

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΜΕ ΤΟ
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ REDOXSYS
ΣΕ ΑΘΛΗΤΕΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΓΩΝΑ ΟΡΕΙΝΟΥ ΜΑΡΑΘΩΝΙΟΥ

Μπέλλα Ευαγγελία

Λάρισα 2014

Τριμελής επιτροπή

Στάγκος Δημήτριος : (Επιβλέπων) Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κουρέτας Δημήτριος : (Επιβλέπων) Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος : Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ πολύ τους καθηγητές μου και πρωτίστως τους κ. Δημήτριο Κουρέτα και κ. Δημήτρη Στάγκο που μου έδωσαν την ευκαιρία να συμμετάσχω σε ένα τέτοιο πείραμα και που μου πρόσφεραν παραπάνω γνώσεις στο αντικείμενο που σπούδασα. Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που συνεργάστηκα για την αποπεράτωση της πτυχιακής μου καθώς ήταν πάντα δίπλα μου πρόθυμοι να βοηθήσουν και να δώσουν την συμβουλή τους και κυρίως το συνεργάτη μου Νίκο που με βοήθησαν στην ομαλή ολοκλήρωση του πειράματος και συνεπώς και της πτυχιακής μου εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Ελεύθερες ρίζες.....	8
1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών	8
1.3 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών	9
1.4 Αντιοξειδωτικά μόρια - ενώσεις.....	10
1.5 Οξειδωτικό στρες	12
1.6 Άσκηση και οξειδωτικό στρες	13
1.7 Πηγές παραγωγής ROS κατά την άσκηση.....	15
1.7.1 Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων.....	15
1.7.2 Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης	15
1.7.3 Φλεγμονώδης αντίδραση	16
1.7.4 Δράση των κατεχολαμινών	16
1.7.5 Υπεροξειδιοσώματα	16
ΣΚΟΠΟΣ	17
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
2.1 Πειραματική διαδικασία.....	18
2.2 Συλλογή αίματος και επεξεργασία.....	18
2.3. Αξιολόγηση του sORP και Corp με τη χρήση του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS	19
2.4 Προσδιορισμός TAC.....	19
2.5 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) στο πλάσμα	20

2.6 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στο πλάσμα	21
2.7 Ανηγμένη Γλουταθειόνη (GSH) ΣΤΟ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΑΙΜΟΛΥΜΑ	23
2.8 Καταλάση σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα	24
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	26
3.1. Δείκτες οξειδωτικού στρες.....	26
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	31

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξειδωτικό στρες είναι ένας σημαντικός παράγοντας σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Ο προσδιορισμός των δεικτών του οξειδωτικού στρες είναι σημαντικός, δεδομένου ότι μπορούν να βοηθήσουν στην ακριβή εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ενός ατόμου και στην πρόβλεψη της πιθανής εκδήλωσης μιας παθολογικής κατάστασης. Αν και έχει αναπτυχθεί ένας αριθμός δεικτών οξειδωτικού στρες, εξακολουθεί να υπάρχει μία μεγάλη ανάγκη για δείκτες που θα είναι ακριβείς, εφικτοί και γρήγοροι. Στην παρούσα μελέτη, εξετάσαμε μια νέα μέθοδο για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες, το RedoxSYS διαγνωστικό σύστημα, που επιτρέπει την ισχυρή και ταχεία εκτίμηση του οξειδωτικού στρες μέσω μέτρησης δύο παραμέτρων, του στατικού δυναμικού οξειδωσης-αναγωγής (sORP) και της ικανότητας δυναμικού οξειδωσης-αναγωγής (cORP) αναλύοντας μία μόνο σταγόνα του πλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, το σύστημα αυτό χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της κατάστασης οξειδοαναγωγής σε 14 αθλητές που συμμετείχαν σε έναν αγώνα μααραθώνιου βουνού (44 χιλιόμετρα με 3600 μ υψόμετρο). Η οξειδοαναγωγική κατάσταση των αθλητών αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας συμβατικούς δείκτες οξειδωτικού στρες, όπως είναι τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH), της δράσης της καταλάσης, ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB) και η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Ο δείκτης φλεγμονής "C-αντιδρώσα πρωτεΐνη" (CRP) μετρήθηκε επίσης. Ελήφθησαν δείγματα αίματος μία ημέρα πριν από τον αγώνα και αμέσως μετά τον αγώνα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά τον αγώνα ο sORP αυξήθηκε σημαντικά κατά 7% , το οποίο δείχνει επαγωγή του οξειδωτικού στρες, ενώ ο cORP, μειώθηκε κατά 14,6%, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά. Επιπλέον τα αποτελέσματα από τους συμβατικούς δείκτες οξειδωτικού στρες έδειξαν επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Ειδικότερα, τα επίπεδα γλουταθειόνης και της δράσης της καταλάσης μειώθηκαν σημαντικά κατά 13,1% και 23,4% αντίστοιχα, ενώ των TBARS και CARB αυξήθηκαν σημαντικά κατά 26,1% και 15,6% αντίστοιχα, μετά τον αγώνα. Επιπλέον, η CRP επίσης αυξήθηκε κατά 22 φορές μετά τον αγώνα. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε για πρώτη φορά ότι ο ORP όπως μετράται από το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση του επαγόμενου από την άσκηση οξειδωτικού στρες σε αθλητές. Είναι σημαντικό για τη μέτρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού να επικυρωθεί ως μια αξιόπιστη εκτίμηση του οξειδωτικού στρες, δεδομένου ότι είναι μια ολική μέτρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, γρήγορη, μη επεμβατική και απαιτεί μικρό όγκο δείγματος.

ABSTRACT

Oxidative stress is a causal factor in several pathological conditions. Identifying markers of oxidative stress is important, since they can assist in accurately assessing the redox status of a person and predicting the possible manifestation of a pathological condition. Although a number of oxidative stress markers have been developed, there is still a great need for markers that would be accurate, feasible and fast. In the present study, we tested a new method for assessing oxidative stress, the RedoxSYS™ Diagnostic System that enables robust and rapid assessment of oxidative stress via measurement of two parameters, the static oxidation-reduction potential (sORP) and the capacity oxidation-reduction potential (cORP) by analyzing a single drop of plasma. In particular, this system was used to assess the redox status of 14 athletes participating in a mountain marathon race (44 km with 3600 m elevation gain). The redox status of the athletes was assessed using conventional oxidative stress markers such as glutathione levels (GSH), catalase activity, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyls levels (CARB) and total antioxidant capacity (TAC). The inflammation marker C-reactive protein (CRP) was also measured. Blood samples were obtained one day before the race and immediately after the race. The results showed that after the race the sORP was increased significantly by 7% indicating oxidative stress induction, while cORP decreased by 14.6% but not statistically significant. Similarly to sORP, the results from the conventional oxidative stress markers indicated oxidative stress induction. In particular, GSH levels and catalase activity were decreased significantly by 13.1% and 23.4% respectively, while TBARS and CARB were increased significantly by 26.1% and 15.6% respectively after the race. In addition, CRP was also increased by 22-fold after the race. In conclusion, the present study demonstrated for the first time that the ORP as measured by the RedoxSYS™ Diagnostic System can be used for evaluating the exercise-induced oxidative stress in athletes. It is important for ORP measurement to be validated as a reliable assessment of oxidative stress, since it is a holistic measurement of redox status, fast, non-invasive and requires small sample volume.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Jenkins, 1988). Αυτό μπορεί να γίνει είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στοιβάδα (Mylonas & Kouretas, 1999). Τα μόρια αυτά είναι ιδιαίτερα ασταθή κι έτσι μπορούν να αντιδρούν με άλλα μόρια οξειδώνοντάς τα. Η αντίδραση αυτή γίνεται με σκοπό να συμπληρωθεί η εξωτερική στιβάδα των ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό (Halliwell, 2001, Halliwell & Gutteridge 1998).

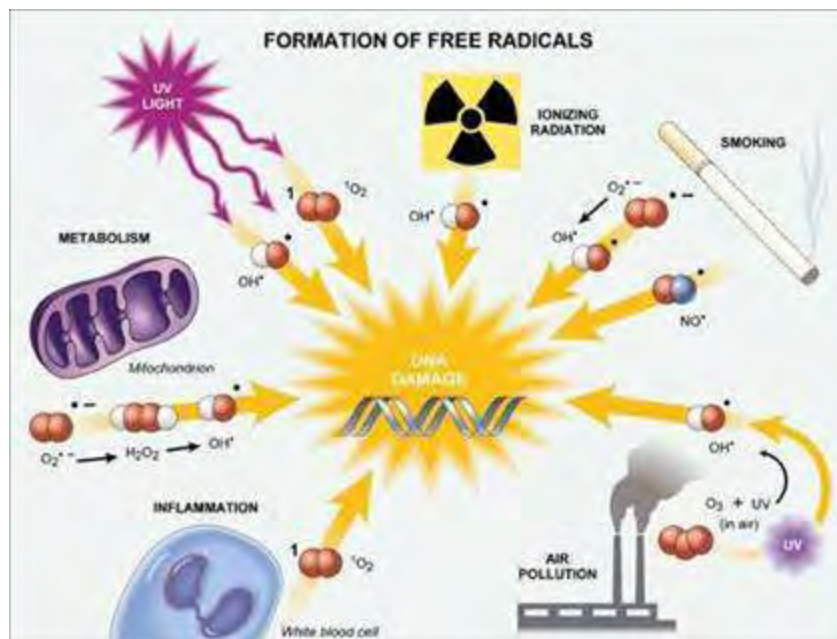
Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο κι ένα ηλεκτρόνιο. Στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που προέρχονται από το οξυγόνο, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο. Στον οργανισμό συνήθως συναντούμε τις ROS. Στις ROS 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 2001).

