



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*“ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΚΚΕΝΤΡΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ
ΣΕ ΙΣΟΚΙΝΗΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΟΜΕΤΡΟ”*

*“ASSESSMENT OF OXIDATIVE STRESS LEVELS IN HUMANS AFTER
ECCENTRIC EXERCISE IN ISOKINETIC DYNAMOMETER”*



ΚΑΡΑΤΖΑ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δ. Κουρέτα, επιβλέποντα καθηγητή, για την εμπιστοσύνη και τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετέχω στην παρούσα μελέτη, όπως επίσης τον κύριο Δ. Στάγκο για την συμβολή του στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας, καθώς και το τρίτο μέλος της τριμελούς επιτροπής τον κύριο Α. Τζιαμούρτα για τη συμμετοχή του σε αυτή.

Θα ήθελα, επιπλέον, να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου, Αλέξανδρο Πρίφτη και Σωτηρίνα Μακρή για την βοήθεια τους κατά τη διάρκεια του πειραματικού τμήματος της μελέτης και την επίλυση τυχών αποριών και προβλημάτων που προέκυπταν.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Άκη Σπανίδη, για τη συνεργασία, την εμπιστοσύνη, την υπομονή και την υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που μου δίνει τη δυνατότητα να σπουδάζω, αλλά και το φιλικό περιβάλλον για την ψυχολογική στήριξη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα που δέχτηκαν εθελοντικά να λάβουν μέρος στην εν λόγω μελέτη, και υποβλήθηκαν σ' αυτή τη διαδικασία, καθώς η συμμετοχή τους ήταν απαραίτητη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	5
Abstract	7
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Ελεύθερες Ρίζες	9
1.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών	11
1.2.1. Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	12
i) Αναπνευστική αλυσίδα- Οξειδωτική φωσφορλίωση	12
ii) Ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450	14
iii) Υπεροξειδιοσώματα	15
iv) Αιμοσφαιρίνη	15
v) Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ	16
vi) Φλεγμονή	17
vii) Κατεχολαμίνες	17
1.2.2. Εξωγενείς πηγές παραγωγή ελευθέρων ριζών	18
1.3. Επίδρασεις ελευθέρων ριζών	18
1.4. Οξειδωτικό στρες	20
1.5. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	21
1.5.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί	22
1.5.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί	27
1.6. Άσκηση και οξειδωτικό στρες	31
1.7. Έκκεντρη άσκηση και οξειδωτικό στρες	33
ΣΚΟΠΟΣ	36
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.1. Συμμετέχοντες	37
2.2. Πρωτόκολλο έκκεντρης άσκησης	37
2.3. Αξιολόγηση του μυϊκού πόνου	38
2.4. Συλλογή του αίματος και επεξεργασία	38
2.5. Αξιολόγηση του sORP και cORP με το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS	39
2.6. Αξιολόγηση των δεικτών: TBARS, CARB, TAC, GSH, CAT	41
2.6.1. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	42
2.6.2. Πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB)	44
2.6.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)	46
2.6.4. Ανηγμένη γλουταθειόνη σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (GSH)	48
2.6.5. Δραστικότητα καταλάσης (CAT)	50
2.7. Στατιστική ανάλυση	52
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	53
3.1. Αξιολόγηση μυϊκού πόνου και μυϊκής βλάβης	53
3.2. Δείκτες Οξειδωτικού στρες	54
ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ ΘΕΙΟΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (TBARS)	55
ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ	57
ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (TAC)	59
ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΝΗΓΜΕΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ	61
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ	63
Static ORP (sORP)	65
Capacity ORP (cORP)	67
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	84

Περίληψη

Μεγάλος αριθμός εργασιών στη βιβλιογραφία αναφέρεται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια πρόκληση οξειδωτικού στρες, έπειτα από έντονη και επίπονη άσκηση όπως η έκκεντρη. Καθώς, ωστόσο, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων που πραγματοποίησαν αυτού του είδους την άσκηση, προέκυψε η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη και εύρεση χαρακτηριστικών που να διακρίνουν και να ομαδοποιούν τα άτομα και ένας τέτοιος χαρακτήρας είναι ασφαλώς το αθλητικό ιστορικό κάθε εξεταζόμενου. Έτσι, σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση των ατόμων μετά από πραγματοποίηση έκκεντρης άσκησης σε ισοκινητικό δυναμόμετρο, όπως επίσης και να διερευνηθεί το γεγονός αν η ενασχόληση με οποιαδήποτε μορφής άσκησης επιφέρει διαφορετικά αποτελέσματα στο οξειδοαναγωγικό προφίλ των ατόμων σε σχέση με άτομα που δεν έχουν επαφή με κάποια αθλητική δραστηριότητα. Για το λόγο αυτό στο πείραμα συμμετείχαν 18 εθελοντές από τους οποίους οι 10 ήταν αθλούμενοι και οι 8 μη αθλούμενοι. Όλοι οι εθελοντές πραγματοποίησαν 5 σετ των 15 μέγιστων έκκεντρων επαναλήψεων και οι αναλύσεις έγιναν σε δείγμα αίματος που συλλέχθηκε πριν την άσκηση, καθώς και 24, 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση. Η αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης εξετάστηκε με τη μέτρηση συμβατικών δεικτών οξειδωτικού στρες στους οποίους ανήκουν τα Πρωτεϊνικά Καρβονύλια (CARB), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και η δραστικότητα καταλάσης (CAT). Επιπλέον, έγιναν μετρήσεις με τη χρήση ενός διαγνωστικού συστήματος (RedoxSYS) που έχει την ικανότητα να προσδιορίζει δύο νέους δείκτες, το στατικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (sORP) και τη διαθεσιμότητα των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων (cORP). Όταν οι συμμετέχοντες εξετάστηκαν ως μία ομάδα, λάβαμε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα στα Πρωτεϊνικά Καρβονύλια και τα TBARS, με έντονη αύξηση της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών στις 24 και 48 ώρες της τάξης του 10,13% και 10,84% αντίστοιχα και έντονη αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης στις 24, 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση κατά 14,29%, 13,01% και 15,29% αντίστοιχα, συγκριτικά με τις τιμές που λάβαμε πριν από την άσκηση. Όταν οι εθελοντές διακρίθηκαν σε

αθλούμενους και μη αθλούμενους η εικόνα που λάβαμε ήταν πως οι μη αθλούμενοι μετά την άσκηση παρουσίαζαν ελαττωμένες τιμές ανηγμένης γλουταθειόνης στις 72 ώρες (10,02%) και αυξημένα επίπεδα TAC στις 24 ώρες (3,30%). Παράλληλα, παρουσίαζαν αύξηση του δείκτη sORP και μείωση του δείκτη cORP στις 72 ώρες μετά την άσκηση (10,29% και 45,52% αντίστοιχα) σε σχέση πάντα με πριν την άσκηση. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν πως η συνεχής έκθεση του οργανισμού σε κάποιου είδους άσκηση, έχει ως συνέπεια ο οργανισμός να αναπτύσσει προσαρμογές και να αντιμετωπίζει την παραγωγή των ελευθέρων ριζών μετά από μία εξαιρετικά απαιτητική άσκηση όπως η έκκεντρη. Σε αυτό το γεγονός βασίζεται και η μελέτη μας καθώς η ετερογένεια στην ανταπόκριση μεταξύ διαφορετικών ατόμων στη φλεγμονή που προκαλείται από την έκκεντρη άσκηση, δείχνει να σχετίζεται με το αθλητικό ιστορικό του καθενός.

Abstract

There is a great number of studies in the bibliography concerning the production of free radicals and therefore the cause of oxidative stress, after intensive and strenuous exercise, such as eccentric. According to bibliography, significant differences were observed among individuals who have done this kind of exercise and showed the need for further study and discovery of features that will distinguish and classify/group these individuals. Such a feature is certainly the athletic background of each participant. Thus, the aim of this study was to evaluate the redox state of people after doing eccentric exercise on an isokinetic dynamometer, as well as to investigate whether dealing with any form of exercise leads to different results in the redox profile of individuals compared to people who do not exercise. For this reason, the experiment involved 18 volunteers, 10 of which were trained and 8 not-trained. All volunteers performed five sets of 15 maximum eccentric repetitions and blood samples collected for analysis before exercise and 24, 48 and 72 hours after the exercise. The redox state was determined by measuring conventional indicators of oxidative stress, among which are protein carbonyls (CARB), substances that react with thiobarbituric acid (TBARS), total antioxidant capacity (TAC), the levels of reduced glutathione (GSH) and catalase activity (CAT). In addition, measurements were made with a new diagnostic system (RedoxSYS), which has the ability to determine two new markers, static oxidation-reduction potential (sORP) and the available antioxidants reserves (Capacity Oxidation-Reduction Potential-cORP). When the participants were examined as one group, we found statistically significant differences in Protein carbonyls and TBARS, with a 10.13 % and 10.84% increase in the carbonylation of proteins at 24 and 48 hours while TBARS increased significantly by 14.29%, 13.01% and 15.29% at 24h, 48h and 72h respectively compared with pre exercise samples. When the volunteers were divided in trained and not trained significant differences were observed between the two groups at the following markers: reduced glutathione, TAC, sORP and cORP. Specifically, glutathione levels reduced by 10.02 % at 72 hours post exercise while TAC increased by 3.30 % at 24 hours post exercise, compared with pre exercise. Similarly, sORP increased significantly at 72 hours by 10.29%, while cORP decreased significantly at the same time point by 45.52 %, compared with the pre exercise samples. These results

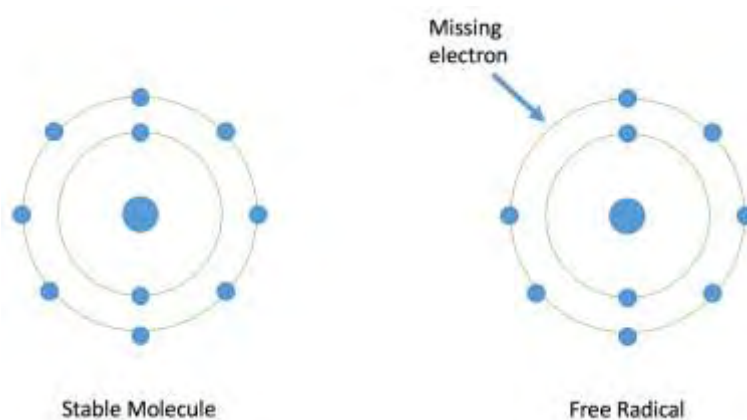
demonstrate that continuous exposure of the organism to some kind of exercise leads to the adjustment of the body and the management of the production of free radicals after an extremely demanding exercise as eccentric. Our study is based on this theory as the heterogeneity in response to inflammation caused by eccentric exercise among different individuals considered to be associated with the athletic background of each person.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες

Τα άτομα αποτελούνται από έναν πυρήνα, ο οποίος περιέχει πρωτόνια και νετρόνια. Γύρω από τον πυρήνα περιστρέφονται τα ηλεκτρόνια σε τροχιακά. Σε κάθε τροχιακό υπάρχει η δυνατότητα να συνυπάρχουν δύο ηλεκτρόνια με αντιπαράλληλα spin που λειτουργούν ως ζεύγος. Η δομή αυτή κάνει τα άτομα πιο σταθερά.

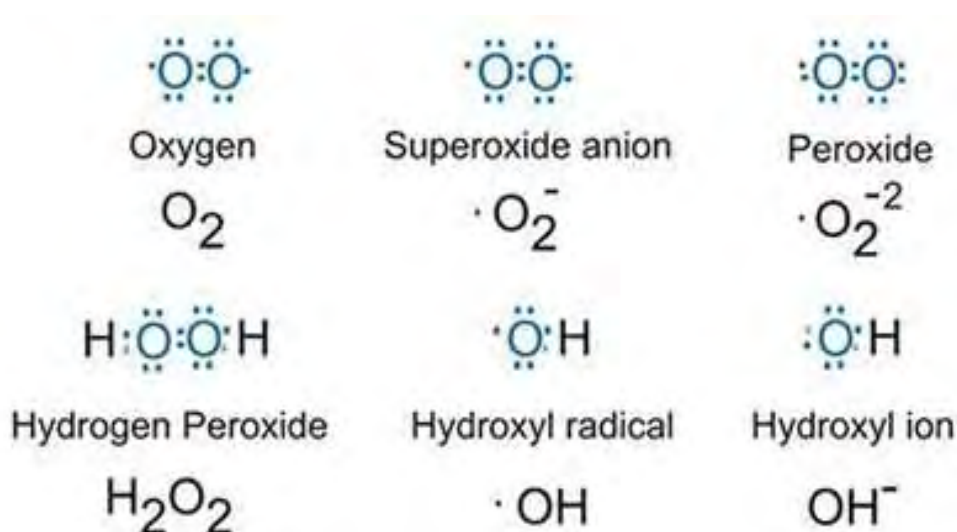
Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Jenkins, 1988). Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ ασταθείς δομές με σύντομη διάρκεια ζωής αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, αποσπώντας από αυτά ένα ηλεκτρόνιο με στόχο να συζευχθεί με το δικό τους. Τα παρακείμενα μόρια μετατρέπονται τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες, με αποτέλεσμα τη διαταραχή της μοριακής τάξης και την πυροδότηση μίας αλυσιδωτής αντίδρασης που οδηγεί σε κυτταρική βλάβη (J. G. Salway, 2006). Ωστόσο, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν και μεταξύ τους σχηματίζοντας διμερή (ή ακόμα και πολυμερή) αν δύο (ή περισσότερες από αυτές έρθουν σε επαφή μεταξύ τους. Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες είναι σταθερές μόνο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε αδρανή μέσα (συνήθως ευγενή αέρια) ή σε κενό.



Εικόνα 1: Σχηματισμός ελεύθερης ρίζας

Ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν με δύο διακριτούς τρόπους. Ο συνηθέστερος για τα βιολογικά συστήματα είναι μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Εναλλακτικά, σχηματισμός ελευθέρων ριζών μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ομοιοπολικής διάσπασης, κατά την οποία το ζεύγος των ηλεκτρονίων είτε θα παραμείνει στο μητρικό μόριο και θα σχηματιστούν δύο ιόντα, είτε θα διαχωριστεί και θα προκύψουν δύο ρίζες.

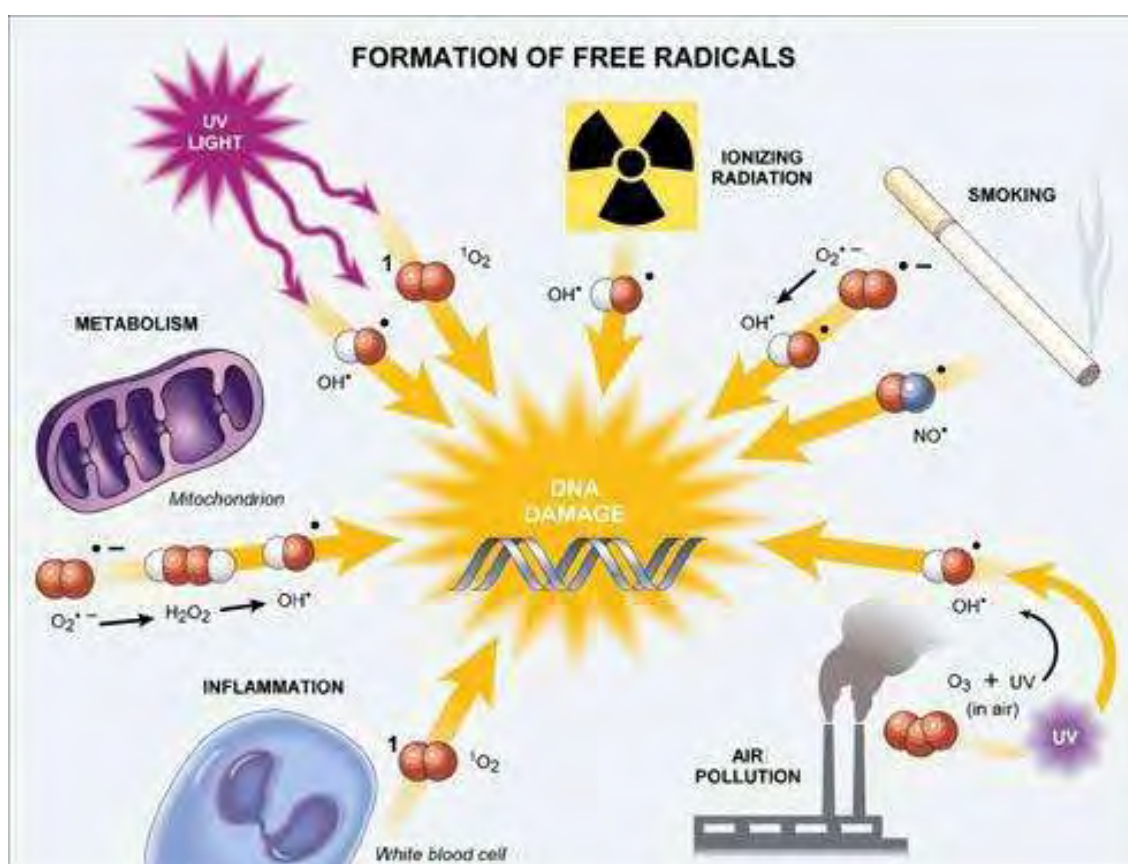
Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου, το οποίο διαθέτει ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Στο εσωτερικό των κυττάρων οι συνηθέστερες ρίζες είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) στις οποίες συγκαταλέγονται οι ρίζες υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), αλκοξειδίου ($\text{RO}\cdot$) και υπεροξειδίου ($\text{RO}_2\cdot$), καθώς επίσης και τα ανιόντα σουπεροξειδίου ($\text{O}_2\cdot^-$) και υπεροξειδίου ($\text{O}_2\cdot^{-2}$). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις, που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman & Slater, 1993). Στις **ROS** επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Halliwell, 2015).



Εικόνα 2: Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν επίσης και οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS), με συνηθέστερα εμφανιζόμενη στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον τη ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ($\text{NO}\cdot$). Η ρίζα $\text{NO}\cdot$ παράγεται από το αμινοξύ L-αργινίνη και είναι πολύ δραστική. Επιπρόσθετα, έχει μεγάλη βιολογική σημασία, καθώς χρησιμεύει στη μεταγωγή σήματος μεταξύ των κυττάρων, συμμετέχει στην αγγειοσυστολή και είναι νευροδιαβιβαστής (Halliwell & Gutteridge, 2007). Τέλος, ελεύθερες ρίζες αποτελούν και οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο, καθώς και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο.

1.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών



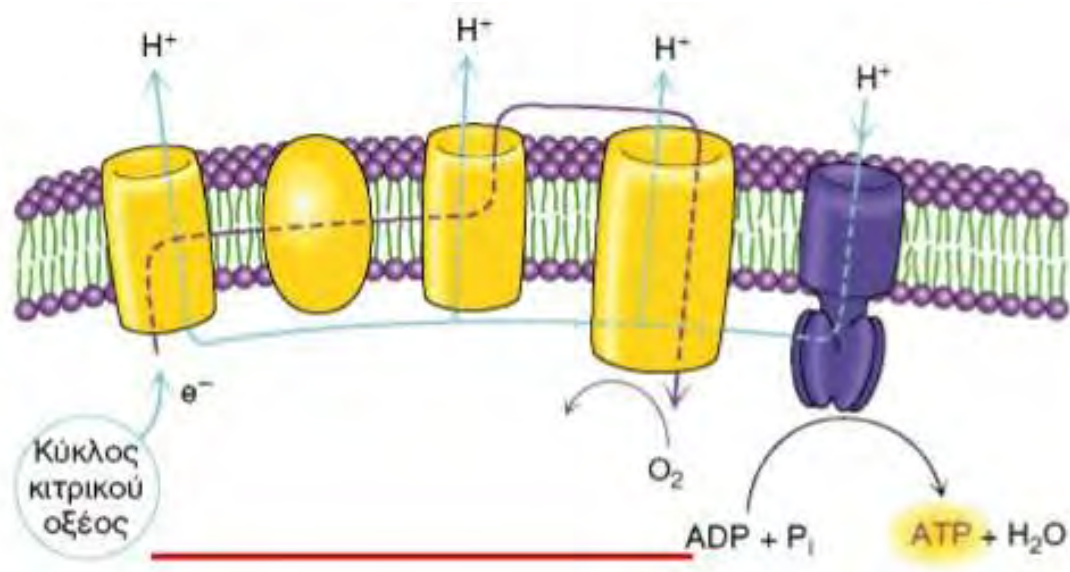
Εικόνα 3: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από εδογενείς και εξωγενείς πηγές

1.2.1. Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών παράγεται από ενδογενείς βιοχημικές διεργασίες ως αποτέλεσμα του φυσιολογικού μεταβολισμού των κυττάρων. Κυριότερη πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών αποτελεί το οξυγόνο. Παρότι σε υψηλά επίπεδα οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου είναι επιβλαβείς για τον οργανισμό, σε χαμηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζουν ευεργετικές ιδιότητες καθώς συμμετέχουν σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η μεταγωγή σήματος, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση, η μυϊκή σύσπαση, η αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπως επίσης και η συμμετοχή τους στην άμυνα του οργανισμού μέσω της διαδικασίας της φαγοκυττάρωσης. Κατά αυτόν τον τρόπο, εξασφαλίζουν την ομαλή λειτουργία των κυττάρων και κατ' επέκταση ολόκληρου του οργανισμού.

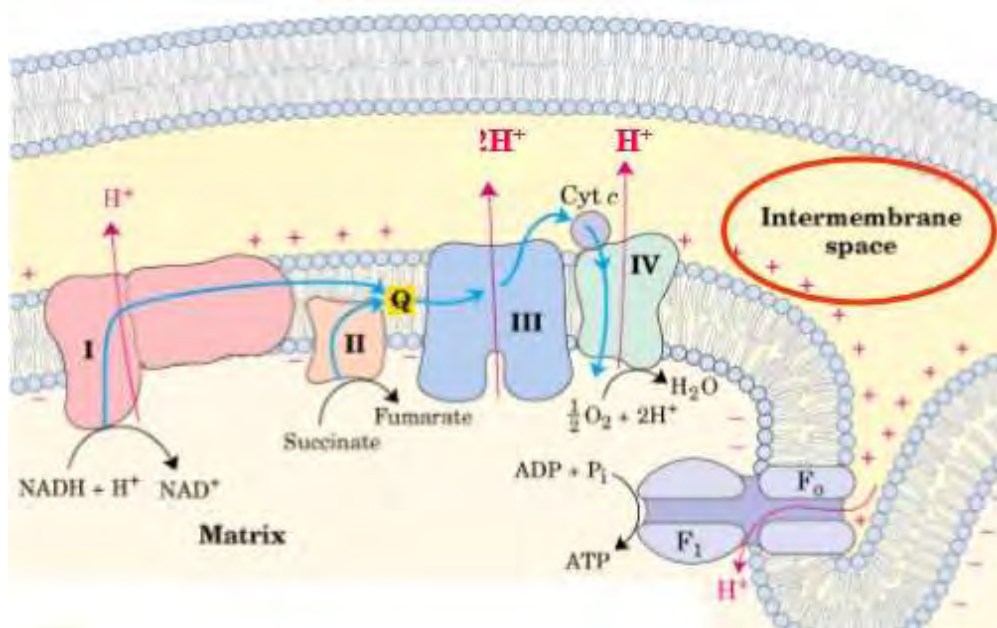
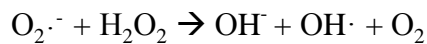
ι) Αναπνευστική αλυσίδα- Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η διαδικασία κατά την οποία παράγεται το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας στους αερόβιους οργανισμούς. Λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια και πιο συγκεκριμένα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη.



