

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΘΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ *in vivo* ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ
ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΘΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΣΕ
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ»**



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΠΑΝΙΔΗΣ ΥΠΑΤΙΟΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**«ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ *in vivo* ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ
ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ ΔΕΙΚΤΗ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΣΕ
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΠΑΝΙΔΗΣ ΥΠΑΤΙΟΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

**«Αποτίμηση οξειδωτικού στρες *in vivo* με τη χρήση ενός νέου δείκτη
οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές
συνθήκες»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δ. ΣΤΑΓΚΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Α. ΤΖΙΑΜΟΥΡΤΑΣ: Καθηγητής Βιοχημείας της Άσκησης, Τμήμα Επιστημών Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού (ΤΕΦΑΑ), Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σ. ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ: Καθηγητής Χημείας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών, Σχολή Αγροτικής Παραγωγής, Υποδομών & Περιβάλλοντος, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Γ. ΒΑΣΙΛΟΠΟΥΛΟΣ: Καθηγητής Παθολογίας-Αιματολογίας, Τομέας Παθολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Α. ΤΣΑΚΑΛΩΦ: Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ε. ΑΣΠΡΟΔΙΝΗ: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΣΠΑΝΙΔΗΣ ΥΠΑΤΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2019

«ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ *in vivo* ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΕΝΟΣ ΝΕΟΥ
ΔΕΙΚΤΗ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΣΕ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ
ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 30

Συνολικός αριθμός σελίδων: 277

Συνολικός αριθμός εικόνων: 26

Συνολικός αριθμός πινάκων: 28

Συνολικός αριθμός διαγραμμάτων: 42

Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 355

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια η ανάγκη για απλούστευση των μεθόδων προσδιορισμού της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ανθρώπων είναι στην επικαιρότητα καθώς το οξειδωτικό στρες έχει τεκμηριωμένα συνδεθεί με αρκετές παθολογικές καταστάσεις. Παράλληλα, η δημοσίευση εργασιών που αμφισβητούν ανοικτά την επαγωγή της κατάστασης αυτής μετά από έντονη άσκηση καθιστά αναγκαία την ενδελεχή μελέτη της απόκρισης του οργανισμού σε οξειδωτικά ερεθίσματα, μεταξύ άλλων και της άσκησης. Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η εξέταση ενός νέου συστήματος (Luoxis RedoxSYS) που επιτρέπει τον άμεσο προσδιορισμό της οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε πλάσμα ανθρώπου σε μόλις 4 και χρησιμοποιώντας μόλις 20μl δείγματος. Η μελέτη απέβλεπε στην ταυτοποίηση της εγκυρότητας των αποτελεσμάτων που παρέχονται από το συγκεκριμένο διαγνωστικό σύστημα τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθοφυσιολογικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα κρίθηκαν ιδιαίτερος ικανοποιητικά καθώς τόσο σε υγιείς όσο και ασθενείς ανθρώπους με Σήψη, Παχυσαρκία, Μεταβολικό Σύνδρομο και Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, υπήρχε σημαντική συσχέτιση των δεδομένων που παρέχονται από το διαγνωστικό σύστημα με τα αντίστοιχα από φωτομετρικούς βιοδείκτες που χρησιμοποιούνται ευρέως και αξιολογούν αξιόπιστα τόσο τα επίπεδα αντιοξειδωτικής άμυνας ενός οργανισμού, όσο και τα επίπεδα οξειδωτικών βλαβών σε βιομόρια. Ταυτόχρονα, σημαντικό συμπέρασμα της παρούσας διατριβής είναι η έλειψη ομοιογένειας στην οξειδοαναγωγική κατάσταση εθελοντών μετά την πραγματοποίηση έντονης άσκησης. Το ενδιαφέρον στοιχείο που προέκυψε αφορά την ύπαρξη βελτιωμένης οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε άτομα μετά την πραγματοποίηση άσκησης, μια κατάσταση που στην βιβλιογραφία αναφέρεται ως ‘‘Αναγωγικό Στρες’’. Υποθέτοντας ότι το αθλητικό ιστορικό των ατόμων μπορεί να επηρεάσει την απόκριση του οργανισμού στην φλεγμονώδη απόκριση λόγω μυϊκής καταστροφής μετά από έντονη άσκηση, και κατά συνέπεια την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση, πραγματοποιήθηκε μεγάλης έκτασης πείραμα όπου τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τον άνωθεν ισχυρισμό. Τέλος, έγινε προσπάθεια εξέτασης των συνεπειών που μπορεί να έχει το ,αμφιλεγόμενο με βάση τη βιβλιογραφία, φαινόμενο του αναγωγικού στρες μετά από άσκηση εστιάζοντας την απόκριση των Ανθρωπίνων Μονοπύρηνων Κυττάρων Περιφερικού Αίματος (PBMCs) σε έναν οξειδωτικό παράγοντα. Τα ληφθέντα δεδομένα κατέδειξαν πως η ύπαρξη αναγωγικού στρες είναι ένας

καθοριστικός μηχανισμός στην αντιμετώπιση των οξειδωτικών μεταβολών που προκαλείται από έναν εξωτερικό παράγοντα, αποτελώντας την πρώτη εργασία που τονίζει ξεκάθαρα τις ευεργετικές επιδράσεις της κατάστασης αυτής για τον οργανισμό.

ABSTRACT

Nowadays, the need to simplify methods of determining the redox status of humans is crucial, as oxidative stress has been documented to be linked to several pathological conditions. At the same time, several studies that openly challenge the induction of this condition after intense exercise, make it necessary to examine the body's response to oxidative stimuli, including exercise. In this study, a thorough examination of a new system (Luoxis RedoxSYS), which allows the immediate determination of redox status in human plasma was attempted. The study aimed at identifying the validity of the results provided by this particular diagnostic system in both physiological and pathophysiological conditions. The obtained results were particularly satisfactory in both healthy individuals and patients suffering from Sepsis, Obesity, Metabolic Syndrome, and Type 2 diabetes mellitus. Specifically, there were significant correlations of the results provided by the diagnostic system with those provided by widely used spectrophotometric assays reliably assessing both antioxidant defense levels of an organism, and levels of oxidative damage in biomolecules. Moreover, a significant conclusion of the present thesis is the lack of homogeneity in the redox status of volunteers after intense exercise. Indeed, an interesting feature that has emerged concerns is the existence of an improved redox condition in individuals after an exercise, a situation referred to as "Reductive Stress" in the literature. Assuming that the athletic background of individuals can affect the body's response to the inflammation following intense exercise and consequently their redox status, a large-scale experiment was conducted and the results confirmed the above hypothesis. Finally, we made an effort to examine the effects of post-exercise reductive stress, focusing on the response of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) to an oxidizing agent. The obtained data suggested that reductive stress is a protective mechanism, at least when followed by an oxidizing stimulus, making it the first work that clearly highlights the beneficial effects of this condition on the organism

Πρόλογος

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε από τον Μάιο του 2015 έως τον Φεβρουάριο του 2019 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, κ. Δημήτριου Κουρέτα. Η εργασία χρηματοδοτήθηκε από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ) και το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ).

Γενικά στοιχεία, σκοπός και σημασία της μελέτης

Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες σε διάφορες λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού έχουν καταστήσει απαραίτητη την μελέτη και παρακολούθησή του. Πράγματι, πολλές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατάσταση αυτή με παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο Διαβήτης, το Μεταβολική Σύνδρομο η Σήψη και ο καρκίνος. Παράλληλα, η εξέτασή του ως απόκριση του οργανισμού μετά από άσκηση παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς μπορεί να δώσει κομβικές πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση του οργανισμού και να προσδώσει τα εχέγγυα για την εύρεση της καλύτερης δυνατής αποθεραπείας.

Καθίσταται λοιπόν σαφές ότι η απλούστευση των μεθόδων μέτρησης του οξειδωτικού στρες θα συμβάλει στην βελτιστοποίηση της παρακολούθησής του και αποφυγής πιθανών δυσάρεστων συνεπειών. Στα πλαίσια αυτής της προσπάθειας κρίθηκε ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα η μελέτη ενός νέου συστήματος μέτρησης του οξειδοαναγωγικού δυναμικού, του μηχανήματος RedoxSYS της εταιρίας Luoxis. Πιο συγκεκριμένα, το μηχάνημα αυτό έχει τη δυνατότητα μέσω μέτρησης δυο βιοδεικτών,

του static oxidation-reduction potential (sORP) και του capacity oxidation-reduction potential (cORP) να δίνει εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ενός ατόμου σε μόλις 4' και χρησιμοποιώντας μόλις 20 μl πλάσματος. Αναλυτικότερα ο δείκτης sORP αντικατοπτρίζει το στιγμιαίο οξειδοαναγωγικό δυναμικό ενώ ο δείκτης cORP τα συνολικά αντιοξειδωτικά αποθέματα του δείγματος.

Στα πλαίσια λοιπόν της παρούσας διδακτορικής διατριβής εξετάστηκε και αναπτύχθηκε η εφαρμογή των παραπάνω βιοδεικτών σε δείγματα ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 και Σήψη. Ταυτόχρονα, δόθηκε ιδιαίτερη βαρύτητα στη μελέτη της εφαρμογής των βιοδεικτών και εξέταση της μεταβολής των επιπέδων οξειδωτικού στρες σε επαγγελματίες και ερασιτέχνες αθλητές ή ακόμα και ατόμων που δεν είχαν καμία επαφή με αθλητική δραστηριότητα μετά την πραγματοποίηση άσκησης.

Ερωτήματα της έρευνας

Τα βασικά ερωτήματα της παρούσας διδακτορικής έρευνας ήταν τα ακόλουθα:

1. Είναι οι βιοδείκτες οξειδοαναγωγικού ORP, sORP και cORP, του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS είναι αξιόπιστοι και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό του οξειδωτικού στρες *in vivo* σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές καταστάσεις.
2. Σε ποίο βαθμό το αθλητικό ιστορικό ατόμων επηρεάζει την απόκριση του οργανισμού στην μυική βλάβη, και πώς μεταβάλλονται οι βιοδείκτες οξειδοαναγωγικού δυναμικού ORP μετά από έκκεντρη άσκηση;

3. Είναι ασφαλές κριτήριο για εξαγωγή συμπερασμάτων η ομαδική εξέταση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε μια ομάδα ανθρώπων και πως μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι βιοδείκτες για τη διάκριση των ατόμων ORP;
4. Είναι ευεργετικό για τον οργανισμό το φαινόμενο του αναγωγικού στρες, δηλαδή της εμφάνισης βελτιωμένης οξειδοαναγωγικής κατάστασης μετά από πραγματοποίηση έντονης και επίπονης άσκησης;

Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από την διδακτορική διατριβή:

- **Y. Spanidis**, N. Goutzourelas, D. Stagos, A.S. Kolyva, C.A. Gogos, D. Bar-Or, D. Kouretas, Assessment of Oxidative Stress in Septic and Obese Patients Using Markers of Oxidation-reduction Potential., *In Vivo*. 29 (2015) 595–600.
- **Y. Spanidis**, A. Mpesios, D. Stagos, N. Goutzourelas, D. Bar-Or, M. Karapetsa, E. Zakyntinos, D.A. Spandidos, A.M. Tsatsakis, G. Leon, D. Kouretas, Assessment of the redox status in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes reveals great variations., *Exp. Ther. Med.* 11 (2016) 895–903.
- **Y. Spanidis**, N. Goutzourelas, D. Stagos, A. Mpesios, A. Priftis, D. Bar-Or, D.A. Spandidos, A.M. Tsatsakis, G. Leon, D. Kouretas, Variations in oxidative stress markers in elite basketball players at the beginning and end of a season., *Exp. Ther. Med.* 11 (2016) 147–153.
- **Y. Spanidis**, D. Stagos, M. Orfanou, N. Goutzourelas, D. Bar-Or, D. Spandidos, D. Kouretas, Variations in Oxidative Stress Levels in 3 Days Follow-up in Ultramarathon Mountain Race Athletes., *J. Strength Cond. Res.* 31 (2017) 582–594.
- **Y. Spanidis**, A. Priftis, D. Stagos, G.A. Stravodimos, D.D. Leonidas, D.A. Spandidos, A.M. Tsatsakis, D. Kouretas, Oxidation of human serum albumin exhibits inter-individual variability after an ultra-marathon mountain race., *Exp. Ther. Med.* 13 (2017) 2382–2390.
- **Y. Spanidis**, D. Stagos, C. Papanikolaou, K. Karatza, A. Theodosi, A.S. Veskoukis, C.K. Deli, A. Poulis, S. D. Koulocheri, A.Z. Jamurtas, S.A. Haroutounian, D. Kouretas, Resistance-Trained Individuals Are Less Susceptible to Oxidative Damage after Eccentric Exercise. *Oxid Med Cell Longev* 2018:6857190 .
- **Y. Spanidis**, A. S. Veskoukis, C. Papanikolaou, D. Stagos, A. Priftis, C.K. Deli, A.Z. Jamurtas, D. Kouretas , “Exercise-Induced Reductive Stress Is a Protective Mechanism against Oxidative Stress in Peripheral Blood Mononuclear Cells,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2018, Article ID 3053704, 9 pages, 2018.

Ευχαριστίες

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κουρέτα για την ευκαιρία που επέτρεψε την πραγματοποίηση της διδακτορικής μου διατριβής στο εργαστήριό του, υπό της οδηγίες του. Η συνεργασία μαζί του σε συνδυασμό με τις συμβουλές του, με βοήθησε να γίνω καλύτερος επαγγελματίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στον επίκουρο καθηγητή κ. Δημήτρη Στάγκο για τη συνεργασία και την καθοδήγηση αλλά και για την εν γένει συμβολή του στην επιτυχημένη ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Εκφράζω ακόμα τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή κ. Αθανάσιο Τζιαμούρτα για τις υποδείξεις του και την πραγματοποίηση μέρους της Διατριβής μου στο Εργαστήριό του, αλλά και σε όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχτηκαν να διαβάσουν και να κρίνουν τη διδακτορική μου διατριβή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Σέρκο Χαρουτουιάν, Διευθυντή του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών που δέχτηκε να πραγματοποιήσω ένα μέρος των πειραμάτων μου στο εργαστήριό του και ιδιαίτερα την κα Σοφία Κουλοχέρη για την καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την παραμονή μου εκεί.

Σαφώς ο όγκος της δουλειάς που παρατίθεται στην παρούσα εργασία δεν θα μπορούσε να είχε ολοκληρωθεί χωρίς τη βοήθεια συγκεκριμένων συναδέλφων και γι' αυτό το λόγο οφείλω να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Μαρίνα Ορφανού, την Κωνσταντίνα Καρατζά, την Άντρια Θεοδώση και τη Χριστίνα Παπανικολάου.

Επίσης δεν θα μπορούσα να μην αναφερθώ και στους φίλους μου, πρώτα απ' όλα, και εν συνεχεία καθημερινούς συνεργάτες Αλέξανδρο Πρίφτη, Σωτηρίνα Μακρή, Βίβιαν Κούκα, Θάλεια Κερασιώτη και Κωνσταντίνο Γερασόπουλο για τη στήριξη και βοήθειά τους σε όλες τις στιγμές που το χρειαζόμουν. Η συνεργασία και οι στιγμές που έζησα με όλα αυτά τα άτομα είναι κειμήλιο που θα με συνοδεύει μια ζωή.

Τέλος το πιο μεγάλο ευχαριστώ και μια βαθιά υπόκλιση απευθύνεται σε τέσσερα συγκεκριμένα και ξεχωριστά για τη ζωή μου, άτομα. Αρχικά, την οικογένειά μου, τους γονείς μου που από μικρή ηλικία μου έδειξαν τον δρόμο της γνώσης και μου παρείχαν όλα τα εφόδια προκειμένου να μπορέσω να ακολουθήσω χωρίς εμπόδια

το δρόμο μου, θυσιάζοντας πολλά προκειμένου να το καταφέρουν. Επίσης στην αδερφή μου, Σοφία, που ήταν πάντα ο καλύτερος σύμβουλός μου και δίπλα μου σε όλες τις στιγμές. Τέλος, στη Γεωργία που ήταν το στήριγμά μου από το πρώτο μέχρι και το τελευταίο λεπτό αυτής της διαδρομής, ιδιαίτερα τις “συννεφιασμένες” ημέρες.

Επιτρέπεται να πέσεις...

...επιβάλλεται να σηκωθείς!!!

Στο μεγαλύτερο μου στήριγμα, την μητέρα μου, και στον πατέρα μου που δεν πρόλαβε να ζήσει αυτά που ονειρευόταν για εμένα...

Περιεχόμενα

Περίληψη	vi
Abstract	viii
Περιεχόμενα εικόνων.....	xxi
Περιεχόμενα Πινάκων	xxiii
Περιεχόμενα Διαγραμμάτων.....	xxv
Συντομογραφίες	xxix
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές.....	1
1.1.1. Μηχανισμός δράσης ελεύθερων ριζών	3
1.2 Είδη Ελευθέρων Ριζών.....	4
1.2.1 Ρίζα Υδροξυλίου (OH·).....	4
1.2.2 Ρίζα Σουπεροξειδικού Ανιόντος (O ₂ ^{·-})	5
1.2.3 Υπεροξειδικές ρίζες (ROO·)	6
1.2.4 Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H ₂ O ₂).....	6
1.2.5 Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)	7
1.2.6 Περοξυνιτρίτης (ONOO ⁻).....	8
1.2.7 Όζον (O ₃).....	8
1.3 Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	9
1.3.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση	9
1.3.2 Ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450	11
1.3.3 Υπεροξειδιοσώματα	12
1.3.4 Αιμοσφαιρίνη	12
1.3.5 Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ.....	13
1.3.6 Φλεγμονή.....	14
1.3.7 Κατεχολαμίνες	15
1.4 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	16

1.5 Βιολογική δράση των ROS.....	17
1.5.1 Λιπίδια.....	18
1.5.2 Πρωτεΐνες.....	19
1.5.3 DNA.....	20
1.6 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	21
1.6.1 Ενζυμικοί μηχανισμοί.....	22
1.6.2 Μη ενζυμικοί μηχανισμοί.....	28
1.7 Οξειδωτικό στρες.....	34
1.7.1 Μέθοδοι προσδιορισμού οξειδωτικού στρες.....	36
1.7.2 Μέτρηση Αντιοξειδωτικών αποθεμάτων και δραστηριότητας.....	37
1.7.3. Προσδιορισμός οξειδωτικών βλαβών σε βιομόρια (πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA)	39
1.9 Άσκηση και οξειδωτικό στρες.....	41
1.9.1 Αερόβια άσκηση-Επιδράσεις στην παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	41
1.9.2 Αναερόβια άσκηση-Επιδράσεις στην παραγωγή ελευθέρων ριζών.....	43
1.10 Ασκησιογενής φλεγμονή.....	43
Σκοπός της μελέτης.....	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	50
2.1 Γενικές πληροφορίες.....	51
2.2 Διαχωρισμός δείγματος αίματος σε πλάσμα και ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.....	52
2.3 Πρωτόκολλα μέτρησης στο πλάσμα.....	53
2.3.1 Βιοδείκτες προσδιορισμού της οξειδοαναγωγικής κατάστασης [sORP & cORP) από το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS].....	53
2.3.2 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι.....	56
2.3.3 Προσδιορισμός των επιπέδων της οξειδωμένης αλβουμίνης με ανάλυση western.....	64
2.3.4 Προσδιορισμός των επιπέδων μαλονδιαλδεύδης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC-DAD).....	66
2.4 Μέθοδοι προσδιορισμού στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.....	67
2.4.1 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι.....	67

2.5 Προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford.....	70
2.6 Επίδραση της επαγομένης κυτταροτοξικότητας του οξειδωτικού παράγοντα tert-Butyl Hydroperoxide (t-BOOH) σε ανθρώπινα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs)	70
2.6.1 Απομόνωση και καλλιέργεια των ανθρώπινων μονοκυττάρων περιφερικού αίματος	70
2.6.2 Μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης του t-BOOH σε PBMCs	72
2.6.3 Ποσοτικός προσδιορισμός της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH στα PBMCs.....	73
2.6.4 Εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης του t-BOOH-Πειραματική διαδικασία στα κύτταρα PBMC.....	74
2.6.5 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός βιοδεικτών οξειδωτικού στρες σε κύτταρα PBMCs	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ORP ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΣΚΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΥΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ.....	
80	80
3.1 Μεταβολή των επιπέδων οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε επαγγελματίες αθλητές καλαθοσφαίρισης, στην αρχή και το τέλος μιας αγωνιστικής χρονιάς.....	81
3.1.1 Εισαγωγή	81
3.1.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	84
3.1.3 Αποτελέσματα.....	85
3.1.4 Συζήτηση	92
3.2 Μεταβολές των επιπέδων οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε διάστημα 3 ημερών μετά από αγώνα Υπερμαραθωνίου βουνού	99
3.2.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	103
3.2.3 Αποτελέσματα.....	106
3.2.4 Συζήτηση	127
3.3 Μεταβολές των επιπέδων οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε γυμνασμένους και μη γυμνασμένους ανθρώπους μετά από έκκεντρη άσκηση	140
3.3.1 Εισαγωγή	140
3.3.2 Πειραματική διαδικασία	142

3.3.3 Αποτελέσματα.....	145
3.3.4 Συζήτηση.....	165
3.4 Μελέτη της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας του οξειδωτικού παράγοντα t-BOOH στα ανθρώπινα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) μετά από έκκεντρη άσκηση.....	174
3.4.1 Εισαγωγή.....	174
3.4.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	177
3.4.3 Αποτελέσματα.....	180
3.4.4. Συζήτηση.....	184
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4-ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ORP ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΥΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ	
4.1 Προσδιορισμός των επιπέδων οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 και Μεταβολικό Σύνδρομο	190
4.1.1 Εισαγωγή.....	190
4.1.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	192
4.1.3 Αποτελέσματα.....	193
4.1.4 Συζήτηση	199
4.2 Προσδιορισμός βιοδεικτών οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε άτομα με Σήψη και Παχυσαρκία, με τη χρήση των βιοδεικτών ORP	205
4.2.1. Εισαγωγή.....	205
4.2.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	207
4.2.3 Αποτελέσματα.....	208
4.2.4 Συζήτηση.....	212
Συμπεράσματα-Προοπτικές.....	216
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	219

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1: Ελεύθερη ρίζα	2
Εικόνα 2: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου	3
Εικόνα 3: Αναπνευστική αλυσίδα	10
Εικόνα 4: Αναπνευστική αλυσίδα: Ροή ηλεκτρονίων μέσω των πρωτεϊνικών συμπλόκων....	11
Εικόνα 5: Δράση της οξειδάσης της ξανθίνης και παραγωγή ρίζας σουπεροξειδίου.	14
Εικόνα 6: Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	17
Εικόνα 8: Δράση αντιοξειδωτικού για την εξουδετέρωση ελεύθερης ρίζας.....	22
Εικόνα 9: Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η εικόνα προέρχεται από τους (Weydert & Cullen 2010).....	23
Εικόνα 10: Ανακύκλωση της γλουταθειόνης	26
Εικόνα 11: Σύνδεση της G6PD με την αναγέννηση της γλουταθειόνης.....	27
Εικόνα 12: Μηχανισμός δράσης των ενζύμων περοξειρεδοξίνη (Prx) και αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR)	28
Εικόνα 13: Συντακτικός τύπος της ανηγμένης (A) και της οξειδωμένης (B) γλουταθειόνης .	30
Εικόνα 14: Ο συντακτικός τύπος του ασκορβικού οξέος.....	31
Εικόνα 15: Ο συντακτικός τύπος της βιταμίνης E (α-τοκοφερόλη).....	32
Εικόνα 16: Ο συντακτικός τύπος του ουρικού οξέος	33
Εικόνα 17: Ο συντακτικός τύπος του Β-καροτενίου.....	34
Εικόνα 18: Οξειδωτικό στρες.....	36
Εικόνα 19: Απεικόνιση του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS	54
Εικόνα 20: Αισθητήρας μιας χρήσης κεραμικού υποστρώματος στον οποίο αφήνεται το δείγμα πλάσματος.....	55
Εικόνα 21: Το TBA αντιδράει με την MDA και σχηματίζεται η ένωση MDA-TBA που στη συνέχεια θα μετρηθεί η απορρόφησή της προκειμένου να εκτιμηθούν τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσις.....	59
Εικόνα 22: Το σύστημα μεθοσουλφονικής φαιναζίνης (PMS) - νικοτιναμίδιο αδενινονουκλεοτίδιου (NADH) σχηματίζει τη ρίζα $O_2^{\cdot-}$ που στη συνέχεια μετατρέπει το NBT ²⁺ σε φορμαζάνη	61

Εικόνα 23: Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) οξειδώνεται στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) από το 5,5'δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) που μετατρέπεται ταυτόχρονα σε 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ.	68
Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού του στρώματος των PBMCs μετά την φυγοκέντρηση ολικού περιφερικού αίματος με το Ficoll.....	71
Εικόνα 25: Το τετραμμωνιακό άλας (XTT) μεταβολίζεται σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη	73
Εικόνα 26: Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα δειγμάτων πλάσματος με ένεση πρότυπου δείγματος 12 $\mu\text{mol/L}$ MDA (A) και πλάσματος εθελοντή χωρίς ένεση πρότυπου δείγματος (B)	161