1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού. Απελευθερώνονται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό από τα μιτοχόνδρια, τα οποία αποτελούν για το κύτταρο, το εργοστάσιο παραγωγής ενέργειας. Ο μηχανισμός παραγωγής τους βασίζεται στο γεγονός ότι κατά την παραγωγή του ATP πολλά ηλεκτρόνια μπορούν να διαφύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων. Επειδή το οξυγόνο είναι αυτό που καταναλώνεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση οι περισσότερες δραστικές ουσίες είναι ROS.

Μια άλλη πηγή ROS και κυρίως H_2O_2 αποτελούν τα υπεροξειδισώματα. Επίσης σε κάποια κύτταρα και κυρίως στα ηπατικά, μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες κατά τις αντιδράσεις του συστήματος του κυτοχρώματος P-450. Τα κυτοχρώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό ξеноβιοτικών ουσιών με κύριο μηχανισμό τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα.

Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών όμως αυξάνεται από εξωγενείς παράγοντες, όπως είναι η υπερβολική έκθεση του οργανισμού σε τοξικές ουσίες, σε συντηρητικά τροφίμων, και μολυσματικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ καπνός τσιγάρου, ρύποι που μολύνουν την ατμόσφαιρα), η έκθεση σε ακτινοβολία (π.χ υπεριώδης ακτινοβολία UV), καθώς και η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ.



Εικόνα 1. Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

1.3 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Θετικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ενδο-όσο και διακυτταρικά (Sen et al., 1996, Rimbach et al., 1999, Reid, 2001, Sen, 2001, Linnane et al., 2002). Παραδείγματος χάριν, έχουν τη δυνατότητα τροποποίησης της δραστικότητας πρωτεϊνών προκαλώντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι πρωτεΐνες στόχοι των ROS ανήκουν σε πολλές κατηγορίες όπως φωσφατάσες, MAP κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και απακετυλάσες η μεθυλάσες ιστονών. Επίσης, οι ROS έχουν καίριο ρόλο σε ορισμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης (Finaud et al., 2006). Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Επιπλέον οι ROS ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την απόπτωση και τη μυϊκή συστολή (Reid, 2001, Linnane et al., 2002).

Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγής ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης. Ακόμα, αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για την στρατολόγηση κι άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων. Τέλος, οι ROS συμμετέχουν και στην διαδικασία της αγγειογένεσης.

Επιβλαβείς επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα) προκαλώντας την καταστροφή ή αλλοίωσή τους. Επίσης, συνδέονται με νευροεκφυλιστικές νόσους (Parkinson's, Alzheimer's, κατάθλιψη), φλεγμονές, λοιμώδεις νόσους, νόσους των νεφρών, ηπατικές και πνευμονικές νόσους. Τέλος συνδέονται με τη γήρανση καθώς και με διάφορους τύπους καρκίνου.

1.4 Αντιοξειδωτικά μόρια - ενώσεις

Ως αντιοξειδωτικός παράγοντας, ορίζεται μια ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Halliwell B, 2001). 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.

A) Ενζυμικοί μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών

Εδώ περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR).

B) Μη ενζυμικοί μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών

Εδώ περιλαμβάνονται μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες που περιέχονται στον ορό του αίματος και γενικότερα σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο, ορισμένα από τα οποία παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα:

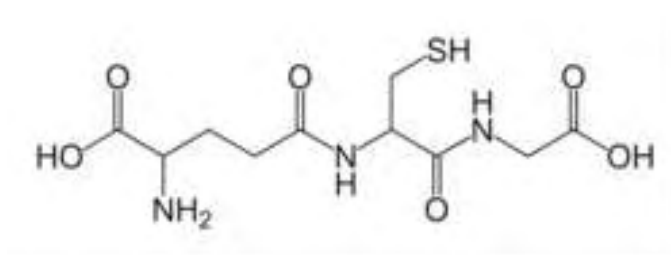
Αντιοξειδωτικό	Διαλυτότητα
Γλουταθειόνη	Νερό
Ασκορβικό οξύ	Νερό

Λιποϊκό οξύ	Νερό
Ουρικό οξύ	Νερό
Καροτένια	Λίπη
Α-τοκοφερόλη	Λίπη
Συνένζυμο Q10	Λίπη

Πίνακας 1: Αντιοξειδωτικά μόρια και οι διαλύτες τους

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό. Είναι ένα τριπεπτιδίο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. 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 .



Εικόνα 2 Το μόριο της γλουταθειόνης

Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)

Η βιταμίνη C αποτελεί μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Είναι πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Λιποϊκό οξύ

Η δράση του λιποϊκού οξέος αφορά τη σωστή λειτουργία του μιτοχονδρίου. Παράγεται από τον οργανισμό σε μικρές ποσότητες και εξαιτίας της δομής του, το λιποϊκό οξύ αποτελεί και ένα πανίσχυρο αντιοξειδωτικό παράγοντα.

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 τα προστατεύει από τις ROS.

B-καροτίνη

Είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη Α. Πιστεύεται ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και ο σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998) .

A-τοκοφερόλη

Η α-τοκοφερόλη ή βιταμίνη E βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξειδωση που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, προστατεύει από οξειδωση την βιταμίνη A (Halliwell & Gutteridge, 1998).

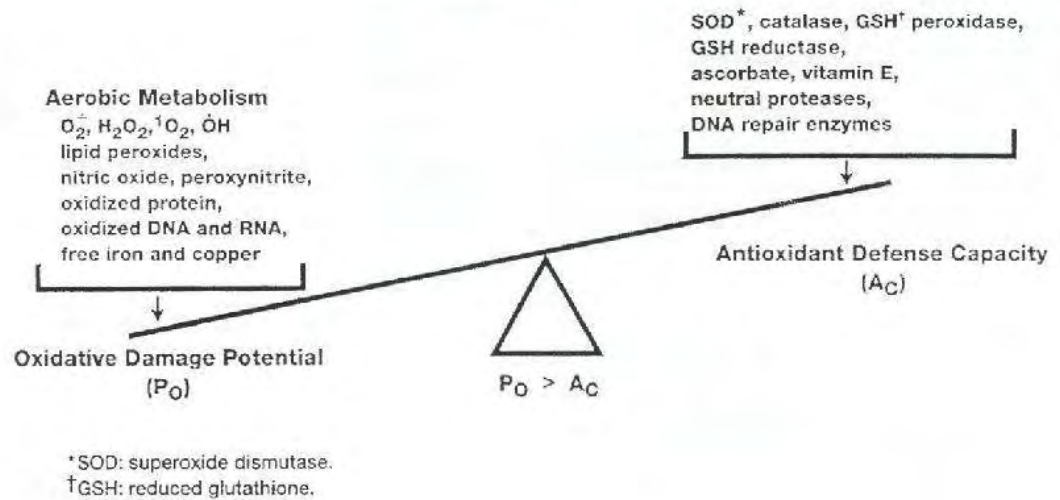
Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.5 Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού. Ο όρος αυτός, έχει οριστεί ως μια διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, με συνέπεια την καταστροφή βιομορίων (Halliwell & Gutteridge, 1990, Dotan, 2004).

OXIDATIVE STRESS



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Εμφάνιση οξειδωτικού στρες μπορεί να προκύψει εξαιτίας τόσο εξωγενών όσο και ενδογενών παραγόντων.

A) Εξωγενείς παράγοντες:

- Ξενοβιοτικές ουσίες
- Παθογόνα βακτήρια και ιοί
- Όζον και υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου
- Ακτινοβολία
- Διατροφή
- Κάπνισμα
- Φάρμακα

B) Ενδογενείς παράγοντες:

- Ένζυμα, όπως οξειδάση της ξανθίνης
- Αερόβιος μεταβολισμός μιτοχονδρίων
- Λευκοκύτταρα

Το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα βιολογικά μακρομόρια όπως DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια. Μπορεί ακόμη να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο.

1.6 Άσκηση και οξειδωτικό στρες

Η άσκηση γενικά έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στη βελτίωση της ποιότητας της ζωής, στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών όπως καρδιοπαθειών, διαβήτη και καρκίνου αλλά και στη βελτίωση της λειτουργίας των σκελετικών μυών. Στις ευεργετικές

επιδράσεις της άσκησης ανήκουν, επίσης, οι προσαρμογές των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ιστών. Όμως, πολλές έρευνες που έγιναν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η άσκηση, ιδίως η έντονη, σχετίζεται με αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών και συνεπώς με την εμφάνιση οξειδωτικού στρες.