Εικόνα 4: Αναπνευστική αλυσίδα

Κατά τη διεργασία αυτή παράγεται ATP κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή/ και το FADH₂ προς το O₂ δια μέσου μιας σειράς φορέων ηλεκτρονίων. Τα μόρια NADH και FADH₂ που σχηματίζονται από τη γλυκόλυση, τον κύκλο του Krebs και την οξείδωση λιπαρών οξέων, είναι μόρια που φέρουν ένα ζευγάρι ηλεκτρονίων με υψηλό δυναμικό μεταφοράς. Η ροή των ηλεκτρονίων από το NADH ή το FADH₂ στο οξυγόνο γίνεται μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Τα σύμπλοκα αυτά καταλύουν την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό και είναι η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-ουβικινόνης, η οξειδοαναγωγή του ζεύγους ουβικινόνης-κυτοχρώματος c και η οξειδάση του κυτοχρώματος c. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει O₂^{·-} (Chance et al., 1979). Το O₂^{·-} ανάγεται σε H₂O₂ από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD). Το O₂^{·-} μπορεί να αντιδράσει με το H₂O₂ προς παραγωγή OH[·], αντίδραση που καλείται “Haber-Weiss”:



Εικόνα 5:

Ροή ηλεκτρονίων από το NADH στο O₂ μέσω μιας αλυσίδας τριών μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων.

I: οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q,

Q: ουβικινόνη ή συνένζυμο Q – μεταφέρει ηλεκτρόνια από το FADH₂

II: αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-Q

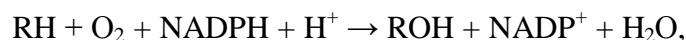
III: οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c

IV: οξειδάση του κυτοχρώματος c

Συνεπώς, κατά τη διάρκεια παραγωγής ATP, ηλεκτρόνια διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών με τη μορφή ROS ως παραπροϊόντων, γεγονός που θέτει σε κίνδυνο δομικά και λειτουργικά συστατικά των κυττάρων (πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα).

ii) Ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450

Τα ένζυμα του συστήματος του κυτοχρώματος P₄₅₀ παράγουν ελεύθερες ρίζες κατά τη δράση τους. Αναλυτικότερα, τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν σε αντιδράσεις της φάσης I, αλλά και γενικότερα στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών προς τον οργανισμό ουσιών (π.χ. φάρμακα) μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADH ή το NADPH στο O₂ και οξειδώνοντας το υπόστρωμα (δηλαδή το ξενοβιοτικό) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



όπου με RH συμβολίζεται η ξενοβιοτική ουσία.

Στην πραγματικότητα και το ξενοβιοτικό και τα NADH ή NADPH οξειδώνονται ενώ το οξυγόνο ανάγεται σε νερό. Έτσι το ενζυμικό αυτό σύστημα λέγεται και οξειδάση μικτού τύπου.

Τα ένζυμα του συστήματος P450 είναι αιμοπρωτεΐνες και εντοπίζονται σχεδόν σε όλους τους ιστούς, αλλά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο των ηπατοκυττάρων. Διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αδρανοποίηση και απομάκρυνση των ξενοβιοτικών από τον οργανισμό, αλλά μπορεί να οδηγήσουν και στη μετατροπή τους σε τοξικές και καρκινογόνες ενώσεις.

iii) Υπεροξειδιοσώματα

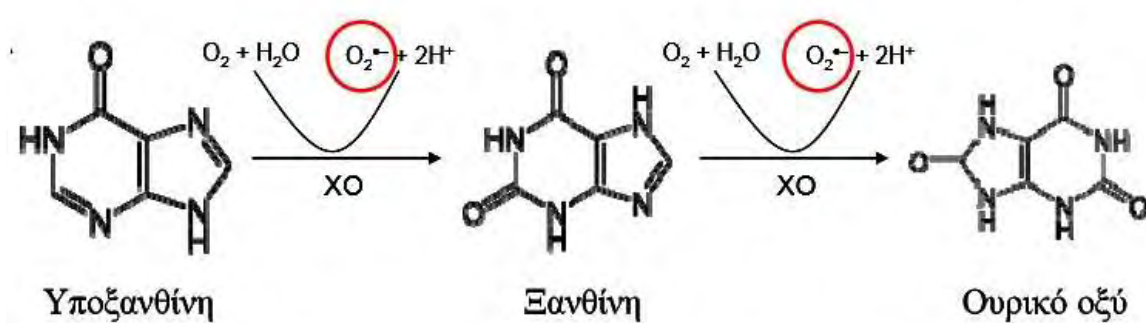
Μία ακόμα ενδογενής πηγή ROS και κυρίως H_2O_2 αποτελούν τα υπεροξειδιοσώματα. Τα μεμβρανικά αυτά κυστίδια διαθέτουν οξειδωτικά ένζυμα όπως είναι η καταλάση, τα οποία συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξείδωσης με στόχο την καταστροφή διαφόρων επιβλαβών ουσιών για το κύτταρο. Τα υπεροξειδιοσώματα συμμετέχουν, επίσης, στην αποδόμηση των λιπιδίων μέσω οξείδωσης. Κατά την διάρκεια της οξείδωσης των λιπιδίων παράγεται υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το λιπαρό οξύ στο FAD προς σχηματισμό $FADH_2$ και από αυτό στο μοριακό οξυγόνο O_2 (Berg et al., 2010). Τα υπεροξειδιοσώματα αδρανοποιούν το H_2O_2 μετά από μετατροπή του σε νερό.

iv) Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων και του αίματος συνολικά. Δεσμεύει το ατμοσφαιρικό οξυγόνο στα τριχοειδή αγγεία που περιβάλλουν τις κυψελίδες των πνευμόνων και μετατρέπεται σε οξυαιμοσφαιρίνη. Έπειτα τα ερυθροκύτταρα μεταφέρουν την οξυαιμοσφαιρίνη σε όλους τους ιστούς. Το οξυγόνο αποδεσμεύεται από την αιμοσφαιρίνη στα τριχοειδή αγγεία των ιστών και διαχέεται μέσα στα κύτταρα. Η μυοσφαιρίνη βρίσκεται στους μύες και χρησιμεύει στην παραλαβή οξυγόνου από το αίμα, στην αποθήκευσή του και στη μετακίνησή του μέσα στα μυϊκά κύτταρα. Αυτό βοηθά το μυ να αντιμετωπίζει ξαφνικές αυξήσεις στη ζήτηση οξυγόνου κατά την άσκηση. Η οξυγονωμένη μορφή της μυοσφαιρίνης ονομάζεται οξυμυοσφαιρίνη (Mougiou Vassilis C., 2008). Κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης οι απαιτήσεις του οργανισμού σε οξυγόνο είναι αυξημένες. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει στην παραγωγή ROS. Έτσι, η αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης οδηγεί στην παραγωγή $O_2^{\bullet-}$ (Cooper et al., 2002), ενώ και η αυτοοξείδωση της μυοσφαιρίνης μπορεί με ανάλογο τρόπο να απελευθερώσει H_2O_2 (Brantley et al., 1993).

ν) Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Κατά την αναερόβια άσκηση παρατηρείται το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Σε κατάσταση ισχαιμίας, η παροχή οξυγόνου στους ιστούς μειώνεται σημαντικά. Όταν αποκατασταθεί η κυκλοφορία, οι ιστοί αιματώνονται πάλι με αποτέλεσμα να αυξάνεται τόσο η παραγωγή ελευθέρων ριζών (και κυρίως $O_2^{\bullet-}$) όσο και η οξειδωτική καταστροφή των ιστών από αυτές (McBride & Kraemer, 1999). Κατά το φαινόμενο ισχαιμία-επαναιμάτωση συμμετέχει το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης και οι αντιδράσεις που καταλύονται από το ένζυμο αυτό αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών και ουρικού οξέος. Κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης λόγω της άμεσης ενέργειας που χρειάζεται ο οργανισμός το ATP διασπάται σε ADP και αυτό σε AMP. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Τα δύο στάδια της αντίδρασης αυτής, η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και η μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύονται από σχηματισμό $O_2^{\bullet-}$. Τα επίπεδα της οξειδάσης της ξανθίνης και υποξανθίνης τόσο στο πλάσμα όσο και σε ιστούς αυξάνονται μετά από αναερόβια άσκηση (Radak et al., 1999; Vina et al., 2000). Κάτω από αερόβιες συνθήκες το ATP αναπληρώνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.



Εικόνα 6: Παραγωγή ελευθέρων ριζών και ουρικού οξέος από τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης.

vi) Φλεγμονή

Ιστική βλάβη που μπορεί να προκληθεί από διάφορους παράγοντες (π.χ. παθογόνα που διαπερνούν τους εξωτερικούς φραγμούς της έμφυτης ανοσίας), είναι δυνατόν να επάγει μια ακολουθία φαινομένων, που είναι γνωστή ως φλεγμονώδης απόκριση. Η διαδικασία αυτή αποτελεί έναν από τους βασικότερους μηχανισμούς που συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού. Η οξεία φλεγμονώδης απόκριση μπορεί να καταπολεμήσει μια μόλυνση σε πρώιμο στάδιο και να πυροδοτήσει διαδικασίες που έχουν σαν αποτέλεσμα την επιδιόρθωση των ιστικών βλαβών που έχουν προκύψει. Λευκοκύτταρα προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων της φλεγμαίνουσας περιοχής και περνούν μέσω των τοιχωμάτων των τριχοειδών αγγείων, προς το μεσοκυττάριο χώρο (εξαγγείωση). Στην περιοχή της ιστικής βλάβης προσελκύονται φαγοκύτταρα, κυρίως ουδετερόφιλα αλλά και μακροφάγα, από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα (Kuby, 2007). Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν δραστικές μορφές οξυγόνου όπως H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} και υποχλωριώδες οξύ (HOCl) κατά τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Klebanoff et al., 1988).

vii) Κατεχολαμίνες

Οι κατεχολαμίνες αποτελούν μία ακόμα ενδογενή πηγή ελευθέρων ριζών που σχετίζεται άμεσα με την άσκηση. Η συγκέντρωσή τους αυξάνεται κατά την άσκηση καθώς η δράση τους είναι συνυφασμένη με την αύξηση του οξειδωτικού μεταβολισμού των σκελετικών μυών και του μυοκαρδίου μέσω ενεργοποίησης των β-αδρενεργικών υποδοχέων. Απόρροια του γεγονότος αυτού είναι η αύξηση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Elosua et al., 2003).

1.2.2. Εξωγενείς πηγές παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν και από εξωγενείς πηγές, κυρίως περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η υπεριώδης ακτινοβολία UVB (280-320nm) προκαλεί βλάβες στο δέρμα και τα μάτια, ενώ η υψηλή θερμοκρασία προκαλεί την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ ως απόκριση. Ελεύθερες ρίζες παράγονται, επίσης, από απόβλητα βιομηχανιών, από τη χρήση φυτοφαρμάκων και εντομοκτόνων και γενικότερα ξеноβιοτικών ουσιών. Η διατροφή παίζει κρίσιμο ρόλο στην αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, όταν είναι φτωχή στις απαραίτητες αντιοξειδωτικές βιταμίνες. Η μειωμένη πρόσληψη μετάλλων, επίσης, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ομαλή λειτουργία των αντιοξειδωτικών ενζύμων, των οποίων τα μέταλλα είναι απαραίτητοι συμπαράγοντες για τη δράση τους. Στις εξωγενείς πηγές των ελευθέρων ριζών περιλαμβάνονται ακόμη το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, το στρες και η άσκηση (Halliwell & Gutteridge, 2007).

1.3. Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν διπλό ρόλο στον οργανισμό, ακολουθώντας το φαινόμενο της όρμησης (hormesis). Κατά το φαινόμενο αυτό, χαμηλές συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών επιδρούν ευεργετικά στον οργανισμό διότι είναι απαραίτητες για ορισμένες θεμελιώδεις διεργασίες των κυττάρων. Όταν όμως οι συγκεντρώσεις τους υπερβαίνουν τις φυσιολογικές τιμές, σε βαθμό που δεν μπορούν να αντισταθμιστούν από τους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, οδηγούν σε πρόκληση βλαβών σε βιομόρια.

Όσον αφορά τις **θετικές επιδράσεις** των ελευθέρων ριζών, χαρακτηριστικά αναφέρεται η συμμετοχή τους σε σημαντικές βιοχημικές οδούς όπως η μεταγωγή σήματος και η γονιδιακή έκφραση. Επιπλέον, κατέχουν σπουδαίο ρόλο στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος και πιο συγκεκριμένα στις διαδικασίες της φαγοκυττάρωσης και της φλεγμονής. Τέλος, η δράση τους εντοπίζεται κατά την

ενεργοποίηση ενζύμων, την αποτοξίνωση του οργανισμού από φάρμακα και τη μυϊκή σύσπαση.

Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε σε αυξημένες τιμές οι ελεύθερες ρίζες έχουν **αρνητικές επιδράσεις**, εφόσον είναι πολύ δραστικά μόρια που αλληλεπιδρούν με βασικά δομικά και λειτουργικά στοιχεία του οργανισμού όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA προκαλώντας αλλοίωση ή καταστροφή τους. Επιπρόσθετα, σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης παθήσεων όπως ο διαβήτης, η αρτηριοσκλήρυνση, νευροεκφυλιστικές νόσοι (Alzheimer, Parkinson) και γήρανση (Halliwell & Gutteridge 1998; Halliwell, 2001), ενώ παράλληλα μπορούν να οδηγήσουν σε χρόνια φλεγμονή.

➤ **Λιπίδια**

Από το σύνολο των βιομορίων, τα λιπίδια είναι τα πλέον ευαίσθητα στην οξειδωτική καταστροφή. Το οξειδωτικό περιβάλλον που δημιουργείται στο κύτταρο ως αποτέλεσμα της παρουσίας ελευθέρων ριζών, οδηγεί στο σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως λιπιδική υπεροξείδωση και τα ασταθή προϊόντα της διασπώνται με αποτέλεσμα να προκύψουν ρίζες περοξυλίου ROO·, συζυγή διένια και μηλονική διαλδεΰδη (MDA). Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν βασικά δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Έτσι, η καταστροφή των PUFA οδηγεί σε αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητας των μεμβρανών με συχνό αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο. Τέλος, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny, 2001).

➤ **Πρωτεΐνες**

Η οξείδωση των πρωτεϊνών και των αμινοξέων από την επίδραση ελευθέρων ριζών οδηγεί στο σχηματισμό πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων αντίστοιχα. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αποτελούν ένα αξιόπιστο δείκτη της οξείδωσης των πρωτεϊνών, εφόσον είναι πολύ σταθερά μόρια. Οι καρβονυλικές

ομάδες (αλδεϋδες και κετόνες), αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα που συνδέεται με διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου (C=O) και παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης, της αργινίνης, της λυσίνης και της θρεονίνης, αμινοξέα ευπαθή σε οξειδωση. Η καρβονυλίωση είναι μία μη αναστρέψιμη διαδικασία, και πρωτεΐνες που έχουν καρβονυλιωθεί σε μέτριο βαθμό μπορούν να διασπαστούν από το πρωτεάσωμα και τα λυσοσώματα. Στην περίπτωση, όμως, που οι βλάβη που έχουν υποστεί οι πρωτεΐνες είναι οξεία τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και σχηματίζουν συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους. Αξιοσημείωτο είναι πως η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών μπορεί να επηρεάσει έμμεσα και τη λειτουργία άλλων βιομορίων όπως το DNA. Έτσι αν καρβονυλιοθούν ένζυμα που συμμετέχουν στη σύνθεση (DNA πολυμεράσες) ή την επιδιόρθωση του DNA, απορυθμίζονται ως επακόλουθο και οι αντίστοιχες διαδικασίες.

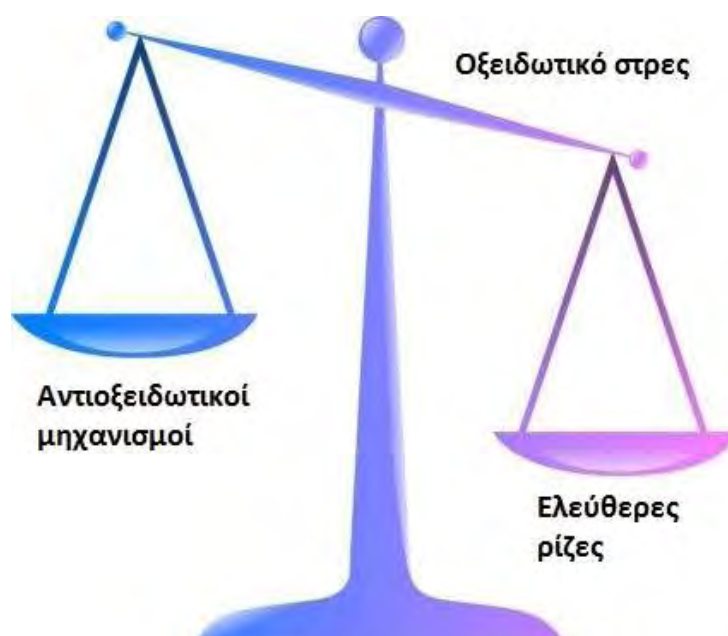
➤ DNA

Ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν, ωστόσο, και άμεσα βλάβες στο DNA αλλοιώνοντας τη δομή του παρότι ως μόριο είναι γενικά σταθερό. Τέτοιες βλάβες αποτελούν σπασίματα στο DNA, τροποποιήσεις ή απώλεια βάσεων, όπως επίσης και βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης. Τελικό αποτέλεσμα είναι η πρόκληση μεταλλάξεων που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση και γήρανση (Radak et al., 1999). Επιπλέον, ρίζες υδροξυλίου (OH·) και περοξυλίου (ROO·) μπορούν να προκαλέσουν μονόκλωνες ριζεις σε πλασμιδιακό DNA.

1.4. Οξειδωτικό στρες

Σε φυσιολογικές συνθήκες ή σε κατάσταση ηρεμίας οι ελεύθερες ρίζες βρίσκονται σε ισορροπία με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού. 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, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων (Halliwell & Gutteridge, 1990, Dotan, 2004). Η διατάραξη της

ισορροπίας αυτής μπορεί οφείλεται αφενός σε μειωμένη δράση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων και αφετέρου σε αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών εξαιτίας παρατεταμένης έκθεσης σε κάποιο οξειδωτικό παράγοντα. Έτσι, η εμφάνισή του εξαρτάται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς παράγοντες και εμπλέκεται στη παθογένεια πολλών νοσημάτων (Mylonas C and Kouretas D., 1999; Meeus M. Et al., 2013). Το οξειδωτικό στρες έχει θεωρηθεί τόσο αιτία όσο και αποτέλεσμα ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Halliwell, 2001).



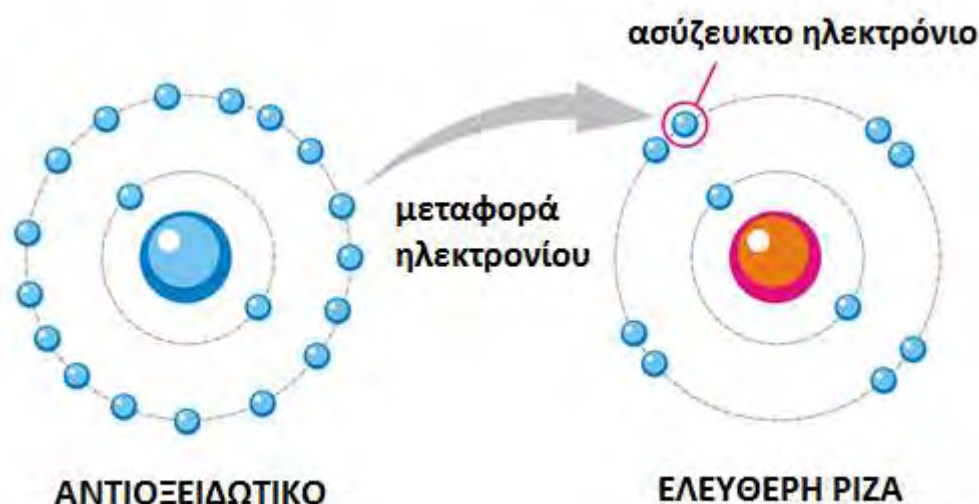
Εικόνα 7: Οξειδωτικό στρες

1.5. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell & Gutteridge, 1999). 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). Μπορεί να παράγονται ενδογενώς από τον οργανισμό ή να είναι μόρια, που προσλαμβάνονται κυρίως μέσω της διατροφής και

συνήθως έχουν μικρό μοριακό βάρος. Βασική προϋπόθεση για να δρα ένα μόριο αντιοξειδωτικά είναι αφενός να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες και αφετέρου να σχηματίζει σχετικά αδρανή και λιγότερο δραστικά προϊόντα από τις ρίζες που αδρανοποιεί.

Οι οργανισμοί για να προστατευτούν από τις βλαβερές επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών, έχουν αναπτύξει μια σειρά από προστατευτικούς μηχανισμούς. Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί. Χαρακτηριστικά τους είναι ότι μπορούν να εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών, να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά στοιχεία και να βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.



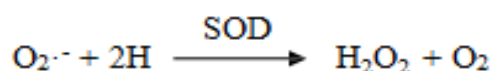
Εικόνα 8: Εξουδετέρωση ελεύθερης ρίζας από αντιοξειδωτικό

1.5.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί

Η δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων έγκειται στη διάσπαση των ελευθέρων ριζών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ενζύμων αποτελούν η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης (Prx) και η αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

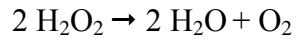
Το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) υπάρχει σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς και καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 , σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



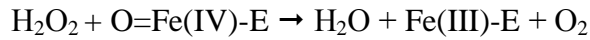
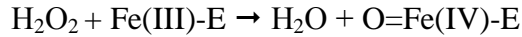
Το ένζυμο αυτό εμφανίζεται με τρεις μορφές ανάλογα με το σημείο εντοπισμού του. Έτσι διακρίνεται η κυτταροπλασματική μορφή που περιέχει Cu και Zn στο ενεργό της κέντρο (Cu/ZnSOD), η μιτοχονδριακή με Mn στο ενεργό κέντρο (MnSOD) και η εξωκυτταρική. Το μεγαλύτερο μέρος του $O_2^{\cdot-}$ παράγεται στα μιτοχόνδρια κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση και ανάγεται από την μιτοχονδριακή SOD, ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα όπου και ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD (Powers & Lennon, 2000).

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι ένα ακόμα πολύ σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο, το οποίο συναντάται σε όλους σχεδόν τους ζώντες οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Είναι παρούσα σε όλα τα κύτταρα και κυρίως στα ερυθροκύτταρα και στο ήπαρ, ενώ ενδοκυτταρικά εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Ως προϊόν του μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς παράγεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), που είναι ιδιαίτερα τοξικό και πρέπει να μετατραπεί άμεσα σε μία λιγότερο επικίνδυνη χημική ένωση. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζει η καταλάση καταλύοντας την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο που είναι αβλαβή για τον οργανισμό. Είναι ένα τετραμερές με τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν τέσσερις πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Η αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε δύο στάδια:



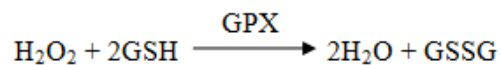
Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεδεμένη στο ένζυμο.