Περιεχόμενα Πινάκων

Πίνακας 1: Μεταβολή των απόλυτων τιμών των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μετρήθηκαν στο πλάσμα στη Φάση 1 και στη Φάση 2 της μελέτης.	90
Πίνακας 2: Μεταβολή των απόλυτων τιμών των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μετρήθηκαν στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα στη Φάση 1 και στη Φάση 2 της μελέτης.	90
Πίνακας 3: Στατιστική συσχέτιση των επιπέδων (%) μεταβολής των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες των αθλητών καλαθοσφαίρισης μεταξύ των Φάσεων 1 και 2 του πειράματος.	92
Πίνακας 4: Τιμές sORP (mV) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.	107
Πίνακας 5: Τιμές cORP(μC) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.	108
Πίνακας 6: Τιμές του βιοδείκτη CARB (nmol/mg πρωτεΐνης) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.	110
Πίνακας 7: Τιμές TBARS (μM/L) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.	111
Πίνακας 8: Τιμές του βιοδείκτη TAC (mM DPPH/L πλάσματος) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.	112
Πίνακας 9: Τιμές του βιοδείκτη GSH (μM/g Hb) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.	113
Πίνακας 10: Τιμές δραστηριότητας CAT (U/mg Hb) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.	114
Πίνακας 11: Επίδοση των αθλητών που συμμετείχαν στην έρευνα, στον Υπερμαραθώνιο βουνού "Olympus Mythical Trail 2015"	115
Πίνακας 12: Ποσοστιαία (%) μεταβολή των επιπέδων οξειδωμένης/ολικής HSA σε κάθε έναν από τους 12 αθλητές σε όλες τις χρονικές στιγμές.	121
Πίνακας 13: Στατιστική συσχέτιση των απόλυτων τιμών των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες των δειγμάτων αθλητών που συμμετείχαν στον Υπερμαραθώνιο "Olympus Mythical Trail 2015"	126
Πίνακας 14: Στατιστική συσχέτιση των μεταβολών (%) των τιμών των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες των δειγμάτων αθλητών που συμμετείχαν στον Υπερμαραθώνιο "Olympus Mythical Trail 2015"	127
Πίνακας 15: Στατιστική συσχέτιση μεταξύ των DOMS και των μεταβολών των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες. MDA: Μαλονδιαλδεύδη (μετρημένη με Χρωματογραφία από την HPLC-DAD).	146

Πίνακας 16: Αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου (DOMS) στο περπάτημα (DOMS π.) και στο κάθισμα (DOMS κ.) μετά την έκκεντρη άσκηση. Δίνονται οι μέσες τιμές \pm SEM (τυπική απόκλιση).....	147
Πίνακας 17: Μεταβολή των απόλυτων τιμών ($\mu\text{M/L}$) του βιοδείκτη TBARS (μέση τιμή \pm SEM) των γυμνασμένων και των μη γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.....	148
Πίνακας 18: Μεταβολή των απόλυτων τιμών (nM/mg πρωτεΐνης) του βιοδείκτη πρωτεϊνικά καρβονύλια (μέση τιμή \pm SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.....	150
Πίνακας 19: Μεταβολή των απόλυτων τιμών (DPPH/L πλάσματος) του βιοδείκτη TAC (μέση τιμή \pm SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές .	151
Πίνακας 20: Μεταβολή των απόλυτων τιμών ($\mu\text{M/g Hb}$) του βιοδείκτη GSH (μέση τιμή \pm SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.	152
Πίνακας 21: Μεταβολή των απόλυτων τιμών (U/mg Hb) του βιοδείκτη CAT (μέση τιμή \pm SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.	154
Πίνακας 22: Στατιστική συσχέτιση χρησιμοποιώντας την εξίσωση Spearman μεταξύ των βιοδεικτών εξουδετέρωσης ή αναγωγής ριζών.....	157
Πίνακας 23: Μεταβολή των απόλυτων τιμών (mV) του δείκτη sORP (μέση τιμή \pm SEM) γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.	158
Πίνακας 24: Μεταβολή των απόλυτων τιμών (μC) του βιοδείκτη cORP (μέση τιμή \pm SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.	160
Πίνακας 25: Ποσοστό μεταβολής % των επιπέδων MDA όπως προσδιορίστηκαν με HPLC-DAD (μέση τιμή \pm SEM) στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές μετά την ολοκλήρωση της άσκησης, σε σύγκριση με το δείγμα πριν την άσκηση.....	162
Πίνακας 26: Μεταβολή των απόλυτων τιμών ($\mu\text{M/L}$) της MDA (μέση τιμή \pm SEM) αθλούμενων και μη στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές, όπως υπολογίστηκε με HPLC-DAD	162
Πίνακας 27: Τιμές των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες σε απόλυτες τιμές, στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (GSH, CAT) και στο πλάσμα (TBARS,TAC) πριν την άσκηση και 48 ώρες μετά την ολοκλήρωση της άσκησης. Οι μεταβολές αναφέρονται τόσο στην οξειδωτική όσο και στην αναγωγική ομάδα).	181
Πίνακας 28: Στατιστική συσχέτιση των απόλυτων τιμών των βιοδεικτών CARB, TBARS, TAC, GSH, CAT, sORP στα δείγματα των δειγμάτων ασθενών με ΜΣ και ΔΤ2.	199

Περιεχόμενα Διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Μέσος όρος των τιμών (\pm SEM) των τιμών του δείκτη sORP σε δείγματα πλάσματος αθλητών καλαθοσφαίρισης στην αρχή (Φάση 1) της και το τέλος (Φάση 2) της αγωνιστικής περιόδου.	86
Διάγραμμα 2: Μέσος όρος των τιμών (\pm SEM) των βιοδεικτών TBARS, TAC, CARB στα δείγματα πλάσματος αθλητών στην αρχή (Φάση 1) της και το τέλος (Φάση 2) της αγωνιστικής περιόδου.....	87
Διάγραμμα 3: Μέσος όρος των τιμών (\pm SEM) της GSH και της δραστηκότητας CAT στα δείγματα ερυθροκυτταρικού αιμολύματος αθλητών καλαθοσφαίρισης στα δείγματα πλάσματος αθλητών στην αρχή (Φάση 1) της και το τέλος (Φάση 2) της αγωνιστικής περιόδου.	88
Διάγραμμα 4: Ποσοστιαία (%) εξατομικευμένη μεταβολή των επιπέδων των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες κάθε αθλητή καλαθοσφαίρισης στη Φάση 2 της έρευνας σε σύγκριση με τη Φάση 1: Οι εξεταζόμενοι βιοδείκτες στο πλάσμα είναι οι sORP, CARB, TBARS και TAC και στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα η GSH και η δραστηκότητα CAT	91
Διάγραμμα 5: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη sORP στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM)..	107
Διάγραμμα 6: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη cORP στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM).	108
Διάγραμμα 7: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη CARB στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM).....	109
Διάγραμμα 8: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη TBARS στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM).	110
Διάγραμμα 9: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη TAC στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM).	111
Διάγραμμα 10: Ποσοστιαία μεταβολή (%) της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM).	112
Διάγραμμα 11: Ποσοστιαία μεταβολή (%) της δραστηκότητας CAT στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM).	113
Διάγραμμα 12: Ποσοστιαία μεταβολή (%) των βιοδεικτών sORP και cORP ανά άτομο στις 24, 48 και 72 ώρες μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα.	116

Διάγραμμα 13: Ποσοστιαία μεταβολή (%) των βιοδεικτών GSH και CAT ανά άτομο στις 24, 48 και 72 ώρες μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα.	117
Διάγραμμα 14: Ποσοστιαία μεταβολή (%) των βιοδεικτών CARB , TBARS και TAC ανά άτομο στις 24, 48 και 72 ώρες μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα.	118
Διάγραμμα 15: Αντιπροσωπευτική εικόνα από την ανάλυση Western για την ανίχνευση μονομερούς και διμερούς αλβουμίνης ορού (HSA)..	119
Διάγραμμα 16: Ποσοστιαία μεταβολή των επιπέδων οξειδωμένης HSA (δηλαδή αναλογία διμερών / μονομερών) στα δείγματα πλάσματος από τους αθλητές που συμμετέχουν στον αγώνα Υπερμαραθωνίου βουνού στις 24, 48 και 72 ώρες μετά τον αγώνα σε σύγκριση με τα δείγματα πριν τον αγώνα (PRE).	120
Διάγραμμα 17: Οι ποσοστιαίες (%) μεταβολές στην αναλογία οξείδωσης HSA (δηλαδή ο λόγος διμερών / μονομερών) και τα επίπεδα CARB των ατόμων 1-6 στις 24, 48 και 72 ώρες μετά το τέλος του αγώνα, σε σύγκριση με το δείγμα πριν τον αγώνα (PRE).	123
Διάγραμμα 18: Οι ποσοστιαίες (%) μεταβολές στην αναλογία οξείδωσης HSA (δηλαδή ο λόγος διμερών / μονομερών) και τα επίπεδα CARB των ατόμων 7-12 στις 24, 48 και 72 ώρες μετά το τέλος του αγώνα, σε σύγκριση με το δείγμα πριν τον αγώνα (PRE).	125
Διάγραμμα 19: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη TBARS στις χρονικές στιγμές των 24, 48 και 72 ωρών μετά την ολοκλήρωση της άσκησης συγκριτικά με το δείγμα πριν την άσκηση, στις ομάδες γυμνασμένων και μη γυμνασμένων.	148
Διάγραμμα 20: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη CARB στις χρονικές στιγμές των 24, 48 και 72 ωρών μετά την ολοκλήρωση της άσκησης συγκριτικά με το δείγμα πριν την άσκηση, στις ομάδες γυμνασμένων και μη γυμνασμένων.	149
Διάγραμμα 21: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη TAC στις χρονικές στιγμές των 24, 48 και 72 ωρών μετά την ολοκλήρωση της άσκησης συγκριτικά με το δείγμα πριν την άσκηση, στις ομάδες γυμνασμένων και μη γυμνασμένων.	151
Διάγραμμα 22: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη GSH στις χρονικές στιγμές των 24, 48 και 72 ωρών μετά την ολοκλήρωση της άσκησης συγκριτικά με το δείγμα πριν την άσκηση, στις ομάδες γυμνασμένων και μη γυμνασμένων.	152
Διάγραμμα 23: Ποσοστιαία μεταβολή (%) της δραστηριότητας CAT στις χρονικές στιγμές των 24, 48 και 72 ωρών μετά την ολοκλήρωση της άσκησης συγκριτικά με το δείγμα pre μετά από διαχωρισμό των συμμετεχόντων σε γυμνασμένους και μη γυμνασμένους ...	153
Διάγραμμα 24: Ποσοστιαία (%) μεταβολή του βιοδείκτη Reducing Power (μέση τιμή ± SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές των 24,48 και 72 ωρών μετά την άσκηση σε σύγκριση με το δείγμα pre.	154
Διάγραμμα 25: Ποσοστιαία (%) μεταβολή του βιοδείκτη εξουδετέρωσης ρίζας σουπεροξειδικού ανιόντος (μέση τιμή ± SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές των 24,48 και 72 ωρών μετά την άσκηση σε σύγκριση με το δείγμα pre.	155

Διάγραμμα 26: Ποσοστιαία (%) μεταβολή του βιοδείκτη εξουδετέρωσης ρίζας OH ⁻ (μέση τιμή ± SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές των 24,48 και 72 ωρών μετά την άσκηση σε σύγκριση με το δείγμα pre.	156
Διάγραμμα 27: Ποσοστιαία (%) μεταβολή του βιοδείκτη sORP (μέση τιμή ± SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές των 24,48 και 72 ωρών μετά την άσκηση σε σύγκριση με το δείγμα pre.	158
Διάγραμμα 28: Ποσοστιαία (%) μεταβολή του βιοδείκτη cORP (μέση τιμή ± SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές των 24,48 και 72 ωρών μετά την άσκηση σε σχέση με το δείγμα pre.	159
Διάγραμμα 29: Σύγκριση των επιπέδων MDA (μM) όπως μετρήθηκαν με χρωματογραφία (HPLC-DAD) και φασματοφωτομετρία (TBARS).....	163
Διάγραμμα 30: Μεταβολή επιπέδων (%) MDA στο γκρούπ των γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση όπως μετρήθηκαν με φασματοφωτομετρία (TBARS) και χρωματογραφία (HPLC), σε σχέση με το δείγμα πριν την άσκηση	164
Διάγραμμα 31: Μεταβολή επιπέδων (%) MDA στο γκρούπ των μη γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση όπως μετρήθηκαν με φασματοφωτομετρία (TBARS) και χρωματογραφία (HPLC), σε σχέση με το δείγμα πριν την άσκηση	164
Διάγραμμα 32: Στατιστική συσχέτιση με βάση την εξίσωση Spearman των μεταβολών (%) των επιπέδων MDA όπως μετρήθηκαν με χρωματογραφία (HPLC) και φασματοφωτομετρία (TBARS)	165
Διάγραμμα 33: Ποσοστιαία (%) μεταβολή των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (GSH, CAT) και στο πλάσμα (TBARS, TAC) στις 48 ώρες μετά την ολοκλήρωση της άσκησης, συγκριτικά με πριν την άσκηση. Οι μεταβολές αναφέρονται τόσο στην οξειδωτική όσο και στην αναγωγική ομάδα.	182
Διάγραμμα 34: Ποσοστιαία (%) μεταβολή των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες (GSH, TBARS, TAC, CAT) σε κύτταρα που έχει χορηγηθεί <i>t</i> -BOOH σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου [(λόγος κύτταρα που έχει χορηγηθεί <i>t</i> -BOOH)/(κύτταρα ελέγχου)] τόσο πριν την άσκηση (Pre) όσο και στις 48 ώρες μετά την άσκηση. Το διάγραμμα αφορά την οξειδωτική ομάδα.	183
Διάγραμμα 35: Ποσοστιαία (%) μεταβολή των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες (GSH, TBARS, TAC, CAT) σε κύτταρα που έχει χορηγηθεί <i>t</i> -BOOH σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου [(λόγος κύτταρα που έχει χορηγηθεί <i>t</i> -BOOH)/(κύτταρα ελέγχου)] τόσο πριν την άσκηση (Pre) όσο και στις 48 ώρες μετά την άσκηση. Το διάγραμμα αφορά την αναγωγική ομάδα.	184
Διάγραμμα 36: Επίπεδα των GSH και CAT στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα μετρημένα σε άτομα με ΔΤ2 και ΜΣ αλλά και σε ομάδα ελέγχου.	193
Διάγραμμα 37: Επίπεδα βιοδεικτών οξειδωτικού στρες (sORP, TBARS, CARB, TAC) στο πλάσμα μετρημένα σε άτομα με ΔΤ2 και ΜΣ αλλά και σε ομάδα ελέγχου.	194

Διάγραμμα 38: Τιμές των βιοδεικτών (GSH, TBARS, CARB, CAT, sORP, TAC) κάθε ασθενή με ΜΣ και ΔΤ2	196
Διάγραμμα 39: Επίπεδα GSH και CAT σε ασθενείς με ΔΤ2 και ΜΣ που ανήκουν στην ομάδα χαμηλής (ΜΣ & ΔΤ2 Χαμηλή GSH) και υψηλής GSH (ΜΣ & ΔΤ2 Υψηλή GSH) αλλά και σε ομάδα ελέγχου.	197
Διάγραμμα 40: Επίπεδα sORP, CARB, TBARS, TAC μετρημένα σε ασθενείς με ΔΤ2 και ΜΣ που ανήκουν στην ομάδα χαμηλής (ΜΣ & ΔΤ2 Χαμηλή GSH) και υψηλής GSH (ΜΣ & ΔΤ2 Υψηλή GSH) αλλά και σε ομάδα ελέγχου.	198
Διάγραμμα 41: Επίπεδα των βιοδεικτών ORP , sORP (Α) και cORP (Β) σε άτομα με Σήψη, Παχυσαρκία και Σήψη με Παχυσαρκία καθώς και στην ομάδα ελέγχου (control).	210
Διάγραμμα 42: Επίπεδα βιοδεικτών CARB (Α), TAC (Β), TBARS (Γ) σε άτομα με Σήψη, Παχυσαρκία και Σήψη με Παχυσαρκία αλλά και στην ομάδα ελέγχου (Control).	211

Συντομογραφίες

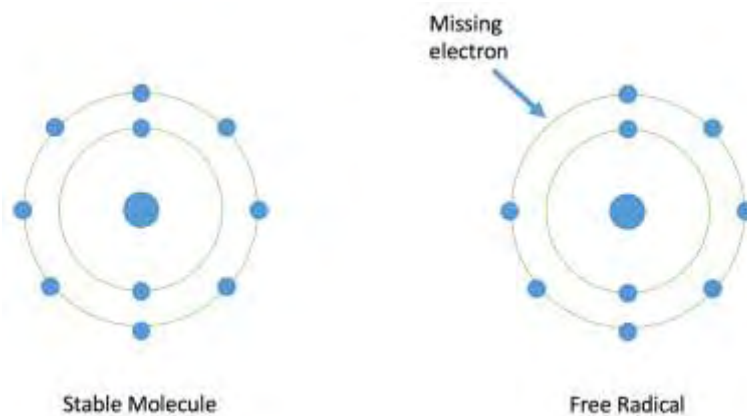
ROS	(Reactive Oxygen Species)	Δραστικές μορφές οξυγόνου
RNS	(Reactive Nitrogen Species)	Δραστικές μορφές αζώτου
O₂•-	(Superoxide radicals)	Ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος
OH•	(Hydroxyl radicals)	Ρίζες υδροξυλίου
RO•	(Alkoxy radicals)	Ρίζες αλκοξυλίου
HO₂•	(Hydroperoxyl radicals)	Ρίζες υδρουπεροξυλίου
H₂O₂	(Hydrogen peroxide)	Υπεροξειδίο του υδρογόνου
1O₂	(Singlet oxygen)	Μονήρες οξυγόνο
SOD	(Superoxide dismutase)	Υπεροξειδική δισμουτάση
CAT	(Catalase)	Καταλάση
GPx	(Glutathione peroxidase)	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GR	(Glutathione reductase)	Αναγωγή της γλουταθειόνης
GSH	(reduced form of glutathione)	ανηγμένη γλουταθειόνη
GSSG	(oxidized form of glutathione)	οξειδωμένη γλουταθειόνη
CARB	(Protein Carbonyls)	Πρωτεϊνικά Καρβονύλια
O₃	(Ozone)	Όζον
MDA	(Malondialdehyde)	Μαλονδιαλδεΐδη
TBARS	(Thiobarbituric Reactive Substances)	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ
TAC	(Total antioxidant capacity)	Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα
DPPH	(1,1-didhenyl-2 picrylhydrazyl)	1,1 διφαινυλ-2-πυκριδραζύλιο
TBA	(Thiobarbituric acid)	Θειοβαρβιτουρικό οξύ
EDTA	(Ethylenediaminetetraacetic acid)	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
TCA	(Trichloroacetic acid)	Τριχλωροοξικό οξύ
DNP	(2,4-dinitrophenylhydrazine)	2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη
HPLC	(High Pressure Liquid Chromatography)	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης
FBS	(Fetal Bovine Serum)	Εμβρυικός βόειος ορός
t-BOOH	(Tert-butyl-hydroperoxide)	Τριτ-βούτυλο-υδροϋπεροξειδίο
PBMCs	(Peripheral blood mononuclear cells)	Ανθρώπινα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος
PBS	(phosphate buffered saline)	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
ORP	(Oxidation-Reduction potential)	Οξειδοαναγωγικό δυναμικό
sORP	(Static Oxidation-Reduction potential)	Στατικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό
cORP	(Capacity Oxidation-Reduction potential)	Ολικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό
NADPH	(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)	Ανηγμένο φωσφορικό δινουκλεοτίδιο νικοτιναμίδιου αδενίνης

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικές μορφές

Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να οριστεί ένα άτομο ή μόριο που περιέχει ένα μη μονήρες ηλεκτρόνιο στη στιβάδα σθένους και είναι ικανό για ανεξάρτητη ύπαρξη, (Mylonas & Kouretas 1999). Η παρουσία ενός μη ζευγαρωμένου ηλεκτρονίου έχει ως αποτέλεσμα ορισμένες κοινές ιδιότητες που μοιράζονται οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες. Πολλές είναι ασταθείς και εξαιρετικά δραστικές και μπορούν να δώσουν αλλά και να δεχτούν ένα ηλεκτρόνιο από άλλα παρακείμενα μόρια, επομένως συμπεριφέρονται ως οξειδωτικά ή αναγωγικά (Cheeseman & Slater 1993). Οι σημαντικότερες ελεύθερες ρίζες που περιέχουν μόριο οξυγόνου και εμπλέκονται σε καταστάσεις ασθένειας είναι η ρίζα του σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$), του υδροξυλίου (OH^{\cdot}), του αλκοξυλίου (RO^{\cdot}) και του υδροπεροξυλίου (HO_2^{\cdot}). Αυτά τα μόρια που έχουν ως κεντρικό μόριο το οξυγόνο είναι γνωστά στη βιβλιογραφία ως δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Ως εν δυνάμει ρίζες (μόρια που δεν είναι ρίζες αλλά μπορεί να μετατραπούν σε τέτοιες) είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl) (Young & Woodside 2001).

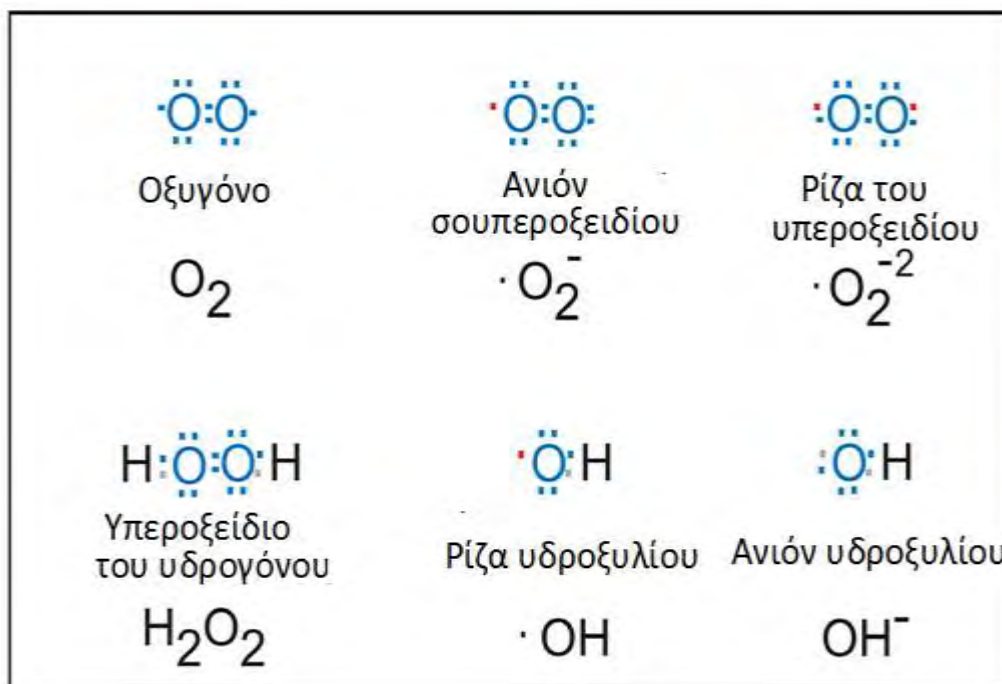
Οι ελεύθερες ρίζες προσβάλλουν μακρομόρια οδηγώντας σε κυτταρική βλάβη και ορμονική διαταραχή. Οι στόχοι των ελεύθερων ριζών περιλαμβάνουν όλα τα είδη μορίων στον οργανισμό. Μεταξύ αυτών, τα λιπίδια, τα νουκλεϊκά οξέα και οι πρωτεΐνες είναι οι κύριοι στόχοι (Fang et al. 2002; Young & Woodside 2001).



Εικόνα 1: Ελεύθερη ρίζα

Επιπλέον, δραστικές μορφές αζώτου (Reactive nitrogen species, RNS) θεωρούνται μόρια στα οποία το κεντρικό μόριο είναι το άζωτο. Πιο γνωστά παραδείγματα αποτελούν το διοξείδιο του αζώτου (NO_2^\bullet), το μονοξείδιο του αζώτου (NO^\bullet) και αζωτούχες ενώσεις που παρότι δεν είναι ελεύθερες ρίζες, είτε αποτελούν οξειδωτικούς παράγοντες είτε μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε ελεύθερες ρίζες [νιτρώδες οξύ (HNO_2), ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου (ONOO^-)] (Fang et al. 2002; Halliwell 1994) (Εικόνα 2).

Τέλος, πέρα από τις προαναφερθείσες κατηγορίες δραστικών μορφών υπάρχουν οι δραστικές μορφές θείου (RSS) όπως είναι οι θειούχες ρίζες (RS^\bullet), όπου η προέλευσή τους είναι από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS), όπως είναι οι ρίζες τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^\bullet), όπου η προέλευσή τους είναι από το χλώριο (Young & Woodside 2001). Οι κατηγορίες αυτές προέρχονται από αντίδραση με τις ROS και μπορούν να αυξήσουν παραγωγή των ROS (Giles & Jacob 2002).



Εικόνα 2: Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

1.1.1. Μηχανισμός δράσης ελεύθερων ριζών

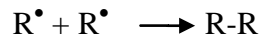
Ο μηχανισμός δράσης των ελευθέρων ριζών αφορά τρία επιμέρους στάδια τα οποία είναι η έναρξη, η διάδοση και ο τερματισμός. Αρχικά μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίου προκύπτουν οι ελεύθερες ρίζες, μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση ενέργειας (Cheeseman & Slater 1993). Κατόπιν, στη διάδοση, οι σχηματιζόμενες ρίζες αντιδρούν με ουδέτερα μόρια που δίνουν νέες ρίζες οι οποίες στη συνέχεια αντιδρώντας με άλλα μόρια, προάγουν τη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Στο στάδιο του τερματισμού, τα μόρια των ελευθέρων ριζών αντιδρούν με προϊόντα που δεν δίνουν νέες ρίζες.