Η πρώτη μελέτη που έδειξε αυτή τη σχέση μεταξύ άσκησης και οξειδωτικού στρες πραγματοποιήθηκε το 1982 (Davies et al., 1982). Στη συνέχεια υπήρξαν πολλές άλλες μελέτες, που συσχέτισαν την άσκηση με το οξειδωτικό στρες. Οι πιο πολλές έχουν μελετήσει την επίδραση της αερόβια άσκησης όπως τρέξιμο, κολύμπι και ποδηλασία (Alessio, 1993, Vasankari et al., 1997, Liu et al., 1999, Mastaloudis et al., 2001, Palmer et al., 2003, Ashton et al., 1998, Child et al., 2000, Lovlin et al., 1987, Aguilo et al., 2005, Michailidis et al., 2007, Nikolaidis et al., 2006). 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. Επίσης, βρέθηκε ότι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξάνονται στο πλάσμα και το γαστροκνήμιο μυ μετά από εξαντλητική άσκηση (Alessio et al., 1993, Gomez-Cabrera et al., 2005, Stadtman and Levine, 2000; You et al., 2005, Veskoukis et al., 2008). Η άσκηση αύξησε και τη λιπιδική υπεροξείδωση στο πλάσμα και το σκελετικό μυ, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες εργασίες (Ajmani et al., 2003, Alessio et al., 1993, You et al., 2005). Η αερόβια άσκηση συνοδεύεται από υψηλή πρόσληψη οξυγόνου και αυτό αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Έτσι, οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι αυξάνεται το οξειδωτικό στρες σε ανθρώπους και ζώα που πραγματοποίησαν έντονη άσκηση.

Σε μελέτες όμως που το πρωτόκολλο δεν περιλάμβανε 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). Όσο όμως αυξάνεται η ένταση της άσκησης τόσο αυξάνεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια και το οξειδωτικό στρες (Palmer et al., 2003).

Πέρα από την αερόβια άσκηση έχει δείχθει ότι και η αναερόβια άσκηση μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες. Τέτοιου είδους ασκήσεις είναι τα άλματα, τα σπριντ και η άρση βαρών (Groussard et al., 2003). Εδώ οι μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι διαφορετικοί από την αερόβια άσκηση καθώς ενεργοποιούνται διάφορα μονοπάτια πέρα από την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Groussard et al., 2003). Σημαντικό ρόλο παίζει η οξειδάση της ξανθίνης ενώ εμφανίζονται φαινόμενα όπως αυτό της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, της φλεγμονής και του κυτταρικού τραυματισμού.

Μελέτες έχουν γίνει σε αθλητές διαφόρων αθλημάτων. Σε τριαθλητές μετά από αγώνα παρατηρήθηκε αύξηση ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) (Palazzetti et al., 2003). Σε κολυμβητές 800 μέτρων έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα καταλάσης είναι αυξημένα μετά την άσκηση (Inal et al., 2001). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι ποδηλάτες μετά από αγώνα είχαν αυξημένα επίπεδα GSSG στο αίμα, μειωμένα επίπεδα GSH και μειωμένο λόγο GSH/GSSG (Aguilo et al., 2005). Συγκριτικές έρευνες όσο αφορά την

ένταση της ποδηλασίας έδειξαν ότι ποδηλασία που έφτανε το 100% της VO_2max παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα ερυθροκύτταρα σε σχέση με ποδηλασία που έγινε σε ένταση 40% της VO_2max (Lovlin et al., 1987).

Όσον αφορά την αναερόβια άσκηση, πρόσφατες μελέτες σε επίμυες που εκτέλεσαν μια σειρά από σπριντς μέτρησαν αυξημένο οξειδωτικό στρες σε σκελετικούς μύες καθώς και στο ήπαρ. Παρατηρήθηκε, επίσης, αύξηση των TBARS στους μύες αλλά όχι στο ήπαρ (Kayatekin et al., 2002). Σε ανθρώπους είχε γίνει μια μελέτη όπου εθελοντές πραγματοποίησαν μια ισοτονική άσκηση αντοχής και παρατηρήθηκε αύξηση στην MDA του αίματος (McBride et al., 1998).

Υπάρχουν όμως και κάποιες μελέτες στη βιβλιογραφία που δε βρίσκουν οξειδωτικό στρες μετά από έντονη αερόβια άσκηση (Vasankari et al., 1997, Vider et al., 2001; Chevion et al., 2003). Αυτό, πιθανόν, οφείλεται στην ένταση και τον τύπο της άσκησης αλλά και στον τύπο και στην εξοικείωση πριν από αυτή. Γενικά, όμως, φαίνεται ότι αερόβια και αναερόβια άσκηση υψηλής έντασης προκαλούν οξειδωτικό στρες (Finaud et al., 2006).

1.7 Πηγές παραγωγής ROS κατά την άσκηση

1.7.1 Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων

Η αερόβια αναπνοή πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια με τη βοήθεια των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Εκεί το μοριακό οξυγόνο ανάγεται σε νερό, που είναι ο τελικός δέκτης των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Όμως δεν ανάγεται όλη η ποσότητα του οξυγόνου σε νερό αλλά ένα μικρό ποσοστό 2-5% μπορεί να μετατραπεί σε O_2 και H_2O_2 που διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα και πιο συγκεκριμένα από το σύμπλεγμα της ουβικινόνης (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). Κατά την έντονη αερόβια άσκηση, όμως, η συνολική πρόσληψη οξυγόνου είναι αυξημένη κατά 20 φορές και τα επίπεδα οξυγόνου σε μια μυική 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).

1.7.2 Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Κατά την αναερόβια άσκηση παρατηρείται το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (ischemia-reperfusion), όπου ενεργοποιείται το μονοπάτι της οξειδάσης της ξανθίνης. Λόγω της άμεσης ενέργειας που χρειάζεται ο οργανισμός το ATP διασπάται σε ADP και αυτό μετά σε AMP. Τότε, η αφυδρογονάση της ξανθίνης οξειδώνει το AMP σε υποξανθίνη. Μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης, η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Τα επίπεδα της οξειδάσης της ξανθίνης και υποξανθίνης τόσο στο πλάσμα όσο και σε ιστούς αυξάνονται μετά από αναερόβια άσκηση (Radak et al., 1996, Vina et al., 2000). Η δράση του ενζύμου αυτού οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα O_2 και H_2O_2 (McCord & Fridovich, 1968). Κάτω από αερόβιες συνθήκες το ATP αναπληρώνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ γίνεται μέσω της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης και όχι μέσω της οξειδωμένης της μορφής (Ji, 1999).

1.7.3 Φλεγμονώδης αντίδραση

Η φλεγμονώδης αντίδραση μπορεί να ενεργοποιείται κατά την άσκηση και ειδικότερα από το είδος της άσκησης που προκαλεί μυϊκή καταστροφή (π.χ. έκκεντρη άσκηση). Τα πολυμορφοουδετερόφιλα (Polymorphoneutrophils, PMN) είναι μια ομάδα κυττάρων που συμμετέχει στη φλεγμονώδη αντίδραση. Κατά τη μυϊκή καταστροφή λόγω άσκησης, τα PMN πλησιάζουν την περιοχή της καταστροφής και εκκρίνουν το ένζυμο λυσοζύμη και O_2 . Έτσι, με την άσκηση προκαλείται ενεργοποίηση και δράση των PMN και παράγονται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες συχνά είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση οξειδωτικού στρες (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). Το γεγονός ότι κατά την άσκηση, που προκαλεί μυϊκή καταστροφή εμφανίζεται φλεγμονή έχει επιβεβαιωθεί και με τον προσδιορισμό δύο ακόμη δεικτών της φλεγμονής, της IL-6 και της μυελοϋπεροξειδάσης (Childs et al., 2000).

1.7.4 Δράση των κατεχολαμινών

Οι κατεχολαμίνες είναι νευροδιαβιβαστές που εκκρίνονται όταν ο οργανισμός βρίσκεται σε εγρήγορση. Κατά την έντονη άσκηση η συγκέντρωσή τους αυξάνεται και ενεργοποιούνται έτσι οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς. Οι κατεχολαμίνες επάγουν το μεταβολισμό για τη μεγαλύτερη παραγωγή ενέργειας με αποτέλεσμα να εμφανίζεται έντονη παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια.

1.7.5 Υπεροξειδιοσώματα

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι οργανίδια που διαθέτουν οξειδωτικά ένζυμα και βοηθούν στη αποτοξίνωση του κυττάρου. Εκεί όμως οξειδώνονται τα λιπαρά οξέα που αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για το μυοκάρδιο και το σκελετικό μυ κατά την άσκηση. Κατά τη διάσπασή τους στα υπεροξειδιοσώματα ελευθερώνονται ROS που προκαλούν οξειδωτικό στρες (Ji, 1999).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να μελετήσουμε μια νέα μέθοδο για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες, χρησιμοποιώντας το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS. Επίσης, η οξειδοαναγωγική κατάσταση των αθλητών μαραθωνίου εξετάστηκε χρησιμοποιώντας συμβατικούς δείκτες οξειδωτικού στρες, όπως είναι τα επίπεδα της γλουταθειόνης (GSH), της δράσης της καταλάσης, ουσίες που αντιδρούν με θιοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB) και η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματική διαδικασία

Δεκατέσσερις μαραθωνοδρόμοι βουνού, έντεκα άνδρες και τρεις γυναίκες (ηλικία, $39,3 \pm 3$ έτη, Ύψος, 174 ± 2 εκατοστά, Βάρος, $70,5 \pm 2,3$ kg, Δείκτης μάζας σώματος, $23,2 \pm 0,6$ kg / m², Μέση τιμή \pm SEM) έδωσαν τη συγκατάθεσή τους να συμμετάσχουν σε αυτή τη μελέτη.