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



Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Η GPX είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα και δρα διασπώντας το H_2O_2 σε αδρανές H_2O . Αυτό το κατορθώνει χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η οποία οξειδώνεται από το H_2O_2 και μεταβαίνει στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Η πορεία αυτή περιγράφεται με την παρακάτω αντίδραση:

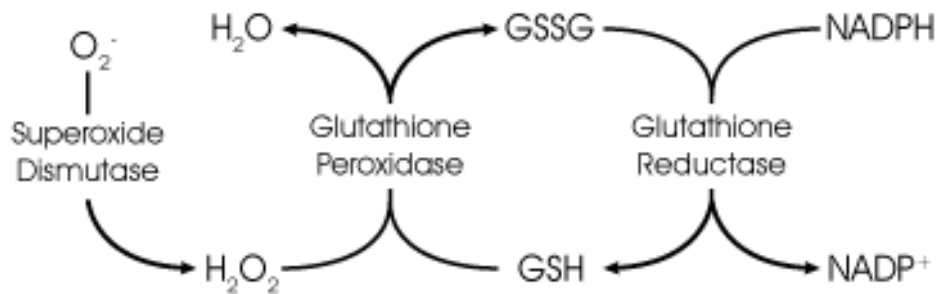
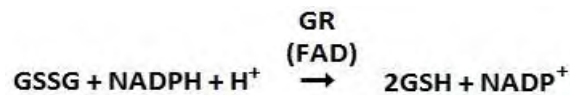


Η GPX και η CAT έχουν την ίδια δράση πάνω στο H_2O_2 αλλά η GPX έχει μεγαλύτερη συγγένεια με αποτέλεσμα να το αποικοδομεί κατά προτίμηση σε φυσιολογικές συνθήκες (Antunes et al., 2002).

Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Το ένζυμο αναγωγή της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της GSH σε GSSG, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στην οξειδωμένη

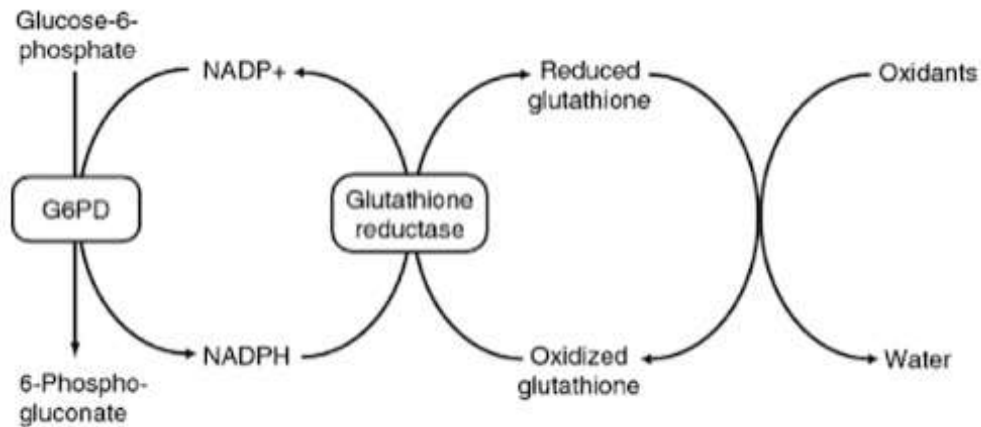
και την ανημένη μορφή της γλουταθειόνης μέσα στο κύτταρο. Η αντίδραση γίνεται παρουσία NADPH που λειτουργεί ως αναγωγικό μέσο. Η GR χρησιμοποιεί σα συνένζυμο το FAD (φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνιά του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης, οδηγώντας έτσι στη διάσπασή τους. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η ακόλουθη:



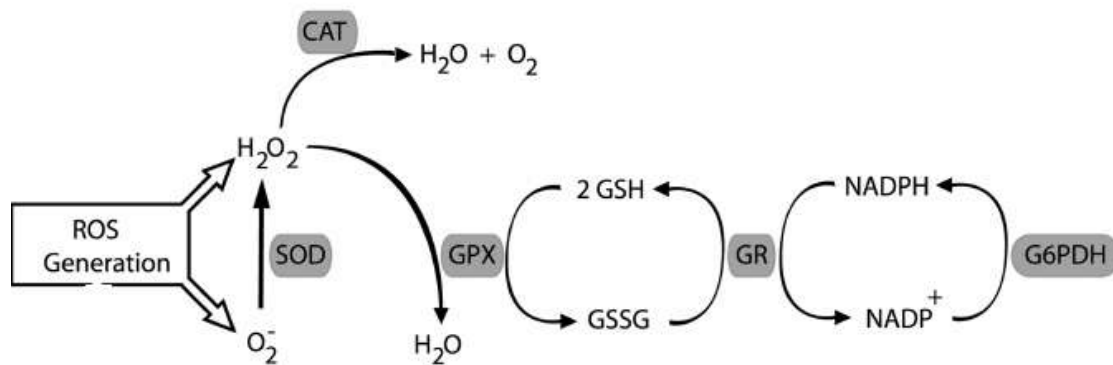
Εικόνα 9: Ανακύκλωση της γλουταθειόνης

Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD)

Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης είναι ένα ένζυμο που φυσιολογικά υπάρχει στα ερυθροκύτταρα. Αυτό το ένζυμο είναι μέρος του βιοχημικού μονοπατιού της φωσφορικής πεντόζης που μεταβολίζει τη γλυκόζη και λειτουργεί για να προστατεύσει τα κύτταρα από βλάβες που προκαλούνται από οξειδωτικούς παράγοντες. Η G6PD μετατρέπει την 6-φωσφορική γλυκόζη σε 6-φωσφογλυκονικό, ενώ παράλληλα παρουσία του αναγωγικού NADPH αποτελεί πηγή ανημένης γλουταθειόνης για τα ευθροκύτταρα.



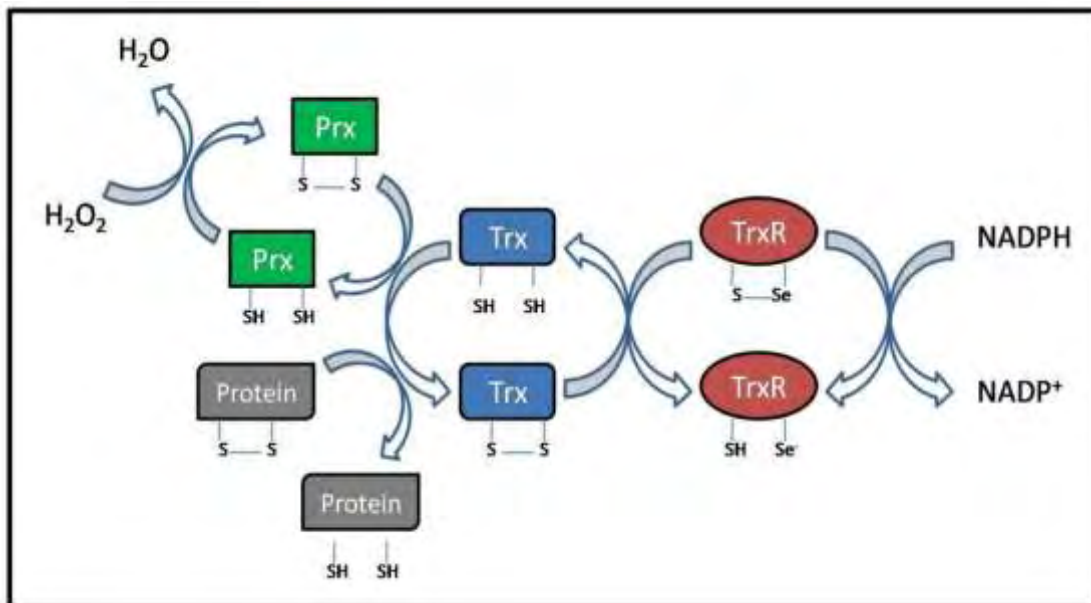
Εικόνα 10: Σύνδεση G6PD με την Αναγωγή της γλουταθειόνης



Εικόνα 11: Σύνοψη της δράσης των ενζύμων SOD, CAT, GPX, GR και G6PD

Υπεροξειδάση (Prx) και Αναγωγή (TrxR) της θειορεδοξίνης

Η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης (Prx) ανάγει τόσο το H₂O₂ όσο και τα αλκυλοδροϋπεροξειδία σε συνδυασμό με την αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR), τη θειορεδοξίνη και το NADPH (Netto et al., 1996).



Εικόνα 12: Μηχανισμός δράσης των ενζύμων Prx και TrxR

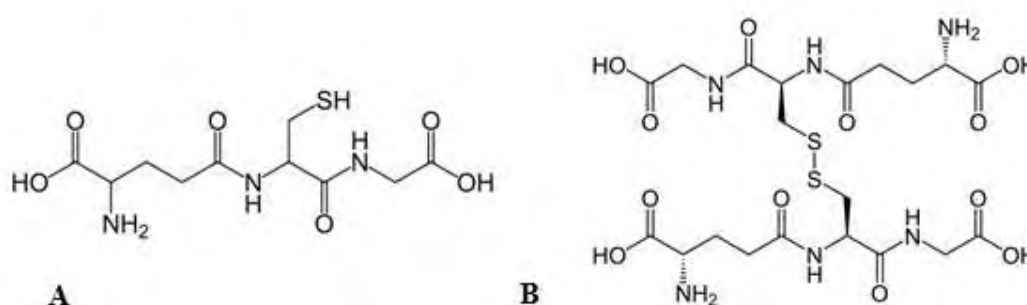
1.5.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Όταν μία ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με ένα μόριο, οδηγεί στην παραγωγή δευτερογενών ριζών, οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν περαιτέρω με άλλα μόρια με αποτέλεσμα την παραγωγή ακόμα περισσότερων ριζών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Μία τέτοια αντίδραση μπορεί να σταματήσει όταν δύο ρίζες αντιδράσουν μεταξύ τους σχηματίζοντας διμερές, ή αν εξουδετερωθούν από μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν μόρια όπως η γλουταθειόνη, το ουρικό οξύ, οι βιταμίνες C και E, τα καροτενοειδή και το σελήνιο.

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι η πιο άφθονη θειόλη στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. Ενδοκυττάρια εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) ιδιότητές της παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Συμμετέχει, επιπλέον, στο μεταβολισμό

φαρμάκων, ασβεστίου καθώς και στις λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και σε διαδικασίες όπως η απομάκρυνση των ξενοβιοτικών, η διατήρηση των επιπέδων των θειολικών ομάδων των πρωτεϊνών, η απομάκρυνση υπεροξειδίων και ελευθέρων ριζών και η μεταφορά αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Η GSH και η GSSG βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία και ο λόγος τους είναι συχνά ενδεικτικός της παρουσίας οξειδωτικού στρες.

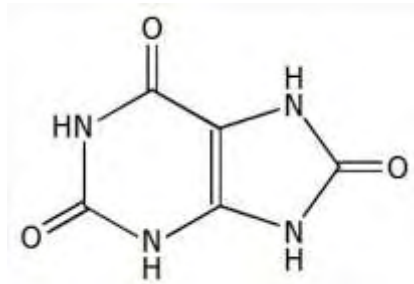


Εικόνα 13: Συντακτικός τύπος ανηγμένης (A) και οξειδωμένης (B) γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη λειτουργεί ως συνένζυμο σε πολλά ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειόλτρανσφεράση.

Ουρικό οξύ

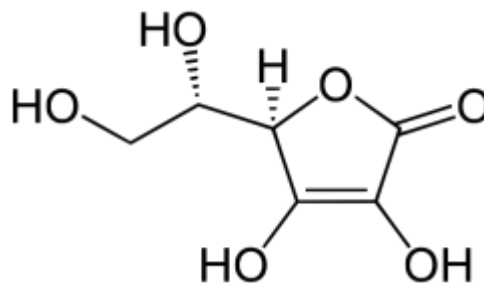
Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και να συμβάλει στην προστασία από τις ελεύθερες ρίζες. Το ουρικό οξύ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



Εικόνα 14: Συντακτικός τύπος ουρικού οξέος

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ, είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη δραστική τόσο στο εξωκυττάριο υγρό όσο και στο κυτταρόπλασμα. Λειτουργεί ως αναγωγικό μέσο, δίνοντας ηλεκτρόνια σε ενζυμικές και μη ενζυμικές αντιδράσεις. Επιπλέον, αποτελεί ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο, εφόσον μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα ελεύθερες ρίζες. Συμβάλλει στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και διευκολύνει την απορρόφηση άλλων θρεπτικών συστατικών, όπως η βιταμίνη E και το σελήνιο (Γιαννακοπούλου, 2009).

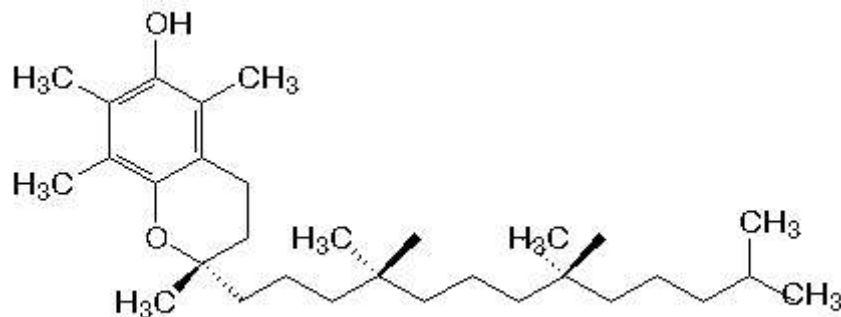


Εικόνα 15: Συντακτικός τύπος ασκορβικού οξέος

Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι λιποδιαλυτή και συναντάται σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η α-τοκοφερόλη είναι η πλέον δραστική μορφή της βιταμίνης E στους ανθρώπους και αποτελεί ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Λόγω της λιποδιαλυτής φύσης της έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται σε κυτταρικές μεμβράνες και να τις προστατεύει από οξειδωτικές βλάβες. Ως αντιοξειδωτικό, σταματά την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου που σχηματίζονται κατά την λιπιδική

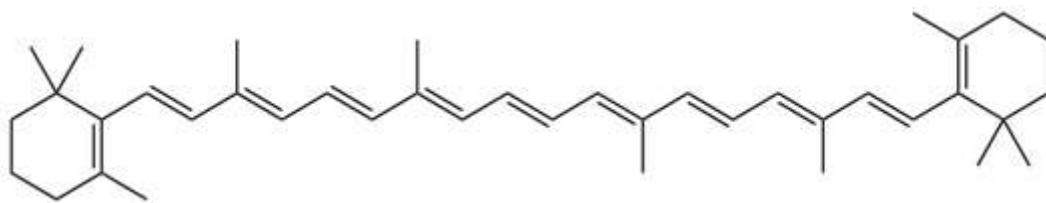
υπεροξειδωση δημιουργώντας μια ρίζα τοκοφερόλης, η οποία στη συνέχεια ανάγεται από μια άλλη αντιοξειδωτική ουσία. Επίσης, προστατεύει από την οξειδωση την βιταμίνη A (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Εικόνα 16: Βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη)

B-καροτένιο

Το B-καροτένιο, ανήκει στην οικογένεια των καροτενοειδών που αποτελούν φυσικές χρωστικές. Είναι μία προβιταμίνη καθώς μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη A. Το B-καροτένιο είναι από τα πλέον ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία δεσμεύουν το μονήρες οξυγόνο (Pham-Huy et al., 2008). Είναι λιποδιαλυτό μόριο και κατανέμεται στις κυτταρικές μεμβράνες, όπου μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. (Halliwell & Gutteridge, 1999). Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E αλλά και το σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998).



Εικόνα 17: Δομή B-καροτενίου

Σελήνιο (Se)

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

1.6. Άσκηση και οξειδωτικό στρες

Πλήθος εργασιών αποδεικνύει ότι η άσκηση μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω πολλών διαφορετικών μηχανισμών. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση εξαρτάται άμεσα από την έντασή της. Έτσι, μεγάλης έντασης άσκηση έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (Palmer et al., 2003), σε τέτοια επίπεδα που η αντιοξειδωτική άμυνα των ιστών να μην μπορεί να τα εξουδετερώσει. Τότε εμφανίζεται το προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες, το οποίο προκαλεί οξειδωτική καταστροφή πρωτεϊνών, λιπιδίων και άλλων βιομορίων (Finaud et al., 2006). Το γεγονός αυτό έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών, που έχουν μελετήσει την επίδραση της άσκησης (αερόβιας και αναερόβιας) στο οξειδωτικό στρες τόσο στον άνθρωπο όσο και σε πειραματόζωα.

Κατά τη διάρκεια της άσκησης, αλλά και για κάποιο χρονικό διάστημα μετά την ολοκλήρωσή της, παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές σε διάφορες διεργασίες του οργανισμού. Συνεπώς, η άσκηση μπορεί να επηρεάσει ενδογενείς μηχανισμούς και να αυξήσει ή να μειώσει τη συγκέντρωση ουσιών, οδηγώντας σε ποικίλες προσαρμογές. Χαρακτηριστικές αποκρίσεις του οργανισμού στην άσκηση είναι η αύξηση της αιματικής ροής και της καρδιακής συχνότητας, όπως επίσης και η αύξηση στην πρόσληψη και την κατανομή του οξυγόνου στους ιστούς για την κάλυψη των αυξημένων αναγκών των μυών. Επιπλέον, ενισχύονται διεργασίες που οδηγούν στην παραγωγή ενέργειας όπως η γλυκόλυση, η γλυκογονόλυση, η λιπόλυση και φυσικά η

οξειδωτική φωσφορυλίωση μέσω της οποίας παράγεται και το μεγαλύτερο μέρος του ATP στα μιτοχόνδρια. Παράλληλα, παρατηρείται αυξημένη παραγωγή μορίων όπως οι κατεχολάμινες, αλλά και βιοσύνθεση και δράση ενζύμων όπως η οξειδάση της ξανθίνης, η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση και η αναγωγή της γλουταθειόνης καθώς και πολλά άλλα. Επιπρόσθετα, εξαιρετικά επίπονη άσκηση οδηγεί σε φαινόμενα φλεγμονώδους αντίδρασης στους μύες, ενεργοποιώντας το αμυντικό σύστημα του οργανισμού. Απόρροια όλων αυτών των διεργασιών είναι τόσο ο σχηματισμός όσο και η εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών, διατηρώντας έτσι μια δυναμική ισορροπία απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία και επιβίωση του οργανισμού.

Η πρώτη μελέτη που κατέδειξε τη σχέση ανάμεσα στην άσκηση και το οξειδωτικό στρες πραγματοποιήθηκε το 1982 (Davies et al., 1982) και ακολούθησε πληθώρα ερευνών που συσχέτισαν την άσκηση με το οξειδωτικό στρες. Έτσι, μετά από χρόνια άσκηση βρέθηκε αυξημένη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, GPX) στο σκελετικό μυ, την καρδιά και το ήπαρ (Jenkins, 1988; Ji, 1999), ενώ μετά από εξαντλητική άσκηση βρέθηκε ότι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξάνονται στο πλάσμα και το γαστροκνήμιο μυ μετά από εξαντλητική άσκηση (Gomez-Cabrera et al., 2005; Veskokoukis et al., 2008).

Αναλυτικότερα, όσον αφορά την αερόβια άσκηση (τρέξιμο, ποδηλασία, κολύμπι) έχει παρατηρηθεί αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών στους σκελετικούς μυς και την καρδιά (Davies, Quintanilla 1992; Kumar, et al., 1992), γεγονός που μπορεί να διαπιστωθεί από τη μεταβολή συγκεκριμένων δεικτών στο αίμα. Έτσι, μετά από άσκηση μέχρι εξάντλησης σε δαπεδοεργόμετρο παρατηρήθηκε αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης και της πρωτεϊνικής οξείδωσης και μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στο πλάσμα (Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2006). Η άσκηση αύξησε σημαντικά την οξείδωση της γλουταθειόνης μετά από μετρήσεις που έγιναν σε δείγμα αίματος αθλητών ποδηλασίας (Aguilo et al., 2005), ενώ η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αυξήθηκε σε ποδηλάτες που ασκήθηκαν στο 100% της VO_{2max} σε σύγκριση με ποδηλάτες που ασκήθηκαν στο 40% της VO_{2max} (Lovlin et al., 1987). Επιπλέον, μετρήσεις στο αίμα αθλητών κολύμβησης των 800 μέτρων έδειξαν αυξημένη δραστηκότητα του ενζύμου καταλάση (Inal et al., 2001). Στην περίπτωση της αερόβιας άσκησης, τέλος, φαίνεται

πως αυξάνεται και η συγκέντρωση τόσο των ενζυμικών όσο και των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών (Inal,Akyuz,Turgut,2001).

Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξαν και έρευνες με αντικείμενο μελέτης την αναερόβια άσκηση όπως η άρση βαρών, τα σπριντ και τα άλματα (Groussard et al., 2003). Όμως και στην περίπτωση της διαλειμματικής άσκησης, στην οποία εμπεριέχονται ομαδικά αθλήματα όπως το ποδόσφαιρο και το μπάσκετ που χαρακτηρίζονται από διαστήματα πολύ έντονης προσπάθειας που εναλλάσσονται με διαστήματα ηπιότερης προσπάθειας (διαλείμματα ανάπαυσης ή ενεργητικής ανάπαυσης), έχει βρεθεί αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (Svensson et al., 2002).

1.7. Έκκεντρη άσκηση και οξειδωτικό στρες

Έκκεντρη συστολή έχουμε όταν ο μυς αυξάνει το μήκος του στην προσπάθεια του να υπερνικήσει μια εξωτερική αντίσταση. Κατά την έκκεντρη συστολή ενεργοποιείται όπως και στην ομόκεντρη συστολή (μείωση του μήκος του μυός) ο κύκλος των εγκάρσιων γεφυρών με τη διάφορα ότι τα μυονημάτια της ακτίνης τραβιούνται μακριά από το κέντρο της ζώνης A και το σαρκομέριο επιμηκώνεται. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό της έκκεντρης άσκησης σε σχέση με την ομόκεντρη είναι ότι προκαλεί μεγαλύτερη μυϊκή βλάβη (Jamurtas et al., 2000; Paschalis, Koutedakis, Jamurtas, Mougios, & Baltzopoulos, 2005). Η μυϊκή βλάβη, περιλαμβάνει αποδιοργάνωση του σαρκειλήματος, καταστροφή του σαρκοπλασματικού δικτύου (Armstrong, 1990), καταστροφή του κυτταροπλάσματος (Friden, 1984) καθώς και πρόκληση ανωμαλιών στον εξωκυττάριο χώρο της μυϊκής ίνας (Stauber, 1989). Τα συμπτώματα που παρουσιάζονται έπειτα από μυϊκή βλάβη είναι ο μυϊκός πόνος, η πτώση της μυϊκής δύναμης, η μείωση του εύρους κίνησης του μυός, η αποδιοργάνωση της δομής του και η εκκροή μυϊκών πρωτεϊνών στο αίμα.

