και εξουθένωση μετά τον αγώνα. Η ψυχική υγεία κρίνεται αναγκαία καθώς η εξουθένωση θα φέρει κάθε αθλητή αντιμέτωπο με τον εαυτό του· εκεί θα κριθεί ποιός μπορεί να συνεχίσει τον αγώνα αλλά και πότε πρέπει κάποιος να τον σταματήσει.

Το ενδιαφέρον των επιστημόνων μεγαλώνει ολοένα και περισσότερο στην ανάλυση παραμέτρων σε αθλητές που συμμετείχαν σε τέτοιου είδους αγώνες, καθώς η παρατήρηση της απάντησης των οργανισμών τους σε αυτές τις στρεσογόνες συνθήκες παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον (Degache et al., 2015; Mrakic-Sposta et al., 2015; Stagos et al., 2015b; Wilhelm et al., 2014). Ακόμα, μεγαλύτερο ενδιαφέρον έχει όταν τέτοιου είδους μελέτες πραγματοποιούνται σε καλά προπονημένους αθλητές. Για αυτό το λόγο εστίασαμε τη μελέτη στην ανάλυση των εναλλαγών της οξειδοαναγωγικής κατάστασης αθλητών που συμμετείχαν σε έναν πολύ απαιτητικό υπερμαραθώνιο βουνού παγκοσμίως που καλείται "Olympus Mythical Trail" (OMT), ο οποίος έλαβε χώρα τον Ιούλιο του 2015 στον Όλυμπο, το πιο γνωστό Ελληνικό βουνό. Έτσι, δώδεκα έμπειροι άντρες δρομείς συμμετείχαν εθελοντικά στην παρούσα μελέτη και δείγματα αίματος συλλέχθηκαν πριν τον αγώνα και 24, 48 και 72 ώρες μετά τη λήξη του για τον προσδιορισμό των εναλλαγών που συμβαίνουν στην οξειδοαναγωγική τους κατάσταση. Να σημειωθεί ότι δεν είχαν επιβληθεί περιορισμοί όσον αφορά την διατροφή αλλά υπήρχαν σχετικά με τη χρήση συμπληρωμάτων. Η εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των αθλητών έγινε με τη μέτρηση δεικτών οξειδωτικού στρες που προσδιορίζονται φασματοφωτομετρικά όπως είναι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB), ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ

(TBARS), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και η δραστικότητα του ενζύμου της καταλάσης (CAT). Στην εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης χρησιμοποιήθηκαν και δύο νέοι δείκτες: ο δείκτης δυναμικού της στατικής οξειδωσης-αναγωγής (sORP) και ο δείκτης δυναμικής ικανότητας οξειδωσης-αναγωγής (cORP).

Σε μια προηγούμενη μελέτη που έγινε στο εργαστήριο μας, σε έναν μαραθώνιο βουνού αποκαλύφθηκαν σημαντικές αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των αθλητών αμέσως μετά τον αγώνα, ιδιαίτερα στους ORP δείκτες (Stagos et al., 2015b). Οι αλλαγές σε αυτούς τους δείκτες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς αντιπροσωπεύουν την τρέχουσα οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού. Η παρούσα μελέτη αποτελεί και μία προσέγγιση σχετικά με την εξατομικευμένη ανταπόκριση του κάθε οργανισμού στο οξειδωτικό στρες. Κάθε άνθρωπος άρα και κάθε αθλητής είναι μοναδικός, επομένως προκύπτει το ερώτημα αν η ανταπόκριση του κάθε οργανισμού τις επόμενες μέρες έπειτα από ένα ακραίο γεγονός θα είναι μοναδική.

Ο αγώνας στον οποίον έγινε η μελέτη, είναι ένας ορεινός υπερμαραθώνιος με μήκος διαδρομής 103 χιλιόμετρα, από τα οποία τα 40 βρίσκονται σε υψόμετρο άνω των 2.000 μέτρων. Όπως αναφέρθηκε ο τύπος της άσκησης που έφεραν εις πέρας οι αθλητές ήταν κυρίως αερόβια, με πολλά τμήματα έκκεντρης άσκησης εξαιτίας της κατάβασης σε πολλά σημεία του αγώνα. Σαν αποτέλεσμα ύστερα από αυτή την υπερβολική άσκηση και προσπάθεια που κατέβαλε κάθε αθλητής, ήταν η πρόκληση οξειδωτικού στρες μετά τον αγώνα.

Συγκεκριμένα, τα επίπεδα γλουταθειόνης (GSH) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα σε όλες τις χρονικές στιγμές δειγματοληψίας μετά τον αγώνα σε σχέση με τα δείγματα πριν τον αγώνα (Σχήμα 3). Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με την προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας σε μαραθώνιο βουνού (Stagos et al., 2015b), καθώς και με άλλες μελέτες που συσχετίζουν την άσκηση με μειωμένα επίπεδα GSH (Elokda et al., 2010; Gambelunghe et al., 2001; Turner et al., 2014). Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα από μια μελέτη που έγινε σε αθλητές που συμμετείχαν στον υπερμαραθώνιο με το όνομα "Σπάρταθλον", που γίνεται στην Ελλάδα, όπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα της GSH