Τα άτομα προπονούνταν τουλάχιστον 3 φορές την εβδομάδα για 3 ώρες και είχαν ιστορικό προπόνησης τουλάχιστον 3 χρόνια. Ήταν μη καπνιστές και δεν λάμβαναν αντιφλεγμονώδη φάρμακα ή συμπληρώματα διατροφής. Όλοι οι δρομείς που συμμετείχαν στον αγώνα Faethon Olympus Marathon ήταν υγιείς, εκπαιδευμένοι αθλητές αντοχής, και είχαν προηγούμενη συμμετοχή σε ένα άλλο ορεινό μαραθώνιο αγώνα άνω των 40 χιλιομέτρων. Ο Faethon Olympus Marathon είναι ένας ορεινός αγώνας συνεχούς άσκησης, μέτριας έντασης, κατά τον οποίο οι δρομείς προσπαθούν να καλύψουν τα 44 χιλιόμετρα σε μονοπάτια και πλαγιές του Ολύμπου.

Τα άτομα επισκέφθηκαν το Νοσοκομείο της Ελασσόνας που βρίσκεται κοντά στην αφετηρία του αγώνα για τον έλεγχο των ανθρωπομετρικών παραμέτρων και ολοκλήρωσαν το ερωτηματολόγιο υγείας και δραστηριότητας. Ο δείκτης μάζας σώματος μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5 kg (δοκός ισορροπίας 710, Seca, Ηνωμένο Βασίλειο) με τα άτομα ελαφρά ντυμένα και ξυπόλητα. Το ύψος μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5 cm (Υψόμετρο 208, Seca). Ο δείκτης μάζας σώματος υπολογίστηκε ως η αναλογία του βάρους σώματος (kg) / ύψος (m).

Κατά τη διάρκεια του αγώνα, οι αθλητές κατανάλωσαν υγρά (νερό, αναψυκτικά και ποτά) και τρόφιμα πλούσια σε υδατάνθρακες (ψωμί, φρούτα, μπισκότα και ζυμαρικά) που ήταν διαθέσιμα σε 10 σημεία ελέγχου σε όλη τη διάρκεια του αγώνα κατά βούληση. Ο μέσος χρόνος τερματισμού των αθλητών ήταν 9 ώρες και 59 λεπτά \pm 27 λεπτά.

2.2 Συλλογή αίματος και επεξεργασία

Το αίμα συλλέχθηκε σε δύο διαφορετικά χρονικά σημεία, πριν τον αγώνα και αμέσως μετά το τέλος του αγώνα. Τα δείγματα αίματος (10 mL) λήφθηκαν από μία φλέβα του αντιβραχίου με τα άτομα σε καθιστή θέση. Το αίμα συλλέχθηκε σε σωλήνες αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (EDTA) για τη μέτρηση των TAC, TBARS, πρωτεϊνικών καρβονυλίων, των επιπέδων GSH και CRP. Αίμα συλλέχθηκε επίσης σε σωλήνες ηπαρίνης για τη μέτρηση του δυναμικού οξειδωσης-αναγωγής. Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν αμέσως στα 1370 g για 10 λεπτά στους 4 ° C και το πλάσμα συλλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε για τις παραπάνω μετρήσεις. Τα συσκευασμένα ερυθροκύτταρα λύθηκαν με απεσταγμένο νερό (1: 1 v / v), φυγοκεντρήθηκαν στα 4020 g για 15 λεπτά στους 4 ° C και το προϊόν λύσεως των ερυθροκυττάρων συλλέχθηκε για μέτρηση της δραστηριότητας της καταλάσης. Ένα μέρος του προϊόντος λύσης των ερυθροκυττάρων

(500μL) υποβλήθηκε σε επεξεργασία με 5% τριχλωροοξικό οξύ (TCA) (1: 1 v / v), αναδεύτηκε με Vortex και φυγοκεντρήθηκε στα 28.000 g για 5 λεπτά στους 4 ° C. Τα υπερκείμενα απομακρύνθηκαν, επεξεργάστηκαν και πάλι με 5% TCA (1,3: 1 v / v) και φυγοκεντρήθηκαν πάλι στα 28.000 g για 5 λεπτά στους 4 ° C. Τα διαυγή υπερκείμενα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες Eppendorf και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της GSH. Το κυτταρόλυμα πλάσματος και ερυθρών αιμοσφαιρίων φυλάχθηκε στους 80 °C πριν από 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). Ειδικότερα, 20 μl πλάσματος εφαρμόστηκαν σε αισθητήρες που σχεδιάστηκαν από την Luoxis, που εισήχθησαν εντός του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS το οποίο και ανέφερε εντός τεσσάρων λεπτών, τις τιμές sORP και cORP. Ο sORP συλλαμβάνει την ολοκληρωμένη ισορροπία των οξειδωτικών και αναγωγικών σε ένα δείγμα και αναφέρεται σε millivolt (mV). Χαμηλές τιμές sORP δείχνουν ότι το βιολογικό δείγμα είναι εντός των φυσιολογικών ορίων της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, ενώ τιμές πάνω από το κανονικό δείχνουν οξειδοαναγωγική ανισορροπία υπέρ των οξειδωτικών πάνω από αναγωγικά. Η τιμή cORP δηλώνει την ποσότητα των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων και εκφράζεται σε microcoulombs (μC). Οι υψηλές τιμές χωρητικότητας δείχνουν ότι το βιολογικό δείγμα έχει αντιοξειδωτικά αποθέματα εντός των φυσιολογικών ορίων, ενώ τιμές κάτω από το κανονικό δείχνουν χαμηλότερα από το κανονικό αποθέματα αντιοξειδωτικών.

2.4 Προσδιορισμός TAC

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

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τις ακόλουθες ποσότητες στα Eppendorfs:

	Blank	Positive control	Sample
Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4	500 μL	495 μL	480 μL
DPPH 0.1 mM	500 μL	500 μL	500 μL
Ascorbic acid 10 mM	—	5 μL	—
Plasma	—	—	20 μL

Ανακινούμε τα Eppendorfs 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 mL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm. 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.

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

Αρχή της μεθόδου

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

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. Σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon (15 ml) προσθέτουμε 100 μL πλάσματος (για τα δείγματα) ή απεσταγμένο νερό (για το τυφλό).
2. Προσθέτουμε 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl και αναδεύουμε.
3. Επωάζουμε για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.
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 ($\mu\text{mol/L}$) = $(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156 \times 31$, 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 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L το $\mu\text{mol/L}$.

2.6 Πρωτεϊνικά Καρβονύλια στο πλάσμα

Αρχή της μεθόδου

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 (αλδεΐδες 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.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες. Η καρβονυλίωση οδηγεί στην απώλεια της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ μεγάλες 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 πλάματος προσθέτουμε 50 μL 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του)*.
2. Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 οC.
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 οC.

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 οC.

7. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

8. Προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού ειθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 οC. 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 οC 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 οC.

13. Μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 mL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορόφηση στα 375 nm.

*(Κάθε δείγμα έχει το τυφλό του. Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0.5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται 0.5 mL HCL 2.5 N).

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = Αδείγματος - Ατυφλού / 0.022 \times 1000/50.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM · cm⁻¹.

Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000 μ L στην κυψελίδα /50 μ L δείγματος).

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

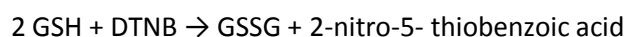
Συγκ. πρωτ. καρβ. (nmol/mg) = συγκ. πρωτ. καρβ. nmol/mL / συγκ. πρωτ mg/mL

Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70 mg/mL

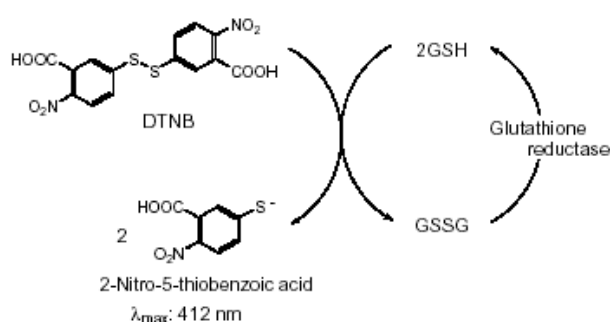
2.7 Ανηγγεμένη Γλουταθειόνη (GSH) ΣΤΟ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΑΙΜΟΛΥΜΑ

Αρχή της μεθόδου

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειοδυο νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετρείται 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 5 Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε φιαλίδια Eppendorf:

	Blank	Sample
	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Water	20 μL	—
RBCL	—	20 μL

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

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της GSH (mmol/L) = (Absδείγματος – ΔAbstυφλού / 13.6) × 262.6, όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (20 μL) (1010 / 20 = 50.5), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη λύση των ερυθροκυττάρων και με 2 × 1.3 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500 μL αιμολ. / 500 μL 5% TCA) και τη δεύτερη αραίωση (390 μL / 300 μL ή 260 μL / 200 μL) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

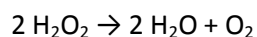
Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/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.