Αρκετές έρευνες στη βιβλιογραφία έχουν ως αντικείμενο έρευνας και μελέτης το μυϊκό ιστό. Μικρός αριθμός από αυτές επικεντρώθηκαν στη μυϊκή βλάβη και τις φυσιολογικές αλλαγές που επέρχονται στον οργανισμό μετά από έκκεντρη άσκηση. Με βάση τα δεδομένα αυτά μας είναι πλέον γνωστό ότι η έκκεντρη άσκηση προκαλεί μυϊκή βλάβη (Jamurtas et al., 2000; Paschalis et al., 2005) καθώς και αλλαγές σε

δείκτες προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες (Close, Ashton, Cable, Doran, & MacLaren, 2004; Close, Ashton, McArdle, & MacLaren, 2005; Goldfarb, Bloomer, & McKenzie, 2005; Lee et al., 2002). 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).

Ο σημαντικότερος λόγος για τις μεταβολές αυτές στους δείκτες του οξειδωτικού στρες φαίνεται να είναι η φλεγμονώδης αντίδραση του οργανισμού στην προκληθείσα μυϊκή βλάβη. Έπειτα από επίπονη άσκηση βρέθηκε μια σημαντική διείσδυση φαγοκυττάρων στο μυ και μια φλεγμονώδης αντίδραση που συνδέεται με την εκδήλωση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου (Aoi et al., 2004). Η φλεγμονώδης αυτή αντίδραση του οργανισμού αναστέλλει αρχικά την αποκατάσταση του μυός, σκοπεύοντας στην επούλωση του τραυματισμένου ιστού. Κατά την αντίδραση αυτή του οργανισμού αυξάνεται η συγκέντρωση λευκοκυττάρων στο αίμα και έχουμε είσοδο φαγοκυττάρων μέσα στο μυ προκαλώντας αύξηση των δραστικών στοιχείων αμέσως μετά αλλά και ώρες μετά τη μυϊκή βλάβη που προκλήθηκε από την άσκηση (Close, Ashton, McArdle et al., 2005). Η έκκεντρη άσκηση λόγω της μυϊκής βλάβης που επιφέρει μπορεί να προκαλέσει λευκοκυτταρική διήθηση επομένως και οξειδωτικό στρες (Close, Ashton, McArdle et al., 2005), αφού τα ουδετερόφιλα που ενεργοποιούνται προκαλούν την παραγωγή αρκετών οξειδωτικών μέσων με σκοπό την απομάκρυνση του κατεστραμμένου μυϊκού ιστού και την επιδιόρθωση του (Close, Ashton, McArdle et al., 2005). Τα δραστικά στοιχεία εάν δράσουν ανεξέλεγκτα μπορούν να καταστρέψουν και υγιή μυϊκό ιστό (Close, Ashton, McArdle et al., 2005). Η παραγωγή αυτών των δραστικών στοιχείων που συνδέονται με την αντιμετώπιση της φλεγμονής φαίνεται να διαρκεί για 3 μέρες μετά από έκκεντρη άσκηση (Close et al., 2004). Συμπερασματικά, ένα σημαντικό μέρος της αύξησης του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό έπειτα από έκκεντρη άσκηση φαίνεται να οφείλεται στα ουδετερόφιλα που ενεργοποιούνται στο σημείο της φλεγμονής.

Παράλληλα με τις μεταβολές που επιφέρει στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του αίματος η έκκεντρη άσκηση προκαλεί και μείωση των λειτουργικών ικανοτήτων του μυός. Συγκεκριμένα επιφέρει μείωση της παραγόμενης ροπής και μείωση του εύρους κίνησης του μυός, δυο αξιόπιστων δεικτών (Bloomer, Goldfarb, Wideman, McKenzie, & Consitt, 2005) που αποτελούν σημαντικούς παράγοντες προσδιορισμού της προκληθείσας μυϊκής βλάβης (Aguilo et al., 2005; Warren, Lowe, & Armstrong, 1999). Επομένως υποθετικά δημιουργείται το ερώτημα ότι οι αλλαγές που έχουν επέλθει στους δείκτες προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες ίσως να μπορούν να συσχετιστούν και να εξηγήσουν μεταβολές στους δείκτες προσδιορισμού της μυϊκής βλάβης. Σε δυο σχετικές έρευνες στις οποίες έγινε μέτρηση της μέγιστης παραγόμενης ροπής (Close et al., 2004; Close, Ashton, Cable et al., 2005) και σε δυο άλλες που έγινε μέτρηση της μέγιστης παραγόμενης ροπής και του εύρους κίνησης (Lee et al., 2002; Saxton, Donnelly & Roper, 1994) έπειτα από μυϊκή βλάβη, δεν βρέθηκε καμία κοινή εκδήλωση των δεικτών μυϊκής βλάβης και του οξειδωτικού στρες. Βέβαια, είναι δύσκολο να αποδειχθεί ότι υπάρχει κάποια κοινή σχέση μεταξύ των μεταβολών των δεικτών της μυϊκής βλάβης και του οξειδωτικού στρες έπειτα από έκκεντρη άσκηση. Ο λόγος είναι ότι οι μετρήσεις που χρησιμοποιούνται για να προσδιορίσουν τη μυϊκή βλάβη καθώς και οι δείκτες προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες συχνά παρουσιάζουν και διαφορετική κινητική ακόμη και στο ίδιο ερέθισμα.

Παράλληλα τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες που αναφέρονται στις περισσότερες έρευνες που ασχολούνται με την μυϊκή βλάβη έπειτα από έκκεντρη άσκηση δεν υποδηλώνουν απαραίτητα μια αρνητική κατάσταση για τον οργανισμό. Η αύξηση της παράγωγης δραστικών στοιχείων είναι και επιθυμητή για να αντιμετωπιστεί η φλεγμονή που δημιουργήθηκε μετά από την έκκεντρη άσκηση και να γίνει επιδιόρθωση του μυός.

Η έκκεντρη άσκηση, συνεπώς, αυξάνει τη συγκέντρωση δεικτών του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό. Τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες μπορεί να διαρκέσουν για αρκετές μέρες μετά το τέλος της έκκεντρης άσκησης, σε αντίθεση με την άσκηση που δεν επιφέρει μυϊκή βλάβη όπου οι δείκτες του οξειδωτικού στρες επιστρέφουν στα φυσιολογικά επίπεδα μετά από μερικές ώρες (Aguilo et al., 2005; Bloomer & Goldfarb, 2004; Close et al., 2004).

ΣΚΟΠΟΣ

Σε παλιότερες έρευνες στη βιβλιογραφία, βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στους δείκτες του οξειδωτικού στρες ανάμεσα στα άτομα (Margaritelis *et al*, 2014; Stagos *et al*, 2015). Έτσι, σκοπός της παρούσας εργαστηριακής μελέτης ήταν η διερεύνηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ατόμων τις επόμενες μέρες έπειτα από την πραγματοποίηση έκκεντρης άσκησης σε ισοκινητικό δυναμόμετρο. Επιπλέον, θέλαμε να δούμε αν το αθλητικό ιστορικό ορισμένων ατόμων επηρεάζει τις μεταβολές στους δείκτες του οξειδωτικού στρες σε διαφορετικό βαθμό σε σχέση με άτομα που δεν έχουν επαφή με κάποιας μορφής άσκηση, όταν και οι δύο ομάδες υποβάλλονται σε μία τόσο επίπονη και απαιτητική άσκηση όπως η έκκεντρη.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συμμετέχοντες

Στη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης συμμετείχαν δεκαοκτώ νέοι εθελοντές, άνδρες και γυναίκες (ηλικία: $24 \pm 0,94$ χρόνια, ύψος: $176,1 \pm 2,08$ cm και βάρος: $75,80 \pm 2,87$ kg). Από την έρευνα αποκλείστηκαν άτομα που είχαν κάποιο ιστορικό μυοσκελετικό τραυματισμό στα κάτω άκρα και συνεπώς τους περιόριζε τη δυνατότητα να εκτελέσουν 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 ισοροπίας 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 ενθαρρύνθηκαν 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 διάλειμμα 2 λεπτών, ενώ συνολικός χρόνος άσκησης ήταν 15 λεπτά. Η

ανατροφοδότηση της έντασης και της διάρκειας της άσκησης παρέχονται αυτόματα από το δυναμόμετρο. Κατά τη διάρκεια της άσκησης, οι εθελοντές ενθαρρύνονταν λεκτικά, ώστε η προσπάθειά τους να είναι η μέγιστη δυνατή. Πριν από την πραγματοποίηση της άσκησης, οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε ζέσταμα 8 λεπτών που περιελάμβανε ποδηλασία σε κυκλικό εργόμετρο (70 rpm, 50 W). Επιπλέον, πραγματοποίησαν 1 σετ των 9 ομόκεντρων επαναλήψεων, καθώς και 1 σετ των 7 έκκεντρων επαναλήψεων στο ισοκινητικό δυναμόμετρο ως ζέσταμα και εξοικείωση με τη διαδικασία. Η επιλογή του ποδιού που πραγματοποίησε την άσκηση έγινε τυχαία από τους ίδιους τους εθελοντές.

2.3. Αξιολόγηση του μυϊκού πόνου

Από τους εθελοντές που συμμετείχαν ζητήθηκε να αξιολογήσουν τον καθυστερημένο μυϊκό πόνο (delayed onset muscle soreness, DOMS) που ένιωθαν αμέσως μετά την συνεδρία της έκκεντρης άσκησης, καθώς και 24, 48 και 72 ώρες μετά. Η αξιολόγηση έγινε με κριτήριο το βάδισμα (DOMSw) και το κάθισμα (DOMSq). 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. Συλλογή του αίματος και επεξεργασία

Από όλους τους συμμετέχοντες στο πείραμα λήφθηκε φλεβικό αίμα από τον βραχίονα (7mL) πριν, και 24, 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση. Τα 6ml αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάρια EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) για τις μετρήσεις της TAC, TBARS, πρωτεϊνικών καρβονυλίων και τη δραστικότητα γλουταθειόνης και καταλάσης. Ενώ το υπόλοιπο 1ml αίματος που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (ORP) συλλέχθηκε σε σωληνάρια ηπαρίνης. Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν αμέσως στα 1370 g (όπου g η σχετική φυγοκεντρική δύναμη, RCF) για 10 λεπτά στους 4 °C για το διαχωρισμό του

πλάσματος, το οποίο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε σε μικρά σωληνάκια (erppendorf). Στη συνέχεια, τα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα στο κάτω μέρος των σωλήνων λύθηκαν με τη χρήση απεσταγμένου νερού 1:1 (v/v), έπειτα από έντονη ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντριση στα 4020 g για 15 λεπτά στους 4 °C και συλλογή του προϊόντος λύσης των ερυθροκυττάρων για τη μέτρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης και της δραστηριότητας του ενζύμου καταλάσης. Το πλάσμα και το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα φυλάχθηκαν στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για τις απαιτούμενες βιοχημικές αναλύσεις.

2.5. 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) και η χρήση του έχει εφαρμοστεί και σε παλαιότερες έρευνες του εργαστηρίου (Spanidis et al., 2015; Stagos et al., 2015b; Stagos et al., 2015a). 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, συγκεκριμένα 30 μl πλάσματος, μέσα σε τέσσερα περίπου λεπτά, δύο διακριτά στοιχεία για τον προσδιορισμό του ORP, το “static ORP” (sORP) και το “capacity ORP” cORP.

Ο δείκτης sORP αντιπροσωπεύει την ολοκληρωμένη ισορροπία των οξειδωτικών και αναγωγικών σε ένα δείγμα, μετράται σε millivolt (mV) και είναι αυτό που κλασικά ορίζεται ως ORP. Χαμηλές τιμές sORP δείχνουν ότι το βιολογικό δείγμα είναι στο εύρος των φυσιολογικών ορίων της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, ενώ τιμές πάνω από το κανονικό δείχνουν οξειδοαναγωγική ανισορροπία με αυξημένη ποσότητα

οξειδωτικών έναντι αναγωγικών, που υποδεικνύουν οξειδωτικό στρες. Από την άλλη, ο δείκτης δυναμικής ικανότητας οξείδωσης-αναγωγής cORP αντιπροσωπεύει το αντιοξειδωτικό διαθέσιμο απόθεμα του οργανισμού και εκφράζεται σε microcoulombs (μC). Οι υψηλές τιμές cORP δείχνουν ότι το βιολογικό δείγμα έχει αντιοξειδωτικά αποθέματα εντός των φυσιολογικών ορίων, ενώ χαμηλές τιμές δείχνουν μειωμένα αποθέματα αντιοξειδωτικών.



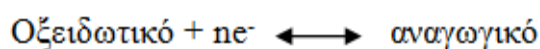
Εικόνα 18: Διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS



Εικόνα 19: Αισθητήρας μιας χρήσεως στον οποίο επιστάζεται το δείγμα

Τρόπος λειτουργίας του RedoxSYS

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



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

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

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

Το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS μετρά το ORP με ένα σύστημα τριών ηλεκτροδίων, ένα ηλεκτρόδιο εργασίας, ένα ηλεκτρόδιο μέτρησης 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). Αυτό αντιπροσωπεύει την τρέχουσα ισορροπία των οξειδωτικών και αναγωγικών σε ένα βιολογικό δείγμα. 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).

2.6. Αξιολόγηση των δεικτών: TBARS, CARB, TAC, GSH, CAT.

Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες στους οργανισμούς μπορούν να χρησιμοποιηθούν μια σειρά από βιοχημικούς δείκτες. Ένας από τους δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της υπεροξείδωσης των λιπιδίων είναι οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ ενώ για την οξείδωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης καθώς και η δραστηριότητα της

καταλάσης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας συχνά προσδορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος του αίματος.

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

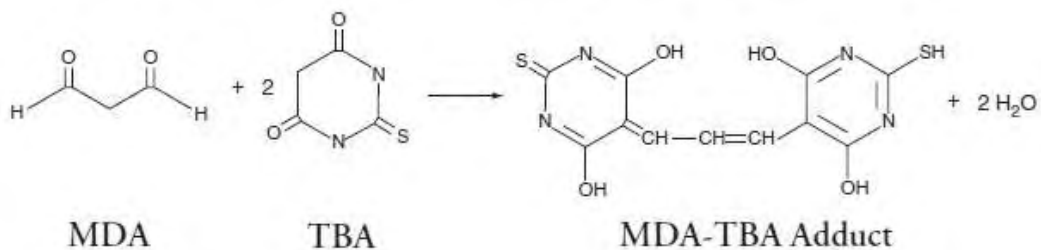
Οι δείκτες του οξειδωτικού στρες προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά και οι αρχές των μεθόδων όπως επίσης και τα εργαστηριακά πρωτόκολλα περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

2.6.1. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Αρχή της μεθόδου

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

Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μία ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του Keles et al., (2001). Πριν ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία ρυθμίζουμε το υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 95°C.



Εικόνα 20: Αντίδραση MDA με TBA, που οδηγεί στην παραγωγή του μορίου MDA-TBA

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 Na_2SO_4 – TBA και επωάζουμε στους 95 $^\circ\text{C}$ 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 $^\circ\text{C}$ για 3 min.
8. Μεταφέρουμε με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 530 nm.

Υπολογισμοί

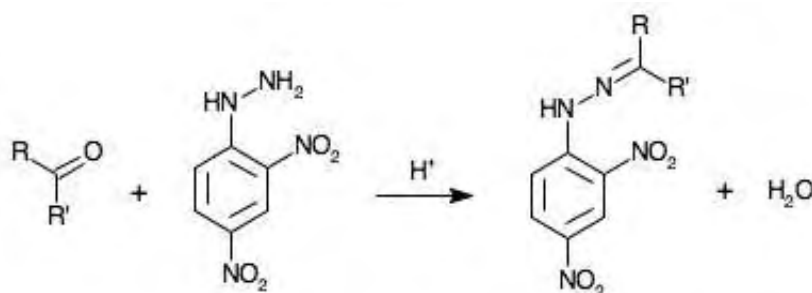
Η συγκέντρωση των TBARS ($\mu\text{mol/L}$) = $(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156 \times 31$, όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100 μL) με τον όγκο του πλάσματος (100 μL) ($3100 / 100 = 31$). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης* της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L το $\mu\text{mol/L}$.

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

2.6.2. Πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB)

Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε οξειδωτικές βλάβες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας γενικός και αξιόπιστος δείκτης της οξείδωσης των πρωτεϊνών που χρησιμοποιείται ευρέως, διότι τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου). Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο Patsoukis et al., (2004).



Εικόνα 21: Σύνδεση πρωτεΐνης με το DNPH και σχηματισμός δινιτροφαινυλδραζονίου

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε 50 μ L πλάσματος προσθέτουμε 50 μ L 20% TCA σε eppendorfs και αναδεύουμε στο vortex (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του. Το τυφλό περιέχει τα πάντα εκτός από τα 0,5 mL DNPH, τα οποία αντικαθίστανται από 0.5 mL HCL 2,5N). Το 20% TCA προστίθεται με σκοπό να κατακρυσταλλωθούν οι πρωτεΐνες του πλάσματος. Το TCA (τριχλωροοξικό οξύ) χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμιση μακρομορίων όπως πρωτεΐνες, DNA και RNA.

2. Επωάζουμε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
3. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
4. Προσθέτουμε στο ίζημα (πελέτα) 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύουμε και επωάζουμε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
5. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
6. Προσθέτουμε 1 mL από το 10% TCA, αναδεύουμε (διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα αν χρειάζεται) και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C.
7. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
8. Προσθέτουμε 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μίγματος, 1:1 v/v), κάνουμε vortex και φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το ίζημα πλένεται με 10% TCA και με μίγμα αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα για να απομακρυνθεί το DNPH που δεν έχει αντιδράσει.
9. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 7 και 8 δύο ακόμα φορές.
10. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.
11. Προσθέτουμε 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), αναδεύουμε και επωάζουμε στους 37 °C για 15 λεπτά. Η ουρία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς) αυξάνοντας τη διαλυτότητά τους.
12. Φυγοκεντρούμε στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4 °C.
13. Μεταφέρουμε με την πιπέτα 900 μL σε μία κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 375 nm.

Υπολογισμοί

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

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

Συγκέντρωση πρωτεϊνών = 70 mg/mL

2.6.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, 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. Ωστόσο, κάθε ένα συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης ολόκληρου του οργανισμού.

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

Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο που έχει τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC στο πλάσμα (55-60%) προκαλώντας μεγάλη 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.

Αρχή της μεθόδου

Η TAC του ορού στη συγκεκριμένη μέθοδο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας το DPPH (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδραζύλο ρίζα). Παρουσία ενός δότη υδρογόνων που υπάρχει στον ορό, η παραπάνω ρίζα (DPPH[•]) ανάγεται προς σχηματισμό της

αντίστοιχης υδραζίνης (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδραζίνης). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm. Ο προσδιορισμός της TAC βασίζεται στη μέθοδο των Janaszewska & Bartosz, (2002).

Πειραματικό πρωτόκολλο

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

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

Πίνακας 1: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για τη μέτρηση της TAC.

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

Φυγοκεντρούμε για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25 °C (για την καταβύθιση σωματιδίων που θα αυξήσουν την απορρόφηση). Μεταφέρουμε 900 μL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυψελίδα και μετράμε την απορρόφηση στα 520 nm, αφού προηγουμένως έχουμε μηδενίσει με αέρα. Επειδή είναι πιθανό η απορρόφηση του τυφλού να αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, είναι σκόπιμη η επανάληψη της μέτρησης του τυφλού κάθε 5 περίπου δείγματα.

Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

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

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

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

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

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

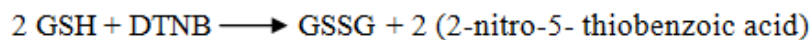
δ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

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

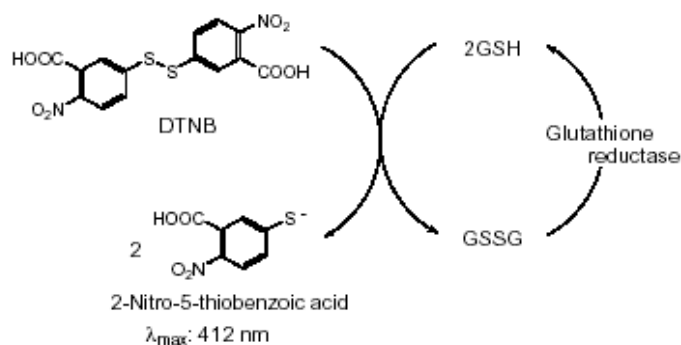
2.6.4. Ανηγγμένη γλουταθειόνη σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (GSH)

Αρχή της μεθόδου

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 σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν που απορροφάει στα 412 nm. Ο προσδιορισμός της GSH βασίζεται στο πειραματικό πρωτόκολλο των Reddy et al., (2004).



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



Εικόνα 22: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης

Καθαρισμός αιμολύματος για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης

1. Προσθέτουμε 500 μL αιμολύματος σε 500 μL 5% TCA σε erpendorf. Ανακινούμε στο vortex.
2. Φυγοκεντρούμε στα 28620 g (16000 rpm) για 5 min στους 5 °C.
3. Συλλέγουμε το υπερκείμενο σε erpendorf και προσθέτουμε 5% TCA με την εξής αναλογία: 300 μL αιμολύματος / 90 μL 5% TCA ή 260 μL αιμολύματος / 60 μL 5% TCA. Ανακινούμε στο vortex.
4. Φυγοκεντρούμε στα 28620 g (16000 rpm) για 5 min στους 5 °C.
5. Μεταφέρουμε 100 μL του καθαρού υπερκειμένου σε erpendorf για τον προσδιορισμό της GSH. Διατήρηση στους -20 °C.

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε Eppendorfs:

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

Πίνακας 2: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για τη μέτρηση της GSH.

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

Υπολογισμοί

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 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.

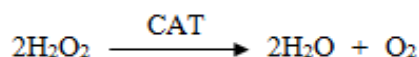
Συγκέντρωση GSH ανά g αιμοσφαιρίνης, GSH (mmol/ g Hb).

2.6.5. Δραστικότητα καταλάσης (CAT)

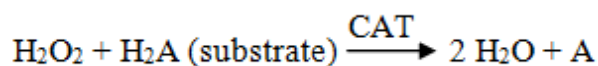
Αρχή της μεθόδου

Η καταλάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και οξυγόνο. Ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει

83000 μόρια H_2O_2 το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται στα υπεροξεισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Είναι ένα τετραμερές με 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Το ιδανικό της pH είναι το ουδέτερο. Η αντίδραση διάσπασης του H_2O_2 από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



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



Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της CAT βασίζεται στο πειραματικό πρωτόκολλο του Aebi, (1984).

Πειραματικό πρωτόκολλο

Προσθέτουμε τους παρακάτω όγκους σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες:

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

Πίνακας 3: Διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων, για τη μέτρηση της καταλάσης.

1. Αναδεύουμε στο vortex και επωάζουμε στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά. Είναι πιο πρακτικό να επωάζουμε 2 δείγματα κάθε φορά ώστε να είμαστε σίγουροι ότι τα δείγματα φωτομετρούνται αμέσως μετά την επώαση.
2. Μεταφέρουμε το περιεχόμενο του πλαστικού κυλίνδρου σε κυψελίδα χαλαζία για μέτρηση στο υπεριώδες (UV).

3. Προσθέτουμε 5 μL 30% H_2O_2 στην κυψελίδα, την ανακινούμε τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφίλμ στην κορυφή της και μετράμε την απορρόφηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

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

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

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

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

$U = \mu\text{mol/min}$. Το $\Delta \text{ Abs}_{\text{blank}}$ είναι πάντα μηδέν, για αυτό δεν χρειάζεται να μετρήσουμε το τυφλό.