(Skenderi et al., 2008). Εδώ είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι ο αγώνας Σπάρταθλον γίνεται σε επίπεδο έδαφος, σε χαμηλό υψόμετρο και δεν περιλαμβάνει έκκεντρη άσκηση. Γενικά, έχει προταθεί ότι η επαγόμενη αύξηση των ROS από την άσκηση, ενεργοποιεί σαν απάντηση την προσαρμογή σε νέα ερεθίσματα μέσω μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ελέγχονται από την κατάσταση των θειολών (με κυριότερη θειόλη τη γλουταθειόνη) (Ji et al., 2006; Melikoglu et al., 2008; Zembron-Lacny et al., 2010; Zembron-Lacny et al., 2010). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς από αλλαγές στην κατάσταση οξειδοαναγωγής των θειολών, επάγεται η έκφραση του πυρηνικού παράγοντα κΒ (NF-κΒ) και της πρωτεΐνης ενεργοποιητή 1 (AP-1). Η έκφραση των οποίων με τη σειρά τους αυξάνουν τα επίπεδα των κυτοκινών ιντερλευκίνης-6 (IL-6) και του ογκογόνου παράγοντα νέκρωσης α (TNF-α) (Ji et al., 2006; Kerksick et al., 2005). Τόσο η IL-6 όσο και ο TNF-α έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν την αναγέννηση του μυός και την ανάπτυξη αντοχής στις επαγόμενες από τις ROS μυϊκές βλάβες (Steensberg et al., 2000).

Στατιστικά σημαντικές αλλαγές παρατηρήθηκαν στους δείκτες sORP και cORP, που μετρήθηκαν με το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS (Luoxis Diagnostics, Inc., Englewood, CO, USA), οι οποίοι αποτελούν νέους δείκτες για τη μέτρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του οργανισμού. Συγκεκριμένα ο δείκτης sORP βρέθηκε σημαντικά αυξημένος 72 ώρες μετά την ολοκλήρωση του αγώνα, υποδεικνύοντας ένα οξειδωτικό δυναμικό την παρούσα χρονική στιγμή (Σχήμα 1). Ο δείκτης sORP είναι το πρότυπο δυναμικό μεταξύ ενός ηλεκτροδίου ρεύματος και ενός ηλεκτροδίου αναφοράς, ο οποίος είναι ανάλογος προς την ισορροπία των αναγωγικών και των οξειδωτικών στο πλάσμα (Stagos et al., 2015a). Χαμηλές τιμές sORP δείχνουν ότι το βιολογικό δείγμα είναι στο εύρος των φυσιολογικών ορίων της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, ενώ τιμές πάνω από το κανονικό δείχνουν οξειδοαναγωγική ανισορροπία με αυξημένη ποσότητα οξειδωτικών έναντι αναγωγικών, που υποδεικνύουν οξειδωτικό στρες. Προγενέστερες μελέτες που έγιναν από το εργαστήριο μας, έχουν χρησιμοποιήσει εκτενώς αυτό τον δείκτη και τα παρατηρούμενα αποτελέσματα μετά από άσκηση δείχνουν ότι η έντονη αερόβια και έκκεντρη άσκηση μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα sORP (Reddy et al., 2004; Stagos et al., 2015a; Stagos et al., 2015b), υποδηλώνοντας την επαγωγή οξειδωτικού στρες. Ωστόσο, η ατομική ανάλυση των αθλητών (Σχήμα 8) παρουσίασε ένα μη

αναμενόμενο γεγονός, καθώς ένας αθλητής συγκεκριμένα είχε διαφορετική απάντηση από ότι το σύνολο, στον οποίο ο δείκτης sORP μειωνόταν μετά τον αγώνα.

Όσον αφορά τον δείκτη cORP, στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στις 24 και στις 72 ώρες μετά τον τερματισμό του αγώνα σε σχέση με πριν τον αγώνα (Σχήμα 2). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο δείκτης cORP αντιπροσωπεύει το αντιοξειδωτικό διαθέσιμο απόθεμα του οργανισμού. Έτσι, έπειτα από μια τόσο απαιτητική άσκηση τα αποθέματα αντιοξειδωτικών έχουν μειωθεί, καθώς οι συμμετέχοντες αθλητές δεν κατάφεραν να ανταπεξέλθουν στο οξειδωτικό στρες ή να αντικαταστήσουν τα αντιοξειδωτικά τους αποθέματα μετά την άσκηση. Ωστόσο, αυτό το αποτέλεσμα ήταν αντικρουόμενο σε σχέση με μία άλλη μελέτη η οποία διεξήχθη σε έναν αγώνα ορεινού μαραθωνίου, στην οποία δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές μετά τον αγώνα στα επίπεδα cORP (Stagos et al., 2015b). Για την ακρίβεια, η μεγάλη διαφορά μεταξύ της παρούσας και της προαναφερθείσας μελέτης, ήταν ότι τα δείγματα πάρθηκαν αμέσως μετά τον τερματισμό του αγώνα για κάθε αθλητή, ενώ στην παρούσα μελέτη η συλλογή των δειγμάτων αίματος έγινε στις 24, στις 48 και στις 72 ώρες μετά τον τερματισμό του αγώνα για κάθε αθλητή. Το εύρημα ότι μπορεί να υπάρχουν αλλαγές με χρονοεξαρτώμενο τρόπο είναι ιδιαίτερα σημαντικό και μπορεί να συσχετισθεί με τη μυϊκή βλάβη που προκαλείται κατά την έκκεντρη άσκηση. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι τα μακροφάγα, τα ηωσινόφιλα και τα ουδετερόφιλα, τα οποία παράγονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν επίσης να επάγουν την παραγωγή ROS. Αυτά τα κύτταρα παρουσιάζουν σημαντική ενεργοποίηση κατά τη διάρκεια έκκεντρης άσκησης, σαν αποτέλεσμα των διαρκών μυϊκών συσπάσεων (Malm et al., 1999). Τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα είναι σε θέση να παράγουν μεγάλες ποσότητες ROS τις οποίες χρησιμοποιούν εναντίον μικροοργανισμών ως μέρος της ενδογενούς άμυνας του οργανισμού (Smith, 1997). Το ανθρώπινο σώμα είναι εξοπλισμένο με ένα πλήθος αντιοξειδωτικών που χρησιμεύουν στην αντιστάθμιση της επίδρασης των οξειδωτικών (Birben et al., 2012). Ωστόσο όταν υπάρχει οξειδωτικό στρες, η εξάντληση των αντιοξειδωτικών μορίων συμβαίνει λόγω της προσπάθειας των κυττάρων να εξουδετερώσουν τις οξειδωτικές δράσεις αλλά και να αποκαταστήσουν την οξειδοαναγωγική ισορροπία με ρύθμιση γονιδίων που κωδικοποιούν αμυντικά ένζυμα, μεταγραφικούς παράγοντες και δομικές πρωτεΐνες. Υποτίθεται ότι αυτός είναι ο κύριος λόγος των μειωμένων επιπέδων του δείκτη cORP τις ημέρες μετά τον αγώνα που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα

που λαμβάνονται αμέσως μετά την ολοκλήρωση του αγώνα. Ένα άλλο γεγονός που αξίζει να λάβουμε υπόψη είναι η διαφορετική απόκριση ενός αθλητή. Πιο συγκεκριμένα, ο ίδιος αθλητής που είχε μειωμένα επίπεδα sORP μετά τον αγώνα, παρουσίασε αυξημένα επίπεδα cORP, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τους υπόλοιπους συμμετέχοντες. Σε μια άλλη μελέτη έχει αναφερθεί επίσης ένα μεγάλο εύρος αποκρίσεων όσον αφορά τον δείκτη cORP έπειτα από εξουθενωτική έκκεντρη άσκηση (Stagos et al., 2015a). Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι ο συγκεκριμένος αθλητής θα μπορούσε να αντιμετωπίζει το επαγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες με την αύξηση των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων του, οδηγώντας ως εκ τούτου σε αυξημένα επίπεδα cORP.

Ακολουθως, όσον αφορά τους δείκτες οξειδωτικού στρες CARB, TBARS, TAC, CAT, κανένας από αυτούς δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή τις ημέρες μετά τον αγώνα σε σύγκριση με πριν τον αγώνα. Αρχικά, όσον αφορά τα TBARS, πολλές προηγούμενες μελέτες που βασίζονται σε άσκηση υπεραντοχής δείχνουν ότι ο δείκτης αυτός είναι σταθερά αυξημένος αμέσως μετά τους υπερμαραθώνιους και παραμένει σε αυξημένα επίπεδα για 24 έως 48 ώρες (Kanter et al., 1988; Nieman et al., 2003; Skenderi et al., 2008; Stagos et al., 2015b; Turner et al., 2011). Από την άλλη πλευρά ένα πείραμα που έγινε στο εργαστήριο μας, με βάση την έκκεντρη άσκηση δεν έδειξε σημαντικές μεταβολές όσον αφορά τα TBARS (Stagos et al., 2015a), καθώς και πολλές άλλες μελέτες μετά από οξεία και αερόβια άσκηση (Alessio et al., 2000; Bloomer et al., 2005; Niess et al., 1996). Αυτή η έλλειψη σημαντικότητας όσον αφορά τις αλλαγές των δεικτών οξειδωτικού στρες μετά την άσκηση μπορεί να εξηγηθεί από τη μεγάλη ατομική διακύμανση που παρουσιάζει κάθε αθλητής (Σχήμα 10). Οι μετρήσεις έδειξαν ότι 6 από τους 12 συμμετέχοντες παρουσίασαν μια αύξηση στα επίπεδα των TBARS μετά τον αγώνα σε σχέση με τα επίπεδα αυτών πριν τον αγώνα, ενώ οι υπόλοιποι 6 παρουσίασαν μείωση. Έτσι, είναι προφανές ότι σχετικά με την επίδραση της άσκησης στη διαδικασία της υπεροξειδωσίας των λιπιδίων, υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ των δημοσιευμένων εργασιών καθώς και μεταξύ των ατόμων που συμμετείχαν στην ίδια έρευνα.

Παρομοίως, στα επίπεδα των CARB παρατηρήθηκαν παρόμοιες μεταβολές, καθώς 6 συμμετέχοντες παρουσίασαν αύξηση των επιπέδων, ενώ οι υπόλοιποι 6 παρουσίασαν μείωση (Σχήμα 11). Αξίζει να αναφερθεί ότι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια χρησιμοποιούνται ως δείκτης για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό

των πρωτεϊνικών βλαβών. Οι πρωτεϊνικές βλάβες είναι από τα πιο κοινά χαρακτηριστικά του οξειδωτικού στρες και αποτελούν μετα-μεταφραστική τροποποίηση η οποία μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαφόρων αντιδράσεων και συνίσταται από την προσθήκη ομάδων καρβονυλίων στις πρωτεϊνικές δομές, κυρίως σε κατάλοιπα προλίνης, αργινίνης και λυσίνης. Έτσι, οι μεταβολές οδηγούν σε μη σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα των CARB, γεγονός που έρχεται επίσης σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη μας (Stagos et al., 2015b) και με άλλες δημοσιευμένες μελέτες μετά από εντατική άσκηση σε ανθρώπους και σε ζώα (Kobayashi et al., 2014; Rosa-Lima et al., 2015). Ωστόσο, μία άλλη μελέτη σε ποδηλάτες (Bloomer et al., 2005) έδειξε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα οξείδωσης των πρωτεϊνών, 24 ώρες μετά την εξαντλητική αερόβια άσκηση, ένα είδος άσκησης που είναι παρόμοιο με τη δική μας μελέτη. Κατά τον ίδιο τρόπο, τα αποτελέσματα μιας άλλης μελέτης μετά από υπερμαραθώνιο κολύμβησης, που θεωρείται επίσης ως εξαντλητική αερόβια άσκηση, δεν έδειξαν σημαντικές αλλαγές ούτε στα επίπεδα των CARB ούτε των TBARS (Kabasakalis et al., 2011).

Τελικώς, οι δείκτες TAC και CAT, που υποδεικνύουν τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τη δραστικότητα του ενζύμου καταλάση αντίστοιχα, επίσης δεν διέφεραν σημαντικά μετά τον αγώνα σε σύγκριση με πριν τον αγώνα. Αξιοσημείωτο είναι ότι παρόμοιες μεταβολές στην ατομική ανάλυση παρατηρήθηκαν και σε αυτούς τους δείκτες. Όσον αφορά την TAC, θα αναμενόταν να αντιστοιχεί με τη μεταβολή της cORP, καθώς και οι δύο δείκτες εκτιμούν την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Ωστόσο, η έλλειψη αντιστοιχίας μεταξύ τους είναι πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για την εκτίμησή τους. Έτσι, η μέθοδος της cORP φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητη για τον προσδιορισμό των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων στο πλάσμα αφού μειώθηκε στατιστικά σημαντικά μετά τον αγώνα, το οποίο ήταν και το αναμενόμενο σε συνδυασμό και με τα αποτελέσματα της sORP.

Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι στα περισσότερα άτομα παρατηρείται μείωση της TAC τις επόμενες ημέρες του αγώνα, αλλά ταυτόχρονα υπάρχουν άτομα που εμφανίζουν αύξηση ειδικά στις 48 και στις 72 ώρες. Η μείωση της TAC σε αυτούς τους αθλητές μετά τον αγώνα σε σύγκριση με πριν, μπορεί να εξηγηθεί από την ανικανότητά τους να ενεργοποιούν αποτελεσματικά αποκρίσεις προσαρμογής στο οξειδωτικό στρες. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση της TAC σε ορισμένα δείγματα

φαίνεται ενδιαφέρουσα, δεδομένου ότι εμφανίζει μια αύξηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών μετά από μια τόσο απαιτητική άσκηση, αλλά έχει επίσης αναφερθεί στο παρελθόν ότι η TAC μπορεί να αυξηθεί μετά την άσκηση (Fatouros et al., 2004; Stagos et al., 2015b; Wiecek et al., 2015).

Επιπλέον, η δραστικότητα της καταλάσης (CAT) στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα εμφανίζει επίσης παρόμοιες μεταβολές (Σχήμα 13), αλλά και τα ομαδοποιημένα αποτελέσματα δεν επιδεικνύουν σημαντικές αλλαγές. Ακόμα, οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η άσκηση και ιδιαίτερα η έκκεντρη και η αερόβια άσκηση επηρεάζουν τη δραστικότητα της CAT εξακολουθούν να παραμένουν άγνωστοι. Πολλές μελέτες έχουν ήδη αναφέρει ότι η δραστικότητα της CAT ούτε αυξάνεται ούτε μειώνεται μετά την άσκηση (Mangner et al., 2013; Oh-ishi et al., 1997; Wiggs, 2015), γεγονός που είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μας.

Συνοπτικά, αυτή είναι η πρώτη μελέτη στην οποία η οξειδοαναγωγική κατάσταση των αθλητών που υποβλήθηκαν σε έναν τόσο απαιτητικό αγώνα δεν ελέγχθηκε αμέσως μετά τον αγώνα, αλλά τις επόμενες τρεις ημέρες, για να ανιχνευθεί η βραχυπρόθεσμη προσαρμογή των ατόμων. Το σημαντικό εύρημα ήταν ότι μπορεί να υπάρξουν αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των αθλητών που οδηγούν σε αύξηση των οξειδωτικών έναντι των αναγωγικών, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, ένα άλλο κρίσιμο συμπέρασμα είναι οι διακυμάνσεις των οξειδοαναγωγικών επιπέδων που παρουσιάζονται ανά άτομο. Όπως και άλλες μελέτες έχουν δείξει (Margaritelis et al., 2014; Stagos et al., 2015a), η έκκεντρη άσκηση, μπορεί να προκαλέσει ακόμα και αναγωγικό στρες ή αμελητέο στρες σε ένα σημαντικό αριθμό ανθρώπων, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη μας. Μια πιθανή εξήγηση για αυτή τη διακύμανση, είναι η υψηλή πολυπλοκότητα της ρύθμισης της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης στον άνθρωπο, δεδομένου ότι πολλοί γενετικοί, φυσιολογικοί, βιοχημικοί ή διατροφικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα των οξειδωτικών ερεθισμάτων (Kant & Graubard, 2008; Rankinen & Bouchard, 2008; Simoneau & Bouchard, 1989). Ως εκ τούτου, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι μεταβολές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των συμμετεχόντων πρέπει να εξετάζονται ατομικά και όχι ως μια ολόκληρη ομάδα ώστε να γίνεται η κατάλληλη παρέμβαση σε αυτούς, βοηθώντας με αυτό τον τρόπο

στην ταχύτερη αποκατάσταση μετά τον αγώνα πιθανώς με την αλλαγή της διατροφής ή / και τη χρήση ορισμένων αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων.