2.8 Καταλάση σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Αρχή της μεθόδου

Η καταλάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) σε νερό και οξυγόνο. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει 83000 μόρια H₂O₂ 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 H₂O₂. Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H₂O₂ από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

	Sample
Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4	2991 μL
RBL diluted 1/10 in water	4 μL

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 μία κυψελίδα 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 130 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 αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μL) ($3000 / 4 = 750$), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραιώση 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 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Δείκτες οξειδωτικού στρες

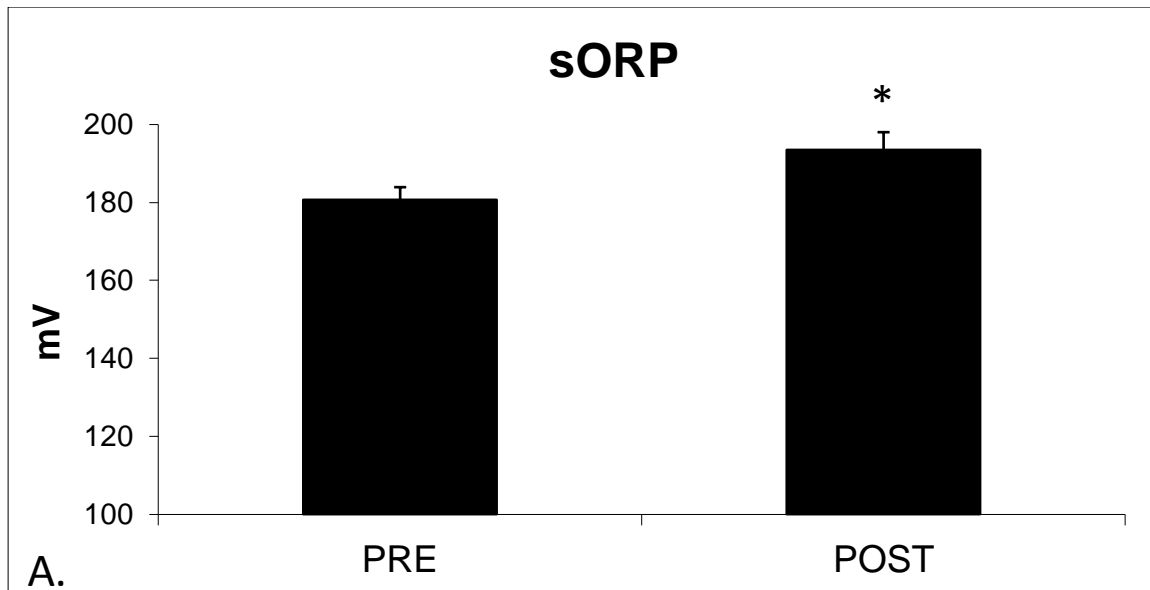
Από τις δύο παραμέτρους που μετρήθηκαν από το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS, ο sORP υποδεικνύει την τρέχουσα ισορροπία οξειδοαναγωγής, που αυξήθηκε σημαντικά ($p < 0,05$) μετά τον αγώνα κατά 7% σε σχέση με πριν τον αγώνα (Εικ. 1A). Αντίθετα, ο cORP που δείχνει τα αποθεματικά των αντιοξειδωτικών μειώθηκε μετά τον αγώνα κατά 14,5%, αλλά όχι στατιστικά σημαντικά (Εικ. 1B).

Όσον αφορά τους συμβατικούς δείκτες οξειδωτικού στρες, τα επίπεδα των CARB στο πλάσμα που υποδεικνύουν την οξείδωση των πρωτεϊνών αυξήθηκαν σημαντικά ($p < 0,05$) κατά 15,6% μετά τον αγώνα σε σχέση με πριν (Εικ. 2).

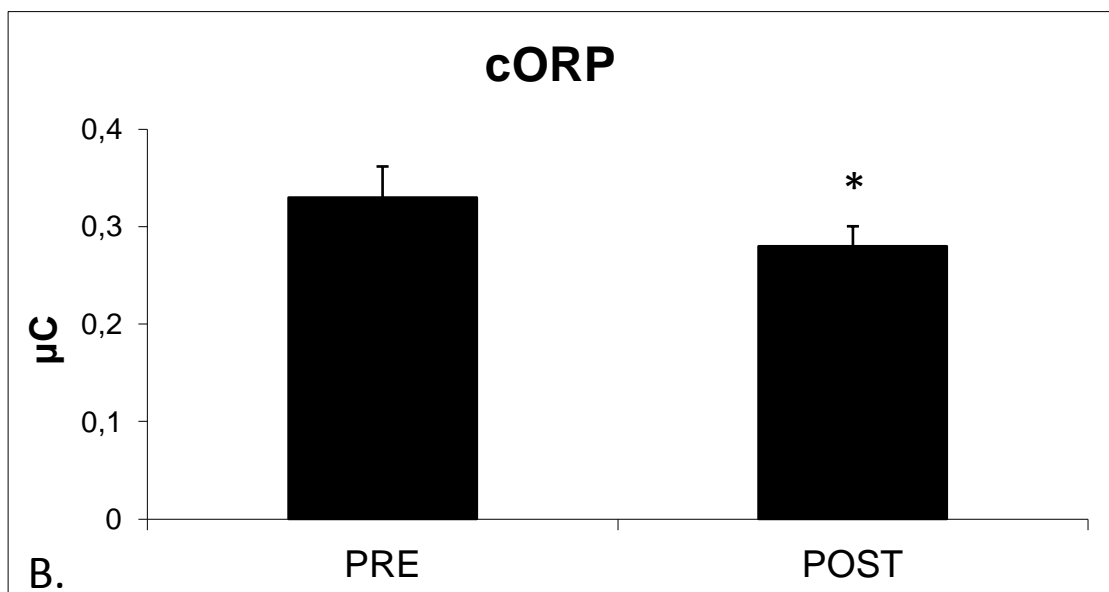
Η TAC στο πλάσμα αυξήθηκε σημαντικά ($p < 0,01$) κατά 6,9% μετά τον αγώνα (Εικ. 3).

Τα επίπεδα TBARS στο πλάσμα που δείχνουν την υπεροξείδωση λιπιδίων αυξήθηκαν σημαντικά ($p < 0,05$) μετά τον αγώνα κατά 26,1% (Σχ. 4). Από την άλλη πλευρά, στα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα επίπεδα της μη-ενζυματικής αντιοξειδωτικής GSH μειώθηκαν σημαντικά ($p < 0,05$) με 13,1% μετά τον αγώνα σε σύγκριση με πριν (Εικ. 5).

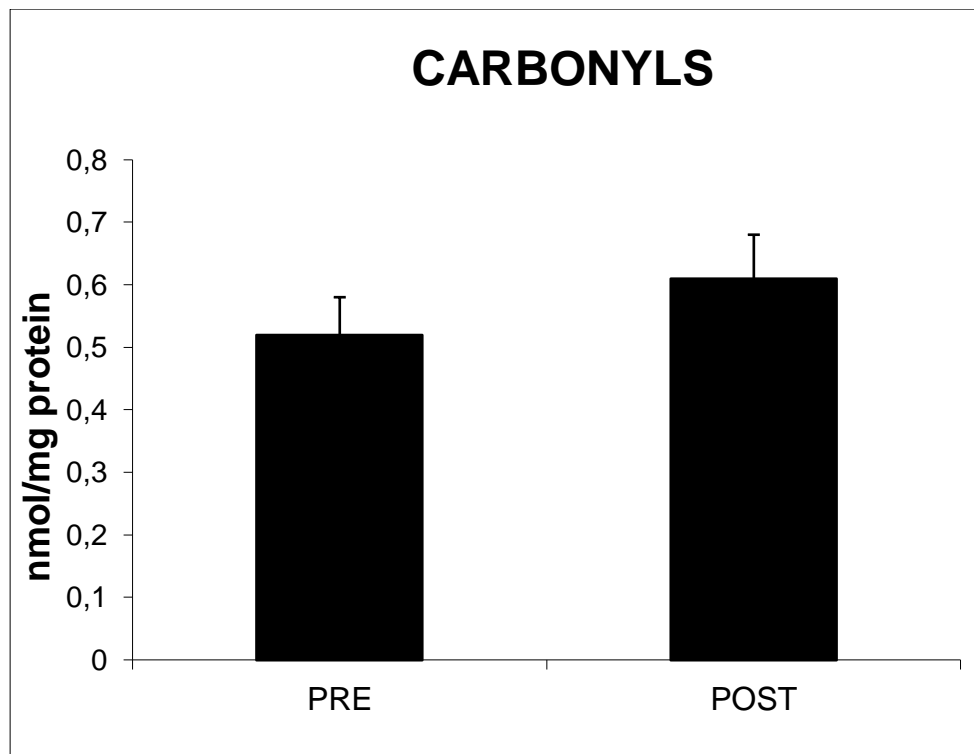
Η δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου καταλάση στα ερυθρά κύτταρα του αίματος μειώθηκε σημαντικά κατά 23,4% μετά τον αγώνα (Εικ. 6).