2.7. Στατιστική ανάλυση

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αξιολόγηση μυϊκού πόνου και μυϊκής βλάβης

Σύμφωνα με την αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου στην οποία υποβλήθηκαν οι συμμετέχοντες στην παρούσα εργασία, φαίνεται ότι ο δείκτης αυτός αυξήθηκε μετά την άσκηση από 3,6 φορές έως 4,3 φορές κατά το βάδισμα και από 3,4 φορές έως 4,4 φορές κατά το κάθισμα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι ο μέγιστος μυϊκός πόνος τόσο στη δοκιμασία του βαδίσματος όσο και σ' αυτή του καθίσματος, εμφανίστηκε κατά τις 48 ώρες μετά την πραγματοποίηση την έκκεντρης άσκησης, ενώ από τις 72 ώρες και μετά οι τιμές αρχίζουν να επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι πράγματι προκλήθηκε μυϊκή βλάβη στους συμμετέχοντες. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 4).

	Πριν	Αμέσως μετά	24 ώρες μετά	48 ώρες μετά	72 ώρες μετά
DOMS περπάτημα	1,00 ± 0,00	3,66 ± 0,47	3,61 ± 0,42	4,27 ± 0,43	3,53 ± 0,36
DOMS κάθισμα	1,00 ± 0,00	3,44 ± 0,35	4,33 ± 0,45	4,38 ± 0,45	3,40 ± 0,37

Πίνακας 4: Αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου (DOMS) μετά την έκκεντρη άσκηση. Δίνονται οι μέσες τιμές ± SEM (τυπική απόκλιση).

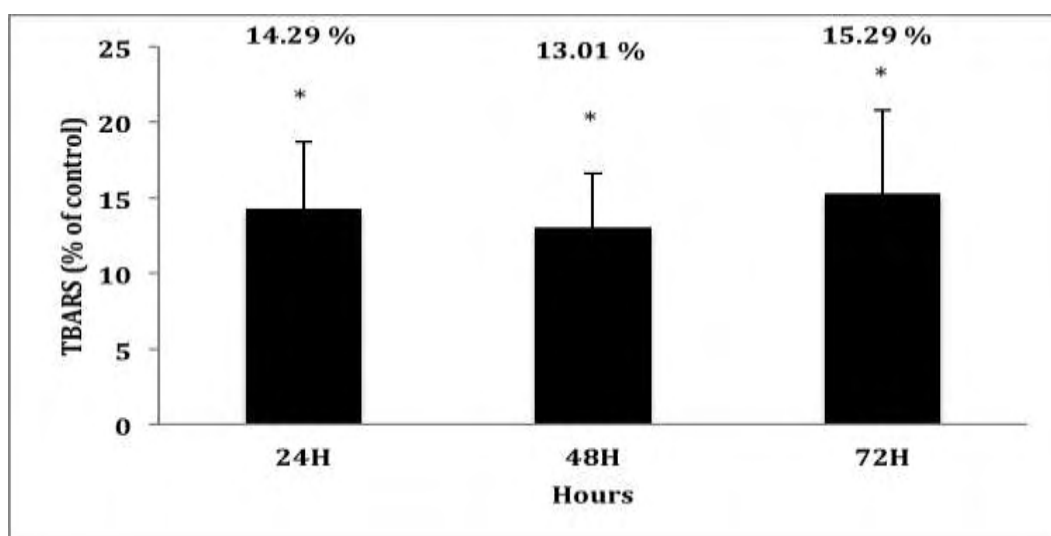
3.2. Δείκτες Οξειδωτικού στρες

Στα διαγράμματα που ακολουθούν, παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα από τη μελέτη των επί τοις εκατό μεταβολών στους δείκτες του οξειδωτικού στρες, μετά από την πραγματοποίηση της έκκεντρης άσκησης. Στην έρευνα έλαβαν μέρος 18 εθελοντές εκ των οποίων οι 10 είχαν επαφή με κάποιου είδους αθλητικής δραστηριότητας και χαρακτηρίζονται ως “αθλούμενοι”, ενώ οι υπόλοιποι 8 δεν πραγματοποιούσαν κανένα είδος άθλησης και αναφέρονται ως “μη αθλούμενοι”. Οι συμμετέχοντες εξετάστηκαν αναφορικά με τους δείκτες του οξειδωτικού στρες, τόσο στο σύνολό τους όσο και μετά από διάκρισή τους στις δύο προαναφερθείσες κατηγορίες (αθλούμενοι και μη αθλούμενοι) και τα αποτελέσματα που λάβαμε παρουσιάζονται εκτενώς στα διαγράμματα που ακολουθούν. Επιπλέον, τα διαγράμματα συνοδεύονται από τους αντίστοιχους πίνακες, στους οποίους παραθέτονται τα επί τοις εκατό ποσοστά μεταβολής του κάθε δείκτη στις διάφορες χρονικές στιγμές μετά την άσκηση σε σχέση με το δείγμα pre (χρησιμοποιείται ως control).

Παρατήρηση: Σε όλα τα διαγράμματα με το σύμβολο «*» παρουσιάζεται η στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα pre, ενώ με το σύμβολο «#» παρουσιάζεται η στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες (αθλούμενοι και μη αθλούμενοι).

ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ ΘΕΙΟΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (TBARS)

Όσον αφορά το δείκτη TBARS, παρατηρήθηκε σημαντικά στατιστική αύξηση σε όλες τις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση, δηλαδή στις 24, 48 και 72 ώρες κατά 14.29%, 13.01 % και 15.29 % αντίστοιχα, όπως απεικονίζεται στο διάγραμμα 1, αλλά και αναλυτικότερα στον πίνακα 5. Διαπιστώνουμε ότι η μέγιστη ποσοστιαία αύξηση παρατηρείται στις 72 ώρες.



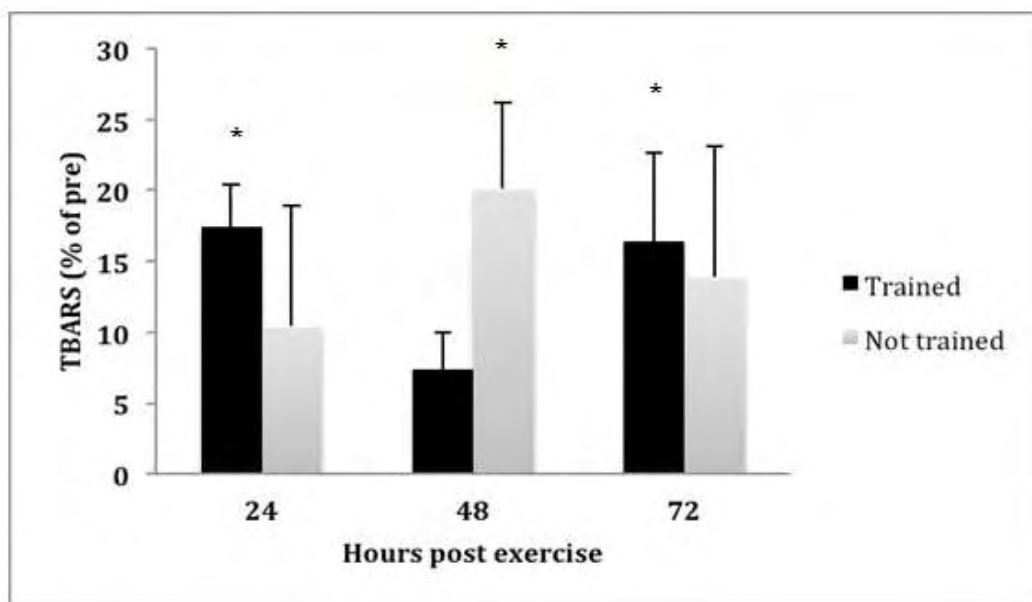
Διάγραμμα 1: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη TBARS στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα *pre*.

(*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα *pre*

Πίνακας 5: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη TBARS (μέση τιμή \pm SEM) σε σχέση με το δείγμα *pre*.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
TBARS ($\mu\text{mol/L}$)	14,29 \pm 4,46	13,01 \pm 3,58	15,29 \pm 5,54

Κάνοντας διαχωρισμό των συμμετεχόντων σε αθλούμενους και μη αθλούμενους η εικόνα που λάβαμε ήταν η ακόλουθη:



Διάγραμμα 2: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη TBARS στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα pre μετά από διαχωρισμό των συμμετεχόντων σε αθλούμενους και μη αθλούμενους.

(*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα pre

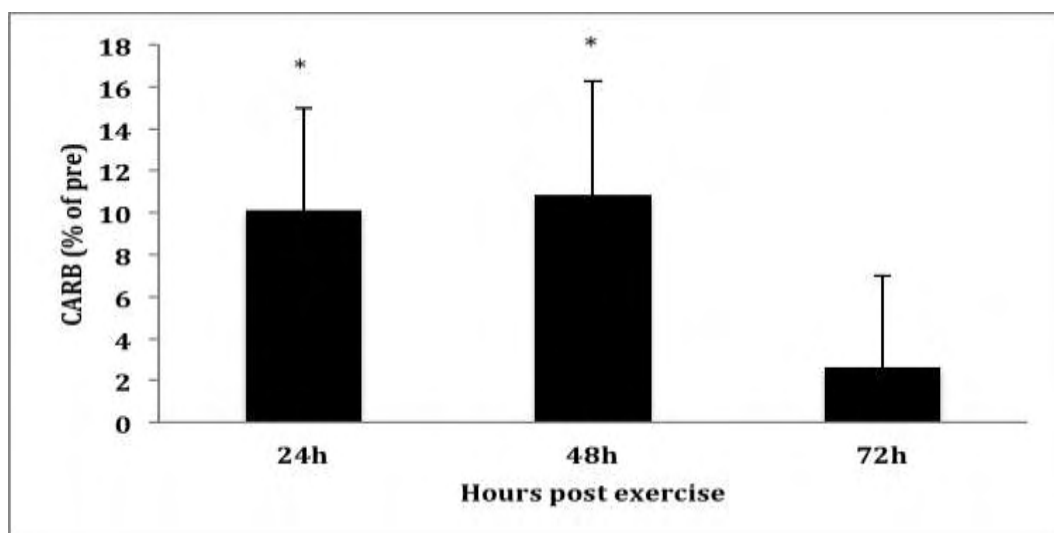
Πίνακας 6: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη TBARS (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα pre.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
αθλούμενοι	17,40 ± 0,03	7,36 ± 2,62	16,44 ± 6,17
μη αθλούμενοι	10,39 ± 8,50	20,07 ± 6,09	13,85 ± 9,23

Παρατηρούμε ότι και στις 2 ομάδες επήλθε αύξηση του δείκτη TBARS μετά την άσκηση. Ωστόσο δεν παρατηρούμε στατιστικά σημαντικές διαφορές όταν συγκρίνουμε τις δύο ομάδες μεταξύ τους. Στην ομάδα των αθλούμενων παρατηρούμε σημαντικά στατιστική αύξηση σε σχέση με το pre, στις 24 και 72 ώρες σε ποσοστά 17,40% και 16,44% αντίστοιχα. Στην ομάδα των μη-αθλούμενων παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στις 48 ώρες κατά 20.07% σε σχέση με το δείγμα pre (διάγραμμα 2 και πίνακας 6).

ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ

Στα Πρωτεϊνικά Καρβονύλια παρατηρείται σημαντικά στατιστική διαφορά στις 24 και 48 ώρες. Συγκεκριμένα στις 24 ώρες παρατηρήθηκε μια αύξηση της τάξης του 10.13 % ενώ στις 48 και 72 ώρες η αύξηση ήταν 10.84 % και 2.63 % αντίστοιχα σε σχέση πάντα με το δείγμα pre (διάγραμμα 3, πίνακας 7).

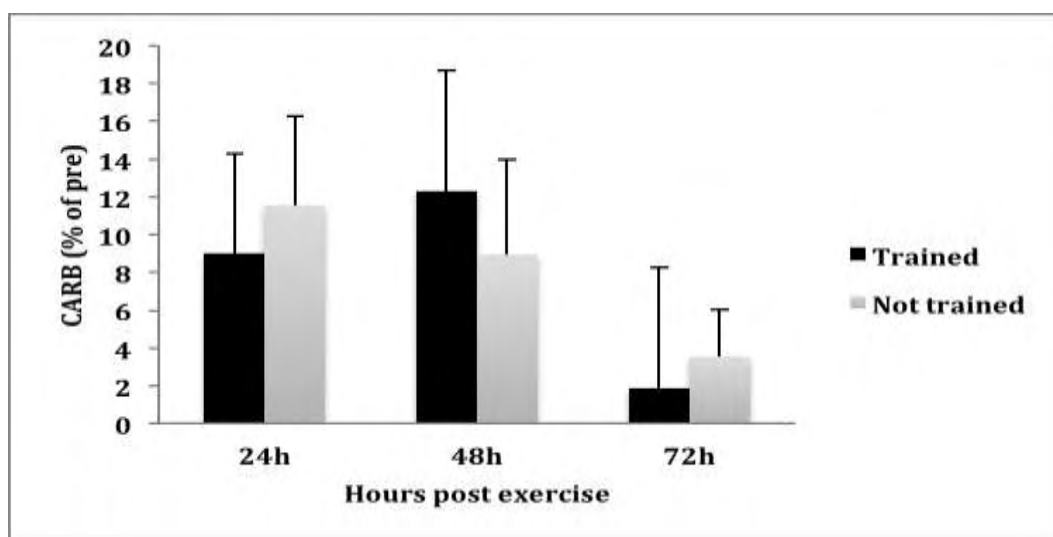


Διάγραμμα 3: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη CARB στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα pre
(*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα pre

Πίνακας 7: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη CARB (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα pre.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
CARB (nmol/mg protein)	10,13 ± 4,87	10,84 ± 5,45	9,63 ± 4,37

Σε ότι αφορά τα πρωτεϊνικά καρβονύλια μετά τη διάκριση σε αθλούμενους και μη η εικόνα ήταν η ακόλουθη:



Διάγραμμα 4: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη CARB στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα pre μετά από διαχωρισμό των συμμετεχόντων σε αθλούμενους και μη αθλούμενους.

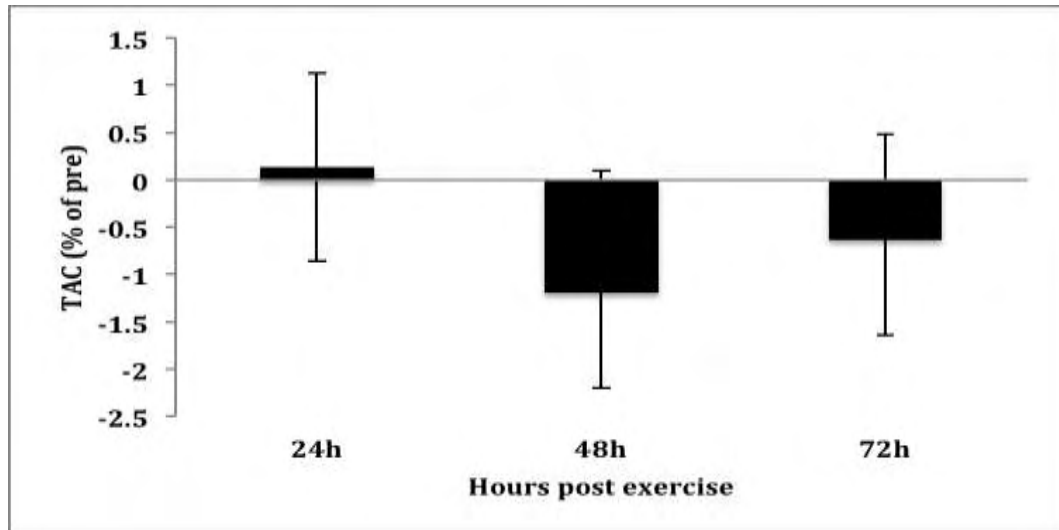
Πίνακας 8: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη CARB (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα pre.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
αθλούμενοι	8,98 ± 7,31	12,32 ± 8,41	1,88 ± 8,49
μη αθλούμενοι	11,57 ± 6,75	8,98 ± 7,07	3,56 ± 4,56

Παρατηρούμε ότι τόσο στους αθλούμενους όσο και στους μη-αθλούμενους σημειώνεται αύξηση μετά την πραγματοποίηση της άσκησης. Δεν παρατηρήθηκαν, ωστόσο, σημαντικά στατιστικές διαφορές στη σύγκριση μεταξύ των μεταβολών μεταξύ των δύο αυτών ομάδων (διάγραμμα 4, πίνακας 8).

ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (TAC)

Στην Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικά στατιστικές διαφορές σε σχέση με το pre όταν οι εθελοντές εξετάστηκαν ως ενιαία ομάδα (διάγραμμα 5, πίνακας 9).

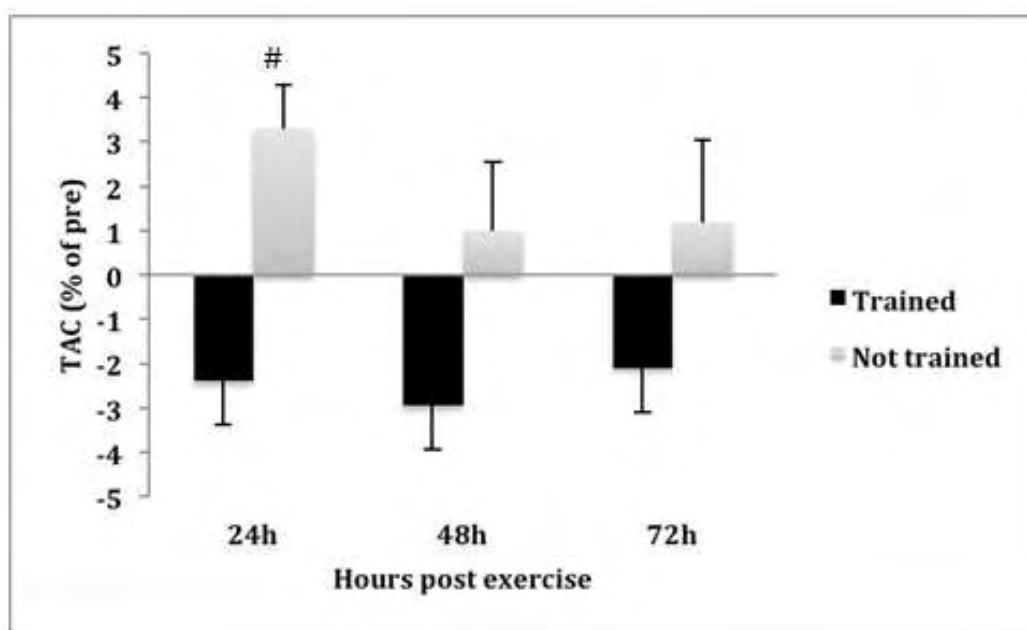


Διάγραμμα 5: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη TAC στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα pre

Πίνακας 9: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη TAC (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα pre.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
TAC (mmol DPPH/L plasma)	0,14 ± 2,99	-1,19 ± 1,29	-0,63 ± 1,12

Ωστόσο, μετά τον διαχωρισμό ανάμεσα σε αθλούμενους και μη-αθλούμενους παρατηρήθηκε σημαντικά στατιστική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες στις 24 ώρες όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα. Συγκεκριμένα, στους μη αθλούμενους παρατηρείται αύξηση της TAC, ενώ στους αθλούμενους μείωση σε όλες τις χρονικές στιγμές, με τη διαφορά αυτή να είναι σημαντική μόνο στις 24 ώρες.



Διάγραμμα 6: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη TAC στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα pre μετά από διαχωρισμό των συμμετεχόντων σε αθλούμενους και μη αθλούμενους.

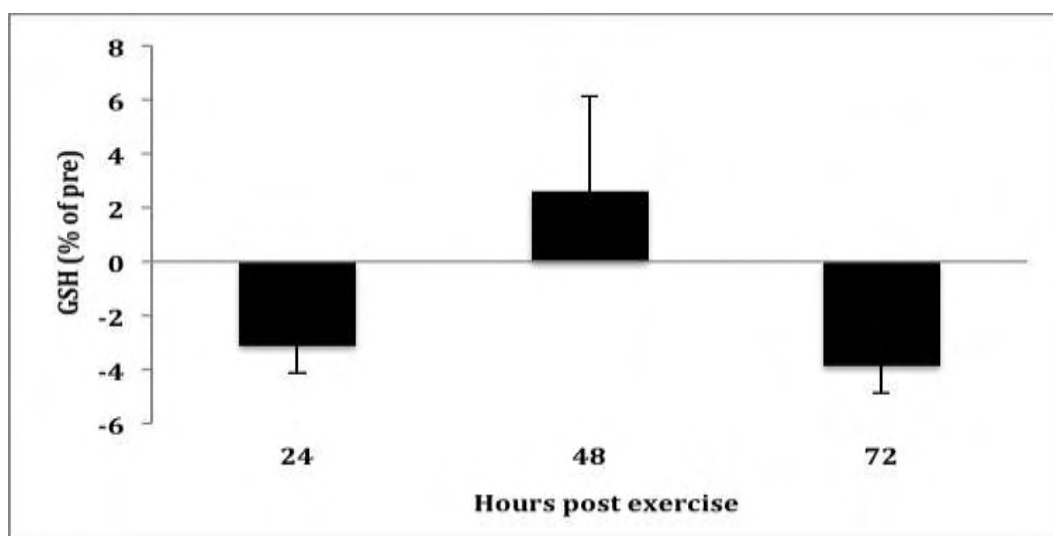
(#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες

Πίνακας 10: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη TAC (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα pre.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
αθλούμενοι	-2,39 ± 0,99	-2,95 ± 1,74	-2,09 ± 1,02
μη αθλούμενοι	3,30 ± 0,97	0,99 ± 1,55	1,19 ± 1,85

ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΝΗΓΜΕΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ

Στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές από άτομο σε άτομο κάτι το οποίο δεν οδήγησε στην εμφάνιση σημαντικά στατιστικών διαφορών σε σχέση με το pre όταν οι εθελοντές εξετάστηκαν ως ενιαία ομάδα. Η συνολική εικόνα που λάβαμε και παρουσιάζεται και στο παρακάτω διάγραμμα είναι μια μείωση στα επίπεδά της στις 24 ώρες κατά 3.12%, αύξηση στις 48 ώρες κατά 2.61% και μείωση στις 72 ώρες κατά 3.87% (πίνακας 11).