Κλείνοντας, αυτή η μελέτη ρίχνει φως σε κάτι άγνωστο μέχρι τώρα, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, σχετικά με τις ατομικές εναλλαγές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, τις επόμενες ημέρες από έναν απαιτητικό αγώνα. Κάτι που θα μπορούσε να βοηθήσει αρκετούς αθλητές σε όλο τον κόσμο οι οποίοι συμμετέχουν σε τέτοιες ακραίες δραστηριότητες άσκησης στην προσπάθειά τους να ξεπεράσουν τον εαυτό τους και να βελτιώσουν την κατάσταση της υγείας τους και τις επιδόσεις τους.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρασκευή αντιδραστηρίων για τη μέτρηση των δεικτών οξειδωτικού στρες:

Για τον προσδιορισμό της TAC

Αντιδραστήρια

- *Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4)*

{Μοριακό βάρος (MB) (KH_2PO_4): 136, μοριακό βάρος (Na_2HPO_4): 178}

Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε 100 mL KH_2PO_4 (10 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (10 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.136 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερό. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 0.712 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερό. Σε ένα ποτήρι ζέσεως χύνουμε τα διαλύματα και προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.4.

- *DPPH 0.1 mM, MB: 394.32*

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

Για τον προσδιορισμό των TBARS

Αντιδραστήρια

- *Tris-HCl 200 mM (pH 7.4)*

{MB (Tris): 121.14, MB (HCl): 36.46 (stock 37%) [10.1 N]}

Για να φτιάξουμε ≈ 100 mL του Tris-HCl buffer φτιάχνουμε 25 mL Tris (200 mM) και 42 mL HCl (0.1 N). Για το Tris ζυγίζουμε 0.61 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το HCl διαλύουμε 0.42 mL του stock 37% HCl (10.1 N) σε 42 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως ρίχνουμε τα 25 mL από το Tris και προσθέτουμε αργά τα 42 mL του HCl και μετά προσθέτουμε νερό ως τα 100 mL. Ελέγχουμε το pH αν είναι στο 7.4.

- *Διάλυμα Na_2SO_4 (2 M) – TBA (55 mM)*

{MB (TBA): 144.1, MB (Na_2SO_4): 142.04}

[Οδηγίες για παρασκευή 10 mL διαλύματος. Το συγκεκριμένο διάλυμα πρέπει να φτιάχνεται πάντοτε την ημέρα του πειράματος]. Ζυγίζουμε 2.84 g Na_2SO_4 και 0.08 g θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα μεταφέρουμε σε ένα ποτήρι ζέσεως και προσθέτουμε 10 mL νερού. Θερμαίνουμε και ανακατεύουμε με το μαγνητάκι μέχρι να διαλυθούν τα συστατικά πλήρως.

- *Διαλύματα TCA% (τριχλωροξικό οξύ)*

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

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

¹ Το Tris είναι συντομογραφία του τρισυδροξυμεθυλαμινομεθάνιου (trishydroxymethylaminomethane) και είναι κατάλληλο για τη δημιουργία ρυθμιστικών διαλυμάτων με pH από 6,5 μέχρι 9,7.

Για τον προσδιορισμό των CARB

Αντιδραστήρια

- *Διάλυμα HCl 2.5 N*

{HCl: MB 36.46; stock 37% (10.1 N)}

Για να φτιάξουμε 100 mL διαλύματος 2.5 N HCl, προσθέτουμε αργά 24.6 mL του 37% HCl (10.1 N) σε ≈ 70 mL απεσταγμένου νερού και το φέρνουμε σε τελικό όγκο 100 mL με απεσταγμένο νερό. Κατά την παρασκευή του διαλύματος του 2,5 N HCl χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή επειδή το διάλυμα του, 37 % είναι πολύ καυστικό. Πάντα η παρασκευή γίνεται κάτω από τον απαγωγό και φορώντας γάντια.

- *DNPH 14 mM (MB: 198.1)*

Για να φτιάξουμε 100 mL 14 mM DNPH διαλύουμε 0.2833 g DNPH σε 100 mL 2.5 N HCl. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται πάντα τη μέρα του πειράματος. Όταν το ετοιμάσουμε το καλύπτουμε με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο. Απαιτούνται 0.5 mL για κάθε δείγμα. Φτιάχνουμε και ένα τυφλό για κάθε δείγμα.

- *Ουρία 5 M (pH 2.3) (MB: 60.06)*

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

Για τον προσδιορισμό της GSH

Αντιδραστήρια

- *Phosphate buffer 67 mM (pH 7.95)*

{MB (KH₂PO₄): 136, MB (Na₂HPO₄): 178}

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

- *DTNB (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο (sodium citrate) σε νερό*

{**DTNB**_i [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396.35, **Κιτρικό νάτριο** (C₆H₅Na₃O₇*2H₂O, tri-sodium dihydrate), MB:294.10}

Για να φτιάξουμε 100 mL DTNB (1mM) σε 1% κιτρικό νάτριο φτιάχνουμε πρώτα το 1% κιτρικό νάτριο διαλύοντας 1g κιτρικού νατρίου σε 100 mL νερού. Έπειτα διαλύουμε σε αυτό 0.0396 g DTNB.

