

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ
ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ RedoxSYS ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΕΠΑΓΩΓΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΜΕ ΕΚΚΕΝΤΡΗ
ΑΣΚΗΣΗ

ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS USING RedoxSYS
DIAGNOSTIC SYSTEM AFTER ECCENTRIC EXERCISE IN
HUMANS

Ντόντου Αμαλία Μαρία

Λάρισα 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

- 1.1 Ελεύθερες ρίζες
- 1.2 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών
- 1.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί
- 1.4 Οξειδωτικό στρες
- 1.5 Άσκηση και οξειδωτικό στρες
- 1.6 Έκκεντρη άσκηση
- 1.7 Διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS
- 1.8 Τρόπος λειτουργίας του RedoxSYS

ΣΚΟΠΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 2.1 Συμμετέχοντες
- 2.2 Πρωτόκολλο έκκεντρης άσκησης
- 2.3 Αξιολόγηση του πόνου των μυών από τους συμμετέχοντες
- 2.4 Μυϊκή βλάβη
- 2.5 Συλλογή αίματος και επεξεργασία
- 2.6 Αξιολόγηση του sORP και cORP με το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS
- 2.7 Αξιολόγηση TAC, TBARS, GSH, καταλάση και πρωτεϊνικών καρβονυλίων

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

- 5.1 Επεξεργασία του αίματος μετά από αιμοληψία για τον προσδιορισμό δεικτών οξειδωτικού στρες
- 5.2 Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Θεωρείται πλέον δεδομένο ότι η έκκεντρη άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες. Υπάρχουν όμως μεγάλες διαφορές μεταξύ των ατόμων μετά από την έκκεντρη άσκηση και έτσι έχει προκύψει η ανάγκη για εύρεση κατάλληλων δεικτών που να προβλέπουν την σοβαρότητα του οξειδωτικού στρες που προκαλείται. Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί αν η χρήση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού ORP, όπως υπολογίζεται από το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS στο πλάσμα, μπορεί να αποτελέσει έγκυρο δείκτη για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες που προκαλεί η έκκεντρη άσκηση. Στο πείραμα συμμετείχαν 19 εθελοντές που εκτέλεσαν έκκεντρη άσκηση με έκταση του γόνατος. Συλλέχθηκε αίμα πριν, 24, 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση. Παράλληλα με τις μετρήσεις του οξειδοαναγωγικού δυναμικού ελέγχθηκαν και πιο άλλοι δείκτες οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα μετρήθηκαν τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβουτιρικό οξύ, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η δραστικότητα της καταλάσης και η συγκέντρωση της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα. Όταν οι συμμετέχοντες εξετάστηκαν ως μία ομάδα, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές σε κανένα δείκτη μετά την άσκηση. Παρατηρήθηκε ωστόσο ότι στους 11 συμμετέχοντες υπήρξε μεγάλη αύξηση του αποθέματος των αντιοξειδωτικών (cORP) μετά την άσκηση ενώ στους υπόλοιπους 8 υπήρξε σημαντική μείωση. Έτσι, οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Μία ομάδα χαμηλού cORP, τα άτομα που παρουσιάζουν σημαντική μείωση της τιμής cORP μετά την άσκηση και στην ομάδα υψηλού cORP, τα άτομα που παρουσιάζουν σημαντική αύξηση. Επιπλέον, μόνο στην ομάδα χαμηλής cORP υπήρξε μια σημαντική αύξηση στην υπεροξείδωση των λιπιδίων μετά την άσκηση υποδηλώνοντας την επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι υψηλές μειώσεις των τιμών cORP μετά την άσκηση μπορεί να υποδεικνύουν την επαγωγή του οξειδωτικού στρες από την έκκεντρη άσκηση, ενώ μεγάλες αυξήσεις των τιμών cORP μετά την άσκηση μπορεί να υποδεικνύουν τη μη ύπαρξη οξειδωτικού στρες.

ABSTRACT

It has been established that eccentric exercise induces oxidative stress. However there are large variations in the levels of oxidative stress between different individuals after eccentric exercise which emphasizes the need to define appropriate markers to predict the severity of oxidative stress caused. The aim of the present study was to investigate the use of oxidation-reduction potential markers (ORP) as measured by the RedoxSYS Diagnostic System in plasma, for assessing eccentric exercise-induced oxidative stress. Nineteen volunteers performed eccentric exercise with the knee extensors. Blood was collected before, immediately post-exercise, 24, 48 and 72 h post-exercise. Moreover, common redox biomarkers were measured, which were protein carbonyls, thiobarbituric acid reactive substances, total antioxidant capacity in plasma, and catalase activity and glutathione levels in erythrocytes. When the participants were examined as one group, there were not significant differences in any marker post-exercise. However, in 11 participants there was a high increase in cORP post-exercise, while in 8 participants there was a high decrease. Thus, the participants were divided in low cORP group exhibiting significant decrease in cORP post-exercise and in high cORP group exhibiting significant increase. Moreover, only in the low cORP group there was a significant increase in lipid peroxidation post-exercise suggesting induction of oxidative stress. The results suggested that high decreases in cORP values post-exercise may indicate induction of oxidative stress by eccentric exercise, while high increases in cORP values post-exercise may indicate no existence of oxidative stress.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

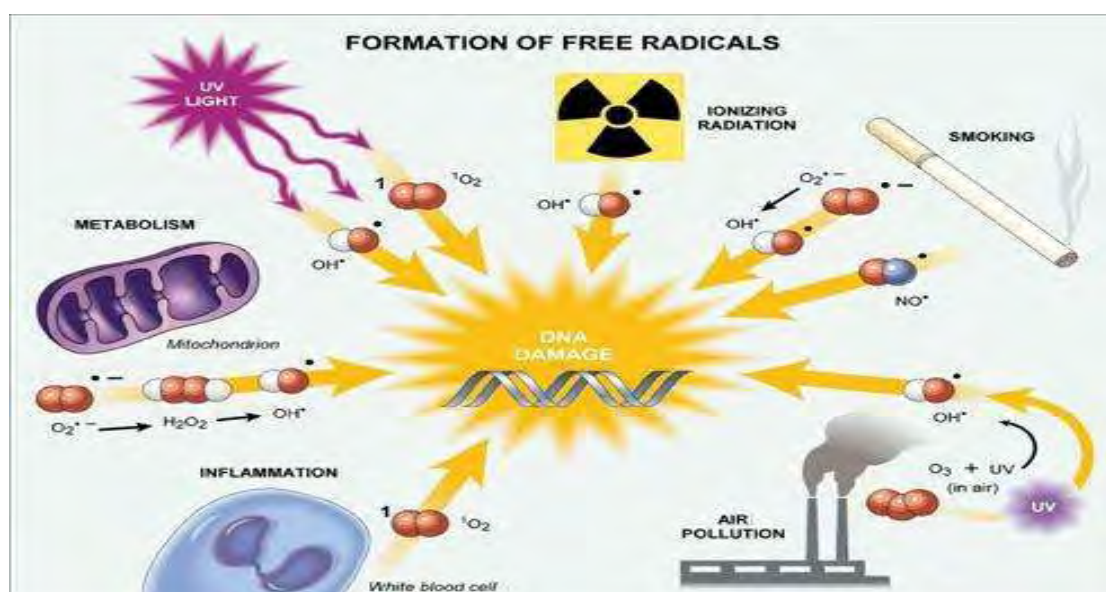
Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Jenkins, 1988). Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ ασταθή μόρια με σύντομη διάρκεια ζωής αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, αποσπώντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο για να ζευγαρώσουν το δικό τους. Τα παρακείμενα μόρια μετατρέπονται έτσι τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες και με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται η μοριακή τάξη και ξεκινά μία αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη (J. G. Salway, 2006). Ο σχηματισμός των ελεύθερων ριζών μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους. Ο πιο σύνηθες τρόπος για τα βιολογικά συστήματα είναι με οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Ο άλλος τρόπος είναι με ομοιοπολική διάσπαση δηλαδή ένας ομοιοπολικός δεσμός θα διασπαστεί και είτε το ζεύγος ηλεκτρονίων θα παραμείνει στο μητρικό μόριο και θα σχηματιστούν δύο ιόντα, είτε θα διαχωριστεί και θα δημιουργηθούν δύο ρίζες. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου ενώ στο εσωτερικό των κυττάρων οι πιο συνήθεις ρίζες είναι οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) στις οποίες ανήκουν οι ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), αλκοξειδίου (RO^{\cdot}) και υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot}). Επίσης στο εσωτερικό των κυττάρων συνήθης είναι και η ρίζα NO^{\cdot} .

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες. Όμως η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών προέρχεται από τον μεταβολισμό και συγκεκριμένα από τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Κατά την παραγωγή ATP κάποια ηλεκτρόνια δύναται να διαφύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών κυρίως με τη μορφή ROS. Η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης και η αναγωγή της ουβικινόνης-κυτόχρωμα c είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 (Chance et al., 1979). Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και το $FADH_2$ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\cdot-}$ (Chance et al., 1979). Το $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD).

Κατά την άσκηση έχει παρατηρηθεί ότι η παραγωγή ελευθέρων ριζών αυξάνεται (Μούγιος, 2008). Στην έντονη άσκηση έχουμε αυξημένες απαιτήσεις σε οξυγόνο και σε αυτές τις συνθήκες η αιμοσφαιρίνη, που μεταφέρει το οξυγόνο στα

κύτταρα, μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει σε παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ (Cooper et al., 2002). Άλλες ενδογενείς πηγές είναι οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις και ενεργοποιημένα φαγοκύτταρα.

Όπως προαναφέρθηκε οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να οφείλονται και σε εξωγενείς παράγοντες. Σε αυτούς περιλαμβάνονται η UV και η ιονίζουσα ακτινοβολία, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός από το τσιγάρο, τα βιομηχανικά απόβλητα αλλά και ουσίες όπως τοξίνες, φάρμακα, εντομοκτόνα αλκοόλ κ.α.



Εικόνα 1. Ενδογενείς και εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.2 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 το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων και κυτταρικών δομών, συμπεριλαμβανομένων των λιπιδίων και των μεμβρανών, των πρωτεϊνών και του DNA. Σε χαμηλές όμως συγκεντρώσεις των ROS και RNS (π.χ ρίζες υπεροξειδίου και οξειδίου του αζώτου) φαίνονται τα ευεργετικά για τον οργανισμό αποτελέσματα. Σε αυτά περιλαμβάνονται η άμυνα του οργανισμού απομακρύνοντας αντιγόνα με τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, ενώ έχουν συμμετοχή στη σηματοδότηση των κυττάρων αλλά και στη μυϊκή συστολή. Ο «διπρόσωπος» χαρακτήρας των ROS είναι καλά τεκμηριωμένος. Έρευνες δείχνουν ότι οι ROS δρουν ως δευτερογενείς αγγελιοφόροι που επάγουν και διατηρούν τον

ογκογόνο φαινότυπο των καρκινικών κυττάρων. Ωστόσο, οι ROS μπορούν επίσης να επάγουν την κυτταρική γήρανση και την απόπτωση και συνεπώς μπορούν να έχουν αντι-ογκογόνο δράση.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η αρνητική δράση των ελευθέρων ριζών σε λιπίδια και πρωτεΐνες. Όσον αφορά τα λιπίδια είναι γνωστό πως είναι ευαίσθητα στην οξείδωση. Όλες οι μεμβράνες του οργανισμού αποτελούνται από λιπίδια και κυρίως από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), η οξείδωση των οποίων είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξειδωσης και οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου ROO^{\bullet} , συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεύδης (MDA). Η οξείδωση των λιπιδίων των μεμβρανών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητάς τους και μπορεί να οδηγήσει και στη λύση των κυττάρων.