Έναρξη ενέργεια R^\bullet (ελεύθερη ρίζα)

Διάδοση \longrightarrow $R^\bullet + O_2 \longrightarrow ROO^\bullet + ROOH$ (ρίζα υπεροξειδίου)



Τερματισμός



(αδρανή προϊόντα που δε προκαλούν έναρξη ή διάδοση)

1.2 Είδη Ελευθέρων Ριζών

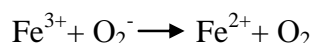
1.2.1 Ρίζα Υδροξυλίου (OH[•])

Η ρίζα υδροξυλίου (OH[•]) αποτελεί το πιο δραστικό χημικό είδος του «ενεργοποιημένου οξυγόνου» που σχηματίζεται από την διαδοχική μονοσθενή αναγωγή του διοξειδίου (O₂) στον κυτταρικό μεταβολισμό και είναι κυρίως υπεύθυνο για τις κυτταροτοξικές επιδράσεις οξυγόνου των φυτών, των ζώων και των μικροοργανισμών (Halliwell 1989; Halliwell & Gutteridge 2015). Το βραχύβιο αυτό μόριο προσβάλλει τα βιομόρια και μπορεί να διασπάσει τους πολυσακχαρίτες, τις πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα που βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη από μερικά νανόμετρα από τον τόπο παραγωγής του (Hippeli & Elstner 1997). Οι ρίζες OH[•] μπορούν να παραχθούν από το O₂ υπό διάφορες συνθήκες στρες και εμπλέκονται σε αμέτρητες κυτταρικές διαταραχές όπως η φλεγμονή (Lipinski 2011) και ο κυτταρικός θάνατος (Harris & Hansen 2012). Οι τοξικές επιδράσεις σχετίζονται με την πρόκληση βλάβης από τη ρίζα υδροξυλίου στο DNA, στις πρωτεΐνες ή στα λιπίδια της μεμβράνης (Fang et al. 2002; Harris & Hansen 2012). Η ρίζα OH[•], δημιουργείται σε βιολογικά συστήματα από το H₂O₂ με την αντίδραση Fenton (von Sonntag 1991; Bielski & Cabelli 1995) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης. Όταν πρόκειται για

βιολογικά συστήματα, το μέταλλο μετάπτωσης συνήθως είναι ο σίδηρος (Mylonas & Kouretas 1999). Η αντίδραση είναι γνωστή από την ανόργανη χημεία ως

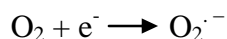


όπου το Fe^{2+} μπορεί να αναγεννηθεί μέσω της οξειδωσης με το ανιόν του υπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$)



1.2.2. Ρίζα Σουπεροξειδικού Ανιόντος ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

Η ρίζα $\text{O}_2^{\cdot-}$ είναι το πιο σημαντικό διαδεδομένο Δραστικό είδος Οξυγόνου, ένα ενδιάμεσο βιοχημικών αντιδράσεων που έχει αρνητικό φορτίο και συνήθως δε διαπερνά τη μεμβράνη του κυττάρου (Halliwell & Gutteridge 2015) και προκύπτει από την εξής αντίδραση:



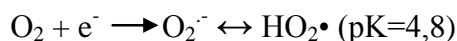
Το μόριο του σουπεροξειδίου μπορεί να εμφανίσει παραμαγνητικές ιδιότητες εξαιτίας του ασύζευτου ηλεκτρονίου στην εξωτερική στιβάδα.

Παράγεται κυρίως μέσα στα μιτοχόνδρια και η δραστηρότητά του είναι χαμηλή. Τα ένζυμα που μπορούν να παράγουν υπεροξείδιο περιλαμβάνουν την οξειδάση ξανθίνης [σε καταστάσεις ισχαιμίας κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ (Fatouros & Kouretas 2010)], τη λιποοξυγενάση, την κυκλοοξυγενάση και την οξειδάση του NADPH. Η τελευταία, αποτελεί ένα παράδειγμα σκόπιμης παραγωγής $\text{O}_2^{\cdot-}$ στη διαδικασία της φλεγμονής κατά την προσπάθεια αντίστασης στην εισβολή μικροοργανισμών (Steinbacher & Eckl 2015). Επίσης, σχηματίζεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων σε αερόβιες

συνθήκες μέσω της λειτουργίας της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Μπορεί να υφίσταται σε δύο μορφές όπως η $O_2^{\bullet-}$ ή η υδροπεροξυλική ρίζα (HO_2) σε χαμηλό pH.

1.2.3 Υπεροξειδικές ρίζες (ROO⁻)

Προέρχονται από το οξυγόνο στους ζωντανούς οργανισμούς. Η απλούστερη μορφή ρίζας υπεροξυλίου είναι η ρίζα υδροϋπεροξειδίου (HOO^{\bullet}) η οποία σχηματίζεται από την πρωτονίωση του υπεροξειδίου (De Grey 2002). Περίπου 0,3% του συνολικού ποσοστού $O_2^{\bullet-}$ στο κυτταρόπλασμα ενός κυττάρου βρίσκεται σε πρωτονιωμένη μορφή. Ξεκινά την υπεροξειδωση λιπαρών οξέων και μπορεί επίσης να προωθήσει την ανάπτυξη όγκων (Cerutti 1985). Όπως φαίνεται στην αντίδραση που παρατίθεται μετά την αναγωγή του οξυγόνου από $1 e^-$ μπορεί να προκύψει η ρίζα του υδροϋπεροξειδίου:

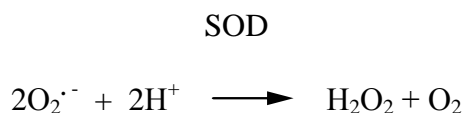


1.2.4 Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το υπεροξείδιο υδρογόνου δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, ωστόσο έχει τη δυνατότητα να οδηγήσει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως είναι η ρίζα OH^{\bullet} . Παρόλα αυτά, μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο κύτταρο σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση (10 μM), ενώ επίσης σε υψηλότερα επίπεδα, τα ένζυμα παραγωγής κυτταρικής ενέργειας όπως η αφυδρογονάση της φωσφορικής -3- γλυκεραλδεΐδης αδρανοποιούνται (Cyne et al. 2010).

Ο σχηματισμός της γίνεται από οξειδάσες που μπορούν να προκαλέσουν κατάλυση τη μεταφοράς των δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο. Τέτοια παραδείγματα οξειδάσεων είναι οι οξειδάσες των αμινοξέων, η οξειδάση του

γλυκολικού και η οξειδάση της γλυκόζης. Επίσης μπορεί να σχηματιστεί μετά από αναγωγή του σουπεροξειδίου από τη δισμουτάση του σουπεροξειδίου (SOD) όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση (Lobo et al. 2010) :

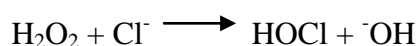


Το μόριο χαρακτηρίζεται από τη σταθερότητά του και τη διαπερατότητα στις μεμβράνες έχοντας μεγάλο χρόνο ημιζωής στο κύτταρο. Η κυτταροτοξικότητα του έγκειται στην συμμετοχή του στην αντίδραση Fenton με την παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης.

Τα κύρια αντιοξειδωτικά ένζυμα που μπορούν να εξουδετερώσουν το H_2O_2 είναι καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPx) και οι περοξειδοξοξίνες (Mates et al. 1999).

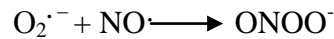
1.2.5 Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

Είναι πιο κυτταροτοξικό μόριο σε σχέση με το H_2O_2 και μπορεί να σχηματιστεί από την ενεργοποίηση ουδετερόφιλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Το HOCl είναι ένα ισχυρό δραστικής μορφής οξυγόνου που εμπλέκεται σε αντιδράσεις οξειδωσης και χλωρίωσης. Μπορεί να οξειδώσει θειόλες και άλλα βιολογικά μόρια, συμπεριλαμβανομένων του ασκορβικού οξέος, του ουρικού οξέος, των νουκλεοτιδίων πυριδίνης και της τρυπτοφάνης (Pattison et al. 2007). Το HOCl χλωριώνει αρκετές ενώσεις όπως αμίνες για να δώσει χλωραμίνες, υπολείμματα τυροσίνης για να δώσουν χλωριωμένα προϊόντα δακτυλίου, χοληστερόλη και ακόρεστα λιπίδια για να δώσουν χλωροϋδρίνες και μπορεί επίσης να χλωριώσει το DNA (Prutz 1996)



1.2.6 Περοξυνιτρίτης (ONOO⁻)

Ο περοξυνιτρίτης σχηματίζεται από την αντίδραση μεταξύ του O₂⁻ και του NO·.



Αποτελεί έναν ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα που οδηγεί στην οξείδωση των ομάδων θειόλης και των πρωτεϊνών αλλά και σε βλάβη στο DNA.

Είναι εξαιρετικά τοξικός (Beckman & Koppenol 1996) και μπορεί να αντιδράσει άμεσα με το CO₂ για να σχηματίσει ένα άλλο εξαιρετικά δραστικό νιτρωδο-υπεροξο καρβοξυλικό (ONOOCO₂⁻) ή υπεροξειδινιτικό οξύ (ONOOH). Το ONOOH υποβάλλεται περαιτέρω σε ομόλυση για να σχηματιστούν ρίζες OH⁻ και το διοξειδίο του αζώτου (NO₂). Επίσης, μπορεί να οξειδώσει λιπίδια, τη μεθειονίνη και υπολείμματα τυροσίνης σε πρωτεΐνες καθώς και το DNA για να σχηματίσει νιτρογουανίνη (Douki & Cadet 1996). Τα υπολείμματα νιτροτυροσίνης θεωρούνται βιοδείκτες κυτταρικής βλάβης που προκαλείται από το υπεροξειδίο του νατρίου (Barteseghi & Radi 2018).

1.2.7 Όζον (O₃)

Το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό που μπορεί να παραχθεί *in vivo* (Lerner & Eschenmoser 2003). Μπορεί να σχηματίζει ελεύθερες ρίζες και άλλα αντιδρώντα ενδιάμεσα με οξείδωση των βιολογικών μορίων. Μπορεί να προκαλέσει υπεροξείδωση λιπιδίων (Long et al. 2001) και να οξειδώσει διαφορετικές λειτουργικές ομάδες, όπως αμίνες, αλκοόλες, αλδεΐδες, σουλφυδρύλια που υπάρχουν στις πρωτεΐνες (Freeman & Mudd 1981) και νουκλεϊκά οξέα (Cataldo 2006). Μπορεί

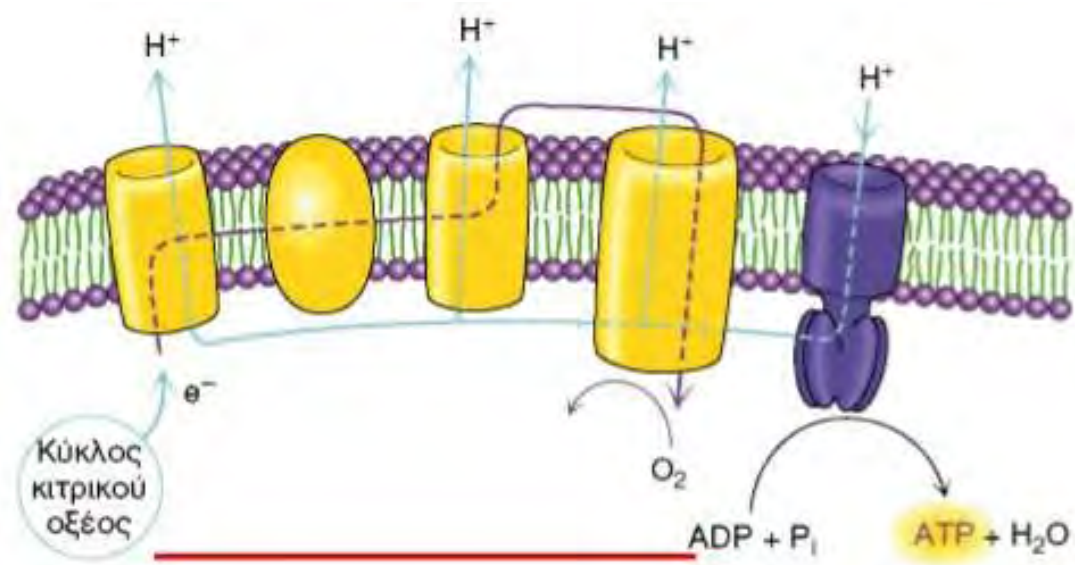
επίσης να προκαλέσει χρωμοσωμικές ανωμαλίες άμεσα ή έμεσα από τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από αυτό (Müller et al. 1996).

1.3 Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Το μεγαλύτερο ποσοστό ελευθέρων ριζών στον οργανισμό παράγεται μέσω φυσιολογικών βιοχημικών διεργασιών ως μέρος του μεταβολισμού των κυττάρων. Η βασικότερη πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι αδιαμφισβήτητα το οξυγόνο και σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορούν να αποβούν επιβλαβείς για τον οργανισμό (Birben et al. 2012). Η δράση των ελευθέρων ριζών μπορεί να είναι ευεργετική σε ελεγχόμενες συγκεντρώσεις καθώς σχετίζεται με μια σειρά επιθυμητών βιολογικών διεργασιών όπως η διαφοροποίηση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η κυτταρική σηματοδότηση, η αναδίπλωση πρωτεϊνών του ενδοπλασματικού δικτύου και μέσω της φαγοκυττάρωσης συμβάλουν στην ενίσχυση της άμυνας τους οργανισμού (Valko et al. 2007; Ji et al. 2006; Pi et al. 2010; Vernon & Tang 2013). Συνεπώς παίζουν καθοριστικό ρόλο στη φυσιολογική λειτουργία και δράση ενός κυττάρου και κατά συνέπεια θεωρούνται απαραίτητα μόρια για τον οργανισμό.

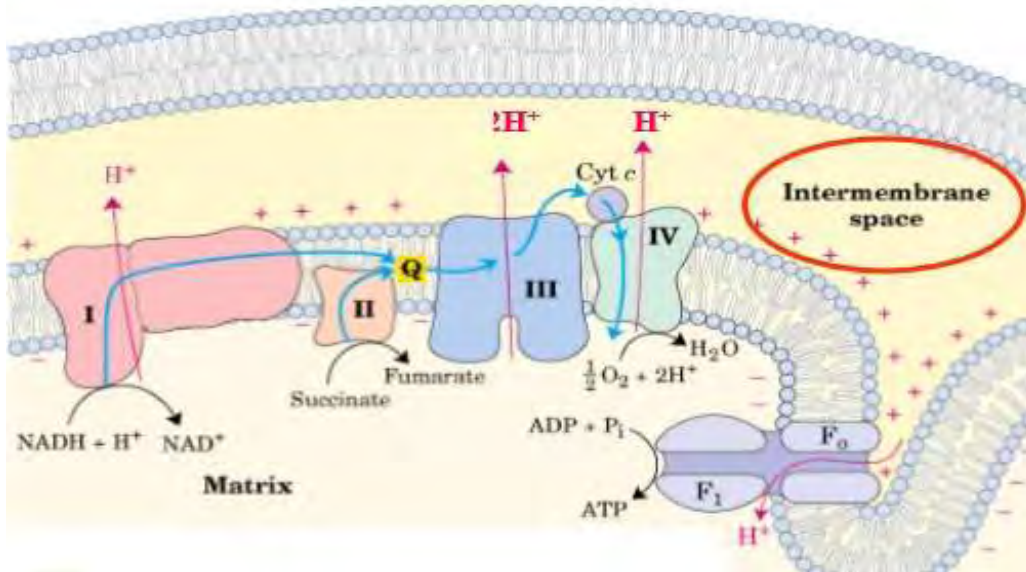
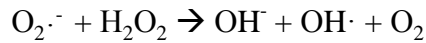
1.3.1 Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποτελεί την κυριότερη πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών σε αερόβιους οργανισμούς. Πρόκειται για μια διαδικασία που λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων.



Εικόνα 3: Αναπνευστική αλυσίδα

Κατά τη διαδικασία αυτή, μεταφέρονται ηλεκτρόνια από το NADH και το FADH₂ που προκύπτουν από διάφορες διεργασίες (κύκλος Krebs, οξείδωση λιπαρών οξέων, γλυκόλυση) μέσω μιας σειράς πρωτεϊνικών συμπλόκων. Τελικό αποτέλεσμα της διεργασίας είναι η παραγωγή ATP. Τα ηλεκτρόνια ρέουν από το NADH ή το FADH₂ προς το O₂ μέσω της παρουσίας πρωτεϊνικών συμπλόκων στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Τέτοια πρωτεϊνικά σύμπλοκα είναι η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-ουβικινόνης (Σύμπλοκο I:ρόλος της είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων από το FADH₂), η αναγωγή του ζεύγους ουβικινόνης- ηλεκτρικού (Σύμπλοκο II), η οξειδοαναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο III) και η οξειδάση του κυτοχρώματος c (Σύμπλοκο IV) όπως φαίνεται και στις εικόνες 3 και 4. Μέσω της ατελούς ροής e⁻ προς το μοριακό οξυγόνο παράγεται O₂^{·-} που στη συνέχεια μπορεί να αναχθεί προς H₂O₂ με τη δράση της μιτοχονδριακής υπεροξειδικής δισμουτάσης (Mn-SOD). Επίσης, το O₂^{·-} αντιδρά με το H₂O₂ προς παραγωγή OH[·] μια αντίδραση που όπως είδαμε προηγουμένως καλείται “Haber-Weiss” (Chance et al. 1979):



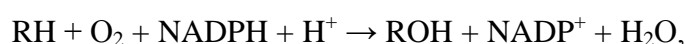
Εικόνα 4: Αναπνευστική αλυσίδα: Ροή ηλεκτρονίων μέσω των πρωτεϊνικών συμπλόκων.

Έτσι, κατά τη διαδικασία παραγωγής ATP η πιθανή διαρροή ηλεκτρονίων κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελεύθερων ριζών, κάτι που αποτελεί κίνδυνο για οξείδωση δομικών και λειτουργικών συστατικών των κυττάρων (πρωτεΐνες, λιπίδια, νουκλεϊκά οξέα). Το ποσοστό αυτό των ηλεκτρονίων που διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα και ανάγονται ατελώς σε $\text{O}_2\cdot^-$ υπολογίζεται ότι είναι περίπου 0,15% (St-Pierre et al. 2002).

1.3.2 Ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450

Μέσω των ενζύμων του κυτοχρώματος P450 παράγονται ελεύθερες ρίζες. Το ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450 περιλαμβάνει πολλές οικογένειες ενζύμων που συναντώνται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς. Αποτελούνται από περισσότερες από 2000 μεμβρανικές πρωτεΐνες που εκφράζονται στην έσωτερική

μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Πιο συγκεκριμένα, η δράση των ενζύμων αυτών αφορούν τη φάση I αλλά και το μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών, όπως φάρμακα. Αυτό συμβαίνει με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο O₂ με συνέπεια την οξειδωση του υποστρώματος (δηλαδή του ξενοβιοτικού), όπως φαίνεται παρακάτω αντίδραση:



όπου με RH χαρακτηρίζεται η ξενοβιοτική ουσία.

1.3.3 Υπεροξειδιοσώματα

Τα υπεροξειδιοσώματα συνιστούν μια σημαντική ενδογενή πηγή ROS και κυρίως H₂O₂. Πρόκειται για μεμβρανικά κυστίδια που συμμετέχουν σε ποικίλες λειτουργίες μέσω ενζύμων που βρίσκονται στο εσωτερικό τους. Ένα τέτοιο ένζυμο είναι η καταλάση που καταλύει τη μετατροπή του H₂O₂ σε H₂O και O₂ (Berg et al. 2010).

1.3.4 Αιμοσφαιρίνη

Είναι μια μεταλλοπρωτεΐνη που περιέχει σίδηρο και μεταφέρει O₂ στα ερυθροκύτταρα σχεδόν όλων των σπονδυλωτών καθώς και τους ιστούς μερικών ασπόνδυλων. Η αιμοσφαιρίνη στο αίμα μεταφέρει οξυγόνο από τους πνεύμονες στους ιστούς. Εκεί απελευθερώνει το οξυγόνο για την αερόβια αναπνοή και την τροφοδότηση του μεταβολισμού. Ένα υγιές άτομο έχει 12 έως 16 γραμμάρια αιμοσφαιρίνης σε κάθε 100 ml αίματος.

Η οξυαιμοσφαιρίνη σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής αναπνοής όταν το οξυγόνο δεσμεύεται με το συστατικό αίμης της πρωτεΐνης αιμοσφαιρίνης στα ερυθρά αιμοσφαίρια. Κατόπιν, τα ερυθροκύτταρα μπορούν να μεταφέρουν την οξυαιμοσφαιρίνη σε όλους τους ιστούς ενώ παράλληλα το οξυγόνο θα αποδεσμευτεί από την αιμοσφαιρίνη στα τριχοειδή αγγεία των ιστών και θα διαχυθεί μέσα στα κύτταρα. Αυτή η διαδικασία συμβαίνει στα τριχοειδή αγγεία που γειτνιάζουν με τις κυψελίδες των πνευμόνων.

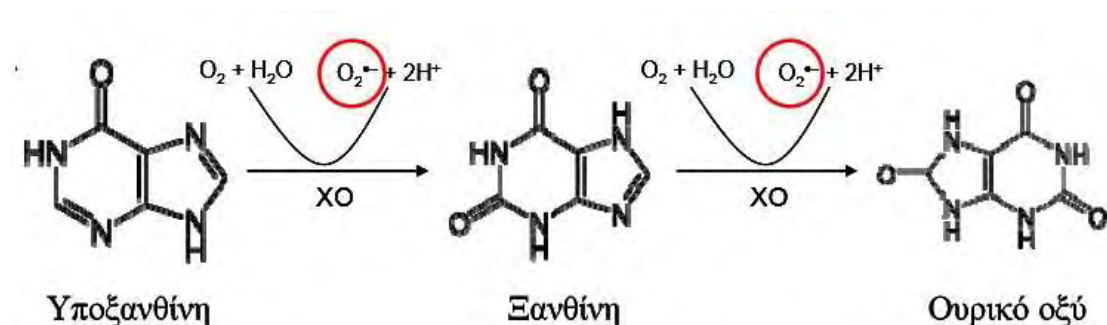
Σε καταστάσεις μεγάλης ζήτησης, η αιμοσφαιρίνη αυτοοξειδώνεται και οδηγεί στην παραγωγή ROS όπως είναι το O_2^- (Balagopalakrishna et al. 1996) ενώ η αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης δύναται να απελευθερώσει H_2O_2 (Brantley et al. 1993).

1.3.5 Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Κατά την αναερόβια άσκηση παρατηρείται το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Όταν ο οργανισμός βρίσκεται σε κατάσταση ισχαιμίας η παροχή οξυγόνου στους ιστούς μειώνεται σημαντικά, ενώ μετά την επαναιμάτωση προκύπτει ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών και κυρίως O_2^- (Fatouros & Kouretas 2010). Το παραπάνω συμβαίνει μετά από δράση του ενζύμου οξειδάση της ξανθίνης .

Σε φυσιολογικές συνθήκες το ένζυμο αφυδρογονάση της ξανθίνης μπορεί να επιτύχει την κατάλυση της μετατροπής της υποξανθίνης σε ξανθίνη και στη συνέχεια σε ουρικό οξύ. Σε περιπτώσεις που υπάρχει μεγάλη ανάγκη ενέργειας (πχ έντονη άσκηση), τα μόρια του ATP διασπώνται διαδοχικά σε ADP και στη συνέχεια σε μόρια AMP. Το ένζυμο υφίσταται πρωτεόλυση δίνοντας την οξειδάση της ξανθίνης και μετά την επαναιμάτωση καταλύει την προαναφερθείσα μετατροπή

χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το μοριακό οξυγόνο και δίνοντας ως προϊόν ρίζα σουπεροξειδίου. (Radak et al. 2001; Vina et al. 2006) (Εικόνα 5) .



Εικόνα 5: Δράση της οξειδάσης της ξανθίνης και παραγωγή ρίζας σουπεροξειδικού ανιόντος.

1.3.6 Φλεγμονή

Η φλεγμονώδης απόκριση αποτελεί έναν βασικό μηχανισμό που συμμετέχει στην άμυνα του οργανισμού. Η φλεγμονή και συσχέτισή της με την κατάσταση του οξειδωτικού στρες, έχουν γίνει σημαντικά ζητήματα υγείας τα τελευταία χρόνια. Η φλεγμονή είναι η φυσική αντίδραση του σώματος στην προσβολή από έναν μολυσματικό παράγοντα, χημικό ή φυσικό. Ο σκοπός σχηματισμού της φλεγμονής είναι η προστασία της περιοχής του τραυματισμού. Ένας σκοπός της φλεγμονής είναι να προστατεύσει τον τόπο ενός τραυματισμού. Συγκεκριμένα, σε περίπτωση μόλυνσης μετά από είσοδο στον οργανισμό κάποιου μικροοργανισμού όπως ιοί ή μήκυτες, ο σχηματισμός φλεγμονής είναι ο μηχανισμός προστασίας του οργανισμού (Conner & Grisham 1996).