ⁱ Το DTNB διαλύεται σε κιτρικό νάτριο το οποίο εμποδίζει σημαντικές αλλαγές στο pH.

Για τον προσδιορισμό της CAT

Αντιδραστήρια

- *Phosphate buffer 67 mM (pH 7.4)*

{MB (KH₂PO₄): 136, MB (Na₂HPO₄): 178}

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

- *30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂)*

Το διάλυμα H₂O₂ είναι έτοιμο προς χρήση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Ajmani, R. S., Fleg, J. L., Demehin, A. A., Wright, J. G., O'Connor, F., Heim, J. M., ... Rifkind, J. M. (2003). Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 28(1), 29–40.
- Alessio, H. M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 25(2), 218–224.
- Alessio, H. M., Hagerman, A. E., Fulkerson, B. K., Ambrose, J., Rice, R. E., & Wiley, R. L. (2000). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(9), 1576–1581.
- Antunes, F., Han, D., & Cadenas, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(9), 1260–1267.
- Berg J, Tymoczko J, Stryer L (2010). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <http://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H., Wideman, L., McKenzie, M. J., & Consitt, L. A. (2005). Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association*, 19(2), 276–285. <http://doi.org/10.1519/14823.1>
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493.
- Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T., & Wilson, M. T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 30(2), 280–285. <http://doi.org/10.1042/>
- Davies, C. T. (1992). The physiology of cycling with reference to power output and muscularity. *The Annals of Physiological Anthropology = Seiri Jinrui-gaku Kenkyukai Kaishi*, 11(3), 309–312.
- Davies, K. J., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A., & Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 107(4), 1198–1205.
- Degache, F., Morin, J.-B., Oehen, L., Guex, K., Giardini, G., Schena, F., ... Millet, G. P. (2015). Running Mechanics During the World's Most Challenging Mountain Ultra-Marathon. *International Journal of Sports Physiology and Performance*. <http://doi.org/10.1123/ijsp.2015-0238>

- Dotan, Y., Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 200–227. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.001>
- Elokda, A., DiFrancisco-Donoghue, J., Lamberg, E. M., & Werner, W. G. (2010). Effects of exercise induced oxidative stress on glutathione levels in Parkinson's disease on and off medication. *Journal of Neurology*, 257(10), 1648–1653. <http://doi.org/10.1007/s00415-010-5584-6>
- Ernster, L., & Dallner, G. (1995). Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1271(1), 195–204.
- Fatouros, I. G., Jamurtas, A. Z., Villiotou, V., Pouliopoulou, S., Fotinakis, P., Taxildaris, K., & Deliconstantinos, G. (2004). Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 36(12), 2065–2072.
- Gambelunghe, C., Rossi, R., Micheletti, A., Mariucci, G., & Rufini, S. (2001). Physical exercise intensity can be related to plasma glutathione levels. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 57(2), 9–14.
- Giles, G. I., & Jacob, C. (2002). Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biological Chemistry*, 383(3-4), 375–388. <http://doi.org/10.1515/BC.2002.042>
- Gomez-Cabrera, M.-C., Borrás, C., Pallardó, F. V, Sastre, J., Ji, L. L., & Viña, J. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *The Journal of Physiology*, 567(Pt 1), 113–120. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.080564>
- Green, H. J., & Fraser, I. G. (1988). Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 20(1), 55–59.
- Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Vincent, S., Sergent, O., ... Gratas-Delamarche, A. (2003). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 89(1), 14–20. <http://doi.org/10.1007/s00421-002-0767-1>
- Halliwell B and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
- Halliwell B (2001). Free radicals and other reactive species in disease. In: *Nature Encyclopaedia of Life Sciences*. J. Wiley and Sons (eds). *Nature Publishing Group*, New York.
- Halliwell, Barry (Mar 2015) *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease*. In: *eLS*.
- Halprin, K. M., & Ohkawara, A. (1967). The measurement of glutathione in human epidermis using glutathione reductase. *The Journal of Investigative Dermatology*, 48(2), 149–152.

- Hirt, R. P., Muller, S., Embley, T. M., & Coombs, G. H. (2002). The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. *Trends in Parasitology*, *18*(7), 302–308.
- Janaszewska, A., & Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *62*(3), 231–236.
- Jenkins, R. R. (1988). Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, *5*(3), 156–170.
- Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, *222*(3), 283–292.
- Ji, L. L., Gomez-Cabrera, M.-C., & Vina, J. (2006). Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1067*, 425–435. <http://doi.org/10.1196/annals.1354.061>
- Kabasakalis, A., Kyparos, A., Tsalis, G., Loupos, D., Pavlidou, A., & Kouretas, D. (2011). Blood oxidative stress markers after ultramarathon swimming. *Journal of Strength and Conditioning Research / National Strength & Conditioning Association*, *25*(3), 805–811. <http://doi.org/10.1519/JSC.0b013e3181d0b109>
- Kant, A. K., & Graubard, B. I. (2008). Ethnic and socioeconomic differences in variability in nutritional biomarkers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *87*(5), 1464–1471.
- Kanter, M. M., Lesmes, G. R., Kaminsky, L. A., La Ham-Saeger, J., & Nequin, N. D. (1988). Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometer race. Relationship to lipid peroxidation. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, *57*(1), 60–63.
- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akcay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, *28*(2), 141–143.
- Kerksick, C., & Willoughby, D. (2005). The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *2*, 38–44. <http://doi.org/10.1186/1550-2783-2-2-38>
- Kobayashi, Y., Nakatsuji, A., Aoi, W., Wada, S., Kuwahata, M., & Kido, Y. (2014). Intense exercise increases protein oxidation in spleen and liver of mice. *Nutrition and Metabolic Insights*, *7*, 1–6. <http://doi.org/10.4137/NMI.S13668>
- Kumar, C. T., Reddy, V. K., Prasad, M., Thyagaraju, K., & Reddanna, P. (1992). Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *111*(1-2), 109–115.
- Latimer, H. R., & Veal, E. A. (2016). Peroxiredoxins in Regulation of MAPK Signalling Pathways; Sensors and Barriers to Signal Transduction. *Molecules*