Όσον αφορά τις πρωτεΐνες μπορούν να οξειδωθούν από τις ελεύθερες ρίζες και κυρίως τις ROS (π.χ OH^{\bullet}) με αποτέλεσμα να τροποποιηθεί η δομή τους και η λειτουργία τους ή και να γίνουν πιο ευαίσθητες στην πρωτεόλυση. Αν οι πρωτεΐνες που οξειδώνονται δεν είναι δομικές αλλά έχουν λειτουργία ενζύμου μπορεί να παρεμποδιστεί η λειτουργία τους και αυτό να έχει σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργία του κυττάρου. Όταν οι πρωτεΐνες οξειδώνονται δημιουργούνται πρωτεϊνικά καρβονύλια και οξειδωμένα αμινοξέα που χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού στρες.

1.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων. Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Γιαννακοπούλου, 2009).

Οι οργανισμοί για να προστατευτούν από τις βλαβερές επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών, έχουν αναπτύξει μια σειρά από προστατευτικούς μηχανισμούς. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν σε προληπτικούς μηχανισμούς, σε μηχανισμούς επιδιόρθωσης, σε φυσικά μέτρα προστασίας και σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς.

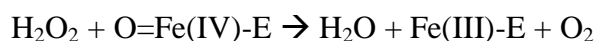
Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα αντιοξειδωτικά που διασπών τις αλυσιδωτές αντιδράσεις και τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν τα μεταβατικά μέταλλα.

A) Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Η δράση τους είναι να καταλύουν τη διάσπαση των ROS. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν η καταλάση (CAT), την οποία μελετήσαμε στην παρούσα εργασία, υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPxs), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), ένζυμα της οδού της φωσφορικής πεντόζης, , υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης και αναγωγή της θειορεδοξίνης.

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση απαντά στα αερόβια βακτήρια, στους μύκητες, στα κύτταρα των φυτών και των ζώων. Εντοπίζεται στα υπεροξεισώματα αλλά και στα μιτοχόνδρια της καρδιάς. Δεν ανευρίσκεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων άλλων ιστών. Καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ύδωρ και οξυγόνο. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει ένα εκατομμύριο μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου κάθε λεπτό (Γιαννακοπούλου). Είναι ένα τετραμερές με πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H₂O₂. Η αντίδραση διάσπασής του πραγματοποιείται σε δύο στάδια.



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

Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (GPxs)

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης καταλύουν την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων, χρησιμοποιώντας ως αναγωγική ουσία τη γλουταθειόνη (GSH). Κατά την διάρκεια της αντίδρασης η γλουταθειόνη οξειδώνεται: $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$. Αν και η αναγωγή του H₂O₂ γίνεται και από την καταλάση, τα σχετικά επίπεδα GPxs και καταλάσης

διαφέρουν από ιστό σε ιστό. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο εγκέφαλος έχει πολύ χαμηλά επίπεδα δραστικότητας καταλάσης και υψηλά επίπεδα δραστικότητας *GPxs*, ενώ το ήπαρ έχει υψηλά επίπεδα και των δύο ενζύμων (Jamieson DJ, 1998). Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο μορφές του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. η μία μορφή εξαρτάται από το σελήνιο *GPxs*, ενώ η άλλη είναι ανεξάρτητη του σεληνίου (glutathione S-transferase GST). Αυτές οι δύο μορφές διαφέρουν ως προς τον αριθμό των υπομονάδων, τη φύση του δεσμού με το σελήνιο στο ενεργό κέντρο, καθώς και ως προς τους μηχανισμούς κατάλυσης.

Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Τόσο η ενζυμική (διά των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης) όσο και η μη ενζυμική αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών από την αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH) οδηγεί σε παραγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG). Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σαν 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.

Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 . Αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά ενδοκυττάρια συστήματα. Το ένζυμο απομονώθηκε πρώτη φορά το 1939 αλλά μόλις το 1969 αποδείχτηκε η αντιοξειδωτική του δράση από τους McCord και Fridovich. Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί τρεις μορφές SOD, η κυτταροπλασματική CuZn- SOD, η μιτοχονδριακή MnSOD και η εξωκυττάρια SOD. Η SOD εξουδετερώνει τις $O_2^{\cdot-}$ με απίστευτα υψηλές ταχύτητες αντίδρασης.

B) Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά και αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Όταν μια δραστική ρίζα αντιδρά με ένα μόριο παράγονται δευτερογενείς ρίζες, που με τη σειρά τους μπορούν να αντιδράσουν με άλλους στόχους και να έχουμε παραγωγή ακόμη περισσότερων ριζών. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί η

αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Η αντίδραση αυτή μπορεί να σταματήσει όταν δύο ρίζες ενωθούν μεταξύ τους ή εξουδετερωθούν από τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν υδατοδιαλυτά και λιποδιαλυτά μικρά μόρια όπως η γλουταθειόνη, η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, τα καροτενοειδή και το σελήνιο.

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτιδίο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Αποτελεί την κύρια αντιοξειδωτική θειόλη και τον κύριο ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης καθώς έχει αναγωγικές και νουκλεόφιλες ιδιότητες (Masella R, 2005).

Απαντά είτε ως αναχθείσα (GSH) είτε ως οξειδωμένη (GSSG) μορφή και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αναστρέψιμης οξείδωσης της ενεργού θειόλης της (Jamieson DJ, 1998). Σε κύτταρα που δεν έχουν υποβληθεί σε stress, το μεγαλύτερο μέρος (99%) αυτού του οξειδοαναγωγικού ρυθμιστή βρίσκεται σε αναχθείσα μορφή. Η ενδοκυττάρια συγκέντρωση της γλουταθειόνης κυμαίνεται ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου και απαντά σε αφθονία στο κυτταρόπλασμα (0,5–11 mM), στον πυρήνα (3–15 mM) και στα μιτοχόνδρια (5–11 mM), όπου αποτελεί και την κύρια διαλυτή αντιοξειδωτική ουσία (Arrigo AP, 1999).

Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτή και απαντά σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η α-τοκοφερόλη είναι η πλέον δραστική μορφή της βιταμίνης E στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Η κύρια αντιοξειδωτική της δράση αφορά στην προστασία κατά της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (Γιαννακολούλου, 2009).

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C είναι υδατοδιαλυτή και ο κύριος ρόλος της είναι η συμμετοχή στη σύνθεση του κολλαγόνου. Επίσης, συμβάλλει στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και διευκολύνει την απορρόφηση άλλων θρεπτικών συστατικών, όπως η βιταμίνη E και το σελήνιο (Γιαννακοπούλου, 2009). Έχει πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και μπορεί να εξουδετερώσει άμεσα της ενεργές μορφές οξυγόνου.

Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι χρωστικές των φυτών και άλλων μικροοργανισμών αλλά δε μπορούν να συνθέσουν τα ζώα. Δίνουν το κόκκινο, το κίτρινο και το πορτοκαλί χρώμα στα φρούτα και τα λαχανικά όπως για παράδειγμα το πορτοκαλί στα καρότα. Στη φύση απαντούν περίπου 600 καροτενοειδή και ταξινομούνται στα καροτένια, τα ξανθόφιλα (περιέχουν οξυγόνο) και το λυκοπένιο (Edge R,1997). Στα καροτένια ανήκει και η β-καροτίνη, ένα λιποδιαλυτό μόριο των κυτταρικών μεμβρανών. Πιστεύεται ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Επίσης παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και ο σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ως συμπάροντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.4 Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών του κυττάρου και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε σε ανεπάρκεια των κυτταρικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Γιαννακοπούλου,2008). Η εμφάνισή του μπορεί να οφείλεται σε ενδογενείς αλλά και σε εξωγενείς παράγοντες. Το οξειδωτικό στρες ενοχοποιείται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων καθώς και στη διεργασία της γήρανσης, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον η προσπάθεια φαρμακολογικής τροποποίησης της απόκρισης των οργανισμών στο οξειδωτικό στρες.

1.5 Άσκηση και οξειδωτικό στρες

Η άσκηση μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες αυξάνοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών με διάφορους τρόπους. 2 με 5% του οξυγόνου που χρησιμοποιείται στα μιτοχόνδρια μετατρέπεται σε ROS. Καθώς η οξειδωτική φωσφορυλίωση αυξάνεται, ως απόκριση προς την άσκηση, θα υπάρχει και ταυτόχρονη αύξηση των ελευθέρων ριζών. Επίσης οι κατεχολαμίνες που απελευθερώνονται κατά την διάρκεια της άσκησης μπορούν να οδηγήσουν σε παραγωγή ελευθέρων ριζών. Άλλες πηγές ελευθέρων ριζών είναι η οξειδάση της ξανθίνης και η NAD(P)H οξειδάση αλλά και δευτερεύουσες πηγές όπως τα μακροφάγα που ενεργοποιούνται για να επιδιορθώσουν τους κατεστραμμένους ιστούς. Παρ' όλ' 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 and Clarkson, 2003).

Η άσκηση και το οξειδωτικό στρες αποτελούν αντικείμενο μελέτης από την δεκαετία του 1980. Πανεπιστήμια και ερευνητικά κέντρα στο εξωτερικό αλλά και στην Ελλάδα μελετάνε την επίδραση αερόβιας και αναερόβιας άσκησης στο οξειδωτικό στρες και τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού. 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.

Πιο συγκεκριμένα, η αερόβια άσκηση (τρέξιμο, ποδηλασία, κολύμπι) έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών στους σκελετικούς μυς και την καρδιά (Davies, Quintanilla 1992; Kumar, et al., 1992). Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξαν και έρευνες στην αναερόβια άσκηση. Όμως και στην διαλειμματική άσκηση στην οποία εμπεριέχονται ομαδικά αθλήματα όπως το ποδόσφαιρο και το μπάσκετ έχει βρεθεί αυξημένη παραγωγή οξειδωτικού στρες (Svensson et al., 2002).

Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την άσκηση επηρεάζει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των ασκούμενων. Στην περίπτωση της αερόβιας άσκησης φαίνεται πως αυξάνεται η συγκέντρωση τόσο των ενζυμικών όσο και των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών (Inal, Akyuz, Turgut, 2001). Στην αναερόβια άσκηση τα αποτελέσματα δεν είναι τόσο ξεκάθαρα. Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά αυξάνονται ή

μειώνονται, ανάλογα με την ένταση της άσκησης (Criswell et al., 1993), ενώ τα μη ενζυμικά ισχυροποιούνται (Groussard et al.2003).

1.6 Έκκεντρη άσκηση και οξειδωτικό στρες

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, 1997).