Σε περίπτωση μυϊκού τραυματισμού μετά από άσκηση, η δράση της φλεγμονώδους απόκρισης αφορά την αντιμετώπιση μιας μόλυνσης και την επιδιόρθωση των βλαβών που έχουν προκύψει στον ιστό. Πιο αναλυτικά, γίνεται προσκόλληση λευκοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων στο σημείο

που έχει προκληθεί βλάβη, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να περάσουν προς το μεσοκυττάριο χώρο μέσω των τοιχωμάτων των τριχοειδών αγγείων, μια διαδικασία που ονομάζεται εξαγγείωση. Στην περιοχή όπου έχει προκληθεί η ιστική βλάβη γίνεται προσέλκυση φαγοκυττάρων, όπως ουδετερόφιλα και μακροφάγα, από χημειοτακτικούς παράγοντες που απελευθερώνονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα. Κατά τη δράση τους με σκοπό την φαγοκυττάρωση των κατεστραμμένων κυττάρων, τα ουδετερόφιλα και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα απελευθερώνουν ROS όπως H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, OH^- και υποχλωριώδες οξύ (HOCl) (Robinson 2008).

1.3.7 Κατεχολαμίνες

Μια κατεχολαμίνη είναι μια μονοαμίνη, μια οργανική ένωση που έχει μια κατεχόλη (βενζόλιο με δύο πλευρικές ομάδες υδροξυλίου στους άνθρακες 1 και 2) και μια αμίνη πλευρικής αλυσίδας (Kobayashi 2001). Οι κατεχολαμίνες προέρχονται από το αμινοξύ τυροσίνη που προσλαμβάνεται από τη διατροφή καθώς και μετά από σύνθεση από τη φαινυλαλανίνη (Fernstrom & Fernstrom 2007). Οι κατεχολαμίνες είναι υδατοδιαλυτές και είναι σε ποσοστό 50% συνδεδεμένες με τις πρωτεΐνες του πλάσματος που κυκλοφορούν. Κυριότερες κατεχολαμίνες είναι η επινεφρίνη (αδρεναλίνη), η νορεπινεφρίνη (νοραδρεναλίνη) και η ντοπαμίνη.

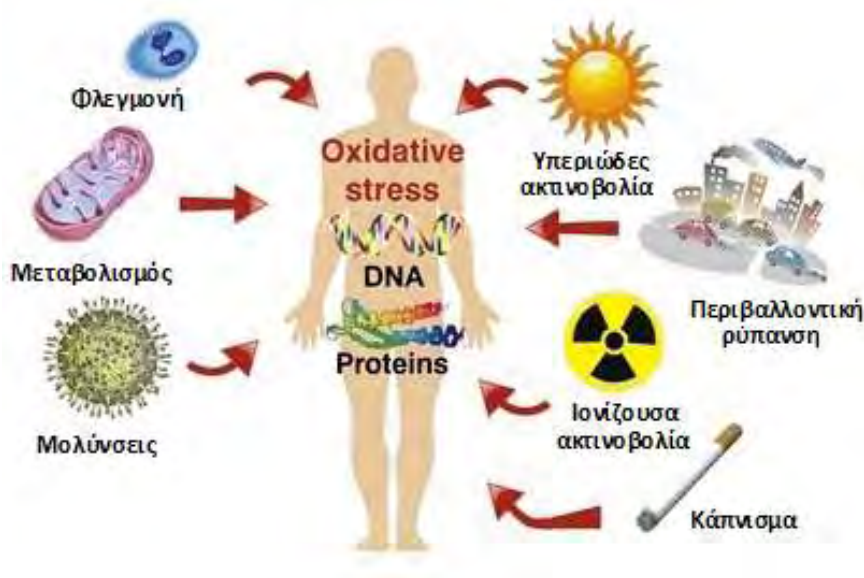
Η παραγωγή ελευθέρων ριζών από τις κατεχολαμίνες αυξάνεται κατά την έντονη άσκηση. Αυτό συμβαίνει καθώς ενεργοποιούνται οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς και έτσι αυξάνεται η δράση των σκελετικών μυών και του μυοκαρδίου. Κατά το μεταβολισμό των κατεχολαμινών το ένζυμο μονοάμινοοξειδάση (MAO) χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το O_2 και δίνει υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (Nelson & Anderson 2016). Έχει βρεθεί ότι μετά από άσκηση η παραγωγή κατεχολαμινών είναι σημαντικά αυξημένη (Messan et al. 2017; Steinbacher & Eckl

2015). Ως αποτέλεσμα, αυξάνεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Elosua et al. 2003).

1.4 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Εξωγενείς και περιβαλλοντικές πηγές ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων την υπεριώδη ακτινοβολία (UV), την ιοντίζουσα ακτινοβολία των X-, γ- ή κοσμικές ακτίνες και τα α-σωματίδια από την αποσύνθεση του ραδονίου. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση των παραπάνω παραγόντων σε συνάρτηση με την έκθεση των κυττάρων σε χημικές ουσίες, αυξάνει τα επίπεδα βλάβης λόγω οξειδωτικών μεταβολών (Cadet et al. 2010; Altieri et al. 2008). Πράγματι, τα φυτοφάρμακα και άλλες περιβαλλοντικές χημικές ουσίες οδηγούν σε οξειδωτικό στρες. Η τοξικότητα των φυτοφαρμάκων οφείλεται κυρίως στην ικανότητά τους να παράγουν ελεύθερες ρίζες που στη συνέχεια οξειδώνουν βιομόρια επηρεάζοντας τη λειτουργία τους (Banerjee et al. 1999). Ο ρόλος ορισμένων διαλυτών έχει επίσης συσχετιστεί με τη δημιουργία ROS και την εξέλιξη του οξειδωτικού στρες. Για παράδειγμα, τα *in vitro* αποτελέσματα έξι διαλυτών (n-εξάνιο, n-οκτάνιο, τολουόλιο, n-βουτυλοβενζόλιο και κυκλοεξάνιο) έχουν αξιολογηθεί σε κυτταρικές καλλιέργειες επιμύων και έδειξαν αυξημένα επίπεδα παραγωγής ROS (Chalansonnet et al. 2013). Επιπροσθέτως, η ικανότητα των ενεργών οξειδοαναγωγικών μετάλλων όπως ο σίδηρος (Fe), ο χαλκός (Cu), το χρώμιο (Cr) και κοβάλτιο (Co)) στη δημιουργία O_2^- και ριζών νιτρικού οξειδίου έχουν ευρέως αναφερθεί επίσης (Jomona & Valko 2011). Είναι γνωστό ότι οι υπερβολικές ποσότητες σιδήρου και χαλκού μπορούν να είναι τοξικές για τα κύτταρα επηρεάζοντας την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου. Άλλοι εξωγενείς παράγοντες που οδηγούν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, το στρες και η άσκηση (Halliwell 2009; Veskoukis

et al. 2010; Stagos et al. 2015; Kerasiotti et al. 2012; Stagos et al. 2014), όπως φαίνεται στην εικόνα 6.



Εικόνα 6: Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.5 Βιολογική δράση των ROS

Οι ROS δεν έχουν μόνο αρνητικές επιδράσεις στον οργανισμό, καθώς μπορούν να οδηγήσουν στο φαινόμενο της όρμησης (hormesis). Η όρμηση αναφέρεται στις προσαρμοστικές απαντήσεις των βιολογικών συστημάτων για να μετριάσουν περιβαλλοντικές ή αυτοπροκαλούμενες προκλήσεις μέσω των οποίων το σύστημα βελτιώνει τη λειτουργικότητα ή/και την ανοχή του σε πιο σοβαρές προκλήσεις (Calabrese & Mattson 2017). Πιο συγκεκριμένα, σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων η παρουσία τους είναι ευεργετική και καθοριστική για αρκετές βασικές διεργασίες των κυττάρων (Sen 2001; Sen & Packer 1996; Linnane et al. 2002; Rimbach et al. 1999). Τέτοιες διεργασίες μπορεί να είναι η μεταγωγή σήματος,

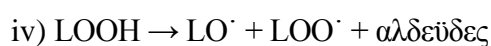
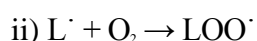
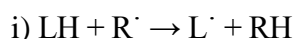
η γονιδιακή έκφραση, όπως επίσης και η άμυνα του οργανισμού μέσω της δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος στην φλεγμονή (Finaud et al. 2006). Μία ακόμα ευεργετική δράση των ROS, αφορά την ενεργοποίηση ενζύμων που συμμετέχουν στην αποτοξίνωση του οργανισμού από φάρμακα (Moselhy et al. 2013).

Ωστόσο, αν οι συγκεντρώσεις των ROS αυξηθούν τότε μπορεί να καταστούν επιβλαβείς για τα βιομόρια του οργανισμού προκαλώντας αλλοίωση ή καταστροφή τους. Ακόμα, υψηλά επίπεδα ROS έχουν συσχετιστεί με ασθένειες όπως η αρτηριοσκλήρυνση, ο διαβήτης, και οι νόσοι του Parkinson και του Alzheimer (Halliwell & Gutteridge 2015; Halliwell 1989).

1.5.1 Λιπίδια

Τα λιπίδια θεωρούνται τα πιο ευαίσθητα βιομόρια ως προς την οξειδωτική καταστροφή. Η αυξημένη παρουσία ελευθέρων ριζών δημιουργεί ένα εντόνωσ οξειδωτικό περιβάλλον στο κύτταρο που μπορεί να σχηματίσει άκρως ενεργά και ασταθή υπεροξειδία των λιπιδίων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), μια διαδικασία που ονομάζεται λιπιδική υπεροξειδωση. Ως αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι ο σχηματισμός ασταθών προϊόντων που μπορούν να διασπαστούν και να σχηματιστούν ρίζες περοξειλίου ($\text{ROO}\cdot$), συζυγή διένια και μαλονδιαλδεύδη (MDA) ως παραπροϊόντα (Mylonas & Kouretas 1999). Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο αφορά τη σπουδαιότητα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων για τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα πιθανή καταστροφή τους να οδηγήσει τελικώς σε αυξημένη ρευστότητα και εν συνεχεία σε κυτταρικό θάνατο. Επίσης, μπορεί να προκύψει οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, που αποτελούν σημαντικό παράγοντα πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny 2001).

Η γενική διαδικασία της υπεροξειδωσής των λιπιδίων μπορεί να απεικονιστεί όπως φαίνεται παρακάτω (αντιδράσεις i-iv) όπου LH είναι ο στόχος και R· είναι η αρχική οξειδωτική ρίζα. Η οξείδωση του λιπαρού οξέος παράγει μια ρίζα λιπαρού οξέος (L·) (αντίδραση i), η οποία προσδίδει άμεσα οξυγόνο για να σχηματίσει μία ρίζα περοξυλίου (ROO·) λιπαρού οξέος (LOO·, αντίδραση ii). Οι LOO· είναι οι φορείς των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Επίσης, μπορούν να οξειδώσουν περαιτέρω τα λιπαρά οξέα και να ξεκινήσουν νέες αλυσιδωτές αντιδράσεις παράγοντας λιπιδικά υδροϋπεροξείδια (LOOH) (αντιδράσεις iii-iv) που μπορούν να διασπαστούν σε ακόμη πιο δραστικές ελεύθερες ρίζες



1.5.2 Πρωτεΐνες

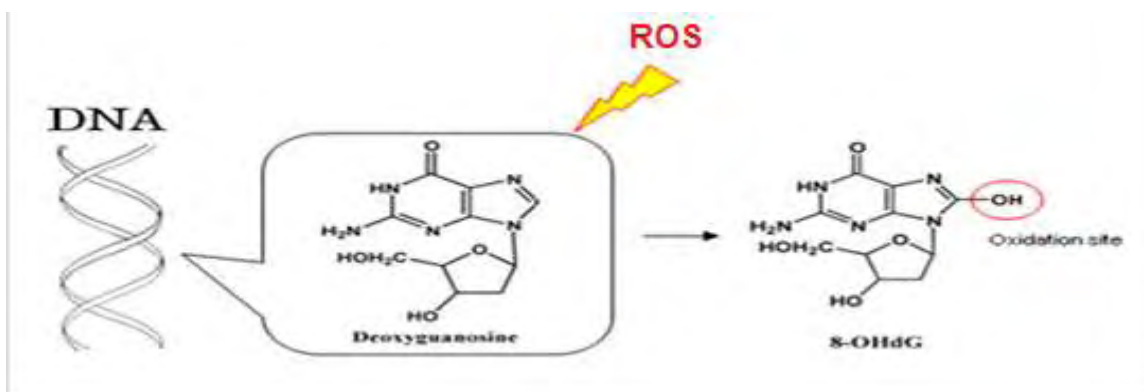
Το έντονο οξειδωτικό περιβάλλον στο εσωτερικό ενός κυττάρου είναι πιθανό να οδηγήσει στην οξείδωση αμινοξέων και το σχηματισμό πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Szweda et al. 2002), που αποτελούν έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο και έγκυρο βιοδείκτη οξείδωσης των πρωτεϊνών. Ο σχηματισμός των καρβονυλικών ομάδων (αλδεϋδες και κετόνες) γίνεται κυρίως σε αμινοξέα που είναι ευπαθή σε οξείδωση όπως η αργινίνη, η προλίνη, η λυσίνη και η θρεονίνη (Renke et al. 2000; Levine 2002). Τελική κατάληξη της διαδικασίας αυτής είναι η διάσπαση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα και τα λυσοσώματα, καθώς πρόκειται για μη αναστρέψιμη διαδικασία (Szweda et al. 2002). Αυτό όμως δεν

συμβαίνει όταν πρόκειται για πρωτεΐνες που έχουν υποστεί οξεία οξειδωση, οι οποίες δεν διασπώνται και σχηματίζουν συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους (Levine 2002).

1.5.3 DNA

Τόσο οι ROS όσο και οι RNS, μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη στο DNA. Συγκεκριμένα, το μιτοχονδριακό DNA είναι πιο ευάλωτο στην οξειδωση από τις ROS σε σύγκριση με το πυρηνικό DNA επειδή βρίσκεται πολύ κοντά στο σημείο παραγωγής τους. Συγκεκριμένα, οι ρίζες OH^\cdot και ROO^\cdot έχουν τη δυνατότητα να προκαλούν μονόκλωνες θραύσεις σε πλασμιδιακό DNA ενώ παράλληλα οι πρώτες αντιδρούν με τις αδεΐνες και σχηματίζουν την 8-υδροξυδιογουανοσίνη (8-OhdG) (Ames 1986; Dizdaroglu et al. 2002; Helbock et al. 1999; Halliwell & Gutteridge 2015) (Εικόνα 7). Η 8-OhdG θεωρείται βιοδείκτης της οξειδωτικής βλάβης του DNA και εμπλέκεται στη μεταλλαξιογένεση, την καρκινογένεση και τη γήρανση (Valavanidis et al. 2009). Τα επίπεδά της είναι υψηλότερα στο μιτοχονδριακό DNA συγκριτικά με το πυρηνικό DNA (Barja 2000; Breen & Murphy 1995).

Από την άλλη πλευρά, οι RNS, και κυρίως το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου (OONO^-), αλληλεπιδρούν με την γουανίνη για την παραγωγή νιτρικών και οξειδωτικών βλαβών DNA όπως 8-νιτρογουανίνης και 8-OhdG, αντίστοιχα (Hiraku et al. 2010). Η 8-νιτρογουανίνη που σχηματίζεται είναι ασταθής και μπορεί να απομακρυνθεί (Yermilov et al. 1995). Αντιστρόφως, η αδεΐνη μπορεί να συνδυαστεί με 8-νιτρογουανίνη κατά τη διάρκεια της σύνθεσης DNA που έχει ως αποτέλεσμα μεταβολές G-T (Loeb & Preston 1986). Συνεπώς, η 8-νιτρογουανίνη είναι μια μεταλλαξιογόνος αλλοίωση DNA που εμπλέκεται στην καρκινογένεση.



Εικόνα 7: Οι ελεύθερες ρίζες οξειδώνουν τη βάση θυμίνης προς σχηματισμό 8-υδροξυδιογουανοσίνης (8-OHdG).

1.6 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται 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 2015). Τα αντιοξειδωτικά δρουν με σκοπό την αποφυγή βλαβών στα κυτταρικά συστατικά και στη διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης καθώς εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και σχηματίζουν λιγότερο δραστικά μόρια σε σχέση με αυτές (Dekkers et al. 1996) (Εικόνα 8). Διακρίνονται σε ενδογενή (μόρια που παράγονται στον οργανισμό) και εξωγενή (μόρια που προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής).

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Την πρώτη κατηγορία αποτελούν μεταξύ άλλων η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GP_x) και η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR), ενώ η δεύτερη κατηγορία αποτελείται από τη βιταμίνη Α (ρετινόλη), τη βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), τη βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη), τα φλαβονοειδή, τις θειόλες (γλουταθειόνη (GSH)), το ουρικό οξύ, το συνένζυμο Q₁₀, τη

φερριτίνη, τη χολερυθρίνη και μικροσυστατικά (σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος, σελήνιο, μαγνήσιο) που λειτουργούν ως ενζυμικοί συμπαράγοντες.

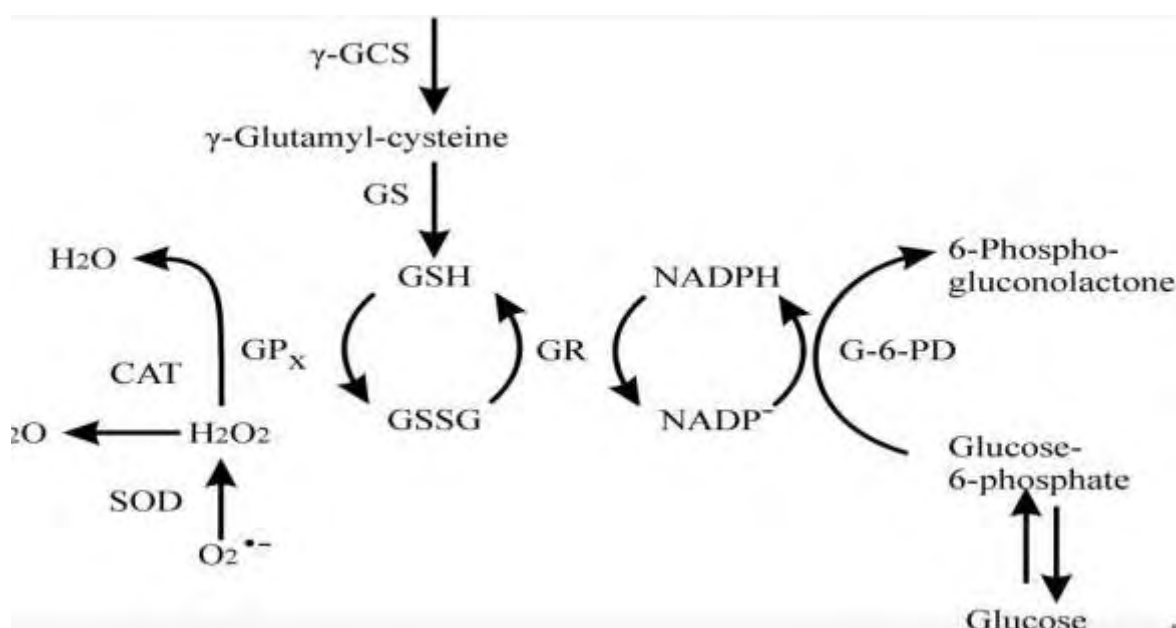


Εικόνα 8: Δράση αντιοξειδωτικού για την εξουδετέρωση ελεύθερης ρίζας

1.6.1 Ενζυμικοί μηχανισμοί

Η SOD μετατρέπει το O_2^- σε H_2O_2 , ενώ η CAT και η GPx μετατρέπουν το H_2O_2 σε νερό. Η GPx απαιτεί δρα παράλληλα με ένζυμα όπως η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και η αφυδρογονάση της φωσφορικής-6-γλυκόζης (G-6-PD) και χρησιμοποιεί συμπαράγοντες όπως η γλουταθειόνη (GSH), το NADPH και η 6-φωσφορική γλυκόζη. Εάν ανασταλεί η GR, τα κύτταρα δεν μπορούν να απομακρύνουν το H_2O_2 μέσω του συστήματος υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και αυξάνονται τα επίπεδα της δισουλφιδικής γλουταθειόνης (GSSG). Εάν η σύνθεση γλουταθειόνης αναστέλλεται, είτε αναστέλλοντας τη συνθετάση της γλουταθειόνης (GS) είτε τη συνθετάση της κυστεΐνης γ-γλουταμυλικού (γ-GCS), η γλουταθειόνη θα εξαντληθεί και η GPx δεν θα είναι σε θέση να απομακρύνει το H_2O_2 . Εάν η δράση της CAT αναστέλλεται, τα κύτταρα επίσης δεν μπορούν να διασπάσουν το H_2O_2 . Τέλος, εάν η πρόσληψη γλυκόζης αναστέλλεται δημιουργώντας μια χημικά

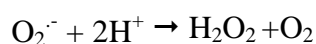
επαγόμενη κατάσταση στέρησης γλυκόζης, η αποτοξίνωση με υδροπεροξείδιο θα αναστέλλεται επίσης (Chance et al. 1979) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Μηχανισμοί δράσης αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η εικόνα προέρχεται από τους (Weydert & Cullen 2010)

1.6.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Πρόκειται για ένα ένζυμο που συναντάται σε όλους τους αερόβιους μηχανισμούς και καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 και O_2 όπως φαίνεται παρακάτω:

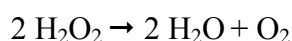


Υπάρχουν τρία είδη SOD και συγκεκριμένα αυτή που περιέχει μαγγάνιο (Mn/SOD) και εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, αυτή που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο (Cu/ZnSOD) και βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα και η

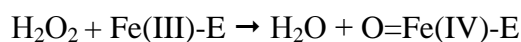
εξωκυτταρική SOD (ECSOD0) που εκφράζεται σε ορισμένους ιστούς (Weydert & Cullen 2010). Το μεγαλύτερο μέρος της ρίζας ανάγεται από την Mn/SOD στα μιτοχόνδρια ενώ το υπόλοιπο μέρος περνάει στο κυτταρόπλασμα και ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD (Powers & Jackson 2008).

1.6.1.2 Καταλάση (CAT)

Συναντάται σε κάθε ζωντανό οργανισμό που έρχεται σε επαφή με το O₂ και συνιστά ένα από τα πιο σπουδαία ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα. Η CAT συναντάται κυρίως σε ερυθρά και ηπατικά κύτταρα και ενδοκυτταρικά κυρίως στα υπεροξειδιοσώματα, τα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Καταλύει τη διάσπαση του H₂O₂ σε H₂O και O₂, αποτρέποντας έτσι τις δυσάρεστες συνέπειες που μπορεί να προκαλέσει το μόριο αυτό συμμετέχοντας στις αντιδράσεις Fenton-Weiss (Antunes et al. 2002). Είναι ένα τετραμερές με τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων, των 62 kDa, όπου κάθε υπομονάδα περιέχει τέσσερις διακεκριμένες περιοχές και μία προσθετική ομάδα αίμης. Η CAT μπορεί να διασπάσει το H₂O₂ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



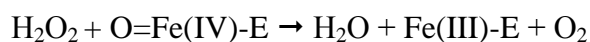
Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια:



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

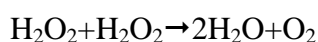
Η πρώτη αντίδραση χαρακτηρίζεται από την οξείδωση της αίμης με ένα μόριο H₂O₂ που οδηγεί στο σχηματισμό του συμπλόκου O=Fe(IV)-E, μια ρίζα κατιόντων οξο-φερρυλ πορφυρίνης (Jones and Dunford, 2005). Μόλις σχηματιστεί το σύμπλοκο

αυτό αντιδρά ταχέως με ένα δεύτερο μόριο H_2O_2 για να παράγει H_2O και O_2 σε διεργασία οξειδοαναγωγής δύο ηλεκτρονίων.



Αυτή η δεύτερη αντίδραση είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε σύγκριση με άλλες πρωτεΐνες όπως μυοσφαιρίνη.

Τελικώς δίνει την αντίδραση :



Μια ακόμα δράση της CAT αφορά τη χρησιμοποίηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου μαζί με υπόστρωμα (αιθανόλη) για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών (H_2A) όπως φαίνεται παρακάτω.

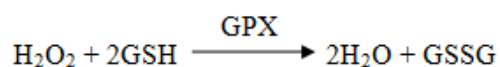


1.6.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

Η υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPx, GPx1) είναι μια πρωτεΐνη, που προστατεύει την αιμοσφαιρίνη από οξειδωτική αποικοδόμηση στα ερυθροκύτταρα (Lubos et al. 2011). Η GPx απαιτεί αρκετά ένζυμα (GR, G6PD) και συμπαραγόντες (GSH, NADPH, και G6P) για να είναι αποτελεσματική. Υπάρχουν πέντε ισοένζυμα GPx με την GPx1 να θεωρείται ως το κύριο ένζυμο για την απομάκρυνση του H_2O_2 (de Haan et al. 1998). Η υπερέκφραση αυτού του ενζύμου προστατεύει τα κύτταρα από την οξειδωτική βλάβη (Kelner et al. 1995) και καταστέλλει την απόπτωση που προκαλείται από το H_2O_2 (Kayanoki et al. 1996).