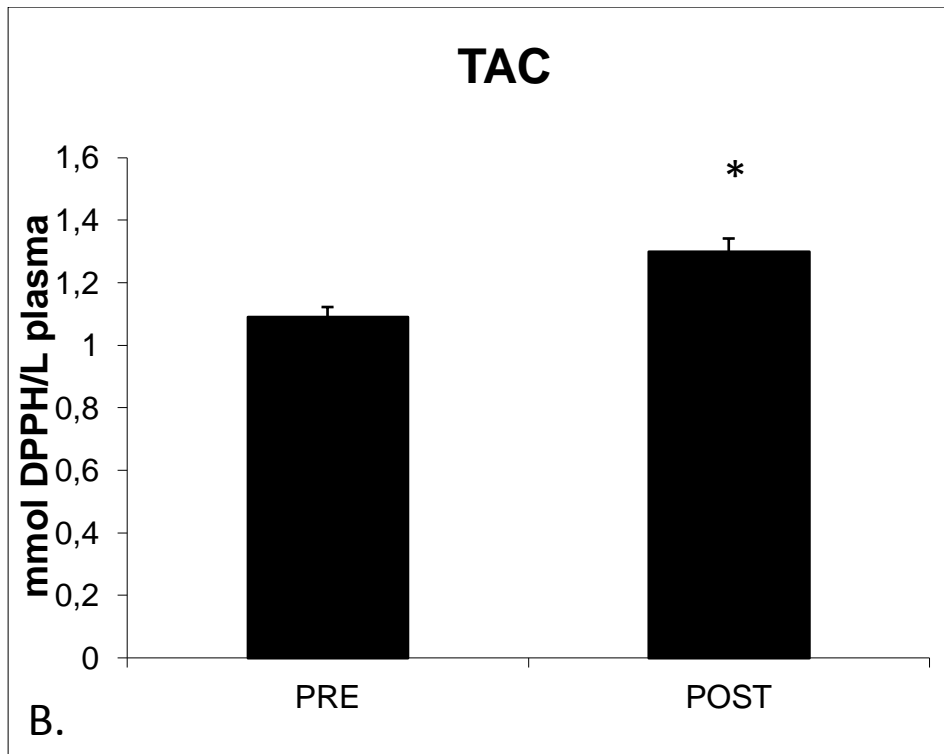
Διάγραμμα 1: επίπεδα Sorp στο πλάσμα πριν (PRE) και μετά (POST) τον αγώνα



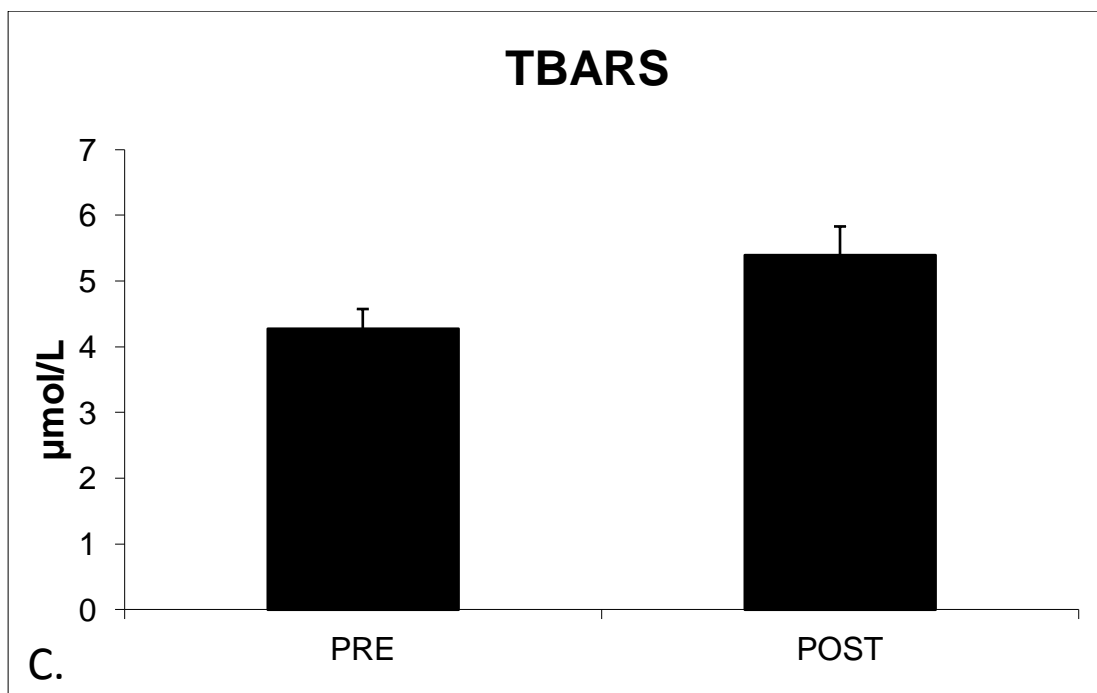
Διάγραμμα 2 : Επίπεδα Corp στο πλάσμα πριν (PRE) και μετά (POST) τον αγώνα



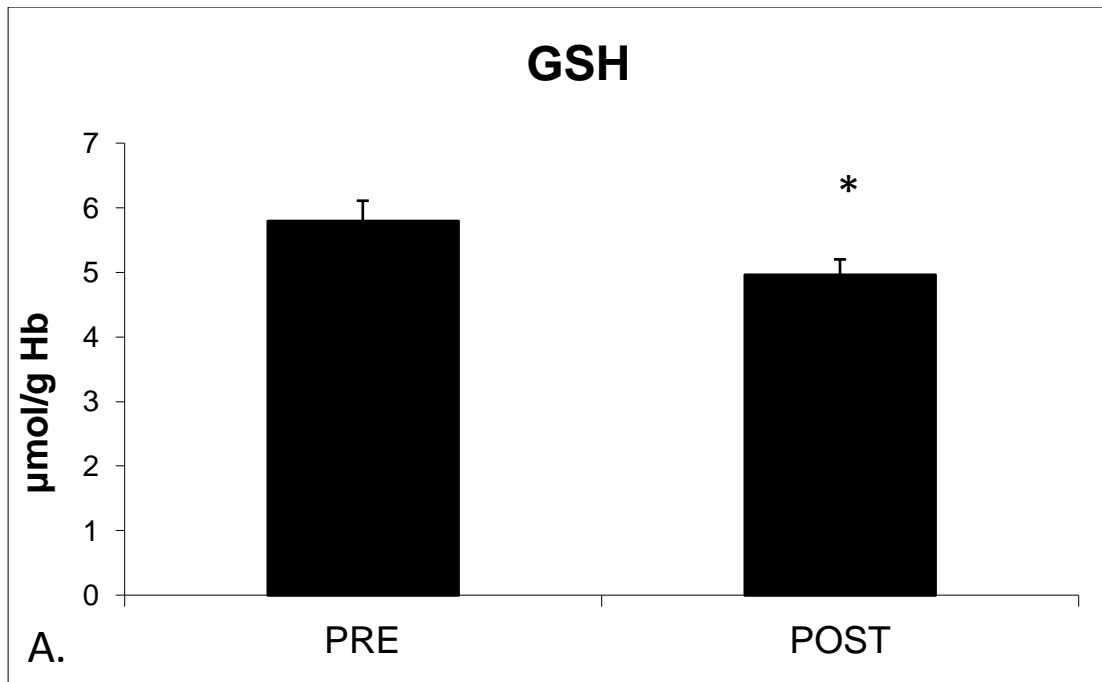
Διάγραμμα 3: Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα πριν (PRE) και μετά (POST) τον αγώνα



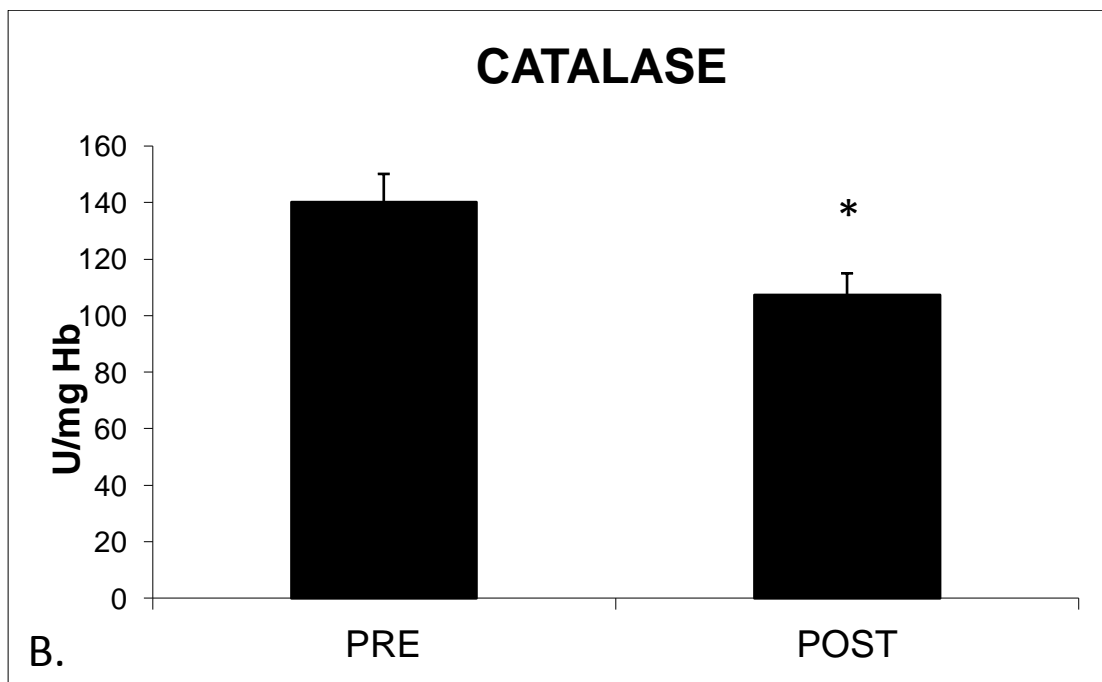
Διάγραμμα 4: Επίπεδα TAC στο πλάσμα πριν (PRE) και μετά (POST) τον αγώνα