Είναι γνωστό ότι η έκκεντρη άσκηση προκαλεί βλάβη στις ίνες των σκελετικών μυών με ένα συγκεκριμένο τρόπο (Friden and Lieber, 2001). Στην έναρξη αλλά και στην εξέλιξη της βλάβης αυτής έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) (Silva et al.,2010,2011). Η παραγωγή ROS κατά τη διάρκεια μιας εκτεταμένης περιόδου έκκεντρης άσκησης έχει αποδοθεί σε διαφορετικούς μηχανισμούς όπως στην παραγωγή ξανθίνης και οξειδάσης του NADPH, στο φαινόμενο της ισχαιμίας- επαναιμάτωσης, στο μεταβολισμό προστανοειδών και κατεχολαμινών, στη διάσπαση πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο, και στην υπερβολική συσσώρευση του ασβεστίου (McHugh et al.,1999). Επιπλέον, η διήθηση των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων στο σημείο της βλάβης (Beaton et al., 2002) μετά την έκκεντρη άσκηση απελευθερώνει ROS (Chiang et al.,2009) που καταστρέφουν και το μυϊκό ιστό (Silva et al., 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). Οι διαφορές αυτές επιβάλλουν την ανάγκη για εύρεση κατάλληλων δεικτών ώστε να μπορούσε να προβλεφθεί η σοβαρότητα του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από την έκκεντρη άσκηση. Σε προηγούμενες μελέτες του τμήματος (Nikolaidis et al.,2008, Paschalis et al., 2007) καθώς και σε άλλες μελέτες, έχουν αναφερθεί αυξήσεις σε δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα μετά από έκκεντρη άσκηση (Childs et al.,2001, Close et al., 2004, Lee et al.,2002). Για παράδειγμα, η έκκεντρη άσκηση έχει δειχθεί ότι αυξάνει τα επίπεδα MDA, πρωτεϊνικών καρβονυλίων και F2-ισοπροστανίου (Nikolaidis et al., 2008, Childs et al., 2001, Lee et al.,2002) ενώ μειωμένα ήταν τα

επίπεδα της γλουταθειόνης (Margaritelis et al., 2014, Nikolaidis et al., 2008). Ωστόσο, οι περισσότεροι από αυτούς τους δείκτες αξιολογούν μια συγκεκριμένη βλάβη που προκαλείται από ROS, και έτσι προκύπτει η ανάγκη για δείκτες που θα μπορούσαν να μετρήσουν τη συνολική κατάσταση οξειδοαναγωγής ενός ατόμου μετά από έκκεντρη άσκηση.

1.7 Διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS

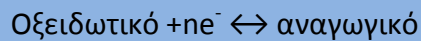


Εικόνα 2. Το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS

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 (π.χ. οξειδωμένες θειόλες, ρίζα υπεροξειδίου, ρίζα υδροξυλίου, υπεροξείδιο του υδρογόνου και νιτρικό υπεροξείδιο) και των συνολικών αναγωγικών (π.χ. ελεύθερες θειόλες, ασκορβικό, α -τοκοφερόλη, β -καροτένιο και ουρικό οξύ). Συνεπώς το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (ORP) είναι ένα συνολικό μέτρο του οξειδωτικού στρες ενός οργανισμού (Harris and Hansen, 2012). Το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS επιτρέπει μια ισχυρή και γρήγορη εκτίμηση του οξειδωτικού στρες μετρώντας, μέσω μιας σταγόνας αίματος, μέσα σε τέσσερα περίπου λεπτά, δύο διαφορετικά στοιχεία για τον προσδιορισμό του ORP. Το ένα είναι το στατικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (sORP) και το άλλο η χωρητικότητα οξειδοαναγωγικού δυναμικού (capacity ORP ή cORP).

1.8 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. E_0 είναι το τυπικό δυναμικό ενός οξειδοαναγωγικού συστήματος μετρημένο σε σχέση με ένα ηλεκτρόδιο υδρογόνου, η οποία αποδίδεται αυθαίρετα μία E_0 ίση με 0 volts, και n είναι ο αριθμός των ηλεκτρονίων που μεταβιβάζεται.

Στατικό ORP (sORP) είναι το πρότυπο δυναμικού μεταξύ ενός ηλεκτροδίου εργασίας και ενός ηλεκτροδίου αναφοράς χωρίς παροχή ρεύματος (ή με εξαιρετικά μικρό ρεύμα), το οποίο είναι ανάλογο με την ισορροπία των αναγωγικών και οξειδωτικών και είναι αυτό που κλασικά ονομάζεται ORP (δηλαδή τρέχουσα ισορροπία των οξειδωτικών και αναγωγικών σε ένα βιολογικό δείγμα). Χαμηλή sORP τιμή σημαίνει ότι το βιολογικό δείγμα είναι στα φυσιολογικά επίπεδα οξειδωτικού στρες, ενώ υψηλότερες από τις κανονικές τιμές sORP σημαίνει ότι το βιολογικό δείγμα είναι σε υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες.

Η χωρητικότητα- capacity ORP (cORP) είναι το αποθεματικό των διαθέσιμων αντιοξειδωτικών στο σώμα. Υψηλές τιμές cORP δείχνουν ότι το αντιοξειδωτικό απόθεμα του οργανισμού είναι σε φυσιολογικό εύρος. Αντίθετα, χαμηλότερες από τις φυσιολογικές τιμές cORP δείχνουν ότι το δείγμα έχει κάτω από το φυσιολογικό απόθεμα αντιοξειδωτικών.

Ειδικότερα, το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS μετρά το ORP με ένα σύστημα τριών ηλεκτροδίων, ένα ηλεκτρόδιο εργασίας, ένα αντίθετο ηλεκτρόδιο και ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς. Αρχικά, μια αμελητέα ποσότητα ρεύματος εφαρμόζεται μεταξύ των ηλεκτροδίων εργασίας και μέτρησης και μετράται το ORP μεταξύ των ηλεκτροδίων εργασίας και αναφοράς. Μόλις η ανάγνωση του ORP φθάσει σε ισορροπία, βρίσκεται το στατικό ORP (sORP) και μετριέται σε millivolt (mV). Στη συνέχεια, εφαρμόζεται στο δείγμα ένα γραμμικά αυξανόμενο ρεύμα, μεταξύ των ηλεκτροδίων εργασίας και μέτρησης. Ο χρόνος από την έναρξη της τρέχουσας σάρωσης έως το μέγιστο ρυθμό μεταβολής του ORP, αναφέρεται ως χρόνος μετάβασης και το ενσωματωμένο ρεύμα ως αυτή τη στιγμή είναι το cORP μετρούμενο σε microcoulombs (μC).

ΣΚΟΠΟΣ

Σε μια προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου αποδείχτηκε ότι το RedoxSYS είναι ένα διαγνωστικό σύστημα που μπορεί να αξιολογήσει αποτελεσματικά το οξειδωτικό στρες που επάγεται μετά από ένα μαραθώνιο αγώνα τρεξίματος.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί αν οι δείκτες που βασίζονται στη μέτρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (ORP) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη του συνολικού οξειδωτικού στρες που προκαλείται από την έκκεντρη άσκηση. Για το λόγο αυτό η αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες έγινε και με «συμβατικούς» δείκτες του οξειδωτικού στρες, όπως η γλουταθειόνη (GSH), η δραστητικότητα της καταλάσης, ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB) και η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Τέλος οι τιμές ORP συγκρίθηκαν με τους «συμβατικούς» δείκτες οξειδωτικού στρες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συμμετέχοντες

Στην πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας συμμετείχαν δεκαεννέα νέοι εθελοντές (ηλικία: $24,4 \pm 4,0$ χρόνια, ύψος: $168,6 \pm 7,5$ cm και βάρος: $69,4 \pm 4,0$ kg). Αποκλείστηκαν από τη μελέτη τα άτομα που είχαν κάποιο ιστορικό μυοσκελετικό τραυματισμό στα κάτω άκρα που περιόριζαν τη δυνατότητα να εκτελεστεί το πρόγραμμα της άσκησης. Το κάπνισμα και η κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής τους τελευταίους τρεις μήνες πριν από την έναρξη της μελέτης ήταν επίσης κριτήριο αποκλεισμού. Κατά την πρώτη τους επίσκεψη, μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5 kg η μάζα σώματος (δοκός ισορροπίας 710, Seca, Ηνωμένο Βασίλειο), ενώ οι εθελοντές ήταν ελαφρά ντυμένοι και ξυπόλητοι. Το ύψος τους μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5 cm (Υψόμετρο 208, Seca).

Οι εθελοντές είχαν εντολή να απέχουν από οποιαδήποτε έντονη άσκηση κατά τη διάρκεια της συμμετοχής τους στη μελέτη, καθώς και για πέντε ημέρες πριν και 3 μέρες μετά τη συνεδρία άσκησης. Τα άτομα ενθαρρύνονται επίσης να μην πάρουν αντι-φλεγμονώδη ή αναλγητικά φάρμακα για όλη τη διάρκεια της μελέτης. Λήφθηκε η γραπτή συγκατάθεση από όλους τους συμμετέχοντες, αφού ενημερώθηκαν για τους κινδύνους, ταλαιπωρίες και τα οφέλη της συμμετοχής στη μελέτη. Οι διαδικασίες ήταν, σύμφωνα με τη δήλωση του Ελσίνκι του 1975, όπως αναθεωρήθηκε το 2000.

2.2 Πρωτόκολλο έκκεντρης άσκησης

Η συνεδρία έκκεντρης άσκησης πραγματοποιήθηκε σε ένα ισοκινητικό δυναμόμετρο (Cybex Norm, Ronkonkoma, NY). Τα πρωτόκολλα άσκησης έγιναν από την καθιστή θέση (120° γωνία ισχίου), αφού οι συμμετέχοντες είχαν σταθεροποιηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι συμμετέχοντες συμπλήρωσαν 5 σετ των 15 μέγιστων έκκεντρων συστολών (γόνατο εύρος, 0° πλήρης έκταση έως 90° κάμψη) σε γωνιακή ταχύτητα $60^\circ / s$. Μεταξύ των σετ υπήρχε διάλειμα 2 λεπτών.

2.3 Αξιολόγηση του μυϊκού πόνου από τους συμμετέχοντες

Ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να αξιολογήσουν τον καθυστερημένο μυϊκό πόνο (DOMS) που ένιωθαν αμέσως μετά την συνεδρία της έκκεντρης άσκησης, 24, 48 και 72 ώρες μετά. Η αξιολόγηση έγινε με κριτήριο το βάδισμα και την κίνηση squat. Ο κάθε ασκούμενος αξιολογούσε προφορικά τον πόνο που ένιωθε σε αυτές τις δύο δοκιμασίες με βάση μια κλίμακα από το μηδέν («χωρίς πόνο») ως το δέκα («χειρότερος πόνος που μπορεί να φανταστεί κανείς»).

2.4 Μυϊκή βλάβη

Το ισοκινητικό δυναμόμετρο χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της μέγιστης ροπής ισομετρικής έκτασης σε 90° κάμψη του γονάτου από το προτιμώμενο πόδι κάθε εθελοντή και καταγράφηκε ο μέσος όρος των τριών μέγιστων συστολών.

Για να εξασφαλιστεί ότι ο καθένας έκανε τη μέγιστη προσπάθειά του, οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν εάν η διαφορά της μεγαλύτερης με τη μικρότερη τιμής ροπής ξεπερνούσε το 10%. Μεταξύ κάθε ισομετρικής προσπάθειας υπήρξε διάλειμμα 2 λεπτών.