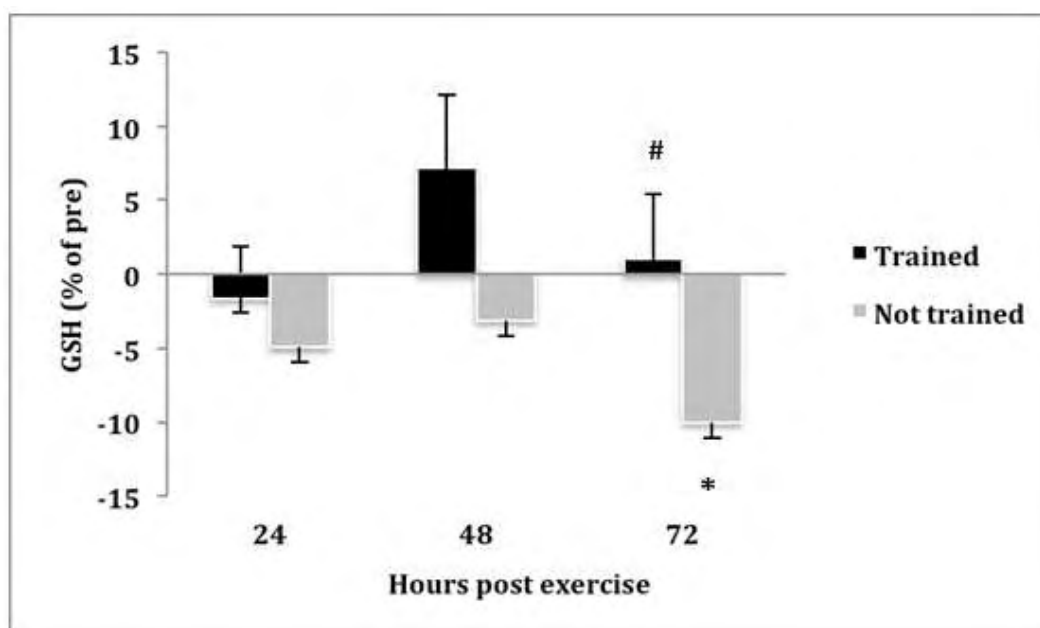


Διάγραμμα 7: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη GSH στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα pre

Πίνακας 11: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη GSH (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα pre.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
GSH (μmol/g Hb)	-3,12 ± 2,52	2,61 ± 3,50	-3,87 ± 3,02

Ωστόσο μετά από διαχωρισμό σε αθλούμενους και μη-αθλούμενους λάβαμε την εξής εικόνα που αντικατοπτρίζει πλήρως τα αποτελέσματα:



Διάγραμμα 8: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη GSH στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα pre μετά από διαχωρισμό των συμμετεχόντων σε αθλούμενους και μη αθλούμενους.

(*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα pre

(#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες

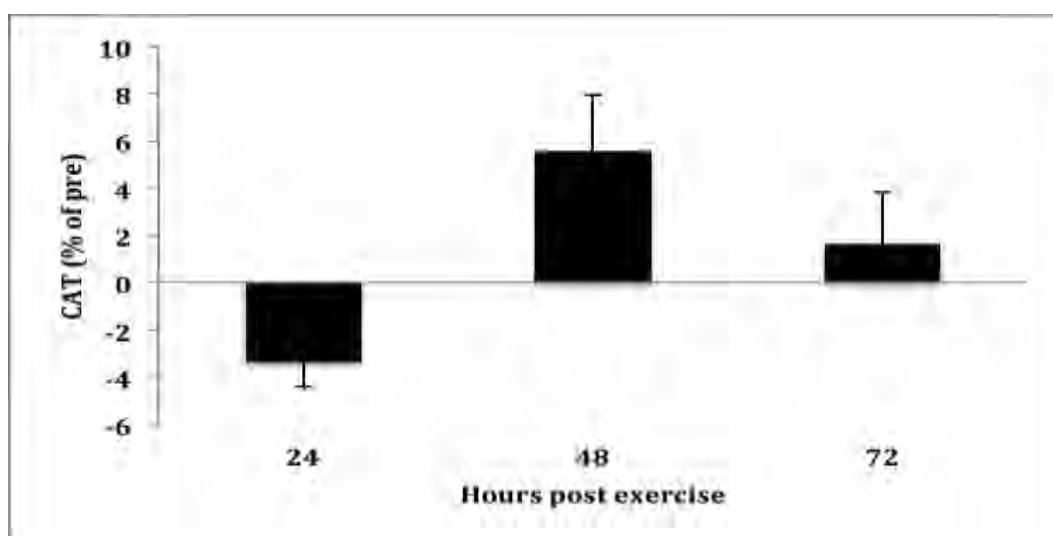
Πίνακας 12: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη GSH (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα pre.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
αθλούμενοι	-1,65 ± 3,51	7,21 ± 4,95	1,25 ± 4,37
μη αθλούμενοι	-4,96 ± 3,49	-3,12 ± 3,91	-10,02 ± 2,39

Στο διάγραμμα 8 είναι εμφανής η μεγάλη διαφορά στην ανταπόκριση των αθλούμενων και των μη-αθλούμενων στην άσκηση. Ειδικά στις 72 ώρες μετά την άσκηση υπάρχει σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των μεταβολών των αθλούμενων και των μη αθλούμενων καθώς οι πρώτοι παρουσίασαν αύξηση κατά 1.25% και οι δεύτεροι μείωση κατά 10.02%. Η συγκεκριμένη μείωση είναι σημαντικά στατιστική σε σχέση με το δείγμα pre (πίνακας 12).

ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ

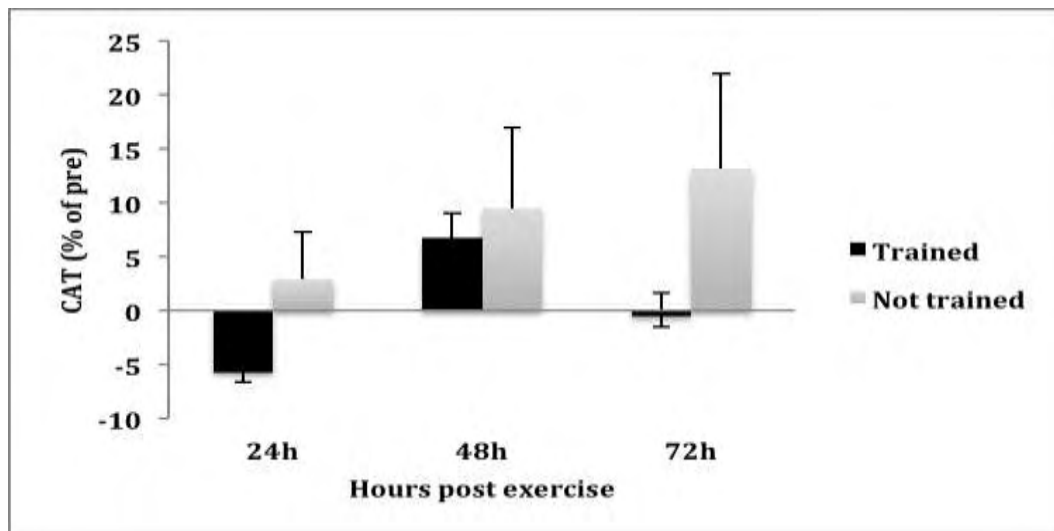
Στην μελέτη της δραστηριότητας της Καταλάσης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικά στατιστικές διαφορές τόσο μετά την εξέταση των συμμετεχόντων σαν ενιαία ομάδα όσο και μετά από διαχωρισμό σε αθλούμενους και μη-αθλούμενους. Τα στοιχεία αυτά καταδεικνύονται στα διαγράμματα και στους πίνακες που ακολουθούν.



Διάγραμμα 9: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη CAT στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα pre

Πίνακας 13: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη CAT (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα pre.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
CAT (U/mg Hb)	-3,38 ± 2,21	5,60 ± 3,28	1,65 ± 2,74



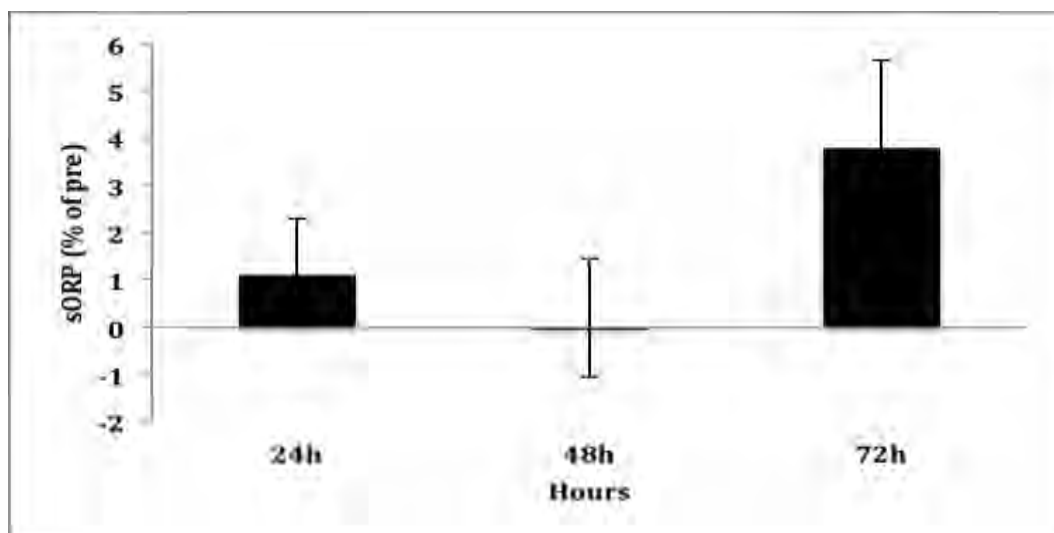
Διάγραμμα 10: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη GSH στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα pre μετά από διαχωρισμό των συμμετεχόντων σε αθλούμενους και μη αθλούμενους.

Πίνακας 14: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη CAT (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα pre.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
αθλούμενοι	-5,68 ± 1,43	6,73 ± 2,35	-0,50 ± 2,21
μη αθλούμενοι	2,93 ± 4,33	9,48 ± 7,54	13,14 ± 8,88

Static ORP (sORP)

Όσον αφορά το δείκτη στατικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού (sORP), δεν παρατηρούμε στατιστικά σημαντικές μεταβολές σε καμία από τις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση σε σχέση με την τιμή pre όταν οι εθελοντές εξετάστηκαν συνολικά (διάγραμμα 11, πίνακας 15).

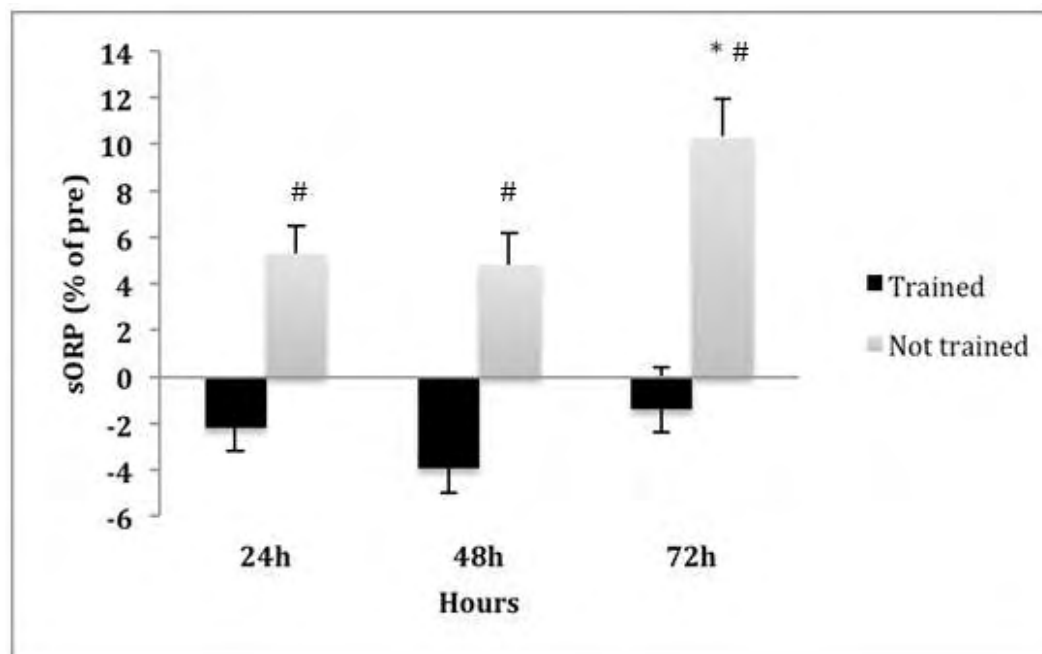


Διάγραμμα 11: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη sORP στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα pre.

Πίνακας 15: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη sORP (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα pre.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
sORP (mV)	1,12 ± 1,17	-0,05 ± 1,50	3,78 ± 1,85

Ωστόσο μετά από διαχωρισμό των εθελοντών στις δύο διακριτές ομάδες η εικόνα ήταν η ακόλουθη:



Διάγραμμα 12: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη sORP στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα pre μετά από διαχωρισμό των συμμετεχόντων σε αθλούμενους και μη αθλούμενους.

(*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα pre

(#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες

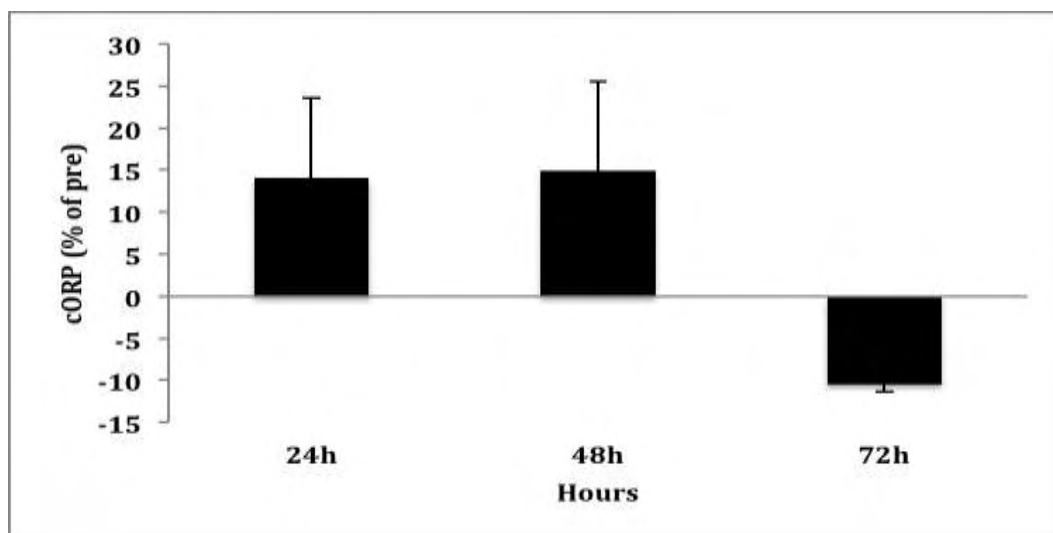
Πίνακας 16: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη sORP (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα pre.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
αθλούμενοι	-2,21 ± 1,02	-3,96 ± 1,66	-1,41 ± 1,81
μη αθλούμενοι	5,29 ± 1,18	4,82 ± 1,35	10,29 ± 1,63

Παρατηρήθηκε σημαντικά στατιστική διαφορά και στις τρεις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση μεταξύ αθλούμενων και μη-αθλούμενων, ενώ οι μη-αθλούμενοι παρουσίασαν σημαντικά στατιστική αύξηση σε σχέση με το pre στις 72 ώρες κατά 10.29% (διάγραμμα 12, πίνακας 16).

Capacity ORP (cORP)

Παρομοίως με το δείκτη sORP, στο cORP δεν παρατηρήθηκαν σημαντικά στατιστικές μεταβολές σε καμία από τις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση όταν οι εθελοντές εξετάστηκαν συνολικά (διάγραμμα 13, πίνακας 17).

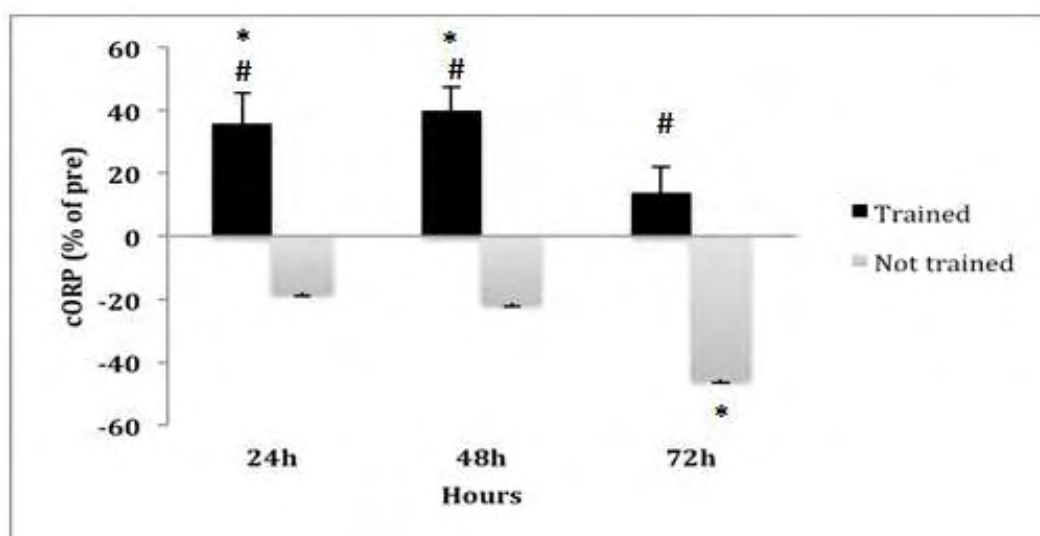


Διάγραμμα 13: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη cORP στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα pre.

Πίνακας 17: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη cORP (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα pre.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
cORP (μC)	14,09 ± 9,95	14,87 ± 10,69	-10,43 ± 10,09

Μετά, όμως από διαχωρισμό των συμμετεχόντων στις δύο κατηγορίες, η εικόνα που λάβαμε ήταν η εξής:



Διάγραμμα 14: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη cORP στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα pre μετά από διαχωρισμό των συμμετεχόντων σε αθλούμενους και μη αθλούμενους.

(*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα pre

(#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες

Πίνακας 18: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη cORP (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα pre.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
αθλούμενοι	35,64 ± 9,83	39,72 ± 7,69	13,96 ± 8,09
μη αθλούμενοι	-17,94 ± 8,74	-21,16 ± 15,57	-45,52 ± 14,64

Παρατηρούμε στατιστικά σημαντικές διαφορές και στις τρεις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση, ανάμεσα σε αθλούμενους και μη αθλούμενους. Επιπλέον, οι αθλούμενοι στις 24 και 48 ώρες μετά την άσκηση παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση του cORP σε σχέση με το δείγμα pre, σε ποσοστά 35,64% και 39,72% αντίστοιχα. Τέλος, οι μη αθλούμενοι στις 72 ώρες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μείωση του cORP σε σχέση με το δείγμα pre κατά 45,52% (διάγραμμα 14, πίνακας 18).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συσχέτιση ανάμεσα στην άσκηση και την παραγωγή ελευθέρων ριζών έχει αναφερθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία (Powers et al, 2007; Maria L. Urso and Priscilla M. Clarkson, 2003; Davies et al, 1982; Alessio H. M., 1993; Alessio et al., 2000) και πραγματοποιείται μέσω διάφορων μηχανισμών (Elosua et al., 2003; Klebanoff et al., 1988; McBride & Kraemer, 1999; Cooper et al., 2002; Brantley et al., 1993). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι το μέγεθος της παραγωγής ελευθέρων ριζών σχετίζεται άμεσα με την ένταση της άσκησης, με αποτέλεσμα δοκιμασίες πολύ υψηλής έντασης να οδηγούν σε υπέρμετρη αύξηση των παραγόμενων ελεύθερων ριζών (Palmer et al, 2003; Nikolaidis et al, 2007). Όταν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών υπερβούν το όριο των τιμών που μπορεί να αντιμετωπίσει η ενδογενής αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού ώστε να τις εξουδετερώσει, τότε προκαλείται μια κατάσταση που ονομάζεται οξειδωτικό στρες. Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται ακριβώς σ' αυτή την ανισορροπία μεταξύ του σχηματισμού ελευθέρων ριζών και της απομάκρυνσής τους από το αντιοξειδωτικό σύστημα (Veskoukis et al, 2008; Nikolaidis et al, 2007). Το γεγονός αυτό μπορεί να επιφέρει αρνητικές συνέπειες στον οργανισμό διότι προκαλεί βλάβες στη δομή και τη λειτουργία βιομορίων, διαταράσσοντας κατά αυτόν τον τρόπο βασικές διεργασίες (Finaud et al, 2006; Veskoukis et al, 2008; Schneider et al, 2007; Phaneuf S, 2001).

Γενικά, έχει προταθεί ότι η επαγόμενη αύξηση των ROS από την άσκηση, ενεργοποιείται σαν απάντηση μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ελέγχονται από την κατάσταση των θειολών (με κυριότερη θειόλη τη γλουταθειόνη) (Ji et al., 2006; Melikoglu et al., 2008; Zembron-Lacny et al., 2010; Zembron-Lacny et al., 2010). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς από αλλαγές στην κατάσταση οξειδοαναγωγής των θειολών, επάγεται η έκφραση του πυρηνικού παράγοντα kB (NF-kB) και της πρωτεΐνης ενεργοποιητή 1 (AP-1). Η έκφραση των οποίων με τη σειρά τους αυξάνουν τα επίπεδα των κυτοκινών ιντερλευκίνης-6 (IL-6) και του ογκογόνου παράγοντα νέκρωσης α (TNF- α) (Ji et al., 2006; Kerksick et al., 2005). Τόσο η IL-6 όσο και ο TNF- α έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν την αναγέννηση του μυός και την ανάπτυξη αντοχής στις επαγόμενες από τις ROS μυϊκές βλάβες (Steensberg et al., 2000).

Η σχέση ανάμεσα στην άσκηση και το οξειδωτικό στρες έχει εξετασθεί σε πληθώρα ερευνών που αναφέρονταν τόσο σε αερόβια όσο και αναερόβια άσκηση, διαφορετικής διάρκειας και έντασης (Jenkins, 1988; Ji, 1999; Gomez-Cabrera et al., 2005; Veskokoukis et al., 2008; Davies, Quintanilla 1982; Kumar, et al., 1992; Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2006; Aguilo et al., 2005). Ωστόσο, ένα μέρος των ερευνών, συμπεριλαμβανομένης και της παρούσας μελέτης, εστιάζουν στη μυϊκή βλάβη και στις εναλλαγές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης που επιφέρει στον οργανισμό η έκκεντρη άσκηση (Park KS, Lee MG, 2015; Jamurtas et al., 2000; Paschalis et al., 2005; Close et al 2004, 2005; Goldfarb, Bloomer, & McKenzie, 2005; Stagos et al., 2015). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι ο όρος “έκκεντρη συστολή” αναφέρεται στην επιμήκυνση του μυός όταν προσπαθεί να υπερνικήσει μια εξωτερική αντίσταση στην οποία υποβάλλεται. Χαρακτηριστικό της άσκησης αυτής αποτελεί το γεγονός πως είναι εξαιρετικά έντονη και επίπονη, προκαλώντας σημαντική μυϊκή βλάβη και μεταβολές σε δείκτες του οξειδωτικού στρες, στοιχεία που την καθιστούν ένα πολύ καλό μοντέλο μελέτης για την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Παρότι, ωστόσο, όπως αναφέρθηκε η έκκεντρη συστολή σχετίζεται με την ευρεία παραγωγή ελευθέρων ριζών, στη βιβλιογραφία υπάρχουν και έρευνες που αναφέρουν μη σημαντικές διαφορές στους οξειδοαναγωγικούς δείκτες μετά από έκκεντρη άσκηση τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα (Stagos et al, 2015; Ismail Boz et al, 2015). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός επίσης, ότι παλαιότερες έρευνες τόσο του εργαστηρίου μας όσο και άλλων εργαστηρίων έχουν δείξει πως ανάμεσα στα άτομα υπάρχουν μεγάλες διαφορές στους δείκτες του οξειδωτικού στρες. Έτσι, η έκκεντρη άσκηση μπορεί όχι μόνο να προκαλέσει οξειδωτικό στρες σε μεγάλο βαθμό, αλλά και αμελητέο ή ακόμα και αναγωγικό στρες σε σημαντικό αριθμό ατόμων (Margaritelis *et al*, 2014; Stagos *et al*, 2015).