Ο κυριότερος μηχανισμός δράσης της GPx, αφορά τη διάσπαση του H_2O_2 σε H_2O χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) ως υπόστρωμα. Πιο συγκεκριμένα, η GSH οξειδώνεται προς GSSG παρουσία της GPx και του H_2O_2 ,

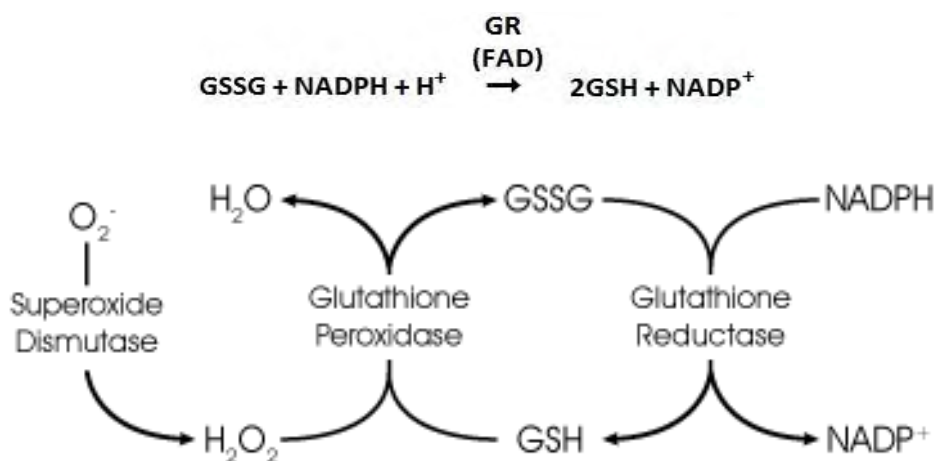
όπως φαίνεται παρακάτω. Συναντάται κυρίως στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα.



Συγκριτικά με την καταλάση, η GPx μπορεί πιο αποτελεσματικά να διασπάσει το H_2O_2 σε φυσιολογικές συνθήκες (Antunes et al. 2002).

1.6.1.4 Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

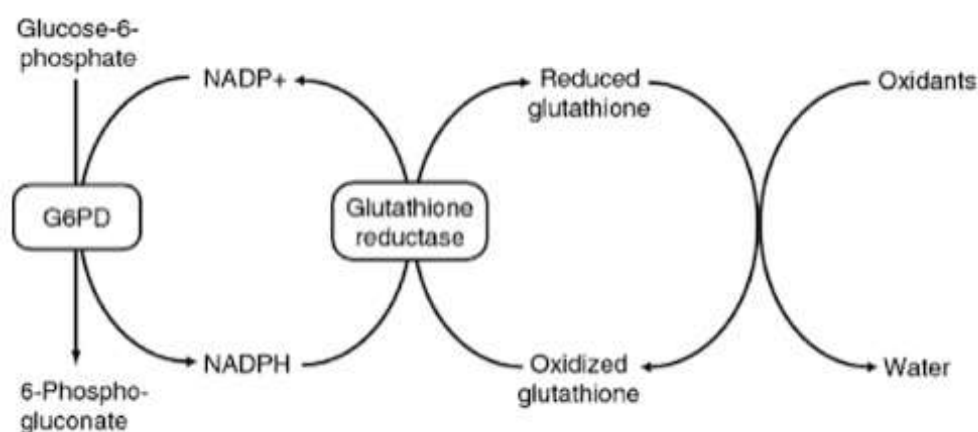
Η αναγωγή της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένης της μορφή (GSH) παρουσία του NADPH, διατηρώντας έτσι την ισορροπία ανάμεσα στις δυο μορφές μέσα στο κύτταρο. Το NADPH ανάγει το συνένζυμο FAD (φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο), που μεταφέρει τα ηλεκτρόνιά του στη δισουλφιδική γέφυρα η οποία συνδέει δύο μόρια GSSG, και έτσι οδηγεί στη διάσπασή τους. Η αντίδραση αυτή παρατίθεται στην Εικόνα 10.



Εικόνα 10: Ανακύκλωση της γλουταθειόνης

1.6.1.5 Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD)

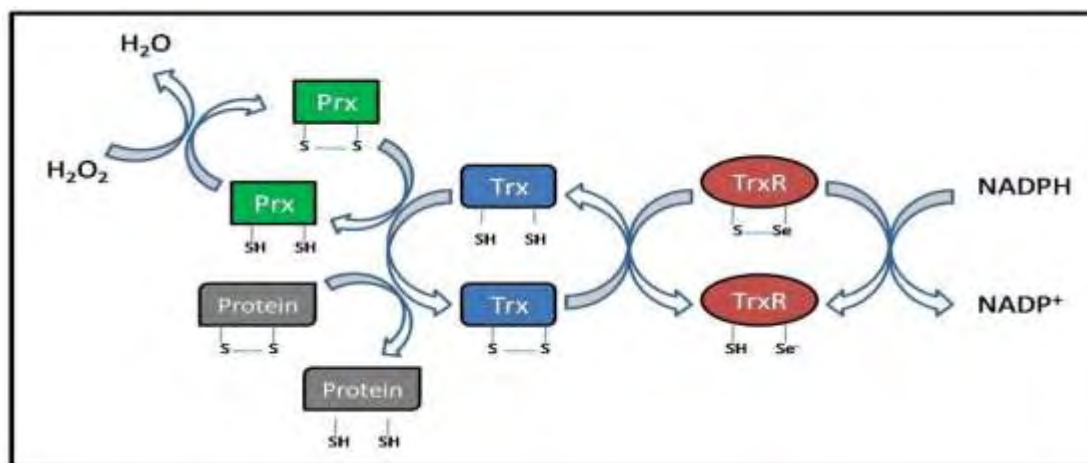
Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) είναι το πρώτο ένζυμο στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών στα ερυθρά αιμοσφαίρια (Kwok et al. 2002). Ο κύριος φυσιολογικός ρόλος αυτής της οδού είναι η παραγωγή του ανηγμένου φωσφορικού δινουκλεοτιδίου νικοτιναμιδίου αδενίνης (NADPH) που είναι απαραίτητο για την προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες (Jablonska-Skwiecinska et al. 1999). Το NADPH διατηρεί τη γλουταθειόνη στην ανηγμένη κατάσταση όταν τα ερυθροκύτταρα υποβάλλονται σε οξειδωτικό στρες (Gaetani et al. 1996). Οι χαμηλές δραστηριότητες της G6PD καθιστούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια ευαίσθητα σε αιμόλυση κάτω από ορισμένες συνθήκες όπως η κατάποση ορισμένων φαρμάκων και σοβαρών λοιμώξεων (Kwok et al. 2002). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 11, η G6PD μετατρέπει την 6-φωσφορική γλυκόζη σε 6-φωσφογλυκονικό ενώ ταυτόχρονα αποτελεί πηγή ανηγμένης γλουταθειόνης για τα ερυθροκύτταρα, παρουσία του αναγωγικού NADPH.



Εικόνα 11: Σύνδεση της G6PD με την αναγέννηση της γλουταθειόνης

1.6.1.6 Περοξειρεδοξίνη (Prx) και Αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR)

Η περοξειρεδοξίνη (Prx) έχει την δυνατότητα αναγωγής τόσο του H_2O_2 , όσο και αλκυλ-υδροϋπεροξειδίων ενώ παράλληλα δρώντας συνδυαστικά με την αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR), μπορούν και ανάγουν τη θειορεδοξίνη και το NADPH (Netto et al. 1996) όπως φαίνεται στο σχήμα της εικόνας 12.



Εικόνα 12: Μηχανισμός δράσης των ενζύμων περοξειρεδοξίνη (Prx) και αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR)

1.6.2 Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Οι μη ενζυμικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν αντιοξειδωτικά μόρια όπως είναι το ουρικό οξύ, τα καροτενοειδή, το σελήνιο, οι βιταμίνες E και C αλλά και η γλουταθειόνη. Κύριος στόχος τους είναι η εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών και η διακοπή της αλυσιδωτής αντίδρασης σχηματισμού δευτερογενών ριζών που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες με παρακείμενα μόρια.

1.6.2.1 Γλουταθειόνη

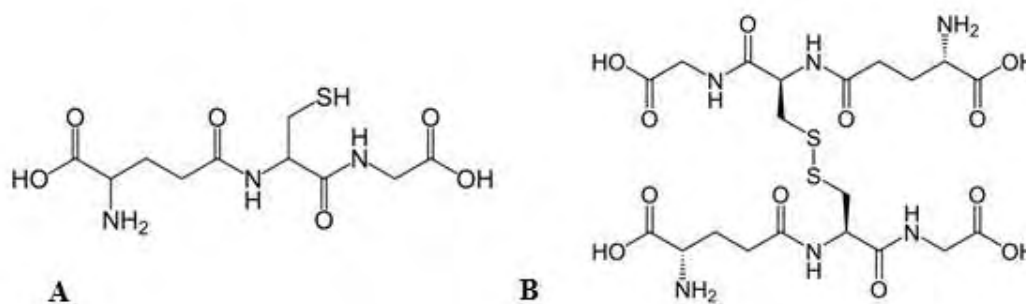
Η γλουταθειόνη είναι ένα από τα πιο καλά μελετημένα αντιοξειδωτικά. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι συντίθεται ενδογενώς και βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα,

σε ορισμένες περιπτώσεις σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις. Αποτελεί την πιο άφθονη θειόλη σε ιστούς ζώων και ανθρώπων και είναι ένα τριπεπίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι έρευνες έχουν επισημάνει ότι η γλουταθειόνη συμμετέχει σε πολλές βιολογικές διεργασίες όπως η αντιοξειδωτική άμυνα, η αποτοξίνωση των ηλεκτροφίλων ξενοβιοτικών, η αποθήκευση και μεταφορά της κυστεΐνης, η ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, η σύνθεση δεοξυριβονουκλεοτιδίων, η διακυτταρική επικοινωνία και η ρύθμιση μεταβολισμού λευκοτριενίου και προσταγλανδίνης (Sen 1999). Εντοπίζεται στον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια και παίζει κομβικό ρόλο σε μεταβολικά μονοπάτια, όπως στο αντιοξειδωτικό σύστημα αερόβιων οργανισμών λόγω των αναγωγικών της ιδιοτήτων ενώ παράλληλα σημαντική είναι η συνεισφορά της στον μεταβολισμό φαρμάκων και ασβεστίου. Άλλες δράσεις της αφορούν την απομάκρυνση των ξενοβιοτικών, τη διατήρηση των επιπέδων των θειολικών ομάδων των πρωτεϊνών, την απομάκρυνση υπεροξειδίων και ελευθέρων ριζών και τη μεταφορά αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών.

Ένας ακόμα σημαντικός ρόλος για τη γλουταθειόνη σχετίζεται με την επίδρασή της στην μεταγωγή σήματος της γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα. Συνοπτικά, τα επίπεδα γλουταθειόνης συνδέονται με δύο βασικούς παράγοντες μεταγραφής, ευαίσθητους στην οξειδοαναγωγή, τον πυρηνικό παράγοντα κB (NF-κB) και την ενεργοποιητική πρωτεΐνη-1 (AP-1) (Sen 1998). Η ενεργοποίηση του NF-κB φαίνεται ότι ρυθμίζεται από τα επίπεδα οξείδωσης των θειολών. Εξαιρετικά υψηλά ή εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης οδηγούν σε μειωμένη ενεργοποίηση αυτών των παραγόντων μεταγραφής καθιστώντας σημαντικό να διατηρούνται σε βέλτιστο επίπεδο τα επίπεδα ενδοκυτταρικής οξειδωμένης γλουταθειόνης στο κύτταρο (Sen 1998).

Συναντάται σε δυο μορφές, την ανηγμένη γλουταθειόνη γνωστή και ως GSH και την οξειδωμένη μορφή (GSSG) που αποτελεί περίπου το 10% της GSH. Ο λόγος της GSH προς την GSSG αξιοποιείται συχνά ως βιοδείκτης οξειδωτικού στρες.

Τέλος, λειτουργεί ως συνένζυμο πολλών ενζύμων όπως είναι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η θειολοτρανσφεράση και η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης.



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

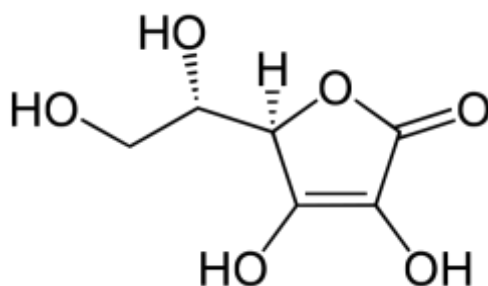
1.6.2.2 Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C, που στη βιβλιογραφία συναντάται και ως ασκορβικό οξύ, είναι ένας δότης ηλεκτρονίων που θεωρείται ένα ισχυρό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό του ανθρώπινου οργανισμού. Αποτελεί μια λακτόνη με 6 άτομα άνθρακα που συντίθεται από γλυκόζη στο ήπαρ των περισσότερων θηλαστικών ειδών, αλλά όχι του ανθρώπου, επομένως είναι απαραίτητη η κατανάλωσή της μέσω της διατροφής (Padayatty et al. 2003).

Οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις της βιταμίνης C έχουν καταδειχθεί σε πολλά πειράματα *in vitro*. Πράγματι, μετά την απώλεια ηλεκτρονίου από το ασκορβικό οξύ, σχηματίζεται μια “ασκορβική” ρίζα που έχει χρόνο ημιζωής 10^{-5} δευτερόλεπτα και είναι αρκετά αδρανής. Αυτή η ιδιότητα εξηγεί γιατί το ασκορβικό θεωρείται ως ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό, καθώς όταν μια ισχυρή και επιβλαβής ρίζα αντιδράσει

με το ασκορβικό, θα δώσει μια νέα ρίζα ασκορβικού που όμως είναι πολύ αδρανής (Buettner & Moseley 1993). Μεταξύ των μορίων που μπορεί να αντιδράσει είναι μόρια που έχουν ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα όπως οι ρίζες O_2^- , OH^- και $ROO\cdot$ αλλά και ουσίες που είναι μεν δραστικές αλλά δεν είναι ελεύθερες ρίζες όπως το υποχλωριώδες οξύ, οι νιτροζαμίνες και το όζον (Padayatty et al. 2003).

Τέλος, σημαντικό στοιχείο της δράσης της είναι η συμβολή της στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος καθώς διευκολύνει την απορρόφηση άλλων θρεπτικών συστατικών, όπως η βιταμίνη E και το σελήνιο (Childs et al. 2001; Palmer et al. 2003).



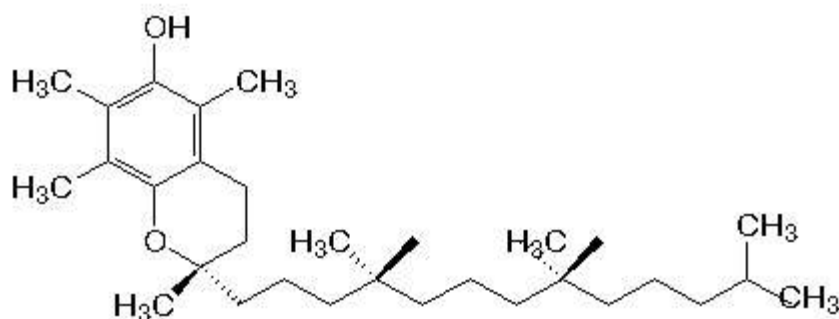
Εικόνα 14: Ο συντακτικός τύπος του ασκορβικού οξέος

1.6.2.3 Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι ένα μόριο που παρεμποδίζει την υπεροξειδωση των λιπιδίων και παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων (Yamauchi 1997). Συντίθεται μόνο από τα φυτά και συνεπώς είναι ένα πολύ σημαντικό διαιτητικό θρεπτικό συστατικό για ανθρώπους και ζώα (Fryer, 1992). Ο όρος βιταμίνη E περιγράφει οκτώ χημικές μορφές (άλφα-, β-, γ- και δ-τοκοτριενόλη και άλφα-, β-, γ- και δ-τοκοφερόλη) αλλά η μορφή α-τοκοφερόλη είναι η πιο δραστική στον άνθρωπο με χαρακτηριστικές αντιοξειδωτικές δραστηριότητες (Yamauchi

1997).

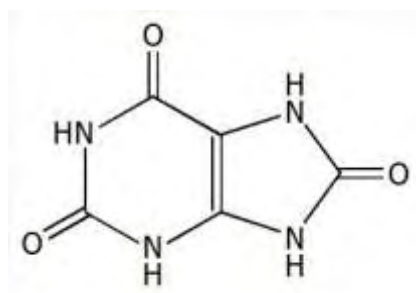
Πρόκειται για μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που μπορεί να συναντηθεί σε οκτώ διαφορετικές μορφές, όπου μεταξύ των οποίων η α-τοκοφερόλη είναι η πλέον δραστική και η πιο ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Καθώς είναι λιποδιαλυτή, ενσωματώνεται στις κυτταρικές μεμβράνες προστατεύοντάς τις από οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες, ενώ παράλληλα προστατεύει τη βιταμίνη Α από οξείδωση (Yamauchi 1997). Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να αναστείλει την παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά τη λιπιδική υπεροξείδωση μέσω του σχηματισμού ρίζας τοκοφερόλης που στη συνέχεια ανάγεται από ένα άλλο αντιοξειδωτικό μόριο (Halliwell & Gutteridge 2015). Η αντιοξειδωτική δράση των τοκοφερολών σχετίζεται με την απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών των ακόρεστων λιπιδίων. Δρα μεταφέροντας αποτελεσματικά ένα άτομο υδρογόνου σε μια ελεύθερη ρίζα λιπιδίων, όπως είναι οι περοξυλικές, αλκοξυλικές και καρβονικές ρίζες δίνοντας το αντίστοιχο μη ριζικό προϊόν του λιπιδίου και μια α-τοκοφεροξυλική ρίζα. Οι ρίζες α-τοκοφεροξυλίου, αφού σχηματιστούν, αντιδρούν με μια δεύτερη ελεύθερη ρίζα ή μεταξύ τους για να σχηματίσουν μία μη ρίζα. Κάθε μόριο της α-τοκοφερόλης καταναλώνει έτσι δύο ελεύθερες ρίζες λιπιδίων και τερματίζει την αλυσιδωτή αντίδραση σχηματισμού ελευθέρων ριζών.



Εικόνα 15: Ο συντακτικός τύπος της βιταμίνης E (α-τοκοφερόλη)

1.6.2.4 Ουρικό οξύ

Σύμφωνα με μελέτες, αντιπροσωπεύει το 50-55% της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Ames et al. 1981). Είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών και γι' αυτό το λόγο μετά από έντονη άσκηση, η οξείδωση των πουρινών μπορεί να οδηγήσει σε υψηλά επίπεδα ουρικού οξέος, όπως έχει φανεί και από εργασία του εργαστηρίου μας (Maiuolo et al. 2016; Stagos et al. 2015). Επίσης εμποδίζει την προ-οξειδωτική δράση του τρισθενούς σιδήρου (Fe^{3+}), τη λιπιδική υπεροξείδωση και την οξείδωση της βιταμίνης C (Settle 2014).

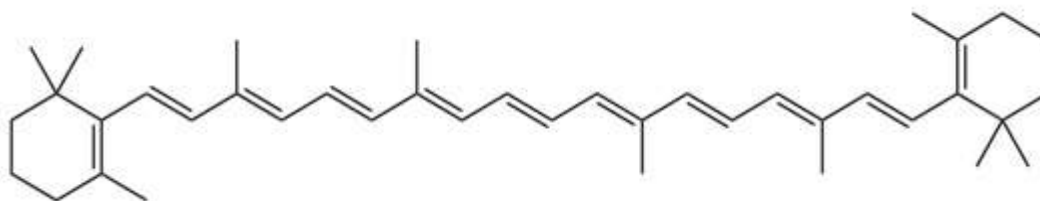
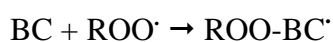


Εικόνα 16: Ο συντακτικός τύπος του ουρικού οξέος

1.6.2.5 Β-καροτένιο

Σημαντικά επιδημιολογικά στοιχεία συνδέουν την υψηλή πρόσληψη του β-καροτενίου με μειωμένο κίνδυνο ανάπτυξης μορφών καρκίνου και καρδιαγγειακών παθήσεων (Liebler & McClure 1996). Πράγματι, το β-καροτένιο θεωρείται από τα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά μόρια καθώς δεσμεύει το μονήρες οξυγόνο (Faller et al. 2001). Βρίσκεται σε κίτρινα και πορτοκαλί φρούτα αλλά και λαχανικά με σκούρο και πράσινο φύλλωμα και είναι το πιο άφθονο καροτενοειδές στα τρόφιμα που καταναλώνει ο άνθρωπος. Η αντιοξειδωτική του δράση έγκειται στην προστασία

έναντι της λιπιδικής υπεροξειδωσης από τις ελεύθερες ρίζες καθώς σαν υδατοδιαλυτό μόριο κατανέμεται στις κυτταρικές μεμβράνες και προστατεύει τα λιπίδια (Halliwell & Gutteridge 2015). Το β-καροτένιο μπορεί επίσης να εξουδετερώσει ρίζες ROO· (Paiva & Russell 1999). Αυτή η δραστηριότητα μπορεί επίσης να παρουσιαστεί από άλλα καροτενοειδή. Η αλληλεπίδραση των καροτενοειδών με τη ρίζα ROO· μπορεί να γίνεται μέσω μιας ασταθούς ρίζας β-καροτενίου.



Εικόνα 17: Ο συντακτικός τύπος του Β-καροτενίου.

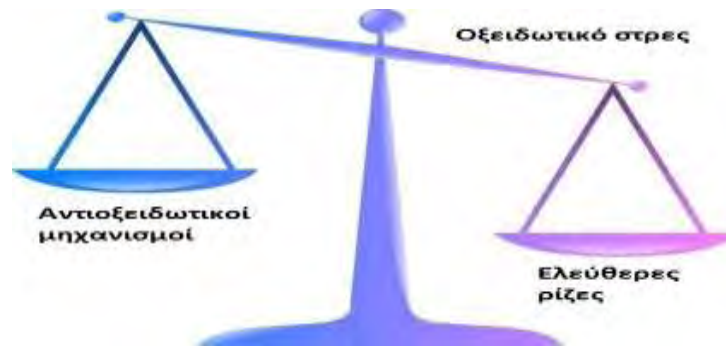
1.7 Οξειδωτικό στρες

Ο όρος αυτός αναφέρεται σε μια κατάσταση διαταραγμένης ισορροπίας μεταξύ ελεύθερων ριζών και αντιοξειδωτικών αποθεμάτων του οργανισμού υπέρ των πρώτων οδηγώντας σε διαταραχή της σηματοδότησης και ελέγχου οξειδοαναγωγής και/ή σε μοριακή βλάβη (Sies & Jones 2007). Αναφέρεται πρώτη φορά στη βιβλιογραφία το 1985 από τον Sies και η εξέλιξη του μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες σε βιομόρια του οργανισμού (λιπίδια, DNA, πρωτεΐνες) μετά από οξείδωσή τους

(Steinbacher & Eckl 2015). Πιο αναλυτικά, σε κατάσταση έντονου οξειδωτικού στρες οι ελεύθερες ρίζες θα προκαλέσουν βλάβη στις βάσεις (πουρίνες και πυριμιδίνες) αλλά και στη D-ριβόζη του μορίου, ενώ στα λιπίδια θα προκληθεί υπεροξειδωση (Halliwell 1994). Παράλληλα, πρωτεΐνες με αμινοξέα όπως αργινίνη, προλίνη, λυσίνη και θρεονίνη είναι πιο ευαίσθητες στην οξείδωση αλλάζοντας τη δομή και τη δράση τους (Stadtman 2015).

Αν η οξειδωτική βλάβη είναι εκτεταμένη, τότε το κύτταρο θα οδηγηθεί σε κυτταρικό θάνατο με απόπτωση ή με άμεση κυτταρική νέκρωση. Ωστόσο, αν είναι περιορισμένη η βλάβη τότε το κύτταρο δύναται να ανακτήσει την πρότερη κατάσταση. Με το οξειδωτικό στρες σχετίζεται μια σειρά ασθενειών όπως είναι ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η αθηροσκλήρυνση, το AIDS, η ηπατίτιδα, η σήψη και νευροεκφυλιστικές παθήσεις (Halliwell 2001). Η εμφάνιση και η εξέλιξη της κατάστασης αυτής που τελικά μπορεί να οδηγήσει σε δυσάρεστες για τον οργανισμό συνέπειες, μπορεί να οφείλεται είτε στην ανεπάρκεια αντιοξειδωτικών μορίων και ενζύμων που παράγονται ενδογενώς ή λαμβάνονται μέσω διατροφής είτε στην εκτεταμένη παραγωγή ROS λόγω άσκησης, έκθεσης σε τοξικούς παράγοντες είτε λόγω ύπαρξης χρόνιας φλεγμονώδους ασθένειας.

Γίνεται αντιληπτό, επομένως, ότι μόλις μια δεκαετία πριν θεωρούνταν ότι το οξειδωτικό στρες και οι ελεύθερες ρίζες είναι επιβλαβείς για τη φυσιολογική λειτουργία των ιστών. Παρ' όλα αυτά, γνωρίζουμε σήμερα ότι είναι απαραίτητη προϋπόθεση για θεμελιώδεις βιολογικές διαδικασίες, όπως η μεταγωγή σήματος. Αυτός είναι ο λόγος για την πρόταση ενός σύγχρονου, αποδεκτού ορισμού του οξειδωτικού στρες από τον Jones το 2006 ως "διακοπή της σηματοδότησης και ελέγχου οξειδοαναγωγής" (Jones 2006).