2.5 Συλλογή αίματος και επεξεργασία

Από όλους τους συμμετέχοντες στο πείραμα λήφθηκε φλεβικό αίμα από τον βραχίονα (10mL) πριν, αμέσως μετά, 24,48 και 72 ώρες μετά την άσκηση. Το αίμα συλλέχτηκε σε σωληνάρια EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) για τις μετρήσεις της TAC, TBARS, πρωτεϊνικών καρβονυλίων και τη δραστικότητα γλουταθειόνης και καταλάσης. Ενώ το αίμα που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (ORP) συλλέχτηκε σε σωληνάρια ηπαρίνης. Η επεξεργασία του αίματος αναλύεται στο παράρτημα (ενότητα 5.1)

2.6 Αξιολόγηση του sORP και cORP με το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS

Οι τιμές sORP και cORP προσδιορίστηκαν με τη χρήση του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS (Luoxis Diagnostics, Inc., Englewood, Κολοράντο, Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής). Συγκεκριμένα με μια πιπέτα τοποθετήθηκαν 20μL πλάσματος στην ειδική υποδοχή των αισθητήρων μιας χρήσεως, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Μέσα σε τέσσερα λεπτά παρουσιάζονταν οι τιμές sORP και cORP. Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα η τιμή sORP δείχνει την ολοκληρωμένη ισορροπία των οξειδωτικών και αναγωγικών σε ένα δείγμα και αναφέρεται σε millivolt (mV) ενώ η cORP είναι η ποσότητα των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων και εκφράζεται σε microcoulombs (μC).

2.7 Αξιολόγηση TAC, TBARS, GSH, καταλάσης και πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Τα πρωτόκολλα των δεικτών οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω. Οι δείκτες οξειδωτικού στρες μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά και η αρχή προσδιορισμού του καθενός αναφέρεται επίσης αναλυτικά παρακάτω.

Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) του πλάσματος

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

Στην παρούσα μέθοδο υπολογίστηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ως σύνολο 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 (μηδενίζουμε το φωτόμετρο με αέρα). Σε 480μL Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4 προστίθενται 500μL DPPH 0.1 mM και 20μL πλάσμα. Ως blank έχουμε 500μL Phosphate buffer 10 mM μαζί με 500μL DPPH 0.1 mM. Δείγματα και blank επώάζονται στο σκοτάδι για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης οι αντιοξειδωτικές ουσίες του ορού εξουδετερώνουν τη ρίζα DPPH μετατρέποντάς τη στην πιο σταθερή ένωση υδραζίνη. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνεται για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση) και μετριέται η απορρόφησή τους στα 520nm.

Υπολογισμοί

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

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

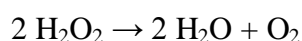
β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/L}$ της κυψελίδας.

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

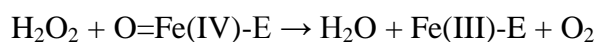
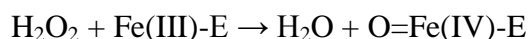
δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

Προσδιορισμός Καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

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. Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε 2 στάδια:



(Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεδεμένη στο ένζυμο)

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:



Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό είναι:

Phosphate buffer 67 mM (pH 7.4)

MB (KH_2PO_4): 136

MB (Na_2HPO_4): 178

30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

Σε 2991 μL Phosphate buffer 67 mM (pH 7.4) προστίθενται 4 μL αιμολύματος αραιωμένο 1/10 με αποσταγμένο νερό. Η διαδικασία που ακολουθείται στη συνέχεια περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

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.

Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (MDA)

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μηλονική διαλδεύδη (MDA). Η μηλονική διαλδεύδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Έτσι, τα TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μηλονικής διαλδεύδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία 1/2 αντίστοιχα. Η

μέτρηση της μαλονδιαλδεΐδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσης των λιπιδίων.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

Tris-HCl 200 mM (pH 7.4)

MB (Tris): 121.14

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

Διάλυμα Na₂SO₄ (2 M) – TBA (55 mM)

MB (TBA): 144.1

MB (Na₂SO₄): 142.04

TCA 35% και TCA 70%

Αρχικά σε 100μL πλάσματος ή απεσταγμένου νερού (για το τυφλό) προστίθενται 500μL TCA 35% και 500μL Tris-HCl αναδεύονται και επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστίθεται 1mL Na₂SO₄-TBA και το μείγμα επωάζεται στους 95°C για 45 λεπτά (στο υδατόλουτρο) και έπειτα στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθεται 1mL TCA 70% και αφού τα μείγματα αναδευτούν καλά μεταφέρεται 1mL από κάθε δείγμα για φυγοκέντρηση στα 11200g στους 25°C για 3 λεπτά. Τέλος φωτομετρούμε το υπερκείμενο στα 530nm.

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 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L το μmol/L.

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

Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Το πειραματικό πρωτόκολλο βασίζεται στην οξείδωση της GSH από το διθειοδυο νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται σε αιμόλυμα. Η GSH αντιδρά με το DTNB

παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm.

Χρησιμοποιούνται τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Phosphate buffer 67 mM (pH 7.95)

MB (KH₂PO₄): 136

MB (Na₂HPO₄): 178

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

DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396.35

Κιτρικό νάτριο (C₆H₅Na₃O₇*2H₂O, διένυδρο τρινάτριο, tri-sodium dihydrate), MB:294.10

Σε eppendorf αναμειγνύονται 660μL Phosphate buffer με 330μL DTNB 1mM και 20μL από το αιμόλυμα. Στο blank αντί για το αιμόλυμα προστίθεται ίσης ποσότητας αποσταγμένο νερό. Αναδεύονται καλά με vortex και στη συνέχεια επωάζονται 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. Μεταφέρεται το περιεχόμενό τους σε μια πλαστική κυψελίδα και μετράται η απορρόφηση στα 412 nm (το φωτόμετρο μηδενίζεται με αέρα).

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της GSH (mmol/L) = $(Abs_{\text{δείγματος}} - \Delta Abs_{\text{τυφλού}} / 13.6) \times 262.6$, όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμόλυματος (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 αιμόλ. / 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 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων. Έτσι η συγκέντρωση της GSH εκφράζεται ανά g αιμοσφαιρίνης: GSH (mmol/ g Hb).

Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίζεται στην αντίδρασή τους με τη 2,4-δινιτροφαινυλαδραζίνη (DNPH) και τη μετατροπή της σε 2,4-δινιτροφαινυλαδραζόνη (DNP-hydrazone). Αρχικά σε 50μL πλάσματος προσθέτουμε 50μL 20% TCA και ανακατεύουμε με vortex. Για κάθε δείγμα που εξετάζεται ετοιμάζουμε και ένα τυφλό. Έπειτα επωάζουμε τα δείγματα σε πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προστίθενται στο ίζημα 500μL DNPH 14mM (διαλυμένα σε 2,5N HCl) για το δείγμα ή 500μL 2,5N HCl για το τυφλό. Επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα και ενδιάμεσα κάθε 15 λεπτά ανακατεύουμε με vortex. Έπειτα φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1mL TCA 10%, ανακατεύουμε με vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 1000μL μίγματος αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα (1/1) και τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 15.000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές. Κατόπιν απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 1mL ουρίας 5M (pH 2,3) και επωάζουμε για 20 λεπτά στους 37°C. Τέλος φυγοκεντρούμε άλλη μια φορά στα 15.000g για 5 λεπτά στους 4°C και μετράμε την απορρόφηση στα 375nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $\frac{\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{τυφλού}}}{0,022} \times 1000 / 50$. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι $22\text{mM} \cdot \text{cm}^{-1}$. Το 0,022 υπολογίζεται ως εξής: 22mmol/L ισούται με $22\mu\text{mol/mL} = 0,022\text{nmol/mL}$. Ενώ $1000/50$ είναι ο συντελεστής αραιώσης (1000μL στην

κυψελίδα/50μL από το δείγμα).

2.8 Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα από τους δείκτες οξειδωτικού στρες, τα αιματολογικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά αναλύθηκαν με την στατιστική μέθοδο one-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν με Dunnet's test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$. Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS, έκδοση 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.) Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm SEM

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αξιολόγηση μυϊκού πόνου και μυϊκής βλάβης

Σύμφωνα με την αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου που έκαναν οι συμμετέχοντες στην εργασία, ο δείκτης αυτός αυξήθηκε από 2,6 έως 4,6 φορές κατά το βάδισμα και από 3,2 έως 5 φορές κατά την άσκηση ημικαθίσματος (squat). Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα 1. Επίσης η ισομετρική ροπή μειώθηκε σημαντικά ($p < 0,05$), κατά 15,8% στο τέλος της συνεδρίας άσκησης (πριν: $243,9 \pm 55,4$ Nm , μετά: $205,20 \pm 57,54$ Nm). Φαίνεται λοιπόν ότι πράγματι προκλήθηκε μυϊκή βλάβη στους συμμετέχοντες.

Πίνακας 1. Αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου (DOMS) μετά την έκκεντρη άσκηση

	Πριν	Αμέσως μετά	24 ώρες μετά	48 ώρες μετά	72 ώρες μετά
DOMS περπάτημα	1.00 ± 0.00	2.63 ± 1.16	3.57 ± 1.16	4.63 ± 1.01	4.63 ± 1.34
DOMS squat	1.00 ± 0.00	3.21 ± 1.27	4.10 ± 1.10	5.00 ± 1.05	4.89 ± 1.10

Δίνονται οι μέσες τιμές \pm SD.

3.2 Δείκτες οξειδωτικού στρες

Στον πίνακα 2 δίνονται τα αποτελέσματα από τους δείκτες οξειδωτικού στρες που μελετήσαμε, ενώ στον πίνακα 3 φαίνεται η % αύξηση ή μείωση των ίδιων δεικτών.

Πίνακας 2: δείκτες οξειδωτικού στρες όταν όλοι οι συμμετέχοντες (n=19) εξετάστηκαν ως ένα γκρουπ (μέσος όρος \pm SD)

	Πριν την άσκηση	24h post	48h post	72h post
sORP (mV)	$136,1 \pm 13,2$ (118,9 - 157,3)	$135,5 \pm 13,7$ (156,4-116)	$135,1 \pm 16,2$ (162,7-112,4)	$134,8 \pm 16,3$ (159,4-104,2)
cORP (μ C)	1.05 ± 0.71 (0.64 -2.63)	1.08 ± 0.93 (0.34 - 4.07)	1.17 ± 0.89 (0.31 - 3.85)	1.19 ± 1.09 (0.32 - 4.75)

TAC (mmol DPPH/L plasma)	0.94 ± 0.09 (0.70 - 1.03)	0.99 ± 0.12 (0.70 - 1.22)	1.00 ± 0.16 (0.70 - 1.35)	1.04 ± 0.12 (0.89 - 1.35)
GSH (μmol/g Hb)	3.09 ± 1.75 (0.42 - 5.60)	3.28 ± 1.70 (0.34 - 6.20)	3.04 ± 1.60 (0.55 - 6.00)	2.88 ± 1.51 (0.73 - 6.10)
Protein carbonyls (nmol/mg protein)	0.70 ± 0.18 (0.29 - 0.95)	0.74 ± 0.21 (0.38 - 1.07)	0.75 ± 0.19 (0.43 - 1.11)	0.76 ± 0.24 (0.43 - 1.48)
TBARS (μmol/L)	6.7 ± 2.8 (3.4 - 13.0)	7.5 ± 2.8 (4.0 - 12.4)	7.4 ± 3.0 (3.1 - 13.0)	7.9 ± 2.9 (2.9 - 13.5)
Catalase (U/mg Hb)	151.9 ± 47.6 (92.8 - 310.4)	154.6 ± 27.0 (114.2 - 207.2)	142.3 ± 19.3 (105.9 - 169.9)	137.9 ± 18.6 (108.9 - 182.4)

Οι αριθμοί στις παρενθέσεις δείχνουν τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές.