- and Cells*, 39(1), 40–45. <http://doi.org/10.14348/molcells.2016.2327>
- Leeuwenburgh, C., & Heinecke, J. W. (2001). Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Current Medicinal Chemistry*, 8(7), 829–838.
- Levine, R. L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(9), 790–796.
- Levine, R. L., & Stadtman, E. R. (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Experimental Gerontology*, 36(9), 1495–1502.
- Lovlin, R., Cottle, W., Pyke, I., Kavanagh, M., & Belcastro, A. N. (1987). Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 56(3), 313–316.
- Malm, C., Lenkei, R., & Sjodin, B. (1999). Effects of eccentric exercise on the immune system in men. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 86(2), 461–468.
- Mangner, N., Linke, A., Oberbach, A., Kullnick, Y., Gielen, S., Sandri, M., ... Adams, V. (2013). Exercise training prevents TNF-alpha induced loss of force in the diaphragm of mice. *PloS One*, 8(1), e52274. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0052274>
- Margaritelis, N. V., Kyparos, A., Paschalis, V., Theodorou, A. A., Panayiotou, G., Zafeiridis, A., ... Vrabas, I. S. (2014). Reductive stress after exercise: The issue of redox individuality. *Redox Biology*, 2, 520–528. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2014.02.003>
- Margaritelis, N. V., Veskokoukis, A. S., Paschalis, V., Vrabas, I. S., Dipla, K., Zafeiridis, A., ... Nikolaidis, M. G. (2015). Blood reflects tissue oxidative stress: a systematic review. *Biomarkers : Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 20(2), 97–108. <http://doi.org/10.3109/1354750X.2014.1002807>
- Melikoglu, M. A., Kaldirimci, M., Katkat, D., Sen, I., Kaplan, I., & Senel, K. (2008). The effect of regular long term training on antioxidant enzymatic activities. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 48(3), 388–390.
- Mendoza-Cozatl, D., Loza-Tavera, H., Hernandez-Navarro, A., & Moreno-Sanchez, R. (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), 653–671. <http://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.004>
- Meydani, M., Evans, W., Handelman, G., Fielding, R. A., Meydani, S. N., Fiatarone, M. A., ... Cannon, J. G. (1992). Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 669, 363–364.
- Mrakic-Sposta, S., Gussoni, M., Moretti, S., Pratali, L., Giardini, G., Tacchini, P., ... Vezzoli, A. (2015). Effects of Mountain Ultra-Marathon Running on ROS Production and Oxidative Damage by Micro-Invasive Analytic Techniques. *PloS One*, 10(11), e0141780. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0141780>

- Mustacich, D., & Powis, G. (2000). Thioredoxin reductase. *The Biochemical Journal*, 346 Pt 1, 1–8.
- Mylonas, C., & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo (Athens, Greece)*, 13(3), 295–309.
- Nieman, D. C., Dumke, C. I., Henson, D. A., McAnulty, S. R., McAnulty, L. S., Lind, R. H., & Morrow, J. D. (2003). Immune and oxidative changes during and following the Western States Endurance Run. *International Journal of Sports Medicine*, 24(7), 541–547. <http://doi.org/10.1055/s-2003-42018>
- Niess, A. M., Hartmann, A., Grunert-Fuchs, M., Poch, B., & Speit, G. (1996). DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *International Journal of Sports Medicine*, 17(6), 397–403. <http://doi.org/10.1055/s-2007-972868>
- Oh-ishi, S., Kizaki, T., Nagasawa, J., Izawa, T., Komabayashi, T., Nagata, N., ... Ohno, H. (1997). Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 24(5), 326–332.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N. T., Georgiou, C. D., Angelatou, F., & Matsokis, N. A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Letters*, 357(2), 83–86. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.10.080>
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 4(2), 89–96.
- Pyne, D. B. (1994). Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 17(4), 245–258.
- Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvari, M., ... Goto, S. (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(1-2), 69–74.
- Rankinen, T., & Bouchard, C. (2008). Gene-physical activity interactions: overview of human studies. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 16 Suppl 3, S47–50. <http://doi.org/10.1038/oby.2008.516>
- Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. (2004) Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J. Tuberc.* 51, 213–218.
- Reddy, Y.N. and Murthy, S. V. and Krishna, D. R. and Prabhakar, M. C. (2004) *Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients* Indian J Tuberc , 51: 213-218.
- Rhee, S. G., Kang, S. W., Chang, T. S., Jeong, W., & Kim, K. (2001). Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life*, 52(1-2), 35–41. <http://doi.org/10.1080/15216540252774748>