Για το λόγο αυτό, και προκειμένου να ληφθούν επαρκείς απαντήσεις που να καλύπτουν τα κενά σημεία που προκύπτουν από τη βιβλιογραφία, δεκαοκτώ νέοι και υγιείς εθελοντές, άνδρες και γυναίκες, υποβλήθηκαν σε έκκεντρη άσκηση που πραγματοποιήθηκε σε ισοκινητικό δυναμόμετρο. Οι μετρήσεις για τον προσδιορισμό των δεικτών του οξειδωτικού στρες έγιναν σε δείγμα αίματος που συλλέχθηκε πριν και 24, 48 και 72 ώρες μετά από την άσκηση. Επιπρόσθετα, οι συμμετέχοντες κλήθηκαν να αξιολογήσουν τη σοβαρότητα του μυϊκού πόνου σε μία κλίμακα από το 1 έως το 10 σε όλες τις χρονικές στιγμές του πειράματος. Η εκτίμηση

της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των συμμετεχόντων έγινε με τη μέτρηση δεικτών οξειδωτικού στρες που προσδιορίζονται φασματοφωτομετρικά όπως είναι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και η δραστηριότητα του ενζύμου της καταλάσης (CAT). Στην εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης χρησιμοποιήθηκαν και δύο νέοι δείκτες: ο δείκτης δυναμικού της στατικής οξείδωσης-αναγωγής (sORP) και ο δείκτης δυναμικής ικανότητας οξείδωσης-αναγωγής (cORP). Επίσης έγινε αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου μετά την άσκηση (Delayed Onset Muscle Soreness-DOMS)

Αναλυτικότερα όσον αφορά την αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου (DOMS) και της μυϊκής βλάβης που προκλήθηκε στους συμμετέχοντες έπειτα από την πραγματοποίηση της έκκεντρης άσκησης, φαίνεται πως ο δείκτης αυτός είχε ανοδική πορεία τόσο στη δοκιμασία της βάρδισης όσο και σ' αυτή του καθίσματος. Συγκεκριμένα, ο μέγιστος μυϊκός πόνος και για τις δύο δοκιμασίες παρουσιάστηκε στις 48 ώρες μετά την άσκηση και ήταν της τάξεως του 4,3% για το περπάτημα και 4,4% για το κάθισμα, ενώ μέσα στις επόμενες μέρες η κατάσταση του μυός δείχνει να επανέρχεται στο φυσιολογικό με τις τιμές να μειώνονται. Τα αποτελέσματα αυτά αναφέρονται στο σύνολο των εθελοντών και υποδηλώνουν την πρόκληση της μυϊκής βλάβης σε όλα τα άτομα ανεξαρτήτως αθλητικού ιστορικού. Η αύξηση του DOMS μετά από έκκεντρη άσκηση δεν είναι πλήρως κατανοητή, αλλά έχει προταθεί πως προκαλείται από ποικίλες βιοχημικές αλλαγές μετά τη μυϊκή καταστροφή και όχι από ένα μεμονωμένο γεγονός (J. Kim and J. Lee, 2014). Έτσι, η κύρια αιτία του DOMS είναι οι δομικές βλάβες των μυών, που προκαλούν θεμελιώδης ρήξεις μέσα στο μυ (J. Kim and J. Lee, 2014). Αυτή η μυϊκή βλάβη επάγει φλεγμονώδη απόκριση (π.χ., απελευθέρωση χημειοκινών, ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων, αύξηση προσταγλανδινών, και την παραγωγή αραχιδονικού οξέος). Αυτές οι φλεγμονώδεις ενώσεις αλληλεπιδρούν άμεσα με προσαγωγούς νευρώνες μέσω των υποδοχέων του πόνου. Όταν τα ερεθίσματα από τους προσαγωγούς νευρώνες φτάσουν στο μυελό και στον εγκεφαλικό φλοιό, ο μυϊκός πόνος γίνεται αντιληπτός (J. Kim and J. Lee, 2014). Άλλοι παράγοντες που δείχνουν να εμπλέκονται στους φυσιολογικούς μηχανισμούς που επάγονται από το DOMS είναι το γαλακτικό οξύ και τα οξείδια του αζώτου (J. Kim and J. Lee, 2014). Επιπλέον, αν και είναι σαφές ότι οι ελεύθερες ρίζες

παράγονται μετά την έκκεντρη άσκηση, δεν είναι ξεκάθαρο αν υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ αυτών και του DOMS (G. L. Close et al, 2005). Έχει προταθεί ότι η φλεγμονή που προκαλείται από έκκεντρη άσκηση μπορεί να είναι η κύρια αιτία της παραγωγής ελευθέρων ριζών. Συγκεκριμένα, η φλεγμονή στρατολογεί τα φαγοκύτταρα να μεταναστεύσουν προς το κατεστραμμένο ιστό και επιδεικνύει μία οξειδωτική έκρηξη με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών όπως το υπεροξειδίο και υπεροξειδίο του υδρογόνου (G. L. Close et al, 2005). Αυτές οι δραστικές μορφές μπορεί να προκαλέσουν περαιτέρω βλάβη καταστρέφοντας τα μυϊκά κύτταρα (G. L. Close et al, 2005). Στην παρούσα μελέτη στο στάδιο της συσχέτισης ανάμεσα στο DOMS και στα αποτελέσματα για το οξειδωτικό στρες από τις μεθόδους που εφαρμόσαμε, παρατηρούμε ότι στις 48 ώρες μετά την άσκηση όπου υπάρχει η μέγιστη μυϊκή βλάβη:

- η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών αυξάνεται κατά 10,84% σε σχέση με το δείγμα pre, στο σύνολο των εθελοντών,
- η λιπιδική υπεροξειδωση (TBARS) αυξάνεται κατά 20,07% σε σχέση με το δείγμα pre, στους μη αθλούμενους και
- ο δείκτης των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων cORP αυξάνεται κατά 39,72% σε σχέση με το δείγμα pre, στην ομάδα των αθλούμενων.

Παρόλα αυτά, αυτή η σχέση που περιγράψαμε δεν σημαίνει απαραίτητα ότι το οξειδωτικό στρες είναι ένας αιτιολογικός παράγοντας για την εμφάνιση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου, καθώς τα δεδομένα μας δεν είναι επαρκή. Έτσι, είναι αναγκαίο να γίνουν περισσότερα πειράματα στα οποία θα εφαρμόζεται η χρήση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων που θα αναστέλλουν τις ελεύθερες ρίζες, ώστε να ληφθεί ακριβέστερη εικόνα για την πιθανή αιτιολογική σχέση ανάμεσα στο DOMS και τις ελεύθερες ρίζες (G. L. Close et al, 2005).

Ακολούθως, ιδιαίτερα ενδιαφέροντα ήταν και τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τους δείκτες του οξειδωτικού στρες. Η πρώτη εικόνα που λάβαμε ήταν μία αύξηση της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών σε όλες τις χρονικές στιγμές, αλλά στατιστικώς σημαντική στις 24 και στις 48 ώρες μετά την άσκηση κατά 10,13% και 10,84% αντίστοιχα. Αξίζει να αναφερθεί ότι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια χρησιμοποιούνται ως δείκτης για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών βλαβών. Οι πρωτεϊνικές βλάβες είναι από τα πιο κοινά

χαρακτηριστικά του οξειδωτικού στρες και αποτελούν μετα-μεταφραστική τροποποίηση η οποία μπορεί να επιτευχθεί μέσω διαφόρων αντιδράσεων και συνίσταται από την προσθήκη ομάδων καρβονυλίων στις πρωτεϊνικές δομές, κυρίως σε κατάλοιπα προλίνης, αργινίνης και λυσίνης.

Επιπλέον, όσον αφορά την υπεροξειδωση των λιπιδίων από τη μέθοδο των TBARS παρατηρήσαμε επίσης αύξηση σε όλες τις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση και ιδιαίτερα στις 72 ώρες της τάξης του 15,29%.

Τα στοιχεία αυτά επιβεβαιώνονται κι από άλλες έρευνες στις οποίες βρέθηκαν αυξημένα πρωτεϊνικά καρβονύλια στις 24 και 48 ώρες μετά από έκκεντρη άσκηση (Margaritelis et al, 2014; Lee et al, 2002), καθώς επίσης και σε όλες τις χρονικές στιγμές σε νεαρούς άνδρες που πραγματοποίησαν έκκεντρη άσκηση (Quindry J et al, 2011). Επιπρόσθετα, η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών ήταν αυξημένη σε αρουραίους 12 ώρες μετά την πραγματοποίηση καθοδικής πορείας (Retamoso LT et al, 2016). Ωστόσο, αύξηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων μετά από έκκεντρη άσκηση έχει βρεθεί και σε άλλες μελέτες (Nikolaidis et al., 2008, Childs 2001, Sacheck 2003). Τα παραπάνω δεδομένα είναι ενδεικτικά του έντονου οξειδωτικού περιβάλλοντος που δημιουργήθηκε στους μύες όλων των συμμετεχόντων έπειτα από την έκκεντρη άσκηση, και επιβεβαιώνουν πως η άσκηση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό αυξημένων συγκεντρώσεων ελευθέρων ριζών. Αυτό έγινε φανερό και σε παλαιότερη μελέτη του εργαστηρίου μας κατά την οποία σημειώθηκε αύξηση των TBARS και των καρβονυλίων σε εθελοντές έπειτα από συμμετοχή τους σε μαραθώνιο βουνού ο οποίος περιλαμβάνει και έκκεντρα κομμάτια (Stagos D et al, 2015).

Παρόλα αυτά, στους υπόλοιπους δείκτες δεν παρατηρήθηκαν σημαντικά στατιστικές διαφορές σε σχέση πάντα με τα δείγματα των ατόμων πριν την άσκηση, και οι τιμές δεν ακολούθησαν το πρότυπο που περιγράψαμε παραπάνω για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και τα TBARS. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι υπήρχαν μεγάλες διαφορές στις τιμές ανάμεσα στα άτομα τα οποία συμμετείχαν στην έρευνα. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάστηκαν και σε προγενέστερη μελέτη του εργαστηρίου μας που περιελάμβανε έκκεντρη άσκηση στην οποία δεν υπήρξε σημαντική διαφορά σε κανένα δείκτη (Stagos et al, 2015).

Πιο συγκεκριμένα, αρχίζοντας με τα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης που αποτελεί έναν από τους σπουδαιότερους δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων, θα αναμέναμε οι συγκεντρώσεις της να ελαττώνονταν σε μεγάλο βαθμό λόγω της κατανάλωσής της για την εξουδετέρωση των ελευθέρων

ριζών. Μειωμένα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης έχουν διαπιστωθεί σε άλλες έρευνες, με στατιστική σημαντικότητα στις 48 ώρες μετά από έκκεντρη άσκηση (Margaritelis et al, 2014), όπως επίσης και τάση για μείωση της ανηγμένης γλουταθειόνης μετά από τις 24 ώρες (Lee et al, 2002). Παρόλα αυτά, στην παρούσα μελέτη μας η γλουταθειόνη δεν μεταβλήθηκε τις επόμενες μέρες έπειτα από την άσκηση, γεγονός που αιτιολογείται από τις πολύ διαφορετικές τιμές μεταξύ των συμμετεχόντων.

Συνεχίζοντας με τα αποτελέσματα της δραστηριότητας της καταλάσης, ένζυμο που επίσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εκτίμηση του οξειδωτικού στρες, σε άλλες μελέτες (Stagos et al, 2015), είχε διαπιστωθεί σημαντική μείωσή της μετά από μαραθώνιο βουνού, που περιλαμβάνει αρκετά έκκεντρα κομμάτια. Ωστόσο, στη μελέτη μας δε λάβαμε σημαντικά αποτελέσματα ώστε να οδηγηθούμε σε κάποιο συμπέρασμα. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων η άσκηση και ιδιαίτερα η έκκεντρη και η αερόβια άσκηση επηρεάζουν τη δραστηριότητα της καταλάσης εξακολουθούν να παραμένουν άγνωστοι. Πολλές μελέτες έχουν ήδη αναφέρει ότι η δραστηριότητα της CAT ούτε αυξάνεται ούτε μειώνεται μετά την άσκηση (Mangner et al., 2013; Oh-ishi et al., 1997; Wiggs, 2015), γεγονός που είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μας.

Περνώντας στα αποτελέσματα της TAC που αναφέρεται στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, επίσης δεν παρατηρήσαμε καμία σημαντική μεταβολή των τιμών, όπως και στο δείκτη cORP που είναι ενδεικτικός του αντιοξειδωτικού αποθέματος του κυττάρου. Την ίδια διαπίστωση κάναμε και για το δείκτη sORP, παρότι θα περιμέναμε να αυξηθεί, εφόσον αυξημένες τιμές του είναι ενδεικτικές του έντονου οξειδωτικού περιβάλλοντος. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με έρευνα κατά την οποία μετά από μαραθώνιο βουνού, ενός είδους άσκησης που περιλαμβάνει έκκεντρα κομμάτια, όπου βρέθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση του sORP (7%) και μείωση του cORP που όμως δεν ήταν σημαντική (Stagos et al, 2015). Και πάλι, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, η εξήγηση που θα μπορούσε δοθεί για τις αμετάβλητες τιμές μας αναφέρεται στην ποικιλομορφία της συμπεριφοράς του κάθε εξεταζόμενου απέναντι στο οξειδωτικό στρες.

Έτσι, δεδομένης της εξατομικευμένης ανταπόκρισης των ατόμων στα οξειδωτικά ερεθίσματα μετά από άσκηση, η μελέτη μας προσανατολίστηκε στην εύρεση ενός χαρακτηριστικού που θα μπορούσε να ομαδοποιεί τα άτομα. Ως τέτοιο

χαρακτηριστικό ορίστηκε το αθλητικό ιστορικό των εθελοντών που συμμετείχαν. Με αυτό το κριτήριο χωρίσαμε τους συμμετέχοντες σε δύο υποομάδες, με τους εθελοντές που είχαν επαφή με κάποιο είδος άσκησης, δηλαδή συστηματική ενασχόληση με οποιαδήποτε μορφής άσκηση στο παρελθόν και στο παρόν, να αναφέρονται ως «αθλούμενοι» και εκείνους που δεν είχαν καμία συστηματική ενασχόληση με άσκηση μέχρι την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος, να αναφέρονται ως «μη αθλούμενοι». Από το σύνολο των εθελοντών οι δέκα ήταν αθλούμενοι, ενώ οι υπόλοιποι οκτώ μη αθλούμενοι.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, στο στάδιο αυτό έγινε διερεύνηση της οξειδοαναγωγικής συμπεριφοράς των συμμετεχόντων μετά από διάκρισή τους στις δύο προαναφερθείσες κατηγορίες. Αναφορικά με τα πρωτεϊνικά καρβονύλια δεν παρατηρούμε στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία από τις χρονικές στιγμές του πειράματος, παρόλο που είχαν διαπιστωθεί σημαντικές διαφορές στην συνολική εξέταση των εθελοντών. Στα TBARS, παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντική αύξηση των τιμών στις 24 και 72 ώρες στους αθλούμενους και στις 48 ώρες στους μη αθλούμενους. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τις αυξημένες τιμές που λάβαμε στη συνολική ανάλυση σε όλες τις χρονικές στιγμές, και καταδεικνύει την αυξημένη λιπιδική υπεροξειδωση ανεξαρτήτως αθλητικού ιστορικού. Τα αποτελέσματα που λάβαμε, όμως, διαφοροποιούνται μεταξύ αθλούμενων και μη αθλούμενων στους υπόλοιπους δείκτες. Στην ομάδα των μη αθλούμενων παρατηρούμε μειωμένα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης στις 72 ώρες σε σχέση με το δείγμα pre αλλά και σημαντικά στατιστική διαφορά σε σχέση με τους αθλούμενους, υποδηλώνοντας μεγαλύτερη εξουδετέρωση του αντιοξειδωτικού αυτού ενζύμου ως απόκριση στην παραγωγή ελευθέρων ριζών από την πραγματοποίηση της έκκεντρης άσκησης. Τα στοιχεία αυτά καταδεικνύουν πως οι μη αθλούμενοι παρουσιάζουν εντονότερο οξειδωτικό στρες σε σχέση με τους αθλούμενους και αποτελούν τις πρώτες ενδείξεις που μας οδηγούν στο ότι το αθλητικό ιστορικό επηρεάζει την παραγωγή των ελευθέρων ριζών.

Επιπρόσθετα, όσον αφορά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του πλάσματος παρατηρούμε στατιστικώς σημαντική διαφορά του δείκτη αυτού ανάμεσα σε αθλούμενους και μη αθλούμενους, στις 24 ώρες μετά την ολοκλήρωση της άσκησης. Στον προσδιορισμό της τιμής της TAC κύριο ρόλο κατέχει το ουρικό οξύ που σχηματίζεται ως προϊόν της αποικοδόμησης των πουρινών εξαιτίας του οξειδωτικού περιβάλλοντος που έχει προκύψει (Darko Duplanic et al, 2011). Έτσι, οι

μη αθλούμενοι φαίνεται να παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή ουρικού οξέος σε σχέση με τους αθλούμενους, ως αποτέλεσμα του εντονότερου οξειδωτικού στρες που υφίστανται που οδηγεί σε αποικοδόμηση των πουρινών.

Επιπλέον, από τη μελέτη του δείκτη sORP στους μη αθλούμενους, βλέπουμε μία αύξηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού και στις τρεις χρονικές στιγμές, που μεταφράζεται ως μετατόπιση της ισορροπίας οξειδωτικών (ελεύθερες ρίζες) – αναγωγικών (αντιοξειδωτικά μόρια) προς την πλευρά των οξειδωτικών. Συγκριτικά με τους αθλούμενους η διαφορά αυτή είναι σημαντικά στατιστική αντικατοπτρίζοντας σε μεγάλο βαθμό τη διαφορετική απόκριση των δυο ομάδων στην παραγωγή ελευθέρων ριζών μετά την άσκηση. Ακόμα, κατά τις 72 ώρες είναι εμφανής στατιστικά σημαντική αύξηση του sORP σε σχέση με πριν την άσκηση, της τάξης του 10,29%. Ταυτόχρονα, στην ομάδα των αθλούμενων δεν παρατηρούμε σχεδόν καμία μεταβολή στο δείκτη sORP. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε για ακόμα μία φορά πως χαμηλές τιμές sORP σημαίνουν πως το βιολογικό δείγμα βρίσκεται σε φυσιολογικά επίπεδα οξειδωτικού στρες. Δεδομένου αυτού και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα μας οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως οι αθλούμενοι επηρεάστηκαν σε ανεπαίσθητο βαθμό από το οξειδωτικό ερέθισμα στο οποίο υποβλήθηκαν σε αντίθεση με τους μη αθλούμενους που επηρεάστηκαν έντονα.

Παρόμοια, όσον αφορά το δείκτη cORP παρατηρήσαμε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων σε όλες τις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση. Πιο αναλυτικά, στους μη αθλούμενους, βλέπουμε μία μείωση των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων που είναι διαθέσιμα σε όλες τις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση με στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με το δείγμα pre στις 72 ώρες (45,52%), γεγονός που φανερώνει πως οι μη αθλούμενοι δεν κατάφεραν να ανταπεξέλθουν στο οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε από την άσκηση. Αρκετά ενδιαφέρον είναι το γεγονός πως αντιστρόφως ανάλογη σημαντική διαφορά βρέθηκε στην ίδια χρονική στιγμή και στο δείκτη sORP κάτι που ήταν αναμενόμενο αν αναλογιστούμε ότι το cORP αντιπροσωπεύει το αντιοξειδωτικό διαθέσιμο απόθεμα του οργανισμού. Από την άλλη οι τιμές cORP στους αθλούμενους δείχνουν να αυξάνονται, ιδιαίτερα κατά τις 24 και 48 ώρες, γεγονός που υποδηλώνει πως αντιμετωπίζουν το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την έκκεντρη άσκηση αυξάνοντας το αντιοξειδωτικό τους απόθεμα. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τα προηγούμενα και ενισχύουν την υπόθεσή μας πως η ενασχόληση με οποιας μορφής άσκηση παίζει ρόλο στο οξειδοαναγωγικό προφίλ των ατόμων. Έτσι, οι αθλούμενοι δείχνουν να

είναι περισσότερο προσαρμοσμένοι στην άσκηση και δεν επηρεάζονται στον ίδιο βαθμό από το οξειδωτικό στρες σε σχέση με τους μη αθλούμενους. Επιπρόσθετα, τις διαφορές στο cORP που παρατηρήσαμε ανέμεσα στις δύο διακριθείσες ομάδες, έρχεται να επιβεβαιώσει προηγούμενη έρευνα του εργαστηρίου μας στην οποία οι συμμετέχοντες είχαν διακριθεί με βάση τις τιμές τους σε μία ομάδα υψηλού και μία χαμηλού cORP (Stagos et al 2015).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι μπορεί να υπάρχουν εξαρτώμενες από το χρόνο διαφορές στο δείκτη cORP κι αυτό ίσως συσχετίζεται με τη μυϊκή βλάβη που προκαλείται από έκκεντρη άσκηση. Συγκεκριμένα, είναι ευρέως γνωστό ότι τα μακροφάγα, ηωσινόφιλα και ουδετερόφιλα μπορεί να επάγουν την παραγωγή ROS (Malm C et al, 1999). Τα κύτταρα αυτά παρουσιάζουν επίσης σημαντική ενεργοποίηση κατά τη διάρκεια έκκεντρης άσκησης, ως αποτέλεσμα της επιμήκυνσης του μυός (Malm C et al, 1999). Όταν υπάρχει το οξειδωτικό στρες, τα αντιοξειδωτικά μόρια εξαντλούνται κι αυτό οφείλεται στην προσπάθεια των κυττάρων να εξουδετερώσουν τις οξειδωτικές επιδράσεις και να αποκαταστήσουν την οξειδοαναγωγική ισορροπία με ενεργοποίηση ή αποσιώπηση γονιδίων που κωδικοποιούν αμυντικά ένζυμα, παράγοντες μεταγραφής, και δομικές πρωτεΐνες (Smith JA, 1997). Αυτή η μείωση σε αντιοξειδωτικά μπορεί να εξηγήσει τα μειωμένα επίπεδα cORP που παρατηρούνται τις επόμενες μέρες μετά την πραγματοποίηση άσκησης. Το cORP, επιπρόσθετα, 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).

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι θα αναμένονταν παρόμοια αποτελέσματα μεταξύ του cORP και της TAC. Αυτό συμβαίνει καθώς η TAC επίσης υποδεικνύει την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, αλλά βασίζεται στη μείωση των ελευθέρων ριζών από τα αντιοξειδωτικά μόρια στο πλάσμα. Η διαφοροποίηση στα αποτελέσματα που λάβαμε από τις δύο μεθόδους έγκειται στη διαφορετική μεθοδολογία που εφαρμόζεται στην καθεμία. Στην TAC πραγματοποιείται εξουδετέρωση ρίζας από τα αναγωγικά μόρια του πλάσματος, ενώ στο δείκτη cORP πραγματοποιείται εξουδετέρωση των αναγωγικών μετά από διοχέτευση ηλεκτρονίων. Για το λόγο αυτό, η μέτρηση cORP μπορεί να είναι μια πιο ακριβής μέθοδος από την

TAC για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες in vino. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας από τις δύο αυτές μεθόδους παρατηρούμε στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε αθλούμενους και μη σε όλες τις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση αναφορικά με το δείκτη cORP, αποτελέσματα που είναι και αναμενόμενα, ενώ στον προσδιορισμό της TAC η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων είναι σημαντική μόνο στις 24 ώρες. Η έλλειψη ακριβούς συσχέτισης πιθανόν να οφείλεται, όπως προαναφέρθηκε, στις διαφορές ανάμεσα στις δύο μεθόδους.