* Σημαντικά διαφορετική σε σχέση με την αρχική τιμή (ρ < 0,05).

Πίνακας 3 Οι % αύξηση ή μείωση των δεικτών οξειδωτικού στρες όταν και οι 19 συμμετέχοντες αποτελούν ένα γκρουπ.

	Πριν την άσκηση	24h % αλλαγή	48h % αλλαγή	72h %αλλαγή
sORP (mV)	136,1±13,2 (118,9 - 157,3)	-0.45 ± 3.76 (-7.54 - 6.93)	-0.81 ± 5.57 (-12.60 - 7.45)	-0.97 ± 7.30 (-18.74 - 9.47)
cORP (μC)	1.05 ± 0.71 (0.64 - 2.63)	3.37 ± 35.27 (- 47.53 - 87.56)	17.71 ± 52.62 (- 38.40 - 150.00)	15.42 ± 52.16 (- 56.27 - 118.89)
TAC (mmol DPPH/L plasma)	0.94 ± 0.09 (0.70 - 1.03)	6.05 ± 14.20 (-19.67 - 45.09)	6.72 ± 15.82 (-11.79 - 41.83)	12.18 ± 17.30 (- 7.15 - 45.61)
GSH (μmol/g Hb)	3.09 ± 1.75 (0.42 - 5.60)	15.26 ± 39.99 (- 25.78 - 126.94)	10.54 ± 44.81 (- 34.21 - 150.96)	8.03 ± 48.54 (- 32.73 - 133.83)
Protein carbonyls (nmol/mg protein)	0.70 ± 0.18 (0.29 - 0.95)	8.21 ± 23.82 (- 36.96 - 57.78)	9.94 ± 26.39 (- 35.92 - 63.16)	12.43 ± 36.8 (- 25.17 - 128.00)
TBARS (μmol/L)	6.7 ± 2.8 (3.4 - 13.0)	16.95 ± 43.06 (- 32.75 - 178.36)	17.09 ± 37.38 (- 72.51 - 129.85)	27.08 ± 43.46 (-74.40 - 138.84)
Catalase (U/mgHb)	151.9 ± 47.6 (92.8 - 310.4)	9.98 ± 20.06 (- 33.24 - 48.67)	-0.38 ± 26.10 (- 45.25 - 56.04)	-2.18 ± 30.96 (- 53.31 - 84.96)

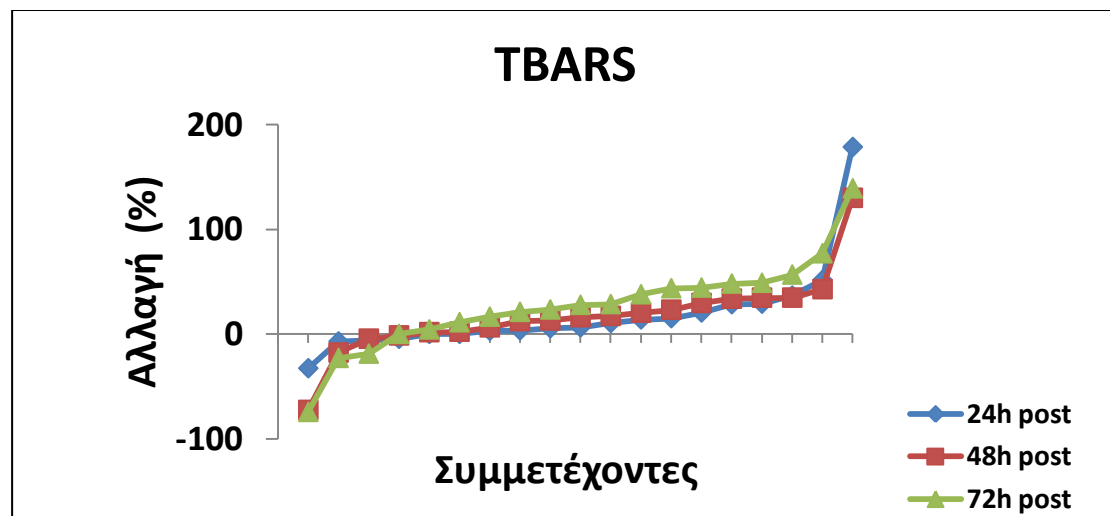
Οι αριθμοί στις παρενθέσεις δείχνουν τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές.

* Σημαντικά διαφορετική σε σχέση με την αρχική τιμή ($p < 0,05$).

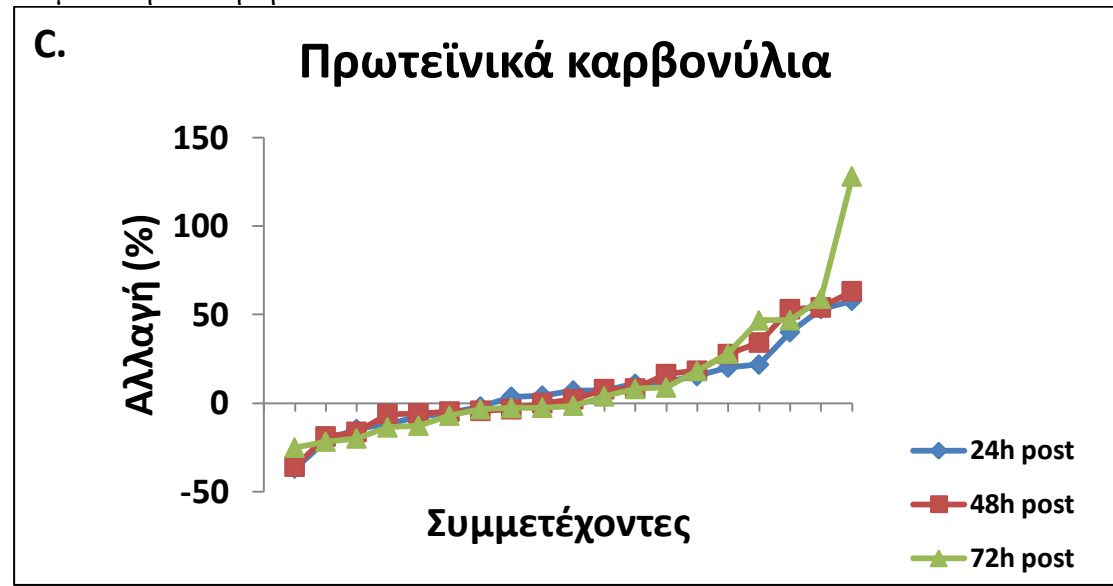
Βλέποντας αυτά τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι οι δείκτες οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν δεν μεταβλήθηκαν στατιστικά σημαντικά. Επίσης υπάρχει μεγάλη διακύμανση μεταξύ των ατόμων. Δοκιμάσαμε λοιπόν να χωρίσουμε τους συμμετέχοντες σε δύο κατηγορίες αντί για την μία που είχαμε αρχικά.

Τα παρακάτω διαγράμματα δείχνουν τις % αλλαγές των διαφόρων δεικτών. Έτσι, σε όλους τους οξειδοαναγωγικούς δείκτες οι συμμετέχοντες μπορούσαν να διαιρεθούν σε δύο ομάδες, εκείνων με μεγάλες αυξήσεις και εκείνων με υψηλές μειώσεις των τιμών των δεικτών μετά την άσκηση σε σύγκριση με πριν από την άσκηση (διαγράμματα 1,2,3,4 και 5).

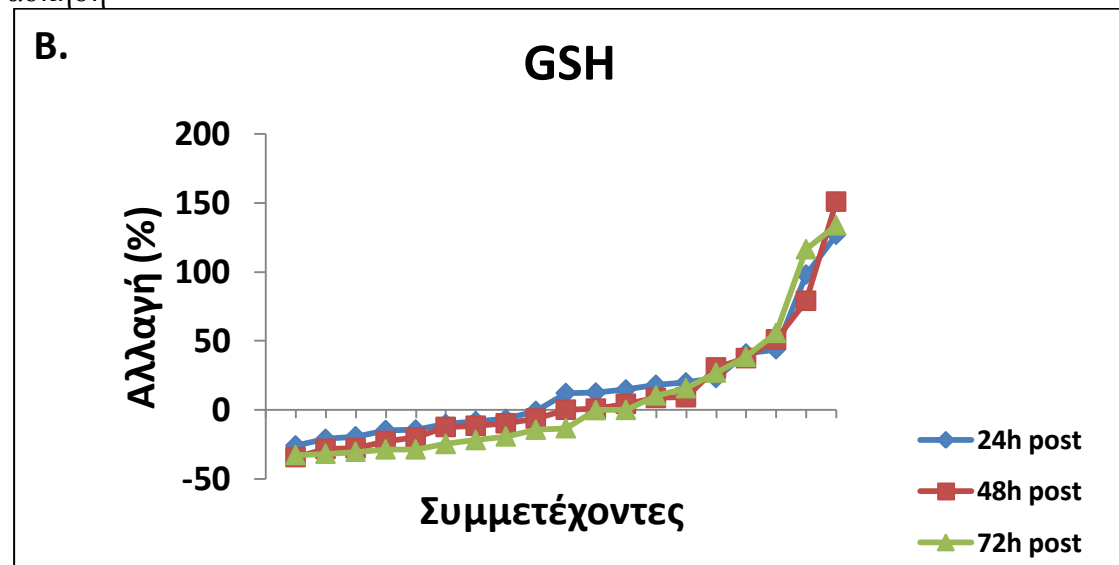
Διάγραμμα 1: Η % αλλαγή των τιμών TBARS στους συμμετέχοντες πριν και μετά την άσκηση



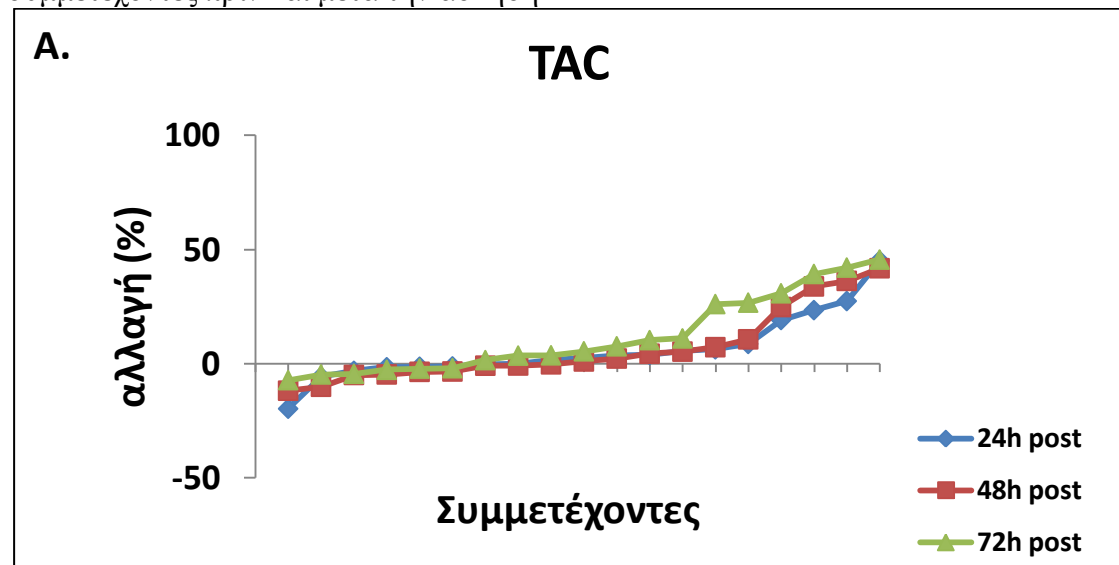
Διάγραμμα 2: Η % αλλαγή των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους συμμετέχοντες πριν και μετά την άσκηση