Διάγραμμα 5 : Επίπεδα των TBARS στο πλάσμα πριν (PRE) και μετά (POST) τον αγώνα



Διάγραμμα 6 : Επίπεδα της GSH στο πλάσμα πριν (PRE) και μετά (POST) τον αγώνα



Διάγραμμα 7 : Επίπεδα καταλάσης στο πλάσμα πριν (PRE) και μετά (POST) τον αγώνα

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το οξειδωτικό στρες, η ανισορροπία δηλαδή μεταξύ της υπερπαραγωγής ROS και της αδυναμίας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας να τις αδρανοποιούν, θεωρείται μια σημαντική αιτία για διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις και ασθενειών (Halliwell 2001). Η αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ενός ατόμου με σκοπό την πρόβλεψη μιας ασθένειας ή την παρακολούθηση της προόδου μιας νόσου είναι κλινικά χρήσιμη. Άμεση μέτρηση των ROS είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί και αδύνατο σε κλινικό περιβάλλον, δεδομένου ότι αυτές οι μέθοδοι απευθείας ανιχνεύσεως των ελεύθερων ριζών (π.χ. electron spin resonance) δεν μπορούν πρακτικά να εφαρμοστούν, λόγω του υψηλού κόστους και της αστάθειας και της βραχείας διάρκειας ζωής των περισσότερων ελεύθερων ριζών. Η μέθοδος που εφαρμόζεται περισσότερο για την εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε ζωντανούς οργανισμούς είναι η αυτή της μέτρησης βιοδεικτών στο αίμα, οι οποίοι υποδεικνύουν οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες, όπως είναι γνωστό μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια (Μυλωνάς και Κουρέτας 1999, Halliwell 2001), έτσι διάφοροι βιοδείκτες για την αξιολόγηση οξειδωτικά τροποποιημένων πρωτεϊνών (π.χ. ο προσδιορισμός των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων), του DNA (π.χ. μέτρηση της 8-υδροξυ-20-δεοξυγουανοσίνης) και των οξειδωμένων λιπιδίων (π.χ. TBARS) έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη ή την παρακολούθηση ασθενειών στις οποίες εμπλέκονται οι ROS (Ogino και Wang 2007). Ωστόσο, οι εν λόγω βιοδείκτες είναι αρκετές φορές ανεπαρκείς για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες λόγω της πολυπλοκότητας με την οποία οι ROS δρουν σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διεργασίες. Επιπλέον, αρκετοί βιοδείκτες οξειδωτικού στρες παρουσιάζουν προβλήματα εξειδίκευσης, ευαισθησίας, επαναληψιμότητας, με το βαθμό της μεγάλης διακύμανσης μεταξύ διαφορετικών ατόμων και με την αιτιώδη σχέση που έχουν με τις διάφορες ασθένειες (Ho et al, 2013, Dalle-Donne et al, 2006). Επιπλέον, αρκετοί βιοδείκτες οξειδωτικού στρες έχουν περιορισμένη χρήση επειδή απαιτούν επεμβατικές μεθόδους δειγματοληψίας, δείγματα μεγάλου όγκου ή δείγματα που έχουν χαμηλή σταθερότητα κατά την αποθήκευσή τους (Dalle-Donne et al., 2006). Ως εκ τούτου, υπάρχει μία μεγάλη ανάγκη για την ανάπτυξη νέων μεθόδων για την εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε ανθρώπους.

Μια νέα μέθοδος για την *in vivo* αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης είναι το σύστημα διάγνωσης RedoxSYS, που αναπτύχθηκε από την Luoxis Diagnostics. Το RedoxSYS διαγνωστικό σύστημα μετρά το δυναμικό οξείδωσης-αναγωγής (ΔΟΑ), το οποίο αποτελεί μια ολοκληρωμένη μέτρηση της ισορροπίας μεταξύ των συνολικών οξειδωτικών (π.χ., οξειδωμένες θειόλες, ρίζες υπεροξειδίου, ρίζες υδροξυλίου, υπεροξείδιο του υδρογόνου, νιτρικό οξείδιο, το νιτρικό υπεροξείδιο και ιόντα μετάλλων), και των συνολικών αναγωγικών (π.χ., ελεύθερες θειόλες, ασκορβικό, α-τοκοφερόλη, β-καροτένιο, και ουρικό οξύ). Έτσι, το δυναμικό οξείδωσης-αναγωγής είναι ένα συνολικό μέτρο του οξειδωτικού

στρες στο οποίο υποβάλλεται ένα βιολογικό σύστημα (Harris and Hansen 2012). Το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS μετρά δύο διακριτά στοιχεία για να προσδιοριστεί το δυναμικό οξειδωσης-αναγωγής: i) το στατικό ORP (sORP) - το τυπικό δυναμικό μεταξύ ενός ηλεκτροδίου εργασίας και ενός ηλεκτροδίου αναφοράς χωρίς χορήγηση ρεύματος (ή εξαιρετικά μικρού ρεύματος), η οποία είναι ανάλογη προς την ισορροπία αναγωγικών και οξειδωτικών και είναι αυτό που ονομάζεται κλασικά ORP. Χαμηλές τιμές sORP σημαίνουν ότι το βιολογικό δείγμα είναι εντός των φυσιολογικών ορίων του οξειδωτικού στρες, ενώ οι υψηλότερες από το κανονικό τιμές sORP δείχνουν ότι το βιολογικό δείγμα παρουσιάζει υψηλότερο οξειδωτικό στρες, ii) η ORP ικανότητα (cORP) - το μέτρο του αντιοξειδωτικού αποθέματος που υπάρχει στον οργανισμό. Υψηλές τιμές cORP δείχνουν ότι το βιολογικό δείγμα έχει αντιοξειδωτικά αποθέματα σε φυσιολογικό εύρος, ενώ χαμηλότερες από τις κανονικές τιμές cORP δείχνουν ότι το δείγμα έχει χαμηλά αντιοξειδωτικά αποθέματα.

Σε άλλες μελέτες, το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS έχει χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με τραύμα. Στην παρούσα μελέτη, το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά, προκειμένου να εκτιμήσει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την εντατική άσκηση, ειδικά μετά από έναν αγώνα μαραθωνίου στο βουνό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στους συμμετέχοντες αθλητές οι τιμές sORP (δηλαδή το στιγμιαίο ισοζύγιο οξειδοαναγωγής) μετά τον αγώνα στο πλάσμα ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση με τις τιμές πριν τον αγώνα δείχνοντας την επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Σε αντίθεση με τις τιμές sORO, οι τιμές cORP (δηλαδή τα αντιοξειδωτικά αποθέματα) μετά τον αγώνα στο πλάσμα, ήταν χαμηλότερες, όπως ήταν αναμενόμενο, σε σύγκριση με τις τιμές πριν τον αγώνα, αν και η μείωση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η απουσία σπουδαιότητας στην περίπτωση της cORP μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι μερικές φορές, ειδικά κατά την άσκηση, υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες ο οργανισμός αυξάνει τα αντιοξειδωτικά μόρια ως αντισταθμιστικό μηχανισμό κατά των ελευθέρων ριζών (Kanter et al., 2003). Για την πιστοποίηση της μεθόδου, ήταν σημαντικό ότι, όπως αναμενόταν, υπήρχε σημαντική υψηλή αρνητική συσχέτιση ($r = -0.855$, $p < 0.01$) μεταξύ sORP και cORP, υποδεικνύοντας ότι σε αθλητές με το μεγαλύτερο οξειδωτικό στρες υπήρχαν χαμηλότερα αποθέματα αντιοξειδωτικών.

Εκτός από τις τιμές ORP, το οξειδωτικό στρες στους αθλητές αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας συμβατικούς βιοδείκτες οξειδωτικού στρες. Υπήρξε μια συνοχή μεταξύ των αποτελεσμάτων από τις μετρήσεις sORP και των αποτελεσμάτων από τους άλλους βιοδείκτες οξειδωτικού στρες. Δηλαδή, τα αποτελέσματα από αυτούς τους βιοδείκτες υποστήριξαν επίσης την επαγωγή του οξειδωτικού στρες μετά τον αγώνα. Ειδικά, τα TBARS, ένας δείκτης υπεροξειδωσης λιπιδίων, στο πλάσμα αυξήθηκαν σημαντικά μετά τον αγώνα. Τα λιπιδικά υπεροξειδία σχηματίζονται συνήθως από την οξειδωτική μετατροπή των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και σε αρκετές μελέτες αυξάνονται σε δρομείς μετά από αγώνα (Nikolaidis et. al 2008)

Επιπλέον, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, ένας δείκτης οξειδωσης των πρωτεϊνών, στο πλάσμα αυξήθηκαν σημαντικά μετά τον αγώνα. Η αύξηση της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών μετά την προπόνηση ή την άσκηση έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες.