- Rosa-Lima FL, Lannes L, Viana-Gomes D, Pierucci APTR and Salerno VP: Protein carbonyl levels correlate with performance in elite field hockey players. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr Metab* 40: 683–688, 2015.
- Sautin, Y. Y., & Johnson, R. J. (2008). Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 27(6), 608–619. <http://doi.org/10.1080/15257770802138558>
- Sies, H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift*, 69(21-23), 965–968.
- Simoneau, J. A., & Bouchard, C. (1989). Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities. *The American Journal of Physiology*, 257(4 Pt 1), E567–72.
- Skenderi, K. P., Tsironi, M., Lazaropoulou, C., Anastasiou, C. A., Matalas, A.-L., Kanavaki, I., ... Chrousos, G. P. (2008). Changes in free radical generation and antioxidant capacity during ultramarathon foot race. *European Journal of Clinical Investigation*, 38(3), 159–165. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01917.x>
- Slauch, J. M. (2011). How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Molecular Microbiology*, 80(3), 580–583. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07612.x>
- Smith, J. A. (1997). Exercise immunology and neutrophils. *International Journal of Sports Medicine*, 18 Suppl 1, S46–55. <http://doi.org/10.1055/s-2007-972699>
- Spanidis, Y., Goutzourelas, N., Stagos, D., Kolyva, A. S., Gogos, C. A., Bar-Or, D., & Kouretas, D. (2015). Assessment of Oxidative Stress in Septic and Obese Patients Using Markers of Oxidation-reduction Potential. *In Vivo (Athens, Greece)*, 29(5), 595–600.
- Stagos, D., Goutzourelas, N., Bar-Or, D., Ntontou, A.-M., Bella, E., Becker, A. T., ... Kouretas, D. (2015). Application of a new oxidation-reduction potential assessment method in strenuous exercise-induced oxidative stress. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 20(4), 154–162. <http://doi.org/10.1179/1351000214Y.0000000118>
- Stagos, D., Goutzourelas, N., Ntontou, A.-M., Kafantaris, I., Deli, C. K., Poullos, A., ... Kouretas, D. (2015). Assessment of eccentric exercise-induced oxidative stress using oxidation-reduction potential markers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 204615. <http://doi.org/10.1155/2015/204615>
- Steensberg, A., van Hall, G., Osada, T., Sacchetti, M., Saltin, B., & Klarlund Pedersen, B. (2000). Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *The Journal of Physiology*, 529 Pt 1, 237–242.
- Svensson, M. B., Ekblom, B., Cotgreave, I. A., Norman, B., Sjoberg, B., Ekblom, O., ... Sjodin, A. (2002). Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiologica Scandinavica*, 176(1), 43–56. <http://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2002.01008.x>

- Turner, J. E., Bennett, S. J., Bosch, J. A., Griffiths, H. R., & Aldred, S. (2014). Ultra-endurance exercise: unanswered questions in redox biology and immunology. *Biochemical Society Transactions*, 42(4), 989–995. <http://doi.org/10.1042/BST20140120>
- Turner, J. E., Hodges, N. J., Bosch, J. A., & Aldred, S. (2011). Prolonged depletion of antioxidant capacity after ultraendurance exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 43(9), 1770–1776. <http://doi.org/10.1249/MSS.0b013e31821240bb>
- Urso, M. L., & Clarkson, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2), 41–54.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. <http://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>
- Vasankari, T. J., Kujala, U. M., Rusko, H., Sarna, S., & Ahotupa, M. (1997). The effect of endurance exercise at moderate altitude on serum lipid peroxidation and antioxidative functions in humans. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 75(5), 396–399.
- Veskoukis, A. S., Nikolaidis, M. G., Kyparos, A., Kokkinos, D., Nepka, C., Barbanis, S., & Kouretas, D. (2008). Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition et Metabolisme*, 33(6), 1140–1154. <http://doi.org/10.1139/H08-102>
- Vina, J., Gomez-Cabrera, M. C., Lloret, A., Marquez, R., Minana, J. B., Pallardo, F. V., & Sastre, J. (2000). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life*, 50(4-5), 271–277. <http://doi.org/10.1080/713803729>
- Wiecek, M., Maciejczyk, M., Szymura, J., & Szygula, Z. (2015). Changes in oxidative stress and acid-base balance in men and women following maximal-intensity physical exercise. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 64(1), 93–102.
- Wiggs, M. P. (2015). Can endurance exercise preconditioning prevention disuse muscle atrophy? *Frontiers in Physiology*, 6, 63. <http://doi.org/10.3389/fphys.2015.00063>
- Wilhelm, M., Zueger, T., De Marchi, S., Rimoldi, S. F., Brugger, N., Steiner, R., ... Ith, M. (2014). Inflammation and atrial remodeling after a mountain marathon. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 24(3), 519–525. <http://doi.org/10.1111/sms.12030>
- Young, I. S., & McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 358–362.
- Zangar, R. C., Davydov, D. R., & Verma, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199(3), 316–331.

<http://doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.018>

Zembron-Lacny, A., Naczek, M., Gajewski, M., Ostapiuk-Karolczuk, J., Dziewiecka, H., Kasperska, A., & Szyszka, K. (2010). Changes of muscle-derived cytokines in relation to thiol redox status and reactive oxygen and nitrogen species. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 59(6), 945–951.

Zembron-Lacny, A., Slowinska-Lisowska, M., & Ziemba, A. (2010). Integration of the thiol redox status with cytokine response to physical training in professional basketball players. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 59(2), 239–245.

Κλεισούρας Βασίλης (2011). *Εργοφυσιολογία, Ιατρικές Π.Χ. Πασχαλίδης*