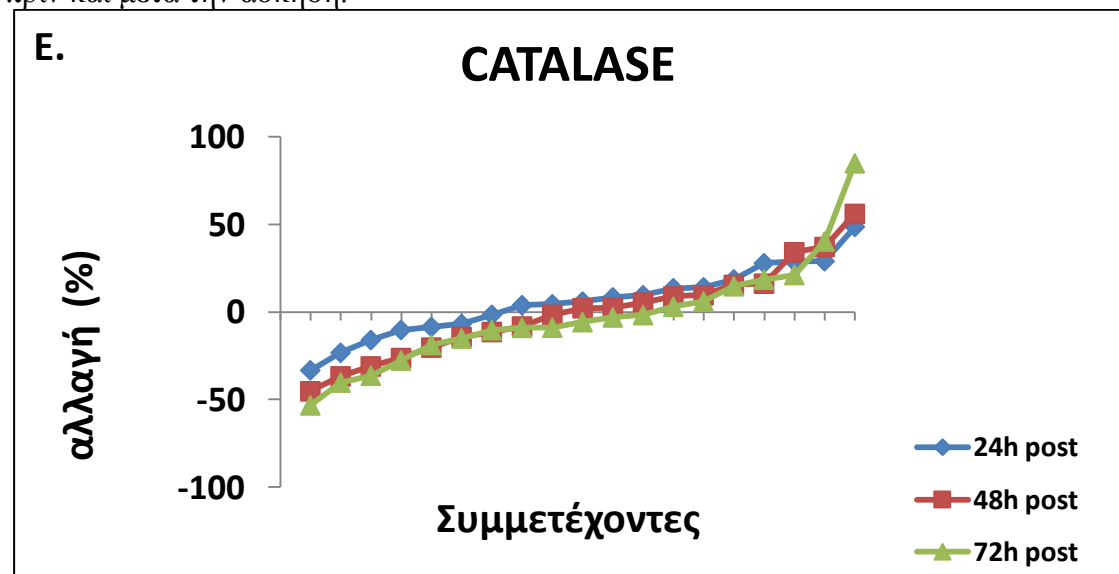
Διάγραμμα 3: Η % αλλαγή της γλουταθειόνης στους συμμετέχοντες πριν και μετά την άσκηση



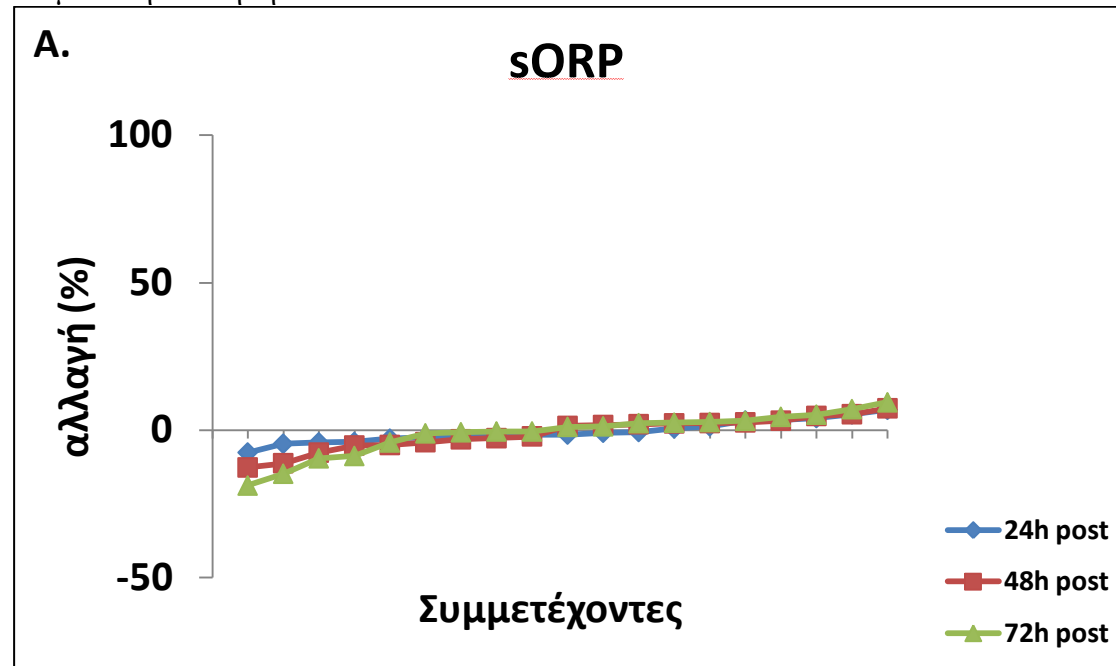
Διάγραμμα 4: Η % αλλαγή της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας TAC στους συμμετέχοντες πριν και μετά την άσκηση



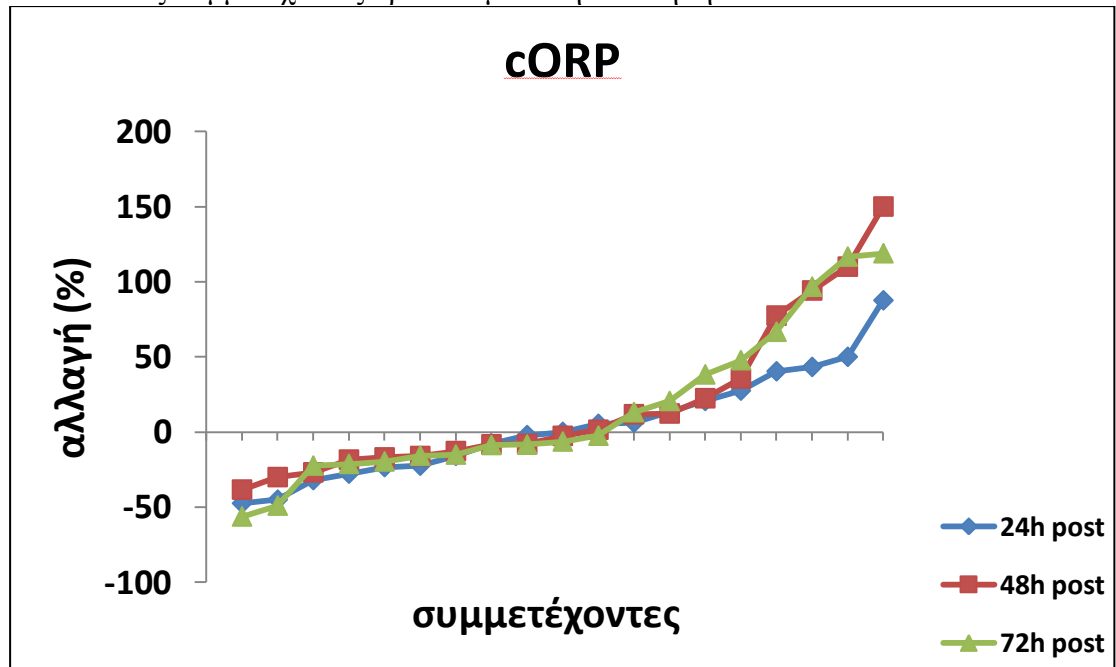
Διάγραμμα 5: η % αλλαγή της δραστηριότητας της καταλάσης στους συμμετέχοντες πριν και μετά την άσκηση.



Διάγραμμα 6: η % αλλαγή του στατικού δυναμικού sORP στους συμμετέχοντες πριν και μετά την άσκηση



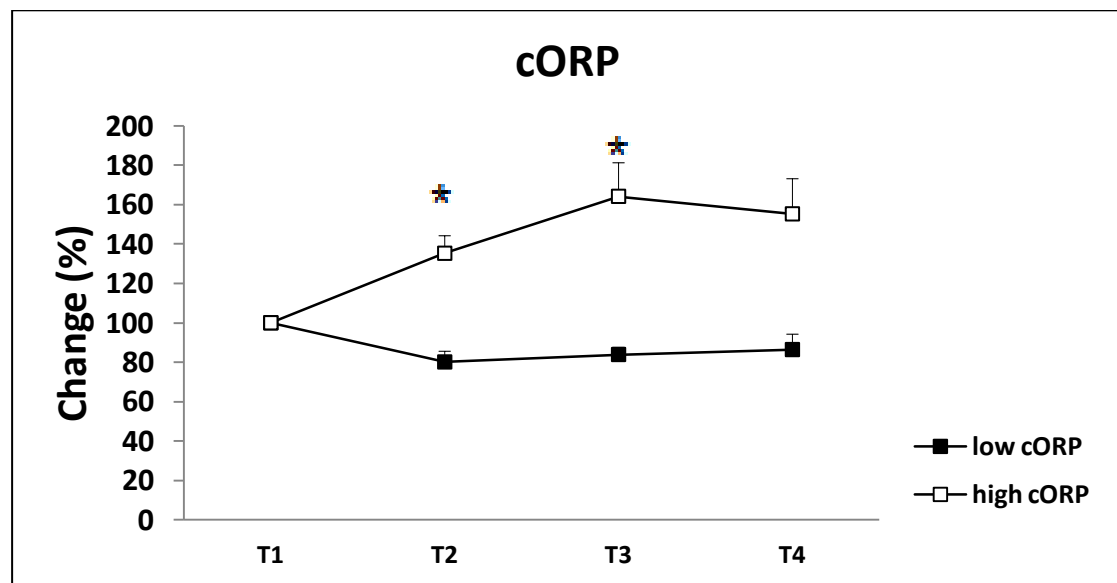
Διάγραμμα 7: η % αλλαγή της χωρητικότητας του οξειδοαναγωγικού δυναμικού cORP στους συμμετέχοντες πριν και μετά την άσκηση



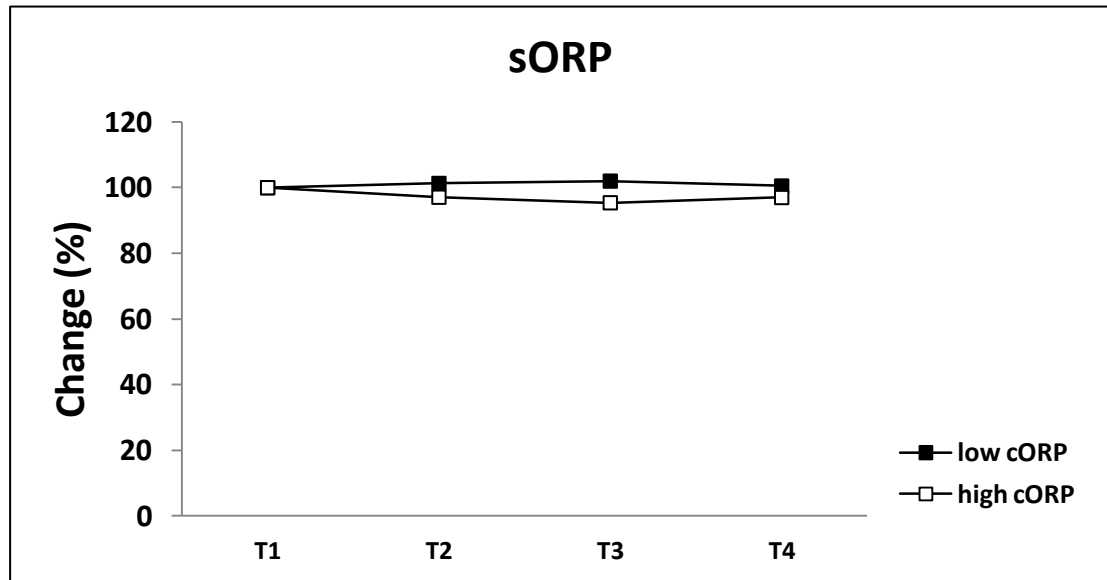
Φαίνεται λοιπόν ότι σε όλους τους οξειδοαναγωγικούς δείκτες οι συμμετέχοντες μπορούσαν να διαιρεθούν σε δύο ομάδες, εκείνων με μεγάλες αυξήσεις και εκείνων με υψηλές μειώσεις των τιμών των δεικτών μετά την άσκηση σε σύγκριση με πριν από την άσκηση.