Επιπλέον, σε ερυθροκυτταρικό κυτταρόλυμα, τα επίπεδα της GSH, του σημαντικότερου μη-ενζυματικού ενδοκυτταρικού αντιοξειδωτικού μορίου, μειώθηκαν σημαντικά μετά τον αγώνα. Οι περισσότερες μελέτες που ερευνούν τις επιδράσεις της οξείας αερόβιας άσκησης στην κατάσταση οξειδοαναγωγής δείχνουν ότι τα επίπεδα GSH μειώνονται τουλάχιστον εν μέρει λόγω της απενεργοποίησης του ελευθέρων ριζών για την αναγέννηση ασκορβικού οξέος και άλφα-τοκοφερόλης. Η πιο λεπτομερής μελέτη που έχει μετρήσει τα επίπεδα γλουταθειόνης μετά από αερόβια άσκηση είναι αυτή του Bloomer(2005), στην οποία τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε τέσσερις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία μείωση στα επίπεδα GSH μόνο αμέσως μετά την άσκηση, αλλά όχι στις 1, 6 και 24 ώρες.

Επιπλέον, η δραστηριότητα της καταλάσης μειώθηκε μετά τον αγώνα στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Η καταλάση, ένα ένζυμο που καταλύει την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο, είναι ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα για την προστασία του κυττάρου από ROS (Halliwell 2001). Άλλες μελέτες έχουν επίσης αναφέρει αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης μετά από άσκηση αντοχής, λόγω της παραγωγής ROS (Sureda et al., 2007).

Γενικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ήταν παρόμοια με τα αποτελέσματα από άλλες μελέτες που αποδεικνύουν ότι το τρέξιμο μεγάλων αποστάσεων προκαλεί οξειδωτικό στρες. Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η εξαντλητική άσκηση διεγείρει την παραγωγή των ROS (π.χ. λόγω της αύξησης της κατανάλωσης οξυγόνου στα μιτοχόνδρια), κυρίως από τον σκελετικό και τον καρδιακό μυ.

Επιπλέον, η σημαντική αύξηση κατά 22 φορές μετά τον αγώνα στα επίπεδα του CRP δείκτη υποστηρίζει την επαγωγή οξειδωτικού στρες στους συμμετέχοντες αθλητές. Η CRP είναι μία φλεγμονώδης πρωτεΐνη που παράγεται από το ήπαρ ως απόκριση σε αυξησεις της IL-6 και άλλων φλεγμονωδών μεσολαβητών. Πολλές μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι τα επίπεδα της CRP αυξάνονται μετά από εξαντλητική άσκηση. Αυτή η αύξηση στην CRP μπορεί εν μέρει να οφείλεται στο αυξημένο σχηματισμό ROS κατά τη διάρκεια της άσκησης, αφού οι ROS είναι ικανές να ενεργοποιούν παράγοντες μεταγραφής που είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την σύνθεση IL-6.

Από τους εξεταζόμενους βιοδείκτες οξειδωτικού στρες, μόνο η αύξηση της TAC μετά τον αγώνα έδειξε μια αύξηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να έρχεται σε αντίθεση με την επαγωγή οξειδωτικού στρες που προτείνεται από τους άλλους δείκτες. Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν επίσης αναφερθεί σε αύξηση της TAC μετά την άσκηση, η οποία εξηγείται ως αντισταθμιστικός μηχανισμός για την αντιμετώπιση της άσκησης που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, πιστεύουμε ότι η αύξηση της TAC μετά την άσκηση δείχνει την ανεπάρκεια αυτής της μεθόδου για την αξιολόγηση in vivo του οξειδωτικού στρες. Δηλαδή, στις περισσότερες περιπτώσεις, ο προσδιορισμός της TAC βασίζεται στην αναγωγή μιας ελεύθερης ρίζας (π.χ. DPPH) από τα αντιοξειδωτικά μόρια στο πλάσμα. Έτσι, η μέθοδος αυτή είναι ατελής, καθώς βασίζεται μόνο στα αναγωγικά μόρια που βρίσκονται στο πλάσμα. Ωστόσο, η οξειδοαναγωγική κατάσταση βασίζεται όχι μόνο στην ποσότητα των αναγωγικών, αλλά και των οξειδωτικών παραγόντων στο πλάσμα. Για το λόγο αυτό, η μέτρηση sORP μπορεί να είναι μία καλύτερη μέθοδος από την TAC ως

μια ολιστική προσέγγιση για την in vivo αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, αφού η sORP βασίζεται στην αξιολόγηση τόσο των αναγωγικών όσο και των οξειδωτικών στο πλάσμα.

Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι η ανάλυση συσχέτισης έδειξε ότι οι αλλαγές στους περισσότερους από τους εξετασθέντες βιοδείκτες δεν συσχετίζονται μεταξύ τους. Όπως αναφέρθηκε, υπήρχε μόνο μια υψηλή σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της sORP και της cORP, καθώς και μια μέτρια αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της GSH και CRP ($r = 0,622$, $p < 0,05$). Η τελευταία συσχέτιση μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η μείωση GSH οδηγεί σε αύξηση των ROS που με τη σειρά τους προκαλούν φλεγμονή. Η απουσία συσχέτισης μεταξύ των άλλων δεικτών μπορεί να οφείλεται στις πολύπλοκες διαδικασίες με τις οποίες οι ROS οξειδώνουν τα διάφορα βιομόρια, στις διαφορές μεταξύ διαφορετικών ατόμων στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άμυνας καθώς και σε άλλους παράγοντες (π.χ. διαίτα) που επηρεάζουν το οξειδωτικό στρες.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που αποδεικνύει ότι το δυναμικό οξειδωσης-αναγωγής, όπως μετράται με το σύστημα διάγνωσης RedoxSYS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται μετά από άσκηση σε αθλητές. Είναι σημαντικό η μέτρηση του δυναμικού οξειδωσης-αναγωγής να πιστοποιηθεί ως μια αξιόπιστη εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, δεδομένου ότι είναι μια ολιστική προσέγγιση, ελάχιστα επεμβατική, γρήγορη και απαιτεί μικρό όγκο δείγματος. Φυσικά, απαιτούνται περισσότερες μελέτες στις οποίες θα χρησιμοποιούνται διαφορετικά είδη και πρωτόκολλα άσκησης για την επιβεβαίωση ότι η μέτρηση ORP μπορεί να χρησιμοποιηθεί αξιόπιστα για την παρακολούθηση του οξειδωτικού στρες μετά από άσκηση, καθώς και για την αντιοξειδωτική ικανότητα (με ή χωρίς τη χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων) των αθλητών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης σπιρουλίνας σε δείκτες οξειδωτικού στρες έπειτα από έκκεντρη άσκηση, διπλωματική εργασία, Γκουτζουρέλας Νικόλαος (2012)
2. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25 (2): 218-24. Ajmani, R.S., Fleg. J.L., Demehin, A.A., Wright, J.G., O'Connor, F., Heim, J.M., Tarien, E., and Rifkind, J.M. Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2003; 28: 29-40.
3. Ashton T, Rowlands CC, Jones E, et al. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol* 1998; 77(6): 498-502.
4. Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Leeuwenburgh C. *Free Rad. Biol. Med.* 2000, 29 (suppl. 1), 531.
5. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107: 1198-205. Halliwell B., (2001), *Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease*, Encyclopedia of Life Science Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry*.
6. Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV, Sastre J, Vina J, Garcia-del-Moral L. Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA* 289:2503-2504; 2003.
7. Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20(2): 55-9.
8. Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003;89(1):14-20.
9. Halliwell B., (2001), *Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease*, Encyclopedia of Life Science
10. Halliwell B and Gutteridge JMC, "Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview", in Parker L, Glazer AN , *Methods in Enzyme bgy* 186, 1990. Inal M, Akyuz F, Turgut A, et al. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33(4):564-7.
11. Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5:156 70.
12. Ji LL. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol.*
13. Kayatekin BM, Gonenc S, Acikgoz O, et al. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur J Appl Physiol* 2002;87(2):141-4. *Med.* 222:283-292.

14. Kouretas D, Stagos D et al, 2015 A new method for assessing redox status: Application in strenuous exercise-induced oxidative stress
15. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem.* 2001 Jun;8(7): 829-38.
16. Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, and Belcastro AN. 1987. Are indices of free radical damage related to exercise intensity? *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 1987; 56(3):313-6. Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radical Biology and Medicine* 2001; 31: 911-922.
17. Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis, Y, Papassotiropoulos I, Kouretas D. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 39:1107-1113; 2007.
18. Mylonas C, and Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*.13: 295-309. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandalis A, Balamitsi V, Koutedakis Y, and Kouretas D. 2006. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc.* 38: 1443-1450.
19. Palazzetti S, Richard MJ, Favir A. Overload training increase exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol* 2003; 28(4):588-604. Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Morrow JD. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol.* 2003; 89: 100-107.
20. Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, and Ohno, H. (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol* 72:189-194. Sen, C.K., 1997. Nutritional biochemistry of glutathione. *Nutritional Biochemistry* 8, 660–672. Stadtman, E.R., and Levine, R.L. Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000;899: 191-208.
21. Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, et al. Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defences. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(3): 509-13.
22. Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, Kouretas D. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008; 33: 1140-54.