Εικόνα 18: Οξειδωτικό στρες

1.7.1 Μέθοδοι προσδιορισμού οξειδωτικού στρες

Ιδιαίτερα σημαντικό ζήτημα για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες είναι η έγκυρη και ακριβής εκτίμηση των επιπέδων συγκεκριμένων βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε ένα βιολογικό δείγμα. Ο όρος “βιοδείκτης” είναι ένας ευρύς ορισμός, ο οποίος περιλαμβάνει τόσο τις φυσιολογικές όσο και τις παθογόνες βιολογικές διεργασίες και επίσης τις θεραπευτικές παρεμβάσεις που θα μπορούσαν εύκολα να αντικατασταθούν από θρεπτικές, τοξικολογικές ή κάθε παρέμβαση μεταβολής των επιπέδων οξειδοαναγωγής. Ως βιοδείκτη οξειδοαναγωγής θεωρείται κάθε βιολογική οντότητα η οποία μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια και αναπαραγωγή και είναι: i) αντιοξειδωτικό μόριο (π.χ. GSH, CAT), των οποίων η συγκέντρωση, η δραστητικότητα ή/και η δομή τους μεταβάλλονται μετά από αλληλεπίδραση με δραστικά είδη, ii) τα προϊόντα των επιβλαβών επιδράσεων αντιδρώντων ειδών σε βιομόρια (π.χ., καρβονύλια πρωτεϊνών, μαλονδιαλδεύδη ως προϊόν οξείδωσης λιπιδίων), iii) τα ίδια τα δραστικά είδη (Veskoukis et al. 2018).

Η επιλογή των κατάλληλων βιοδεικτών για την εξαγωγή συμπερασμάτων σε μια μελέτη είναι υψίστης σημασίας. Μια μελέτη είναι απαραίτητο να επικεντρωθεί σε βιοδείκτες, οι οποίοι αντικειμενικά αντικατοπτρίζουν μια βιολογική κατάσταση ή

φαινόμενο και κατόπιν να τις ομαδοποιούν ανάλογα με τη λειτουργία τους ενισχύοντας την ικανότητά τους να παρέχουν μηχανιστικές απαντήσεις. Η εγκυρότητα και η ακρίβεια καθώς και η γρήγορη και οικονομικά αποδοτική χρήση αποτελούν σημαντικά δεδομένα επιλογής των κατάλληλων βιοδεικτών (Veskoukis et al. 2018).

1.7.2 Μέτρηση Αντιοξειδωτικών αποθεμάτων και δραστηριότητας

1.7.2.1 Εκτίμηση της ενζυμικής δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων

Τα κύτταρα περιέχουν μεγάλο αριθμό αντιοξειδωτικών για την πρόληψη ή την επιδιόρθωση της βλάβης που προκαλείται από το ROS, καθώς και για τη ρύθμιση των οδών σηματοδότησης που είναι ευαίσθητες στην οξειδοαναγωγή. Τα γενικά πρωτόκολλα που περιγράφονται για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής ενζυμικής δραστηριότητας περιλαμβάνουν τη SOD, τη CAT και τη GPx. Τα ένζυμα SOD μετατρέπουν τη ρίζα $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 και O_2 , ενώ η CAT και οι υπεροξειδάσες μετατρέπουν το H_2O_2 σε H_2O . Με αυτό τον τρόπο, δύο τοξικά είδη, η ρίζα $O_2^{\cdot-}$ και το H_2O_2 , μετατρέπονται στο αβλαβές προϊόν του προϊόντος. (Hajizadeh Maleki et al. 2017; Delwing-de Lima et al. 2017). Επίσης, στο σύστημα γλουταθειόνης, η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και η αφυδρογονάση της γλυκόζης-6-φωσφορικής (G-6-PD) δεν δρουν απευθείας στο ROS, αλλά επιτρέπουν τη λειτουργία του GPx. Γενικότερα το SOD και η CAT δεν χρειάζονται συν-παράγοντες για να λειτουργήσουν, ενώ η GPx όχι μόνο απαιτεί πολλούς συν-παράγοντες και πρωτεΐνες αλλά έχει επίσης πέντε ισοένζυμα.

Η πιο σημαντική παράμετρος που προσδιορίζει τη βιολογική επίδραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι η δραστηριότητα. Επειδή η έκφραση του mRNA κάποιου αντιοξειδωτικού ενζύμου ή πρωτεΐνης δεν οδηγεί απαραίτητα σε αύξηση

της δραστηριότητας, χρησιμοποιούνται ενζυματικές δοκιμασίες και φυσικά πηκτώματα (native gels) για τη μέτρηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Czaja et al. 1994; Weydert & Cullen 2010)

1.7.2.2 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

Έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι προσδιορισμού της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) σε ένα βιολογικό δείγμα (Ashton et al. 1998). Οι φωτομετρικές μέθοδοι βασίζονται κυρίως στην εξουδετέρωση μιας ρίζας (συνήθως DPPH και ABTS) από τα αντιοξειδωτικά του οργανισμού, στην αναγωγή το ιόντων όπως είναι ο Fe^{3+} (μέθοδος FRAP) και ο Cu^{2+} (μέθοδος CUPRAC), στην ικανότητα να σβήνουν ρίζες OH^{\cdot} που παράγονται από ένα σύστημα τύπου Fenton που βασίζεται σε Co(II) (μέθοδος HORAC). Επίσης υπάρχουν ηλεκτροχημικές (με Κυκλική Βολταμετρία και Αμπερομετρία) και χρωματογραφικές [με Αέρια Χρωματογραφία (GC) και Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)] μέθοδοι προσδιορισμού της TAC (Pisoschi & Petre Negulescu 2012).

1.7.2.3 Προσδιορισμός αντιοξειδωτικών

Ένας πολύ συνηθισμένος τρόπος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού είναι η μέτρηση των θειολών στην ανηγμένη τους μορφή. Πιο συγκεκριμένα, ο προσδιορισμός της GSH που αποτελεί το πιο σημαντικό μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό και μια άκρως σημαντική θειόλη στο ανθρώπινο σώμα είναι μια γνωστή, έγκυρη και συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες (Townsend et al. 2003; Dickinson & Forman 2002). Πολύ συχνά επίσης μετράται ο λόγος GSH/GSSG που αντικατοπτρίζει την ανηγμένη προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη καθώς οι ελεύθερες ρίζες επάγουν την οξείδωση της GSH σε GSSG (Svensson et al. 2002). Μια ακόμα σημαντική θειόλη του πλάσματος είναι

η αλβουμίνη ανθρώπινου ορού (HSA), η οποία όχι μόνο αποτελεί την πιο αφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος (περίπου το 50% των πρωτεϊνών) αλλά διαθέτει μια ελεύθερη σουλφυδρυλομάδα στο μόριό της η οποία αντιστοιχεί στο 80% των ελεύθερων θειολών του πλάσματος (Roche et al. 2008). Η ελεύθερη σουλφυδρυλομάδα οξειδώνεται από τις ελεύθερες ρίζες δίνοντας διμερή αλβουμίνης (Alvarez et al. 1999; Turell et al. 2009; Carballal et al. 2003). Η μέτρηση του λόγου της ανηγμένης προς την οξειδωμένη μορφή της HSA αποτελεί έναν ακόμα δείκτη εκτίμησης των επιπέδων οξειδωτικού στρες (Kuwahata et al. 2017; Lamprecht et al. 2008).

1.7.2.4. Εκτίμηση εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών σε βιολογικό δείγμα

Μια ακόμα προσέγγιση αναφορικά με την προσπάθεια εκτίμησης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ενός δείγματος είναι ο προσδιορισμός των επιπέδων εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών. Συγκεκριμένα, προστίθεται ή σχηματίζεται μια ελεύθερη ρίζα στο ύπο εξέταση δείγμα και μελετάται η ικανότητα των αντιοξειδωτικών μορίων του οργανισμού να την ανάγουν. Στην διατριβή αυτή, οι ελεύθερες ρίζες οι οποίες μελετήθηκαν ως προς τα επίπεδα εξουδετέρωσής τους είναι οι ρίζες O_2^- και OH^- (Liu et al. 2009; Oowada et al. 2012; Noda et al. 1997).

1.7.3. Προσδιορισμός οξειδωτικών βλαβών σε βιομόρια (πρωτεΐνες, λιπίδια, DNA)

Είναι μια προσέγγιση που δίνει σημαντικές πληροφορίες για την έκταση των βλαβών που προκαλούν οι δραστικές μορφές στα βιομόρια του οργανισμού σε κατάσταση οξειδωτικού στρες. Αρχικά, ο σχηματισμός των καρβονυλικών ομάδων

(αλδεϋδες και κετόνες) γίνεται κυρίως σε αμινοξέα που είναι ευπαθή σε οξείδωση όπως η αργινίνη, η προλίνη, η λυσίνη και η θρεονίνη (Renke et al. 2000; Levine 2002) με τελική κατάληξη της διαδικασίας αυτής να είναι η διάσπαση των καρβονυλιωμένων πρωτεϊνών από το πρωτεάσωμα και τα λυσοσώματα, καθώς πρόκειται για μη αναστρέψιμη διαδικασία (Suzuki et al. 2010). Υψηλά επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων αντιπροσωπεύουν μια κατάσταση όπου επικρατεί έντονο οξειδωτικό στρες (Levine 2002; Hopps & Caimi 2013). Αντίστοιχα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος προσδιορισμού των οξειδωτικών βλαβών η οξείδωση των αμινοξέων (Leeuwenburgh et al. 1999).

Μια ακόμα προσέγγιση αποτελεί η υπεροξείδωση των λιπιδίων των μεμβρανών ή των λιπαρών οξέων. Η προσέγγιση αυτή αφορά τον προσδιορισμό σχηματιζόμενων από τη λιπιδική υπεροξείδωση πρωτογενών προϊόντων και συγκεκριμένα των συζευγμένων διενίων ή των λιπιδικών υδροϋπεροξειδίων αλλά και άλλων προϊόντων που είναι δευτερογενή προϊόντα οξείδωσης, όπως η μαλονδιαλδεϋδή (MDA), τα F₂-ισοπροστανία, το αιθάνιο, το πεντάνιο, ή το εξάνιο. Η MDA αποτελεί το συνηθέστερο μόριο προσδιορισμού και εκτίμησης των επιπέδων λιπιδικής υπεροξείδωσης. Προσδιορίζεται μετά την αντίδρασή της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), σχηματίζοντας σύμπλοκο το οποίο μετρείται φωτομετρικά στα 532nm στη μέθοδο των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS). Το σύμπλοκο TBA-MDA μπορεί να προσδιοριστεί επίσης με HPLC. Μια ακόμα προσέγγιση που αφορά την εκτίμηση των επιπέδων οξείδωσης των λιπιδίων και της επακόλουθης οξειδωτικής βλάβης, αφορά τον προσδιορισμό των F₂-ισοπροστανίων (Milne et al. 2005; Veskoukis et al. 2016).

1.9 Άσκηση και οξειδωτικό στρες

Η σχέση μεταξύ του είδους και της έντασης της άσκησης με την παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι άμεση και έχει αναφερθεί στο παρελθόν (Steinbacher & Eckl 2015). Η πραγματοποίηση έντονης άσκησης έχει ως επακόλουθο την ευρεία παραγωγή ελευθέρων ριζών σε βαθμό που να μην μπορεί να αντιμετωπιστεί επαρκώς από την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού και να οδηγήσει σε βλάβες σε βιομόρια (Palmer et al. 2003).

Γενικότερα, η άσκηση (αερόβια και αναερόβια) έχει συσχετιστεί με ενθαρρυντικές και θετικές επιδράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα, το μεταβολισμό και το μυϊκό σύστημα καθώς συνδέεται με μείωση της πίεσης του αίματος, βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ και μείωση της λιπώδους μάζας (Booth et al. 2000; Inayama et al. 1996). Παράλληλα, η άσκηση οδηγεί σε παραγωγή ελευθέρων ριζών κάτι που συχνά αποτελεί δίκικοπο μαχαίρι καθώς η έντονη άσκηση μπορεί να επάγει το οξειδωτικό στρες, ωστόσο, συχνή και χαμηλής έντασης άσκηση βοηθάει στην ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών μηχανισμών μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών έχοντας ως αποτέλεσμα καλύτερο αντιοξειδωτικό προφίλ και εμφάνιση προσαρμογών (Steinbacher & Eckl 2015; Stupka et al. 2001; Melikoglu et al. 2008; Stagos et al. 2014; Stagos et al. 2015; Kerasioti et al. 2012; Veskoukis et al. 2010).

1.9.1 Αερόβια άσκηση-Επιδράσεις στην παραγωγή ελευθέρων ριζών

Η έντονη αερόβια άσκηση ή η άσκηση αντοχής είναι γνωστό ότι προκαλούν υπερπαραγωγή των ROS και NOS λόγω του αυξημένου μεταβολισμού, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες και σχετικούς τραυματισμούς (Reichhold et al. 2009). Έχει υπολογιστεί ότι κατά την αερόβια άσκηση, αυξάνεται 1-3 φορές ο αριθμός των ριζών

O_2^- κατά τη διάρκεια της συστολής των μυών (Sakellariou et al. 2014). Ωστόσο, τα μιτοχόνδρια αντιπροσωπεύουν μόνο ένα μικρό ποσοστό της παραγωγής ριζών O_2^- κατά τη διάρκεια της αερόβιας άσκησης (Sakellariou et al. 2014). Το ποσοστό αυτό σε παλαιότερες εργασίες αναφέρονταν ότι ήταν της τάξης του 2-4% των συνολικών μορίων του οξυγόνου που καταναλώθηκαν, ωστόσο νεότερες μελέτες περιορίζουν το ποσοστό αυτό περίπου στο 0,15% (Steinbacher & Eckl 2015). Η παραγωγή ελευθέρων ριζών μετά από αερόβια άσκηση από τα μιτοχόνδρια, έγκειται στην χρήση του O_2 ως δέκτη e^- από τους οργανισμούς προκειμένου να γίνει η οξείδωση μεταβολικών υποστρωμάτων. Καθώς κατά τη διάρκεια αερόβιας άσκησης αυξάνεται η κατανάλωση οξυγόνου (VO_2), γίνεται σαφές πως θα αυξηθεί και ο αριθμός και η δραστικότητα των ελευθέρων ριζών.

Γενικότερα, οι συστολικές δραστηριότητες μεταβάλλουν την κατάσταση οξειδοαναγωγής στους μύες προς μια περισσότερο οξειδωτική κατάσταση, οδηγώντας σε μείωση του λόγου $NADH/NAD^+$. Η μείωση της αναλογίας $NADH/NAD^+$ συνδέεται με την ελάττωση της απελευθέρωσης O_2^- από το σύμπλοκο I (Sakellariou et al. 2014). Επίσης, κατά τη διάρκεια άσκησης αντοχής, το ATP διασπάται για να απελευθερώσει ενέργεια και να υποστηρίξει τη συνεχή συστολή των μυών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, σχηματίζεται AMP που μπορεί να αποικοδομηθεί περαιτέρω σε υποξανθίνη, ξανθίνη και ουρικό οξύ μέσω βιοχημικής διεργασίας που περιλαμβάνει την οξειδάση της ξανθίνης. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, η οξειδάση της ξανθίνης διεγείρει σχηματισμό O_2^- χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο (Fatouros & Kouretas 2010).

Επιπλέον, η οξειδωτική έκρηξη που επάγεται από τα λευκοκύτταρα είναι ένας αποτελεσματικός μηχανισμός για την καταπολέμηση των μικροβίων κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και συνοδεύεται από ευρεία παραγωγή ROS (Fatouros & Kouretas

2010). Ωστόσο, έχει δημοσιευτεί πως η μακροχρόνια άσκηση αντοχής μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ικανότητα παραγωγής λευκοκυττάρων από την ROS, με αποτέλεσμα την αυξημένη ευαισθησία σε μολυσματικές ασθένειες στους αθλητές (Nielsen et al., 2004). Ως αποτέλεσμα της εκταταμένης παραγωγής ελευθέρων ριζών, παρατηρείται αυξημένη υπεροξειδωση των λιπιδίων και η οξειδωτική βλάβη του DNA μετά από μία περίοδο εντατικής άσκησης (Alessio et al. 2000; Stagos et al. 2015; Steinbacher & Eckl 2015; Varamenti et al. 2013).

1.9.2 Αναερόβια άσκηση-Επιδράσεις στην παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι μηχανισμοί οξειδοαναγωγής κατά την διάρκεια μιας αναερόβιας άσκησης έχουν διερευνηθεί σε ποικίλα μοντέλα άσκησης, όπως εκγύμναση με σπριντ, καθώς και ισομετρικές και έκκεντρες ασκήσεις (Stagos et al. 2015; Nikolaidis, Kyparos, et al. 2007).

Σε αντίθεση με άλλες ασκήσεις, τα σπριντ βασίζονται κυρίως στις αναερόβιες ενεργειακές διαδρομές λόγω της υψηλής ζήτησης ενέργειας. Κατά τη διάρκεια ενός σπριντ, παράγεται ένα μικρό τμήμα (0,15%) του O_2^- στα μιτοχόνδρια (St-Pierre et al., 2002). Ωστόσο, σε σύγκριση με την αερόβια άσκηση, η παραγωγή O_2^- στα μιτοχόνδρια των σκελετικών μυών είναι σαφώς μικρότερη και μπορεί να αποδοθεί σε σχετικά χαμηλές ποσότητες κατανάλωσης οξυγόνου και στην αυξημένη κατανάλωση ADP κατά τη διάρκεια ενός σπριντ (Herrero & Barja 1997).

Επιπρόσθετα, η ενεργοποίηση της οξειδάσης της ξανθίνης που προκαλείται σε καταστάσεις ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, θεωρείται ως ένας άλλος σημαντικός παράγοντας για την παραγωγή ROS (Steinbacher & Eckl 2015; Fatouros & Kouretas 2010). Η εντατική άσκηση επιταχύνει την αποικοδόμηση του ATP, οδηγώντας σε

αυξημένο σχηματισμό AMP, υποξανθίνης, ξανθίνης και ουρικού οξέος. Συγκεκριμένα, τα αυξημένα επίπεδα ξανθίνης διευκολύνουν την παραγωγή ROS από την οξειδάση της ξανθίνης, επιδεινώνοντας έτσι το οξειδωτικό στρες στην αναερόβια άσκηση (Radak et al. 2013).

Τέλος σημαντικό ρόλο στην παραγωγή ελευθέρων ριζών μετά από αναερόβια άσκηση παίζουν οι οξειδάσες NADPH (NOX). Πρόκειται για ένζυμα φλαβοπρωτεϊνών που ενεργοποιούνται από ασβέστιο, ελεύθερα λιπαρά οξέα, αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις και χρησιμοποιούν NADPH ως δότες ηλεκτρονίων (Bedard & Krause 2007). Έχει τεκμηριωθεί ότι τα μέλη της οικογένειας NOX συμβάλλουν στην παραγωγή κυτοσολικού O_2^- σε σκελετικούς μύες τόσο σε ηρεμία όσο και κατά τη διάρκεια της συστολικής δραστηριότητας σε μεγαλύτερη έκταση από τα μιτοχόνδρια (Sakellariou et al. 2014).

1.10 Ασκησιογενής φλεγμονή

Η ασκησιογενής φλεγμονή σχετίζεται με το μυϊκό πόνο ή τη δυσφορία και την έντονη πτώση της μυϊκής δύναμης κατά τη διάρκεια των πρώτων 12-72 ωρών μετά την άσκηση, ανάλογα με το μέγεθος της άσκησης και με τη διάσπαση των υποκυτταρικών δομών (Paulsen et al. 2012). Παρόλο που το φαινόμενο αυτό περιγράφηκε ήδη από το πρώτο μισό του 20ού αιώνα (Asmussen 1956), οι ακριβείς μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται η μυϊκή βλάβη δεν είναι πλήρως κατανοητοί.

Η εμφάνιση φλεγμονής ακολουθεί αμέσως μετά την πραγματοποίηση άσκησης όπου διαταράσσονται τα σαρκομέρια, οι κυτταροσκελετικές δομές που σχετίζονται με τη μετάδοση δύναμης, η κυτταρική μεμβράνη και η παραγωγή δύναμης. Η βλάβη της μεμβράνης των μυϊκών ινών προκαλεί επίσης εισροή

εξωκυτταρικών ουσιών (π.χ. αλβουμίνη και ινωδονεκτίνη) (Givli 2015; Cramer et al. 2004). Η αυξημένη διαπερατότητα της μεμβράνης έχει συνδεθεί με τη διέγερση διαύλων νατρίου και ασβεστίου σε απόκριση της επαναλαμβανόμενης τάνυσης των μυϊκών ινών με την επιμήκυνση των συστολών. Παράλληλα, παρατηρείται συσσώρευση φλεγμονωδών κυττάρων (λευκοκύτταρα) και προ-φλεγμονωδών πρωτεϊνών όπως και αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (Allen et al. 2010) .

Η μυϊκή βλάβη οδηγεί σε κινητοποίηση των τοπικών λευκοκυττάρων στον τραυματισμένο μυϊκό ιστό. Ο πρώτος υποπληθυσμός λευκοκυττάρων που διεισδύει τον τραυματισμένο μυ είναι τα ουδετερόφιλα μέσα σε 4-6 ώρες μετά την άσκηση και παραμένει αυξημένος έως και 48 ώρες μετά τον τραυματισμό (Raastad et al. 2003). Η διείσδυση μακροφάγων στον τραυματισμένο μυ ακολουθεί τις επόμενες ημέρες μετά τον τραυματισμό ανάλογα με το μέγεθος της προσβολής (Hamada et al. 2005; Sciorati et al. 2010). Η αποστολή των λευκοκυττάρων είναι η απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμάτων όπως τα κατεστραμμένα πρωτεϊνικά μόρια με την απελευθέρωση των δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου κατά τη διάρκεια μιας διαδικασίας που ονομάζεται αναπνευστική έκρηξη.

Επιπρόσθετα, παράγονται πρωτεολυτικά ένζυμα και προφλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως η IL-1β, IL-6, IL-8 και ο TNF-α έως και 5 ημέρες μετά την άσκηση από κύτταρα του ανοσοποιητικού ή και από κατεστραμμένα μυϊκά κύτταρα που προσελκύουν τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα μέσω της κυκλοφορίας στο σημείο της φλεγμονής (Fatouros & Jamurtas 2016). Αρχικά, οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες προκαλούν τη διέγερση της γονιδιακής έκφρασης μορίων προσκόλλησης (VCAM-1, CINC-1, MCP-1) και την έκφραση της συνθετάσης του οξειδίου του αζώτου. Παράλληλα προσδένονται σε υποδοχείς μεμβρανών και προκαλούν την ενεργοποίηση ενζύμων που σχετίζονται με την παραγωγή ROS όπως η κυκλοξυγενάση 2 (COX-2),

η οξειδάση της ξανθίνης και η οξειδάση του NADPH η οποία αξιοποιείται από τα μακροφάγα κατά τη φαγοκυττάρωση και μετατρέπει το O_2 σε O_2^- . Συνεπώς αυξάνεται η παραγωγή οξειδωτικών μορίων και μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες (Fatouros & Kouretas 2010). Μάλιστα, πρόσφατες ενδείξεις υποδεικνύουν ότι αυτή η φλεγμονώδης φάση μπορεί να είναι υπό οξειδοαναγωγική ρύθμιση μέσω της διαμεσολάβησης βασικών ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών όπως αυτή των NF-κB και MAPK που ελέγχουν τη σύνθεση των κυτοκινών και την ανοσοποιητική ενεργοποίηση (Sakelliou et al. 2016).

Αξίζει να αναφερθεί ότι η οξεία φλεγμονώδης απόκριση μετά από άσκηση αυξάνει τους αριθμούς των λευκοκυττάρων όχι μόνο μέσα στο μυ αλλά και στην κυκλοφορία υποδηλώνοντας ότι η μυική βλάβη προκαλεί συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση. Ωστόσο, το φαινόμενο είναι εντονότερο όταν προηγείται έκκεντρη άσκηση συγκριτικά με την ομόκεντρη και την ισομετρική. Αυτές οι συστηματικές ανοσολογικές μεταβολές συνοδεύονται από μεταβολές στα επίπεδα κυκλοφορίας των προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως IL-1β και TNF-α (Toft et al. 2002; Sakelliou et al. 2016), που δείχνουν ότι η μυική βλάβη μπορεί να προκαλέσει έκκριση κυτοκινών από τα ανοσοκύτταρα και όχι μόνο από τα μυικά κύτταρα. Είναι χαρακτηριστικό, ότι μετά από εκτεταμένη μυική βλάβη, η IL-6, που παράγεται επίσης από τους σκελετικούς μύες μπορεί να παραμείνει σε υψηλά επίπεδα ακόμη και μετά την ολοκλήρωση της φλεγμονώδους φάσης καθώς έχει εμπλακεί στην ενεργοποίηση δορυφορικών κυττάρων κατά τη φάση αναγέννησης (Sakelliou et al. 2016; Phillips et al. 2003) και στην απελευθέρωση αντιφλεγμονωδών μορίων, όπως η κορτιζόλη, η IL-1ra και η IL-10 (Petersen & Pedersen 2005). Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η μυική βλάβη προκαλεί τόσο τοπικές όσο και συστηματικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις.