Τέλος, η δραστηριότητα του ενζύμου καταλάση δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε μετά την διάκριση που πραγματοποιήσαμε σε αθλούμενους και μη. Αυτό ίσως να οφείλεται και στο γεγονός πως η δράση της δεν είναι πλήρως κατανοητή, όπως προαναφέρθηκε.

Μία πιθανή εξήγηση για αυτή τη μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των εξεταζόμενων ατόμων, θεωρείται η μεγάλη πολυπλοκότητα στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης στον άνθρωπο, δεδομένου ότι πολλοί γενετικοί, φυσιολογικοί, βιοχημικοί ή διαιτητικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα του οξειδωτικού ερεθίσματος (Simoneau JA and Bouchard C, 1989; Rankinen T and Bouchard C, 2008; Kant AK and Graubard BI, 2008). Για παράδειγμα, μεταξύ των γονιδίων των οποίων η μεταβλητότητα φαίνεται να επηρεάζει την απόκριση στο οξειδωτικό στρες είναι αυτά που κωδικοποιούν για την υπεροξειδική δισμουτάση, την τρανσφεράση της γλουταθειόνης, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, την αναγωγή της θειορεδοξίνης, την αφυδρογονάση της ξανθίνης όπως επίσης και γονίδια που εμπλέκονται στην μιτοχονδριακή δραστηριότητα (Dato S et al, 2013). Επιπλέον, οι παρατηρούμενες παραλλαγές θα μπορούσαν να αποδοθούν στην αλλαγμένη ενσωμάτωση των οξειδοαναγωγικών συστημάτων λόγω της άσκησης. Η ενσωμάτωση αναφέρεται στο χαρακτηριστικό πολλών βιοχημικών συστημάτων, τα οποία εμφανίζουν μια συσχέτιση και αλληλεξάρτηση σε πολλά επίπεδα (π.χ. λειτουργική, δομική, αναπτυξιακή ή εξελικτική) (Constantini D et al, 2011 & 2013). Επιπλέον, ένα άλλο σημαντικό στοιχείο είναι ότι οξειδοαναγωγικοί βιοδείκτες είναι χημικές ουσίες, των οποίων οι βιολογικές επιδράσεις, οι πολλαπλοί λειτουργικοί ρόλοι, οι δράσεις και μεταβολικές οδοί δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητές (Bruschi M et al, 2013; Carocho M and Ferreira, 2013; Kar S and Kavdia M, 2013). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα επίπεδά

τους μπορούν να ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό στο γενικό πληθυσμό και οι περισσότεροι από αυτούς παρουσιάζουν μια πολύπλοκη αλληλεξάρτηση (Constantini D et al, 2013; Arguelles S et al, 2007; Su H et al, 2008; Valencia E et al, 2001).

Μια ακόμα πιθανή επεξήγηση των διαφορών που παρατηρούνται ανάμεσα σε αθλούμενους και μη αθλούμενους, αφορά πιθανώς τον ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2. Συγκεκριμένα, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από οξεία άσκηση σε μιτοχόνδρια σκελετικού μυός, συνδέεται με τη θετική ρύθμιση της σηματοδότησης του REF1/Nrf2 και την ενίσχυση των οδών που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική ανοσοαποκρίση (Wang D et al, 2016). Η ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 από οξεία άσκηση μπορεί να αποτελεί το μοριακό μηχανισμό που ρυθμίζει την αντίσταση του κυττάρου στο οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια άσκησης. Μελέτες σε αρουραίους έδειξαν πως η μακροχρόνια άσκηση αυξάνει την αντιοξειδωτική άμυνα με τη συμμετοχή των παραγόντων NFkB και Nrf2 γεγονός που συμβάλλει στη μείωση του οξειδωτικού στρες (Liza George et al, 2008). Από τα δεδομένα αυτά και σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως τα άτομα που έχουν επαφή με αθλητική δραστηριότητα πιθανόν να έχουν αναπτύξει τις απαιτούμενες προσαρμογές που οδηγούν σε ταχύτερη ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, εξασφαλίζοντας κατά αυτό τον τρόπο πιο γρήγορη αποκατάσταση μετά την έκθεσή τους σε κάποιο οξειδωτικό παράγοντα.

Συνοψίζοντας, αξίζει να αναφερθεί πως στη μελέτη μας έγινε μια πρώτη προσπάθεια για κατηγοριοποίηση θέτοντας ως σημείο αναφοράς το αθλητικό ιστορικό του κάθε ατόμου. Την υπόθεσή μας αυτή επιβεβαίωσαν τα αποτελέσματα που λάβαμε καθώς παρατηρήσαμε πως η έκθεση ορισμένων ατόμων σε κάποιου είδους άσκηση, έχει ως απόρροια ο οργανισμός να αναπτύσσει προσαρμογές αντιμετωπίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο την παραγωγή ελευθέρων ριζών, εξηγώντας έτσι την ποικιλομορφία που παρατηρήθηκε στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των εξεταζόμενων ατόμων. Επομένως, είναι φανερό πως το αθλητικό ιστορικό του καθενός αποτελεί μία πιθανή αιτία για τις μεγάλες διαφορές μεταξύ των ατόμων στην ανταπόκριση απέναντι στο οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή που προκαλείται από έκκεντρη άσκηση. Ωστόσο, είναι ακόμα απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες, σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα ανωτέρω ευρήματα.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρασκευή αντιδραστηρίων για τη μέτρηση των δεικτών οξειδωτικού στρες:

Για τον προσδιορισμό των TBARS:

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

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

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

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

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

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

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

- *Διαλύματα TCA% (τριχλωροοξικό οξύ)*

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

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

Για τον προσδιορισμό των CARB:

- ***Διάλυμα HCl 2.5 N***

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

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

- ***DNPH 14 mM (MB: 198.1)***

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

- ***Ουρία 5 M (pH 2.3) (MB: 60.06)***

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

Για τον προσδιορισμό της TAC:

- ***Phosphate buffer 10 mM (pH 7.4)***

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

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

- ***DPPH 0.1 mM, MB: 394.32***

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

Για τον προσδιορισμό της GSH:

- ***Phosphate buffer 67 mM (pH 7.95)***

MB (KH_2PO_4): 136, MB (Na_2HPO_4): 178

Για να φτιάξουμε 500 mL από το phosphate buffer φτιάχνουμε 25 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 500 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.227 g και τα διαλύουμε σε 25 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 5.94 g και τα διαλύουμε σε 475 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα. Διορθώνουμε με NaOH or HCl, 1 N μέχρι το pH να φτάσει την τιμή 7.95.

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

DTNB [5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)], MB:396.35, **Κιτρικό νάτριο** ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, tri-sodium dihydrate), MB:294.10

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

Για τον προσδιορισμό της CAT:

- *Phosphate buffer 67 mM (pH 7.4)*

MB (KH_2PO_4): 136, MB (Na_2HPO_4): 178

Για να φτιάξουμε 500 mL του phosphate buffer φτιάχνουμε πρώτα 100 mL KH_2PO_4 (67 mM) και 400 mL Na_2HPO_4 (67 mM). Για το KH_2PO_4 ζυγίζουμε 0.91 g και τα διαλύουμε σε 100 mL νερού. Για το Na_2HPO_4 ζυγίζουμε 4.77 g και τα διαλύουμε σε 400 mL νερού. Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύουμε τα διαλύματα. Αν χρειαστεί προσθέτουμε NaOH ή HCl, 1 N ώστε το pH του παραγόμενου διαλύματος να είναι 7.4.

- *30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)*

Το διάλυμα H_2O_2 είναι έτοιμο προς χρήση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 84(1), 1-7.
- Alessio, H. M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 25(2), 218–224.
- Alessio, H. M., Hagerman, A. E., Fulkerson, B. K., Ambrose, J., Rice, R. E., & Wiley, R. L. (2000). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(9), 1576–1581.
- Antunes, F., Han, D., & Cadenas, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(9), 1260–1267.
- Aoi, W., Naito, Y., Takanami, Y., Kawai, Y., Sakuma, K., Ichikawa, H., et al. (2004). Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radic Biol Med*, 37(4), 480-487.
- Arguelles S, Gomez A, Machado A and Ayala A: A preliminary analysis of within-subject variation in human serum oxidative stress parameters as a function of time. *Rejuvenation Res* 10: 621–636, 2007.
- Armstrong, R. B. (1990). Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc*, 22(4), 429-435.
- Berg J, Tymoczko J, Stryer L (2010). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- Bloomer, R. J., & Goldfarb, A. H. (2004). Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. *Can J Appl Physiol*, 29(3), 245-263.
- Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H., Wideman, L., McKenzie, M. J., & Consitt, L. A. (2005). Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res*, 19(2), 276-285.
- Boz I, Belviranli M and Okudan N: Curcumin Modulates Muscle Damage but not Oxidative Stress and Antioxidant Defense Following Eccentric Exercise in Rats. *Int J Vitam Nutr Res* 84: 163–172, 2014.
- Brantley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, Singleton EW, Olson JS (1993). The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 268(10), 6995-7010.

- Bruschi M, Candiano G, Santucci L and Ghiggeri GM: Oxidized albumin. The long way of a protein of uncertain function. *Biochim Biophys Acta* 1830: 5473–5479, 2013.
- Carocho M and Ferreira ICFR: A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 51: 15–25, 2013.
- Chance B., Sies H and Boveris A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605,1979.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493.
- Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C (2001). Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med* 31,745-753.
- Close, G. L., Ashton, T., Cable, T., Doran, D., & MacLaren, D. P. (2004). Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayed onset muscle soreness: the role of reactive oxygen species. *Eur J Appl Physiol*, 91(5-6), 615-621.
- Close, G. L., Ashton, T., Cable, T., Doran, D., Noyes, C., McArdle, F., et al. (2005). Effects of dietary carbohydrate on delayed onset muscle soreness and reactive oxygen species after contraction induced muscle damage. *Br J Sports Med*, 39(12), 948-953.
- Close, G. L., Ashton, T., McArdle, A., & Maclaren, D. P. (2005). The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 142(3), 257-266.
- Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T., & Wilson, M. T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 30(2), 280–285.
- Costantini D, Monaghan P and Metcalfe NB: Biochemical integration of blood redox state in captive zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *J Exp Biol* 214: 1148–1152, 2011.
- Costantini D, Monaghan P and Metcalfe NB: Loss of integration is associated with reduced resistance to oxidative stress. *J Exp Biol* 216: 2213–2220, 2013
- Dato S, Crocco P, D'Aquila P, de Rango F, Bellizzi D, Rose G and Passarino G: Exploring the Role of Genetic Variability and Lifestyle in Oxidative Stress Response for Healthy Aging and Longevity. *Int J Mol Sci* 14: 16443– 16472, 2013.
- Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107, 1198–1205.

- Dotan, Y., Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 200–227.
- Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D and Radic N: Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. *Molecules* 16: 7058–7068, 2011.
- Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, Ordonez-Llanos J, Marrugat J (2003). Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis* 167, 327–334.
- Finaud J, Lac G, Filaire E (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 36(4), 327-358.
- Friden, J. (1984). Muscle soreness after exercise: implications of morphological changes. *Int J Sports Med*, 5(2), 57-66.
- George L, Asghar M and Lokhandwala M: Exercise Stimulates Transcription Factors (Nrf2 & NFkB), Increases Antioxidant Defenses, Decreases Oxidative Stress, and Restores Renal Dopamine D1 Receptor Function in Aging. *Faseb J*, 2008.
- Goldfarb, A. H., Bloomer, R. J., & McKenzie, M. J. (2005). Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 37(2), 234-239.
- Gomez-Cabrera, M.-C., Borrás, C., Pallardó, F. V, Sastre, J., Ji, L. L., & Viña, J. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *The Journal of Physiology*, 567(Pt 1), 113–120.
- Green, H. J., & Fraser, I. G. (1988). Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 20(1), 55–59.
- Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Vincent, S., Sergent, O., ... Gratas-Delamarche, A. (2003). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 89(1), 14–20. <http://doi.org/10.1007/s00421-002-0767-1>
- Halliwell B, Gutteridge J (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications.

- Halliwell B and Gutteridge JMC, "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview", in Parker L, Glazer AN, Methods in Enzymology 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.
- Halliwell B and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
- Halliwell B (2001). Free radicals and other reactive species in disease. In: *Nature Encyclopaedia of Life Sciences*. J. Wiley and Sons (eds). *Nature Publishing Group*, New York.
- Halliwell, Barry (Mar 2015) *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease*. In: *eLS*.
- Harris C. and Hansen J. M., "Oxidative stress, thiols, and redox profiles," *Methods in molecular biology*, vol. 889, pp. 325-346, 2012
- Inal M, Akyuz F, Turgut A, Getsfrid WM (2001). Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 33 (4), 564-7.
- Jamurtas, A. Z., Fatouros, J. G., Buckenmeyer, P. J., Kokkinidis, E., Taxildaris, K., Kambas, A., et al. (2000). Effects of plyometric exercise on muscle soreness and creatine kinase levels and its comparison to eccentric and concentric exercise. *J Strength Cond Res*, 14, 68-74.
- Janaszewska, A., & Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 62(3), 231–236.
- Jenkins, R. R. (1988). Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 5(3), 156–170.
- J. Kim and J. Lee, "A review of nutritional intervention on delayed onset muscle soreness. Part I," *Journal of Exercise Rehabilitation*, vol.10,no.6,pp.349–356, 2014.
- Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. *Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 222(3), 283–292.
- Ji, L. L., Gomez-Cabrera, M.-C., & Vina, J. (2006). Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067, 425–435.
- Kant AK and Graubard BI: Ethnic and socioeconomic differences in variability in nutritional biomarkers. *Am J Clin Nutr* 87: 1464–1471, 2008.

- Kar S and Kavdia M: Endothelial NO and O₂(·) production rates differentially regulate oxidative, nitroxidative, and nitrosative stress in the microcirculation. *Free Radic Biol Med* 63: 161–174, 2013.
- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akcay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 28(2), 141–143.
- Kerksick, C., & Willoughby, D. (2005). The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2, 38–44. <http://doi.org/10.1186/1550-2783-2-2-38>
- Klebanoff SJ (1988). Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. In: Gallin, J. I.; Goldstein, I. M.; Synderman, R., eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York Raven, 391– 444.
- Kuby, Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne (2007). *Ανοσολογία, εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης*.
- Kumar, C. T., Reddy, V. K., Prasad, M., Thyagaraju, K., & Reddanna, P. (1992). Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 111(1-2), 109–115.
- Lee J, Goldfarb AH, Rescino MH, Hegde S, Patrick S and Apperson K: Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc* 34: 443–448, 2002.
- Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, Belcastro AN (1987). Are indices of free radical damage related to exercise intensity? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 56(3), 313-6.
- Malm C, Lenkei R and Sjodin B: Effects of eccentric exercise on the immune system in men. *J Appl Physiol* 86: 461–468, 1999.
- Mangner, N., Linke, A., Oberbach, A., Kullnick, Y., Gielen, S., Sandri, M., ... Adams, V. (2013). Exercise training prevents TNF-alpha induced loss of force in the diaphragm of mice. *PloS One*, 8(1), e52274.
- Margaritelis, N. V, Kyparos, A., Paschalis, V., Theodorou, A. A., Panayiotou, G., Zafeiridis, A., ... Vrabas, I. S. (2014). Reductive stress after exercise: The issue of redox individuality. *Redox Biology*, 2, 520–528.
- Maria L. Urso, Priscilla M. Clarkson (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189 (2003) 41-54.
- McBride JM. Kraemer W J (1999). *Free Radicals, Exercise, and Antioxidants* (Vol. 13, pp. 175-183): National Strength and Conditioning Association.

- McHugh M. P., Connolly D. A., Eston R. G., and Gleim G. W., "Exercise-induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect," *Sports medicine*, vol. 27, no. 3, pp. 157-170, 1999.
- Meeus M, Nijs J, Hermans L, Goubert D and Calders P: The role of mitochondrial dysfunctions due to oxidative and nitrosative stress in the chronic pain or chronic fatigue syndromes and fibromyalgia patients: peripheral and central mechanisms as therapeutic targets? *Expert Opin Ther Targets* 17: 1081–1089, 2013.
- Melikoglu, M. A., Kaldirimci, M., Katkat, D., Sen, I., Kaplan, I., & Senel, K. (2008). The effect of regular long term training on antioxidant enzymatic activities. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 48(3), 388–390.
- Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG., Koutedakis Y, Papassotiriou I, Kouretas D (2007). Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 39, 1107-1113.
- Mougiou Vassilis C. (2008). Βιοχημεία της Άσκησης, εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- Mylonas C and Kouretas D: Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13: 295–309, 1999.
- Netto LES , Chae HZ , Kang NA , Rhee SG , Stadtman ER (1996). Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *J Biol Chem* 271(26):15315-21
- Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D (2006). Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc* 38, 1443-1450.
- Nikolaidis MG, Kyparos A, Hadziioannou M, Panou N, Samaras L, Jamurtas AZ and Kouretas D: Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr Metab* 32: 197–205, 2007.
- Nikolaidis M.G., Jamurtas A.Z., Paschalis V., Fatouros I.G, Koutedakis Y., and Kouretas D., "The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations," *SportsMedicine*, vol.38 , no.7 , pp.579–606, 2008.
- Oh-ishi, S., Kizaki, T., Nagasawa, J., Izawa, T., Komabayashi, T., Nagata, N., ... Ohno, H. (1997). Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 24(5), 326–332.

- Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Morrow JD (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol* 89, 100-107.
- Park K-S and Lee M-G: Effects of unaccustomed downhill running on muscle damage, oxidative stress, and leukocyte apoptosis. *J Exerc Nutr Biochem* 19: 55–63, 2015.
- Paschalis, V., Koutedakis, Y., Jamurtas, A. Z., Mougios, V., & Baltzopoulos, V. (2005). Equal volumes of high and low intensity of eccentric exercise in relation to muscle damage and performance. *J Strength Cond Res*, 19(1), 184-188.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N. T., Georgiou, C. D., Angelatou, F., & Matsokis, N. A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Letters*, 357(2), 83–86.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 4(2), 89–96.
- Phaneuf S and Leeuwenburgh C: Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 33: 393–396, 2001.
- Powers SK, Lennon SL (2000). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58, 1025-33.
- Powers SK and Jackson MJ: Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88: 1243–1276, 2008.
- Quindry J, Miller L, McGinnis G, *et al.*: Muscle-fiber type and blood oxidative stress after eccentric exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 21: 462–470, 2011.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 27(1-2), 69-74.
- Rankinen T and Bouchard C: Gene-physical activity interactions: overview of human studies. *Obesity (Silver Spring)* 16 Suppl 3: S47–50, 2008.
- Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. (2004) Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J. Tuberc.* 51, 213–218.
- Retamoso LT, Silveira Junior MEP, Lima FD, *et al.*: Increased xanthine oxidase-related ROS production and TRPV1 synthesis preceding DOMS post-eccentric exercise in rats. *Life Sci* 152: 52–59, 2016.
- Salaway J. G. *Medical Biochemistry at a Glance*, 2006.

- Sacheck JM, Milbury PE, Cannon JG, Roubenoff R., and Blumberg JB: Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free Radic Biol Med* 34: 1575-1588, 2003.
- Sautin, Y. Y., & Johnson, R. J. (2008). Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 27(6), 608–619.
- Saxton, J. M., Donnelly, A. E., & Roper, H. P. (1994). Indices of free-radical-mediated damage following maximum voluntary eccentric and concentric muscular work. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 68(3), 189-193.
- Schneider BSP and Tiidus PM: Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? *Sports Med* 37: 837– 856, 2007.
- Silva L. A., Pinho C. A., Silveira P. C. 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.
- Silva L. A., Silveira P. C., Ronsani M. M. 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.
- Simoneau JA and Bouchard C: Human variation in skeletal muscle fiber type proportion and enzyme activities. *Am J Physiol* 257: E567–72, 1989.
- Smith JA: Exercise immunology and neutrophils. *Int J Sports Med* 18 Suppl 1: S46–55, 1997.
- Spanidis, Y., Goutzourelas, N., Stagos, D., Kolyva, A. S., Gogos, C. A., Bar-Or, D., & Kouretas, D. (2015). Assessment of Oxidative Stress in Septic and Obese Patients Using Markers of Oxidation-reduction Potential. *In Vivo (Athens, Greece)*, 29(5), 595–600.
- Stagos, D., Goutzourelas, N., Bar-Or, D., Ntontou, A.-M., Bella, E., Becker, A. T., ... Kouretas, D. (2015). Application of a new oxidation-reduction potential assessment method in strenuous exercise-induced oxidative stress. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 20(4), 154–162.
- Stagos, D., Goutzourelas, N., Ntontou, A.-M., Kafantaris, I., Deli, C. K., Poullos, A., ... Kouretas, D. (2015). Assessment of eccentric exercise-induced oxidative stress using oxidation-reduction potential markers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 204615.
- Stauber, W. T. (1989). Eccentric action of muscles: physiology, injury, and adaptation. *Exerc Sport Sci Rev*, 17, 157-185.

- Steensberg, A., van Hall, G., Osada, T., Sacchetti, M., Saltin, B., & Klarlund Pedersen, B. (2000). Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *The Journal of Physiology*, 529 Pt 1, 237–242.
- Su H, Gornitsky M, Geng G, Velly AM, Chertkow H and Schipper HM: Diurnal variations in salivary protein carbonyl levels in normal and cognitively impaired human subjects. *Age (Dordr)* 30: 1–9, 2008.
- Svensson, M. B., Ekblom, B., Cotgreave, I. A., Norman, B., Sjoberg, B., Ekblom, O., ... Sjodin, A. (2002). Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiologica Scandinavica*, 176(1), 43–56.
- Valencia E, Marin A and Hardy G: Circadian rhythmicity of whole-blood glutathione in healthy subjects. *Nutrition* 17: 731–733, 2001.
- Veskoukis, A. S., Nikolaidis, M. G., Kyparos, A., Kokkinos, D., Nepka, C., Barbanis, S., & Kouretas, D. (2008). Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition et Metabolisme*, 33(6), 1140–1154.
- Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J (2000). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50, 271–277.
- Wang P, Li CG, Qi Z, Cui D and Ding S: Acute exercise stress promotes Ref1/Nrf2 signalling and increases mitochondrial antioxidant activity in skeletal muscle. *Exp Physiol* 101: 410–420, 2016.
- Warren, G. L., Lowe, D. A., & Armstrong, R. B. (1999). Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Med*, 27(1), 43-59.
- Wiggs, M. P. (2015). Can endurance exercise preconditioning prevention disuse muscle atrophy? *Frontiers in Physiology*, 6, 63.
- Yiannakopoulou E. (2009). Oxidative stress – antioxidant mechanisms: Clinical implications. *Archives of Hellenic Medicine* 2009, 26(1):23-35.
- Young, I. S., & McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 358–362.
- Zembron-Lacny, A., Naczki, M., Gajewski, M., Ostapiuk-Karolczuk, J., Dziewiecka, H., Kasperska, A., & Szyszka, K. (2010). Changes of muscle-derived cytokines in relation to thiol redox status and reactive oxygen and nitrogen species. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 59(6), 945–951.

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