Χωρίζοντας λοιπόν τους συμμετέχοντες σε δύο ομάδες (η μία αποτελούνταν από αυτούς που είχαν αύξηση της τιμής cORP, και η άλλη από αυτούς που παρουσίαζαν μείωση της τομής cORP), πήραμε τα αποτελέσματα που φαίνονται στα παρακάτω διαγράμματα.

Διάγραμμα 8: Ποσοστιαίες μεταβολές των τιμών cORP των ατόμων χαμηλού cORP και υψηλού cORP πριν την άσκηση (T1) και 24 ώρες (T2), 48 ώρες (T3) και 72 ώρες (T4) μετά από την έκκεντρη άσκηση. * Σημαντικά διαφορετική σε σύγκριση με πριν την έκκεντρη άσκηση ($p < 0,05$).

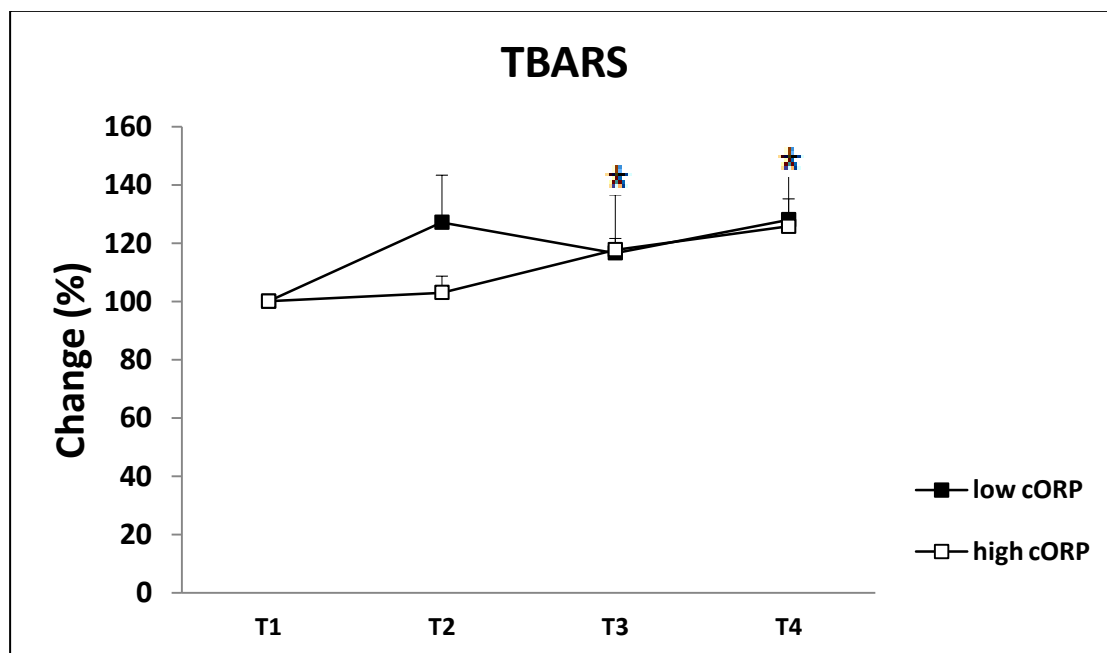


Διάγραμμα 9: Ποσοστιαίες μεταβολές των τιμών sORP των ατόμων χαμηλού cORP και υψηλού cORP πριν την άσκηση (T1) και 24 ώρες (T2), 48 ώρες (T3) και 72 ώρες (T4) μετά από την έκκεντρη άσκηση.

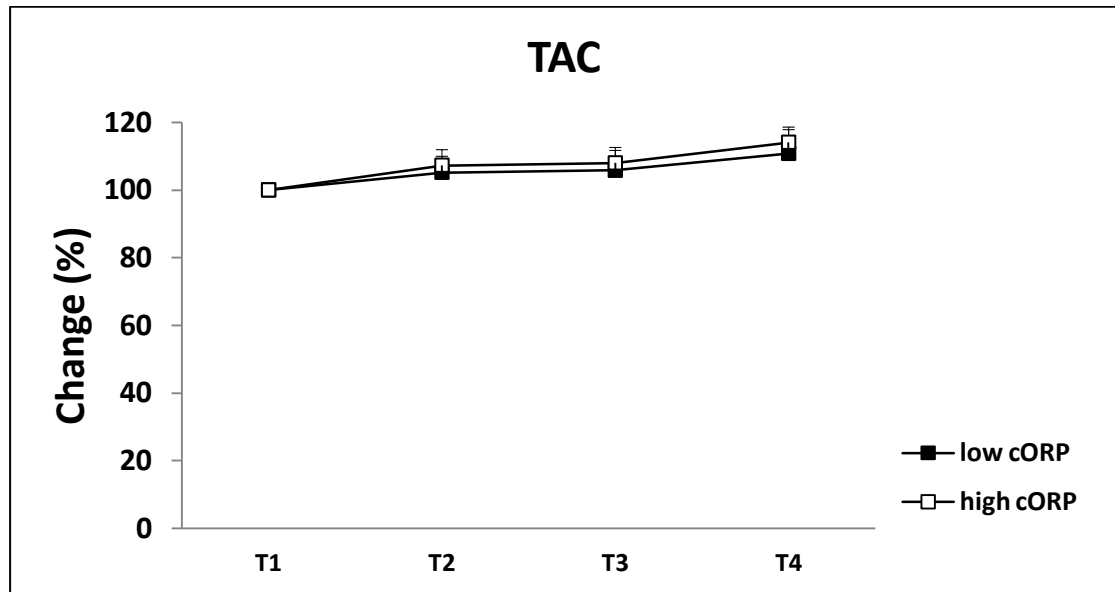


Διάγραμμα 10: Ποσοστιαίες μεταβολές των TBARS πριν (T1) και 24ώρες (T2), 48ώρες (T3) και 72ώρες (T4) μετά την έκκεντρη άσκηση.

* Σημαντικά διαφορετική σε σύγκριση με πριν την έκκεντρη άσκηση στην ομάδα low cORP ($p < 0,05$).



Διάγραμμα 11: Ποσοστιαίες μεταβολές της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) πριν (T1) και 24ώρες (T2), 48ώρες (T3) και 72ώρες (T4) μετά την έκκεντρη άσκηση.



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Θεωρώντας όλους τους συμμετέχοντες ένα ενιαίο γκρουπ, οι δείκτες οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν δεν άλλαξαν στατιστικά σημαντικά μετά την άσκηση σε σύγκριση με πριν την άσκηση. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί αν λάβουμε υπόψη τη μεγάλη διακύμανση που παρουσιάζουν μεταξύ των διαφόρων ατόμων (Πίνακες 2 και 3). Επίσης μερικοί δείκτες άλλαξαν απροσδόκητα σε μερικούς συμμετέχοντες. Για παράδειγμα, σε πολλά άτομα, τα επίπεδα TBARS και πρωτεϊνικών καρβονυλίων μειώθηκαν, ενώ τα επίπεδα GSH αυξήθηκαν μετά την άσκηση (διαγράμματα 1-5), ενώ σύμφωνα με τις προηγούμενες μελέτες ήταν αναμενόμενο το αντίθετο αποτέλεσμα (Margaritelis et al.,2014, Nikolaidis et al.,2008, Childs et al.,2001, Lee et al.,2002).

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και σε άλλες μελέτες σχετικά με τη έκκεντρη άσκηση (Margaritelis et al.). Συγκεκριμένα, ο Μαργαριτέλης και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι η έκκεντρη άσκηση μπορεί να προκαλέσει ακόμη και μείωση του οξειδωτικού στρες ή αμελητέο στρες σε ένα μεγάλο αριθμό ανθρώπων. Αυτή η μεγάλη διακύμανση στην απόκριση των διαφόρων ατόμων στην έκκεντρη άσκηση μπορεί να αποδοθεί στην υψηλή πολυπλοκότητα του μηχανισμού ρύθμισης της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης στον ανθρώπινο οργανισμό. Η τελική έκβαση του οξειδωτικού ερεθίσματος, δηλαδή αν θα υπάρξει οξειδωτικό στρες ή όχι καθορίζεται από γενετικούς, φυσιολογικούς, βιοχημικούς καθώς και διατροφικούς παράγοντες (Bloomer and Fisher,2008, Kand and Graubard,2008, Simoneau and Bouchard,1989, Rankinen and Bouchard,2008).

Όπως και στους άλλους δείκτες έτσι και ο δείκτης cORP του RedoxSYS έδειξε διαφορετικές αποκρίσεις στην έκκεντρη άσκηση μεταξύ των διαφόρων ατόμων. Συγκεκριμένα, σε ποσοστό 42,2% οι συμμετέχοντες παρουσίαζαν μεγάλη αύξηση της τιμής cORP ενώ το υπόλοιπο 57,8% παρουσίαζε μεγάλη μείωση της cORP μετά την άσκηση, όπως φαίνεται στο διάγραμμα 7. Όπως προαναφέρθηκε ο δείκτης cORP είναι ένα μέτρο των διαθέσιμων αντιοξειδωτικών αποθεμάτων του σώματος. Έτσι με τα αποτελέσματα που πήραμε μπορούμε να υποθέσουμε ότι ένα μέρος των συμμετεχόντων (αυτό που παρουσίασε την αύξηση στη τιμή της cORP) αντιμετώπιζε το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την έκκεντρη άσκηση

αυξάνοντας το αντιοξειδωτικό τους απόθεμα. Όμως δεν ήταν όλοι οι συμμετέχοντες σε θέση να αντιμετωπίσουν το οξειδωτικό στρες ή να αντικαταστήσουν το απόθεμα αντιοξειδωτικών και έτσι είχαν μείωση του cORP.