Μετά από έναν εκτεταμένο τραυματισμό ο σκελετικός μυς μπορεί να οδηγηθεί σε αναγέννηση και αποθεραπεία. Η αναγέννηση των μυών συνήθως ξεκινά τις πρώτες 4-5 ημέρες μετά τον τραυματισμό, κορυφώνεται 2 εβδομάδες μετά και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά και παύει να υπάρχει 3-4 εβδομάδες μετά. Πρόκειται για μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση/πολλαπλασιασμό των δορυφορικών κυττάρων, την επιδιόρθωση και την ωρίμανση των κατεστραμμένων μυϊκών ινών και του σχηματισμού μυϊκού ιστού (Laumonier & Menetrey 2016). Αυτή η φάση χαρακτηρίζεται από μια έντονη αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης στο μυ (Smith et al. 2008). Μετά την ενεργοποίησή τους τα δορυφορικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν έναν πληθυσμό μυοβλαστών που μπορούν είτε να διαφοροποιηθούν για την αποκατάσταση των κατεστραμμένων ινών είτε, για ένα μικρό ποσοστό, να ανανεωθούν για να διατηρήσουν δορυφορικά κύτταρα για πιθανές μελλοντικές απαιτήσεις αναγέννησης μυών (Laumonier & Menetrey 2016). Οι φάσεις φλεγμονής και αναγέννησης συνδέονται άμεσα και η διαταραχή της πρώτης μπορεί να παρεμποδίσει τη δεύτερη καθώς η αφαίρεση των κυτταρικών υπολειμάτων αποτελεί προϋπόθεση για την επακόλουθη αναγέννηση των τραυματισμένων μυϊκών ινών (Gomez-Cabrera et al. 2005). Απόδειξη είναι ότι η καταστολή της φλεγμονώδους φάσης πιθανώς μέσω της χορήγησης αντιοξειδωτικών μετά από την πραγματοποίηση άσκησης μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη αναγέννηση ή αποθεραπεία κατά τη διάρκεια της φάσης αναγέννησης (Sakelliou et al. 2016).

Σκοπός της μελέτης

Η συσχέτιση του οξειδωτικού στρες με αρκετές παθοφυσιολογικές καταστάσεις στον οργανισμό έχει καταστήσει επιτακτική την ενδεδειγμένη μελέτη και παρακολούθηση του φαινομένου σε ζωντανούς οργανισμούς και δη σε ανθρώπους. Ωστόσο, είναι γεγονός ότι οι περισσότεροι εκ των βιοδεικτών εκτίμησης του οξειδωτικού στρες και των αντίστοιχων που εκτιμούν την οξειδοαναγωγική κατάσταση ενός οργανισμού απαιτούν χρόνο, σχετικά μεγάλη ποσότητα βιολογικού δείγματος για την πραγματοποίησή τους ενώ είναι αρκετά κοστοβόρες. Επομένως, ο σχεδιασμός μιας συσκευής που θα βοηθάει έναν ερευνητή σε μια πιο άμεση και οικονομική εκτίμηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες/οξειδοαναγωγικής κατάστασης ενός ασθενούς κρίνεται αναγκαία.

Προς αυτή την κατεύθυνση, η εταιρία Luoxis ανέπτυξε το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS και υποστήριξε την παρούσα μελέτη αναφορικά με την εξέταση της αξιοπιστίας του μηχανήματος αυτού κατά τη μέτρηση του οξειδοαναγωγικού προφίλ ανθρώπων κάτω από φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές συνθήκες. Για το σκοπό αυτό δείγματα ασθενών με σήψη, μεταβολικό σύνδρομο και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 καθώς και υγιών ερασιτεχνών και επαγγελματιών αθλητών συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν. Οι τιμές που λήφθηκαν από τις μετρήσεις με το προαναφερθέν μηχάνημα συγκρίθηκαν με τα επίπεδα των ευρέως χρησιμοποιούμενων βιοδεικτών οξειδωτικού στρες και οξειδοαναγωγικής κατάστασης για την εκτίμηση της αξιοπιστίας του.

Ταυτόχρονα, ιδιαίτερο βάρος δόθηκε στη μελέτη της μεταβολής των επιπέδων του οξειδωτικού στρες μεταξύ αθλούμενων ανάλογα με τον τύπο της άσκησης και το αθλητικό ιστορικό τους. Το μείζον ερώτημα που μας απασχολούσε ήταν η εξέταση των ατομικών μεταβολών στους βιοδείκτες εκτίμησης οξειδωτικού στρες και

οξειδοαναγωγικής κατάστασης και η ανάλυση των παραγόντων που τις καθορίζουν. Οι απαντήσεις από τα ερωτήματα αυτά θεωρούνταν σημαντικές καθώς θα μπορούσαν να ξεκαθαρίσουν ένα θολό τοπίο σχετικά με την ενδεδειγμένη εξωγενή παρέμβαση και τον τρόπο με τον οποίο πρέπει να γίνεται η προσέγγιση, εξατομικευμένα και όχι ομαδικά, έτσι ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή αποκατάσταση.

Συνοπτικά, λοιπόν, τα ζητήματα που κληθήκαμε να εξετάσουμε κατά τη διάρκεια της παρούσας έρευνας ήταν τα εξής:

- 1) Αξιοπιστία ως προς τη χρήση του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS σε παθοφυσιολογικές συνθήκες.
- 2) Αξιοπιστία ως προς τη χρήση του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS σε φυσιολογικές συνθήκες και ειδικότερα σε αθλούμενους.
- 3) Εξατομικευμένη ή ομαδική προσέγγιση στη μελέτη της οξειδοαναγωγικής κατάστασης μίας ομάδας ανθρώπων μετά την εκτέλεση άσκησης ή γενικότερα αθλητικής δραστηριότητας.
- 4) Επίδραση του αθλητικού ιστορικού/υπόβαθρου στην οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων μετά από άσκηση.
- 5) Μελέτη του φαινομένου του αναγωγικού στρες σε άτομα μετά από άσκηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Γενικές πληροφορίες

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες που αποσκοπούσαν όχι μόνο στην εκτίμηση της οξειδωτικής βλάβης αλλά και στον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των βιολογικών δειγμάτων. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα πλάσματος και ερυθροκυτταρικού αιμολήματος μετά την εκτέλεση της διαδικασίας διαχωρισμού του αίματος.

Αναφορικά, οι μετρήσεις αυτές ήταν οι εξής:

Στο πλάσμα:

- 1) Προσδιορισμός του static oxidation-reduction potential (sORP) με τη βοήθεια του RedoxSYS.
- 2) Προσδιορισμός του capacity oxidation-reduction potential (cORP) με τη βοήθεια του RedoxSYS.
- 3) Προσδιορισμός των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB) φασματοφωτομετρικά.
- 4) Προσδιορισμός των επιπέδων των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) φασματοφωτομετρικά.
- 5) Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) φασματοφωτομετρικά.
- 6) Προσδιορισμός των επιπέδων εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$) φασματοφωτομετρικά.
- 7) Προσδιορισμός των επιπέδων εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου (OH^{\cdot}) φασματοφωτομετρικά.

- 8) Προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης (ισχύος) μέσω της αναγωγής του Fe (III) σε Fe (II) φασματοφωτομετρικά.
- 9) Προσδιορισμός των επιπέδων μαλονδιαλδεύδης (MDA) με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC-DAD)
- 10) Προσδιορισμός των επιπέδων της οξειδωμένης αλβουμίνης με ανάλυση western

Στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα:

- 1) Προσδιορισμός των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) φασματοφωτομετρικά.
- 2) Προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης (CAT) φασματοφωτομετρικά.

2.2 Διαχωρισμός δείγματος αίματος σε πλάσμα και ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

Κατά την πραγματοποίηση των πειραμάτων, λήφθηκε φλεβικό αίμα από τον βραχίονα όλων των συμμετεχόντων. Για τη μέτρηση των βιοδεικτών του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (sORP & cORP) το δείγμα αίματος συλλέχτηκε σε σωληνάρια με ηπαρίνη, ενώ για την ανάλυση όλων των υπολοίπων βιοδεικτών τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάρια με EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ). Η διαδικασία συλλογής, διαχωρισμού και αποθήκευσης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε ακριβώς όπως αναφέρεται σε δημοσιευμένη εργασία του εργαστηρίου μας (Stagos et al. 2015).

Αναλυτικά, τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- 1) Συλλογή του αίματος και διαχωρισμός σε σωληνάρια με EDTA και ηπαρίνη.

- 2) Φυγοκέντρωση (1.370 g, 10 λεπτά, 4°C) για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός του πλάσματος.
- 3) Συλλογή του πλάσματος, τοποθέτησή του σε σωληνάρια (eppendorf) και αποθήκευση σε θερμοκρασία -80°C.
- 4) Μετά τη συλλογή του πλάσματος ακολουθεί λύση των ερυθροκυττάρων με χρήση απεσταγμένου νερού (dH₂O) σε αναλογία 1:1 και πραγματοποίηση έντονης ανάδευσης.
- 5) Φυγοκέντρωση (4.020 g, 15 λεπτά 4°C).
- 6) Συλλογή του υπερκείμενου που είναι το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, τοποθέτησή του σε σωληνάρια (eppendorf) και αποθήκευση σε θερμοκρασία -80°C.

2.3 Πρωτόκολλα μέτρησης στο πλάσμα

2.3.1 Βιοδείκτες προσδιορισμού της οξειδοαναγωγικής κατάστασης [sORP & cORP] από το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS]

2.3.1.1 Διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS της εταιρίας Luoxis

Στα πλαίσια της προσπάθειας απλούστευσης των πρακτικών προσδιορισμού των επιπέδων οξειδοαναγωγικής κατάστασης ενός οργανισμού, η εταιρία Luoxis (Luoxis Diagnostics, Inc., Englewood, Colorado, USA) προχώρησε στην ανάπτυξη του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS. Η σημαντική καινοτομία του μηχανήματος αυτού είναι η ικανότητα μέτρησης του οξειδοαναγωγικού δυναμικού [Oxidation-Reduction Potential (ORP)], δηλαδή της ισορροπίας μεταξύ των αντιοξειδωτικών και των προοξειδωτικών μορίων. Με αυτό τον τρόπο δίνεται μια ασφαλής εκτίμηση των επιπέδων του οξειδωτικού στρες σε ένα βιολογικό δείγμα και συνεπώς σε ένα οργανισμό (Harris & Hansen 2012).

Επίσης, ένα πολύ σημαντικό στοιχείο που απλουστεύει την προσπάθεια των ερευνητών για γρήγορη εκτίμηση δειγμάτων είναι ο χρόνος μέτρησης καθώς μέσα σε 4 λεπτά και με τη χρήση μόνο 20 µl πλάσματος, το μηχάνημα μπορεί να εκτιμήσει τα επίπεδα οξειδοαναγωγικού δυναμικού. Επιπλέον, ο τρόπος χρήσης είναι πολύ απλός καθώς η μόνη απαίτηση από τον αναλυτή είναι η απόθεση του δείγματος σε ειδικό αισθητήρα κεραμικού υποστρώματος, ο οποίος στη συνέχεια εισέρχεται σε ειδική οπή του συστήματος. Οι δείκτες που προσδιορίζονται είναι δυο: το στατικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (sORP) που αναφέρεται στην ολοκληρωμένη ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αναγωγικών σε ένα δείγμα και το αναγωγικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (cORP) που αντικατροπτρίζει το αντιοξειδωτικό απόθεμα στο πλάσμα. Όσον αφορά τον βιοδείκτη sORP, υψηλές τιμές ισοδυναμούν με οξειδωτικό περιβάλλον καθώς επικρατούν τα οξειδωτικά μόρια έναντι των αναγωγικών, ενώ αντίθετα υψηλές τιμές του βιοδείκτη cORP αντιστοιχούν σε αναγωγικό περιβάλλον. Τέλος, οι μονάδες μέτρησης είναι τα millivolt (mV) για το sORP και τα microcoulomb (µC) για το cORP.



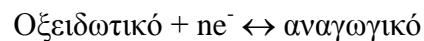
Εικόνα 19: Απεικόνιση του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS



Εικόνα 20: Αισθητήρας μιας χρήσης κεραμικού υποστρώματος στον οποίο αφήνεται το δείγμα πλάσματος

2.3.1.2 Τρόπος λειτουργίας του RedoxSYS

Η βασική φιλοσοφία πάνω στην οποία δημιουργήθηκε το σύστημα RedoxSYS αφορά την μεταφορά e^- από ένα αναγωγικό σε ένα οξειδωτικό μόριο στα πλαίσια μιας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης όπως φαίνεται στην εξίσωση που ακολουθεί.



Το ORP υπολογίζεται με βάση την εξίσωση Nerst που παρατίθεται παρακάτω

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

όπου οι τιμές R , T και F αντιστοιχούν στη σταθερά αερίων, τη θερμοκρασία σε βαθμούς Kelvin και τη σταθερά Faraday, αντίστοιχα. Η τιμή E_0 αντιστοιχεί στο τυπικό δυναμικό ενός οξειδοαναγωγικού συστήματος μετρημένο σε σχέση με ένα ηλεκτρόδιο υδρογόνου που θεωρείται αυθαίρετα ίσο με 0 volts, και n είναι ο αριθμός των ηλεκτρονίων που μεταβιβάζονται (Chang et al. 2004).

Η λειτουργία του διαγνωστικού συστήματος βασίζεται στη χρήση τριών ηλεκτροδίων (εργασίας, μέτρησης και αναφοράς). Με την εισαγωγή του αισθητήρα κεραμικού υποστρώματος στην οπή της συσκευής παρέχεται μια πολύ μικρή

ποσότητα ρεύματος (~1 nA) μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του ηλεκτροδίου μέτρησης. Για 1,5 λεπτό, το σύστημα βρίσκεται σε ισορροπία και συνεχίζεται η παροχή του ρεύματος. Ωστόσο, το διάστημα από 1'50''-2'00'' λεπτά, ήτοι για 10 δευτερόλεπτα, το σύστημα υπολογίζει τη διαφορά δυναμικού μεταξύ των ηλεκτροδίων εργασίας και αναφοράς. Πραγματοποιούνται 20 μετρήσεις ανά 0,5 sec και ο μέσος όρος των τιμών αντιστοιχεί στον δείκτη sORP που υπολογίζεται σε mV.

Κατόπιν, μετά το πέρας των 2 λεπτών και της μέτρησης του δείκτη sORP εφαρμόζεται στο δείγμα ένα γραμμικά αυξανόμενο ρεύμα μεταξύ των ηλεκτροδίων εργασίας και μέτρησης. Η διαδικασία θα πραγματοποιηθεί μέχρι εξάντλησης των αναγωγικών μορίων. Το συνολικό φορτίο που εφαρμόστηκε προκειμένου να εξουδετερωθούν τα αναγωγικά μόρια του δείγματος μετριέται σε μC και αντιστοιχεί στον δείκτη cORP (Polson et al. 2018).

2.3.2 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

2.3.2.1 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων έγινε με βάση το πρωτόκολλο των Patsoukis et al. (Patsoukis et al. 2004).

Αναλυτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής :

- 1) 200 μl 20% TCA προστίθενται σε 200 μl πλάσματος. Κάθε δείγμα έχει και το τυφλό του.
- 2) Επώαση των δειγμάτων στον πάγο για 15 λεπτά.
- 3) Φυγοκέντρηση (15.000 g, 5 λεπτά, 4°C).

- 4) Απομάκρυνση υπερκείμενου και προσθήκη 500 μl DNPH 10mM (διαλυμένο σε 2,5N HCl) για τα δείγματα ή 500 μL 2,5N HCL για τα τυφλά.
- 5) Διαλύουμε με την πιπέτα το ίζημα και αναδεύουμε. Επώαση των δειγμάτων για 1 ώρα και ανάδευση κάθε 15 λεπτά.
- 6) Φυγοκέντρηση (15.000 g, 5 λεπτά, 4°C) και απομάκρυνση υπερκείμενου.
- 7) Προσθήκη 1ml 10% TCA, ανάδευση και φυγοκέντρηση (15.000 g, 5 λεπτά, 4°C). Απομάκρυνση υπερκείμενου.
- 8) Προσθήκη 1 ml μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) και φυγοκέντρηση (15.000 g, 5 λεπτά, 4°C). Η προσθήκη του μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) συνίσταται να πραγματοποιείται μέσα στον απαγωγό. Το βήμα 8 πραγματοποιήθηκε συνολικά 3 φορές και γίνεται για να απομακρυνθεί το DNPH.
- 9) Προσθήκη 1 ml 5M ουρίας (pH 2,3) και επώαση δειγμάτων στους 37°C για 15 λεπτά.
- 10) Φυγοκέντρηση (15.000 g, 5 λεπτά, 4°C) και μέτρηση της απορρόφησης στα 375 nm.

Η συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακή απόσβεσης του DNPH, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Protein carbonyls (nmol/mg protein)} = \frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / 0.022}{C \cdot d} \times 5$$

Όπου:

Η τιμή A_{sample} αντιστοιχεί στη μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

Η τιμή A_{blank} αντιστοιχεί στη μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του τυφλού.

Η τιμή 0,022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPΗ.

Η τιμή 5 αντιστοιχεί στο συντελεστή αραιώσης του αιωρήματος Ντελ. αντίδρασης/ μl πλάσματος [1000 μl /200 μl]).

Η τιμή Cδ αντιστοιχεί στη συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε με το αντιδραστήριο Bradford.

2.3.2.2. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

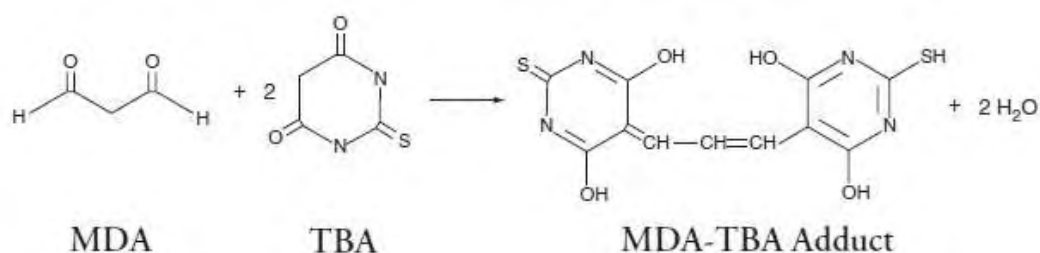
Ο προσδιορισμός των επιπέδων λιπιδικής υπεροξειδωσης μέσω της μεθόδου των TBARS βασίστηκε σε πρωτόκολλο των Keles et al. (Keles et al. 2001).

Πιο αναλυτικά, σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon των 15 ml προστίθενται 100 μl πλάσματος ή dH₂O για τα τυφλά. Στη συνέχεια προστίθενται 500 μl διαλύματος TCA 35% και 500 μl Tris-HCl και ακολουθεί ανάδευση και επώαση 10 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, προστίθεται 1 ml διαλύματος Na₂SO₄ – TBA και επωάζουμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο στους 95°C για 45 λεπτά. Μετά την επώαση τα δείγματα μεταφέρονται σε πάγο και αφήνονται για 5 λεπτά. Ακολουθεί προσθήκη 1 ml TCA 70%, ανάδευση και μεταφορά 1ml σε σωληνάρια erpendorf. Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρούνται (11.200 g, 3 λεπτά, 25°C). Τέλος, μεταφέρονται 900 μl από το υπερκείμενο σε κυψελίδα και καταγράφεται η απορρόφηση στα 530 nm.

Ο υπολογισμός των TBARS γίνεται ακολουθώντας την παρακάτω εξίσωση:

$$TBARS (\mu mol/L) = (Abs \text{ δείγματος} - Abs \text{ τυφλού}) / 0,156 \times 31,$$

όπου το 31 αντιστοιχεί στον συντελεστή αραίωσης διαιρώντας τον τελικό όγκο που είναι 3.100 μl με τον όγκο του πλάσματος που είναι 100 μl. Παρομοίως η τιμή 0,156 αντιστοιχεί στο συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA (απορρόφηση της ουσίας σε συγκέντρωση 1 mol/l) που είναι 156000 (mol/l) διαιρούμενου με 10^{-6} με σκοπό να μετατραπούν τα mol/l σε μmol/l.



Εικόνα 21: Το TBA αντιδράει με την MDA και σχηματίζεται η ένωση MDA-TBA που στη συνέχεια θα μετρηθεί η απορρόφηση της προκειμένου να εκτιμηθούν τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης

2.3.2.3 Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC)

Ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός δείγματος πλάσματος βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών του δείγματος να ανάγουν τη σταθερή ελεύθερη ρίζα του εμπορίου DPPH (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδραζύλιο) προς την αντίστοιχη υδραζίνη (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδραζίνη).

Για τον προσδιορισμό της TAC ακολουθήθηκε η μέθοδος των Janaszewska & Bartosz (Janaszewska & Bartosz 2002). Αναλυτικά, σε σωληνάρια eppendorf προστίθενται 480 μl ρυθμιστικού διαλύματος (phosphate buffer, 10 mM (pH = 7,4), 20 μl πλάσματος και 500 μl DPPH 0,1M. Για τα τυφλά δείγματα, στα σωληνάρια προστίθενται 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος και 500 μl DPPH 0,1M. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση για 60 λεπτά σε σκοτάδι, διάστημα στο οποίο τα

αντιοξειδωτικά του πλάσματος εξουδετερώνουν τη ρίζα του DPPH. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (20.000 g, 3 λεπτά, 25°C), μεταφορά του υπερκειμένου σε κυψελίδα και μέτρηση της απορρόφησης στα 520nm. Λόγω έκθεσης του τυφλού δείγματος σε φωτεινό σημείο κατά τη διάρκεια της φωτομέτρησης είναι πιθανή η αύξηση της τιμής απορρόφησης. Ως εκ τούτου συνίσταται συχνή μέτρηση του τυφλού δείγματος ανά 5-6 δείγματα.

Οι τιμές της TAC υπολογίζονται σε mmol DPPH/l πλάσματος με βάση την παρακάτω εξίσωση:

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

- Η διαίρεση με 100 γίνεται για μετατροπή της ποσοστιαίας μείωσης της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.
- Ο πολλαπλασιασμός με το 50 γίνεται καθώς στην κυψελίδα περιέχεται διάλυμα DPPH συγκέντρωσης 50 μmol/l.
- Ο πολλαπλασιασμός με το 50 γίνεται καθώς υπάρχει αραιώση του πλάσματος κατά 50 φορές μετά την προσθήκη 20 μl πλάσματος σε 1000 μl συνολικού όγκου στην κυψελίδα.
- Η διαίρεση με το 1000 γίνεται για τη μετατροπή των l σε ml.

2.3.2.4 Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδικού ανιόντος ($O_2^{\cdot-}$)

Ο προσδιορισμός του βαθμού εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot-}$ πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη μέθοδο του Sannigrahi et al (Sannigrahi et al. 2010). Οι ρίζες $O_2^{\cdot-}$ παράγονται σε συστήματα PMS (phenazime methosulfate)-

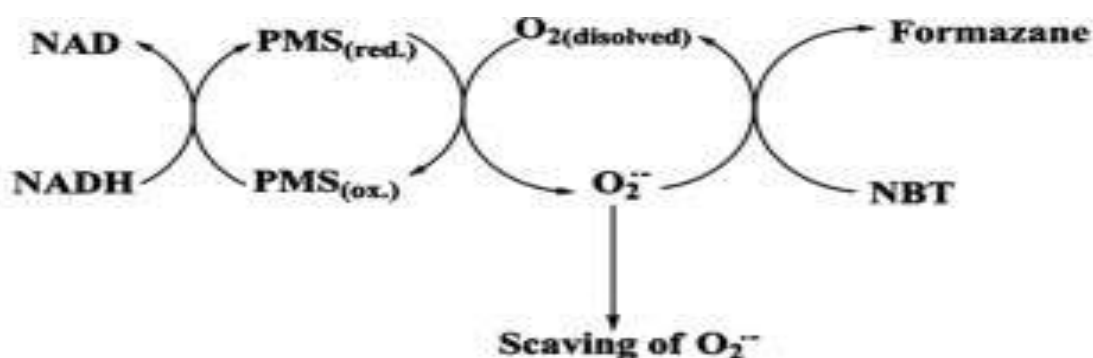
NADH με οξείδωση NADH και προσδιορίζονται ποσοτικά μετρώντας τη μείωση της απορρόφησης του NBT^{2+} . Συγκεκριμένα, η ρίζα $\text{O}_2^{\cdot-}$ μετατρέπει το NBT^{2+} σε φορμαζάνη που έχει μπλε χρώμα. Η δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών περιορίζει τον σχηματισμό του μπλε χρώματος της φορμαζάνης (Εικόνα 22) .

Πιο αναλυτικά, σε 625 μl Tris-HCl (16 mM, pH = 8) προσθέτουμε 125 μl NBT 300 μM . Στη συνέχεια, προστίθενται 125 μl NADH 468 μM και 50 μl πλάσματος. Η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη 125 μl διαλύματος PMS 60 μM στο μίγμα. Τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά, φυγοκεντρώνονται (3.000 g, 5 λεπτά, 25°C) και η απορρόφηση μετράται στα 560nm.

Η % αναστολή της ρίζας του σουπεροξειδίου σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (control) προσδιορίζεται με βάση την ακόλουθη εξίσωση:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_o - A_d) / A_o \times 100$$

όπου η τιμή A_o αντιστοιχεί στην οπτική απορρόφηση του δείγματος ελέγχου ενώ η τιμή A_d στην απορρόφηση του εξεταζόμενου δείγματος στα 560 nm.