Για να ελέγξουμε αν η αρχική μας υπόθεση είναι σωστή χωρίσαμε του συμμετέχοντες σε δύο ομάδες:

i. Ομάδα υψηλού cORP (11 άτομα που παρουσίασαν μεγάλη αύξηση του δείκτη)

ii. Ομάδα χαμηλού cORP (8 άτομα που παρουσίασαν μεγάλη μείωση του δείκτη)

Στην ομάδα υψηλού cORP υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση στις τιμές cORP σε 24 ώρες και 48 ώρες μετά την άσκηση, ενώ στην ομάδα χαμηλού CORP υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση στις τιμές cORP σε 24 ώρες και 48 ώρες μετά την άσκηση (Διάγραμμα 8).

Στην συνέχεια εξετάστηκαν οι υπόλοιποι δείκτες οξειδωτικού στρες σε αυτές τις δύο ομάδες. Αν και οι συμμετέχοντες μπορούσαν να χωριστούν σε δύο ομάδες με όλους τους δείκτες, επιλέχθηκε το cORP, διότι είναι ένα ολοκληρωμένο μέτρο της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού, ενώ οι περισσότεροι από τους άλλους εξεταζόμενους δείκτες αξιολογούν είτε ένα συγκεκριμένο αντιοξειδωτικό μηχανισμό (π.χ. GSH, καταλάση) ή μια συγκεκριμένη οξειδωτική βλάβη (π.χ. TBARS, πρωτεϊνικά καρβονύλια). Η TAC επίσης υποδεικνύει την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, αλλά βασίζεται στη μείωση των ελευθέρων ριζών από τα αντιοξειδωτικά μόρια στο πλάσμα. Έτσι, η μέθοδος αυτή είναι ατελής, καθώς αξιολογεί μόνο τα αναγωγικά που βρίσκονται στο πλάσμα. Ωστόσο, το cORP βασίζεται όχι μόνο στο ποσό των αναγωγικών, αλλά και των οξειδωτικών παραγόντων στο πλάσμα. Για το λόγο αυτό, η μέτρηση cORP μπορεί να είναι μια πιο ακριβής μέθοδος από την TAC για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες in vivo. Τέλος, όπως το cORP, έτσι και το sORP μετρά το τρέχον ισοζύγιο οξειδοαναγωγής, αλλά αυτός ο δείκτης στους περισσότερους συμμετέχοντες δεν άλλαξε σημαντικά μετά την άσκηση και παρουσίαζε πολύ μικρότερη διακύμανση από το cORP (Διάγραμμα 9).

Εξετάζοντας λοιπόν τους συμμετέχοντες σε δύο ομάδες, βγήκαν μερικά ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Στην ομάδα χαμηλού cORP υπήρξε μια σημαντική αύξηση στα επίπεδα TBARS 48 ώρες και 72 ώρες μετά την άσκηση υποδεικνύοντας μία αύξηση στην υπεροξείδωση λιπιδίων (Διάγραμμα 10). Αύξηση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων μετά από έκκεντρη άσκηση έχει βρεθεί και σε άλλες

μελέτες (Nikolaidis et al., 2008, Childs 2001, Sacheck 2003). Αντίθετα στην ομάδα υψηλού cORP δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή στο επίπεδο των TBARS μετά την άσκηση, κάτι που υποδηλώνει απουσία οξειδωσης λιπιδίων και ίσως ακόμα και οξειδωτικού στρες. Η TAC δεν μεταβλήθηκε σημαντικά σε καμία από τις δύο ομάδες cORP (Διάγραμμα 11). Στην πραγματικότητα, θα αναμέναμε για την TAC να ακολουθήσει τη μείωση ή την αύξηση του cORP, δεδομένου ότι και οι δύο δείκτες εκτιμούν τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Ωστόσο, η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ τους πιθανόν να οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε, στις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό τους.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά το δυναμικό οξειδωσης-αναγωγής ως δείκτης για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από έκκεντρη άσκηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ειδικά το cORP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από την έκκεντρη άσκηση. Δηλαδή, υψηλή μείωση στις τιμές cORP μετά την άσκηση σε σχέση με πριν από την άσκηση μπορεί να υποδεικνύει την επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Από την άλλη πλευρά, η υψηλή αύξηση στις τιμές cORP μετά την άσκηση μπορεί να υποδεικνύει μη ύπαρξη οξειδωτικού στρες μετά από την έκκεντρη άσκηση.

Τα συμπεράσματα αυτά μπορούν να βοηθήσουν στον εντοπισμό ατόμων που πλήττονται περισσότερο από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την έκκεντρη άσκηση, δεδομένου ότι η μέτρηση cORP είναι εύκολη και εκτελείται γρήγορα. Αυτό θα επιτρέψει την εφαρμογή κατάλληλων παρεμβάσεων (π.χ. αντιοξειδωτική αγωγή) για την αποφυγή των αρνητικών επιπτώσεων για την υγεία ή ακόμα και τη μείωση της περιόδου ανάκαμψης που απαιτείται, σε εκείνα τα άτομα που πλήττονται από το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, είναι ακόμα απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες, ειδικά με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα ευρήματα.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Επεξεργασία του αίματος μετά από αιμοληψία για τον προσδιορισμό δεικτών οξειδωτικού στρες

Χρησιμοποιούμε:

-Ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της καταλάσης

-Πλάσμα για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, TBARS, πρωτεϊνικών καρβονυλίων και για τη μέτρηση με RedoxSYS.

Συλλογή πλάσματος και ερυθροκυτταρικού αιμόλυματος

Αρχικά συλλέγουμε το αίμα σε σωληνάρια falcon με EDTA 7.5% και το ανακινούμε μερικές φορές στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στα 1370 g, για 10 λεπτά, στους 4 °C.

Συλλέγουμε το υπερκείμενο (πλάσμα) και το χωρίζουμε σε φιαλίδια erpendorf. Αφού διαχωρίσουμε καλά το πλάσμα από το ίζημα προσθέτουμε απιονισμένο νερό (1:1 v/v) στα ερυθροκύτταρα, τα οποία μετά τη φυγοκέντρηση βρίσκονται στο κάτω μέρος του falcon και ανακινούμε βίαια. Φυγοκεντρούμε στα 4020 g, για 15 λεπτά, στους 4 °C. Συλλέγουμε το υπερκείμενο, που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα ενώ οι μεμβράνες των ερυθροκυττάρων μένουν ως ίζημα πολύ μικρού όγκου. Τέλος χωρίζουμε σε erpendorf το αιμόλυμα. Η διατήρηση των δειγμάτων γίνεται στους -80 °C.

Καθαρισμός αιμόλυματος για την προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης

Αρχικά προσθέτουμε 500 μL αιμόλυματος σε 500 μL 5% TCA σε erpendorf και ανακινούμε στο vortex. Φυγοκεντρούμε στα 28620 g (16000 rpm) για 5 λεπτά στους 5 °C. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε erpendorf και προσθέτουμε 5% TCA με την εξής αναλογία: 300 μL αιμόλυματος / 90 μL 5% TCA και ανακινούμε στο vortex.

Έπειτα φυγοκεντρούμε στα 28620 g (16000 rpm) για 5 λεπτά στους 5 °C. Μεταφέρουμε το καθαρό υπερκείμενο σε erpendorf.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Arrigo Ap. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* 1999, 27:936–944
- C. Harris and J. M. Hansen, "Oxidative stress, thiols, and redox profiles," *Methods in molecular biology*, vol. 889, pp. 325-346, 2012
- Childs, C. Jacobs, T. Kaminski, B. Halliwell, and C. Leeuwenburgh, "Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise," *Free radical biology & medicine*, vol. 31, no. 6, pp. 745-753, 2001.
- Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. The carotenoids as antioxidants – A review. *J Photochem Photobiol B* 1997, 41:189–200
- E. Giannakopoulou, "Oxidative stress-antioxidant mechanisms: Clinical implication", *Archives of Hellenic Medicine: ISSN 11-05-3992*, 2009
- G. L. Close, T. Ashton, T. Cable, D. Doran, and D. P. MacLaren, "Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayed onset muscle soreness: the role of reactive oxygen species," *European journal of applied physiology*, vol. 91, no. 5-6, pp. 615-621, 2004.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications.
- J. A. Simoneau and C. Bouchard, "Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities," *The American journal of physiology*, vol. 257, no. 4, pp. 567-572, 1989.
- J. Chiang, Y. C. Shen, Y. H. Wang et al., "Honokiol protects rats against eccentric exercise-induced skeletal muscle damage by inhibiting NF-kappaB induced oxidative

stress and inflammation," *European journal of pharmacology*, vol. 610, no. 1-3, pp. 119-127, 2009.

J. Friden and R. L. Lieber, "Eccentric exercise-induced injuries to contractile and cytoskeletal muscle fibre components," *Acta physiologica Scandinavica*, vol. 171, no. 3, pp. 321-326, 2001.

J. Lee, A. H. Goldfarb, M. H. Rescino, S. Hegde, S. Patrick, and K. Apperson, "Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness," *Medicine and science in sports and exercise*, vol. 34, no. 3, pp. 443-448, 2002.

Jamieson DJ. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998, 14:1511–1527

K. Kant and B. I. Graubard, "Ethnic and socioeconomic differences in variability in nutritional biomarkers," *The American journal of clinical nutrition*, vol. 87, no. 5, pp. 1464-1471, 2008.

L. A. Silva, C. A. Pinho, P. C. Silveira et al., "Vitamin E supplementation decreases muscular and oxidative damage but not inflammatory response induced by eccentric contraction," *The journal of physiological sciences*, vol. 60, no. 1, pp. 51-57, 2010.

L. A. Silva, P. C. Silveira, M. M. Ronsani et al., "Taurine supplementation decreases oxidative stress in skeletal muscle after eccentric exercise," *Cell biochemistry and Function*, vol. 29, no. 1, pp. 43-49, 2011.

L. J. Beaton, M. A. Tarnopolsky, and S. M. Phillips, "Contraction-induced muscle damage in humans following calcium channel blocker administration," *The Journal of physiology*, vol. 544(Pt 3), pp. 849-859, 2002.

M. G. Nikolaidis, A. Z. Jamurtas, V. Paschalis, I. G. Fatouros, Y. Koutedakis, and D. Kouretas, "The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations," *Sports medicine*, vol. 38, no. 7, pp. 579-606, 2008.

M. P. McHugh, D. A. Connolly, R. G. Eston, and G. W. Gleim, "Exercise-induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect," *Sports medicine*, vol. 27, no. 3, pp. 157-170, 1999.

Marian Valko, Dieter Leibfritz, Jan Moncola, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, "*The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*" (Impact Factor: 4.15). 02/2007; 39(1):44-84. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, et al., Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005, 16:577–586

N. V. Margaritelis, A. Kyparos, V. Paschalis et al., "Reductive stress after exercise: The issue of redox individuality," *Redox biology*, vol.19, no. 2, pp. 520-528, 2014.

R. J. Bloomer and K. H. Fisher-Wellman, "Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake," *Gender medicine*, vol. 5, no. 3, pp. 218-228, 2008.

T. Rankinen and C. Bouchard, "Gene-physical activity interactions: overview of human studies," *Obesity (Silver Spring)*, vol. 16 (Suppl 3), pp. 47-50, 2008.

V. Paschalis, M. G. Nikolaidis, I. G. Fatouros et al., "Uniform and prolonged changes in blood oxidative stress after muscle-damaging exercise," *In vivo*, vol. 21, no. 5, pp. 877-883, 2007.