Εικόνα 22: Το σύστημα μεθοσυλφονικής φαιναζίνης (PMS)- νικοτιναμίδιο αδενινονουκλεοτίδιου (NADH) σχηματίζει τη ρίζα $\text{O}_2^{\cdot-}$ που στη συνέχεια μετατρέπει το NBT^{2+} σε φορμαζάνη

2.3.2.5 Προσδιορισμός της ικανότητας εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου (OH[•])

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή βασίζεται σε δημοσιευμένο πρωτόκολλο από τους Chung et al. (Chung et al. 1997). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην οξείδωση της 2-δεοξυριβόζης από τις ρίζες OH[•]. Οι ρίζες του OH[•], σχηματίζονται κατά την αντίδραση Fenton που προκαλούμε στο σύστημα και θα οξειδώσουν τη 2-δεοξυριβόζη προς MDA, η οποία μπορεί να σχηματίσει σύμπλοκο με το TBA. Μετρώντας την απορρόφηση του συμπλόκου μπορούν να εκτιμηθούν τα επίπεδα οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης (Gutteridge, 1984,1987).

Πιο αναλυτικά, 75 μl πλάσματος προστίθενται σε 450 μl ρυθμιστικού διαλύματος (sodium phosphate buffer 0.2 M, pH = 7,4). Στη συνέχεια, προστίθενται 150 μl δεόξυριβόζης 10mM, 150 μl διαλύματος FeSO₄- EDTA 10 mM, 525 μl dH₂O και 150 μl H₂O₂ 10 mM. Τα δείγματα επωάζονται σε κλίβανο (37°C, 4 ώρες) και στη συνέχεια προστίθενται 750 μl 2,8 % TCA και 750 μl 1% TBA. Τα δείγματα τοποθετούνται σε υδατόλουτρο (95°C, 10 λεπτά) προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σχηματισμού συμπλόκου μεταξύ MDA-TBA. Στη συνέχεια, τα δείγματα τοποθετούνται στον πάγο για 5 λεπτά, φυγοκεντρώνται (1.700 g, 10 λεπτά, 25°C) και στη συνέχεια η απορρόφησή τους μετράται στα 520nm.

Αξίζει να αναφερθεί πως τα τυφλά δείγματα δεν περιείχαν H₂O₂ 10 mM.

Η % αναστολή της ρίζας του υδροξυλίου βασίστηκε στην παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_o - A_d) / A_o \times 100$$

όπου A_o είναι η οπτική απορρόφηση του δείγματος ελέγχου και A_d η απορρόφηση του εξεταζόμενου δείγματος στα 560 nm.

2.3.2.6 Αναγωγική Δύναμη-Μετατροπή του Fe (III) σε Fe (II)

Στη συγκεκριμένη διατριβή ο προσδιορισμός της αναγωγικής δύναμης βασίστηκε σε πρωτόκολλο που δημοσιεύτηκε από τους Yen & Duh (Yen & Duh 1994). Σύμφωνα με αυτό, εξετάζεται η ικανότητα αναγωγής του Fe³⁺ σε Fe²⁺ από τα αντιοξειδωτικά του πλάσματος. Η μέθοδος αξιολογεί τα επίπεδα αντίδρασης του Fe²⁺ με το χλωριούχο σίδηρο (FeCl₃). καθώς όταν αντιδρά με αυτόν σχηματίζει σύμπλοκο που απορροφά στα 700 nm. Ανάλογα με το βαθμό αναστολής από τα αντιοξειδωτικά του πλάσματος, το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος μετατρέπεται σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε. Η αύξηση της αναγωγικής δύναμης είναι ανάλογη με την αύξηση της απορρόφησης στα 700 nm.

Πιο αναλυτικά, 50 μl πλάσματος διαλύονται σε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος (phosphate buffer 0,2M, pH = 6,6) και στη συνέχεια το διάλυμα αυτό προστίθεται σε 250 μl 1% σιδηροκυανούχου καλίου (potassium ferricyanide) και επωάζεται (50°C, 20 λεπτά). Κατόπιν, τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο για 5 λεπτά και στη συνέχεια προστίθενται 250 μl 10% TCA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων (1.700 g, 10 λεπτά, 25°C). Το υπερκείμενο συλλέγεται και σε αυτό προστίθενται 250 μl dH₂O και 50 μl 0,1% χλωριούχου σιδήρου (ferric chloride). Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά και η απορρόφηση μετράται στα 700nm.

Η % αναγωγή του Fe³⁺ σε Fe²⁺ βασίστηκε στην παρακάτω εξίσωση:

$$\% \text{ αναγωγή} = (A_0 - A_\delta) / A_0 \times 100$$

όπου A₀ είναι η οπτική απορρόφηση του δείγματος ελέγχου και A_δ η απορρόφηση του εξεταζόμενου δείγματος στα 560 nm.

2.3.3 Προσδιορισμός των επιπέδων της οξειδωμένης αλβουμίνης με ανάλυση western

Στη συγκεκριμένη διατριβή ακολουθήθηκε ελαφρώς τροποποιημένο πρωτόκολλο από προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας (Kerasioti et al. 2016). Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση βασίστηκε στο διαχωρισμό μονομερών και διμερών HSA. Η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο πλάσμα μετά τον καθαρισμό των δειγμάτων μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης HSA έγινε με τη χρήση πρότυπης καμπύλης. Τα μονομερή και τα διμερή HSA στη συνέχεια προσδιορίστηκαν με ανάλυση western χρησιμοποιώντας μη αναγωγικό ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (non-reducing loading buffer). Χρησιμοποιήθηκε non-reducing loading buffer, καθώς οι μη αναγωγικές συνθήκες επιτρέπουν την απεικόνιση οποιονδήποτε διμερών συνδεδεμένων με δισουλφίδιο (Sheffield et al. 2005). Συγκεκριμένα, τα μη αναγωγικά ρυθμιστικά διαλύματα δεν περιέχουν 2-μερκαπτοαιθανόλη (2-ME) ή διθειοθρεϊτόλη (DTT) που μπορεί να διασπάσουν τις δισουλφιδικές γέφυρες στις οξειδωμένες πρωτεΐνες. Προκειμένου να γίνει ανάλυση western, το καθαρισμένο δείγμα αραιώθηκε μέχρις ότου επιτεύχθηκε η τελική συγκέντρωση 1 μ M HSA.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκε ένα κλάσμα που περιείχε το αραιωμένο καθαρισμένο δείγμα και 2 \times non-reducing loading buffer, θερμάνθηκε σε βραστό νερό για 3 λεπτά και εφαρμόστηκε σε πηκτή ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE, χρησιμοποιώντας πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8% (w/v) για την ταξινόμηση των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός τους. Σε μία από τις διαδρομές της πηκτής τοποθετήθηκε και ο δείκτης (marker). Η πηκτή ακρυλαμιδίου χωρίζεται σε δύο μέρη, την πηκτή στοίβαξης (stacking gel), όπου πακετάρονται τα δείγματα των πρωτεϊνών πριν διαχωριστούν και την πηκτή διαχωρισμού (separating gel). Η πηκτή

πακεταρίσματος έχει σταθερό ποσοστό ακρυλαμίδης (5%) [dH₂O, 0.5 M Tris-HCl σε pH = 6,8, 30% ακρυλαμίδη, 10% SDS (sodium dodecyl sulfate), 10% APS (ammonium perosulfate) και TEMED (tetramethylethylenediamine)], ενώ στην πηκτική διαχωρισμού το ποσοστό ακρυλαμίδης εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος των μορίων προς διαχωρισμό (dH₂O, Tris 1.5 M pH = 8,8, 30% ακρυλαμίδη, 10% SDS, 10% APS, TEMED). Μετά από 1 ώρα ηλεκτροφόρησης στα 150 V, οι πρωτεΐνες μεταφέρθηκαν σε μεμβράνες διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Η πηκτική ακρυλαμίδη στην οποία πλέον έχουν διαχωριστεί οι πρωτεΐνες ανάλογα με το μοριακό τους βάρος μεταφέρεται σε κασετίνα και η τοποθέτηση γίνεται σύμφωνα με την εξής σειρά: Στο κάτω μέρος της κασετίνας τοποθετείται σφουγγαράκι, αμέσως επάνω διηθητικό χαρτί Whatman, στη συνέχεια το πήκτωμα, η μεμβράνη PVDF και αμέσως πάνω από τη μεμβράνη διηθητικό χαρτί Whatman και ξανά σφουγγαράκι. Η κασετίνα κλείνει και την τοποθετούμε στην συσκευή ηλεκτροφόρησης ώστε μετά από ηλεκτροφόρηση για 2 ώρες στα 110 V να επιτευχθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα στη μεμβράνη PVDF. Η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει αντιληπτή εφόσον είναι εμφανής η διαδρομή των πρωτεϊνών του δείκτη (marker). Σε αυτή την περίπτωση προχωράμε στο επόμενο βήμα που είναι η τοποθέτηση της μεμβράνης σε διάλυμα διάλυμα 1× TBST (50 ml) που περιέχει 5% αποβουτυρωμένο γάλα σε μορφή σκόνης (TBSTMS) στους 4 °C για όλη τη νύχτα. Την επόμενη ημέρα, στις μεμβράνες χρησιμοποιείται πολυκλωνικό αντίσωμα goat anti-human albumin (1:5000 σε TBSTMS) προκειμένου να ανιχνευτούν οι πρωτεΐνες. Οι μεμβράνες στη συνέχεια επωάζονται σε συσκευή ανατάραξης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με αντίσωμα goat anti-albumin, αραιωμένο 1:5000 σε TBSTMS. Μετά από εκτεταμένες πλύσεις σε TBST (5 φορές για 5 λεπτά) τα στυπώματα επωάζονται για 30 λεπτά με

δευτερογενές αντίσωμα IgG anti-goat (αραίωση 1:3000) (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Οι μεμβράνες πλένονται με TBST (3 φορές για 15 λεπτά) και οι σηματοδοτημένες ζώνες πρωτεΐνης οπτικοποιούνται με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (Bio-Rad Laboratories) και επακόλουθη έκθεση σε φιλμ XAR5 (Fujifilm Corp., Tokyo, Japan). Ανάλογα με την ποιότητα του σήματος προσαρμόζεται και ο χρόνος έκθεσης του φιλμ στη μεμβράνη. Η οπτική πυκνότητα των ζωνών πρωτεΐνης προσδιορίζεται κάνοντας χρήση του λογισμικού της Alpha View ποσοτικοποίησης (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Κάθε δείγμα αναλύθηκε εις τριπλούν.

2.3.4 Προσδιορισμός των επιπέδων μαλονδιαλδεΐδης με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC-DAD)

Αναφορικά με τον προσδιορισμό MDA πλάσματος με HPLC-DAD χρησιμοποιήθηκε μία μέθοδος που περιγράφεται από τους Spirlandeli et al. (Spirlandeli et al. 2013). Εν συντομία, 100 μl πλάσματος προστέθηκαν σε 700 μl 1% φωσφορικού οξέος και 200 μl 42 mM TBA. Το μίγμα αναμίχθηκε και θερμάνθηκε για 40 λεπτά σε υδατόλουτρο στους 100°C έτσι ώστε να σχηματιστεί το σύμπλοκο TBA-MDA. Στη συνέχεια, 250 μl του μίγματος προστέθηκαν σε 250 μl διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) 1M και μεθανόλης (1:6). Το μίγμα κατόπιν φυγοκεντρήθηκε (10.000 g, 5 λεπτά, 20°C) και διηθήθηκε μέσω ενός φίλτρου Milli-RO 10 Plus και ενός Milli-Q Plus (τελικό μέγεθος πόρων 0,2 μm, Millipore, Bedford, MA). Στο τελικό στάδιο, 20 μl του υπερκείμενου υγρού εγχύθηκαν στη συσκευή HPLC με ροή 1 ml/λεπτό. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 532 nm.

Για την πρότυπη καμπύλη MDA παρασκευάστηκε stock διάλυμα 100 μM MDA σε 0,01 mM HCl. Ακολούθως, έγιναν αραιώσεις του stock διαλύματος MDA

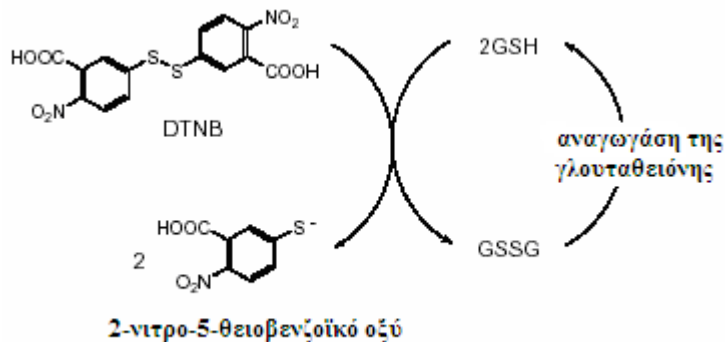
από 2-14 μM . Η ίδια επεξεργασία που περιγράφηκε για το πλάσμα χρησιμοποιήθηκε για το πρότυπο. Η μέθοδος διεξήχθη με τη χρήση μίας στήλης αντίστροφης φάσης C18, 5 μm (4,6 mm. x 250 mm.), σε χρωματογραφικό μηχάνημα HPV Hewlett Packard HP1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Γερμανία) εφοδιασμένο με τεταρτοταγή αντλία, αυτόματο δειγματολήπτη, απαερωτήρα και ανιχνευτή συστοιχίας διόδων (DAD). Η ανάκτηση και η επεξεργασία των χρωματογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Chemstation.

2.4 Μέθοδοι προσδιορισμού στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα

2.4.1 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

2.4.1.1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων της GSH χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο από τους Reddy et al. (Reddy et al. 2004). Σύμφωνα με αυτό, η GSH οξειδώνεται από το 5,5'-δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) με παράλληλη μετατροπή του 5,5'-δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκού οξέος σε 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ που είναι έγχρωμο προϊόν και προσδιορίζεται φωτομετρικά (Εικόνα 23). Αναλυτικότερα, 20 μl ερυθροκυτταρικού αιμόλυματος προστίθενται σε 660 μl 67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (pH = 8) και 330 μl από το διάλυμα DTNB 1 mM. Στα αντίστοιχα τυφλά δείγματα, αντί του ερυθροκυτταρικού αιμόλυματος χρησιμοποιείται dH_2O . Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 15 λεπτά και η οπτική απορρόφηση καταγράφεται στα 412nm. Ο μηδενισμός του φωτομέτρου γίνεται με αέρα.



Εικόνα 23: Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) οξειδώνεται στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) από το 5,5'δι-θειο-2-νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) που μετατρέπεται ταυτόχρονα σε 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH βασίζεται στον συντελεστή μοριακή απόσβεσης του DTNB σύμφωνα με την εξίσωση:

$$GSH (\mu\text{mol/g Hb}) = [(Abs_{\text{sample}} - \Delta A_{\text{blank}} / 13,6) \times 262,6] \times 1000 / Hb (\text{g/L})$$

Όπου,

- Abs δείγματος αντιστοιχεί στη μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος
- Abs τυφλού αντιστοιχεί στη μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού
- Το 13,6 αντιστοιχεί στο συντελεστή μοριακής απόσβεσης του DTNB
- Η τιμή 262,6 αντιστοιχεί στο συντελεστή αραιώσης διαιρώντας τον τελικό όγκο του διαλύματος προς τον όγκο του ερυθροκυτταρικού κυτταρολύματος (20 μl) μετά από πολλαπλασιασμό με 2 καθώς υπολογίζουμε την αρχική αραιώση με το dH₂O (1:1 v/v) κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων και τέλος πολλαπλασιάζοντας με 2 × 1,3 για να ληφθεί υπόψη η δεύτερη και τρίτη αραιώση με 5% TCA.
- Η τιμή 1000 αντιστοιχεί στη μετατροπή των mmol/l σε μmol/ml.

2.4.1.2 Προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης (CAT)

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του Aebi (Aebi 1984). Σύμφωνα με αυτό, σε ειδικά σωληνάρια προστίθεται 4 μl ερυθροκυτταρικού αιμολύματος αραιωμένου σε dH₂O σε αναλογία 1:10 σε 2.991 μl ρυθμιστικού διαλύματος (phosphate buffer 67 mM, pH = 7,4). Τα δείγματα αναδεύονται σε vortex και επωάζονται σε κλίβανο στους 37°C για 10 λεπτά. Κατόπιν, μεταφέρονται σε κυψελίδα χαλαζία, προστίθενται 5 μl 30% H₂O₂ και η κυψελίδα ανακινείται 3 φορές με τη χρήση πάραφιλμ στην κορυφή της. Η απορρόφηση μετράται στα 240nm. Γίνονται 2 μετρήσεις στα 5 και στα 125 δευτερόλεπτα προκειμένου να μελετηθεί ο ρυθμός διάσπασης του H₂O₂ από το ένζυμο στο διάστημα αυτό.

Ο υπολογισμός της δραστηριότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη (Hb) και γίνεται σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Δραστηριότητα CAT (U/mg Hb)} = (\Delta Abs_{\text{δείγματος ανά λεπτό}} / 40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2) / \text{Συγκέντρωση Hb (mg/mL)}.$$

Όπου:

- Η τιμή 40 αντιστοιχεί στο συντελεστή μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ μετά από πολλαπλασιασμό με 1000 ώστε να μετατραπεί σε μmol/ml.
- Η τιμή 750 αντιστοιχεί στο συντελεστή αραιώσης μετά από διαίρεση του τελικού όγκου που εισάγεται στα σωληνάρια καταλάσης (3000 μl) με τον όγκο του αιμολύματος (4 μl) (3000 / 4 = 750)
- Η τιμή 10 αντιστοιχεί στην αραιώση 1:10 του ερυθροκυτταρικού αιμολύματος.
- Η τιμή 2 αντιστοιχεί στην 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.
- Η συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/L
- Abs ανά λεπτό είναι η μεταβολή της απορρόφησης σε διάστημα ενός λεπτού.

2.5 Προσδιορισμός της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης με τη χρήση του αντιδραστήριου Bradford

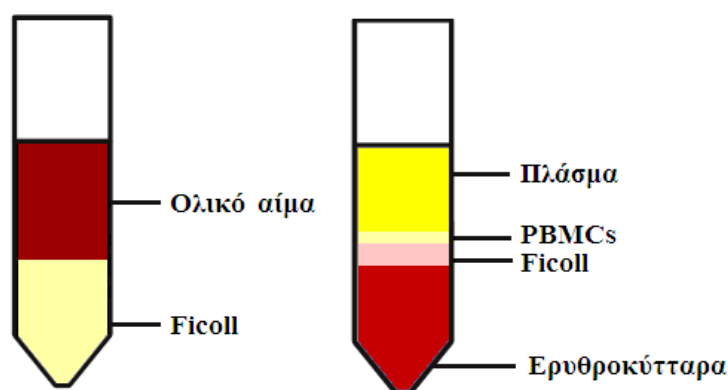
Η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης σε όλα τα εξεταζόμενα δείγματα έγινε με βάση πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 που περιέχει το αντιδραστήριο Bradford με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος μπλε χρώματος με μέγιστη απορρόφηση στα 595 nm (Bradford 1976). Αναλυτικά, 20 μl δείγματος προστίθενται σε 1 ml διαλύματος Bradford και μετά από επώαση 10 λεπτών στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου μετράται η οπτική απορρόφηση στα 595 nm. Στα τυφλά δείγματα χρησιμοποιήθηκε dH₂O. Για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήθηκαν 20 μl διαλύματος αλβουμίνης διαφορετικών συγκεντρώσεων και πιο συγκεκριμένα 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 μg/ml. Τελικός σκοπός είναι η αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης του εξεταζόμενου δείγματος με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

2.6 Επίδραση της επαγομενης κυτταροτοξικότητας του οξειδωτικού παράγοντα tert-Butyl Hydroperoxide (t-BOOH) σε ανθρώπινα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs)

2.6.1 Απομόνωση και καλλιέργεια των ανθρώπινων μονοκυττάρων περιφερικού αίματος

Τα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) απομονώνονται από ολικό περιφερικό αίμα που συλλέγεται σε ηπαρινισμένη σύριγγα με τη χρήση του διαχωριστικού μέσου Φικόλη (Ficoll) προσθέτοντας ίση ποσότητα αίματος. Πιο αναλυτικά, 10 ml ηπαρινισμένου αίματος προστίθενται

προσεκτικά πάνω σε 10 ml Ficoll. Στη συνέχεια, το αίμα φυγοκεντρείται (300 g, 20 λεπτά, 20°C). Η φυγοκέντρηση γίνεται χωρίς φρένο και χωρίς επιτάχυνση ώστε να διαχωριστούν τα μονοκύτταρα χωρίς να υπάρχει ανάμιξη με τη Φικόλη, η οποία είναι κυτταροτοξική. Το ημίλευκο στρώμα ανάμεσα στο πλάσμα και τα ερυθροκύτταρα και της Φικόλης αποτελεί το στρώμα των μονοκυττάρων του αίματος (λεμφοκύτταρα, μονοπύρρηνα, θρομβοκύτταρα) (Εικόνα 24). Το στρώμα των κυττάρων συλλέγεται προσεκτικά με σύριγγα και προστίθεται σε 10 ml θρεπτικού μέσου RPMI-1640. Τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με το θρεπτικό μέσο με φυγοκέντρηση (300 g, 20 λεπτά, 20°C) με κανονικό φρένο και επιτάχυνση. Το ίζημα των κυττάρων μετά τις πλύσεις επαναιωρείται σε 20 mL θρεπτικού μέσου RPMI-1640 εμπλουτισμένου με 1% L-γλουταμίνη, 1% διάλυμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών και 10% ορό FBS. Τα κύτταρα καλλιεργούνται για 24 ώρες σε επωαστικό κλίβανο στους 37°C πριν την πραγματοποίηση των πειραμάτων.



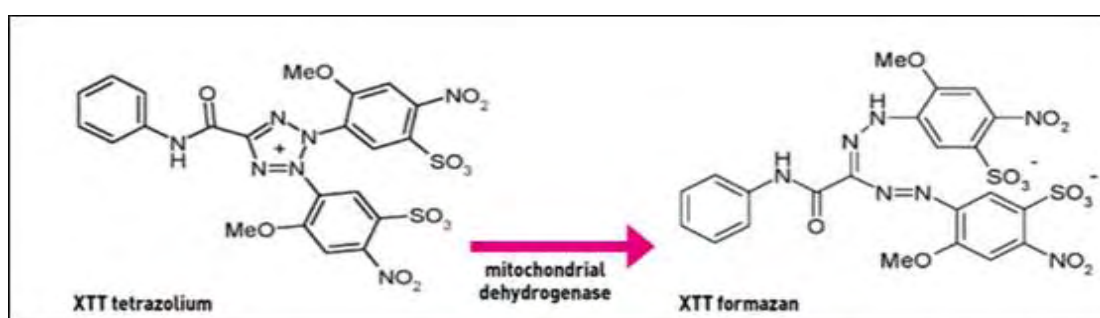
Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση του διαχωρισμού του στρώματος των PBMCs μετά την φυγοκέντρηση ολικού περιφερικού αίματος με το Ficoll.

2.6.2 Μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης του *t*-BOOH σε PBMCs

Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων στα PBMCs, τα κύτταρα μετά την απομόνωση και την 24-ωρη επώασή τους σε 20 ml θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένου με 1% L-γλουταμίνη, 1% διάλυμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών και 10% ορό FBS στους 37°C, μετρούνται με τη χρήση κυτταρόμετρου τύπου Neubauer (Hausser Scientific, USA). Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων τα κύτταρα τοποθετούνται σε πλάκες ανάπτυξης κυττάρων 24 θέσεων της εταιρίας Corning (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Για την επαγωγή του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας *t*-BOOH.

Για τη μελέτη της προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων στην επαγόμενη από τον οξειδωτικό παράγοντα *t*-BOOH κυτταροτοξικότητα πραγματοποιήθηκε αρχικά καμπύλη κυτταροτοξικότητας διάφορων συγκεντρώσεων του *t*-BOOH. Πιο αναλυτικά, μετά την απομόνωση και τη μέτρηση των PBMCs, 2×10^6 κύτταρα (2 ml) προστίθενται στις θέσεις της πλάκας 96 θέσεων σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 1% L-γλουταμίνη, 1% διάλυμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών και απουσία ορού FBS. Τα κύτταρα επωάζονται για 2 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις *t*-BOOH (20, 40, 60, 80, 100, 200, 400 μ M). Οι θέσεις που περιέχουν μόνο κύτταρα αποτελούν το μάρτυρα. Η κυτταροτοξική δράση των συγκεντρώσεων του *t*-BOOH προσδιορίζεται με τη μέτρηση των βιώσιμων κυττάρων με τη χρήση του αντιδραστηρίου XTT (τετραμμωνιακό άλας). Χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του XTT

μπορούμε να εξετάσουμε χρωματομετρικά το πλήθος και τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Το αντιδραστήριο υφίσταται μεταβολισμό από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων προς υδατοδιαλυτή φορμαζάνη που ανιχνεύεται φασματοφωτομετρικά στα 450nm. Μειωμένη απορρόφηση αντιστοιχεί σε μειωμένο μεταβολισμό και συνεπώς σε μειωμένη βιωσιμότητα κυττάρων. Τα δείγματα εξετάστηκαν εις τριπλούν.



Εικόνα 25: Το τετραμωνιακό άλας (XTT) μεταβολίζεται σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη

2.6.3 Ποσοτικός προσδιορισμός της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας του οξειδωτικού παράγοντα *t*-BOOH στα PBMCs

Η επίδραση του οξειδωτικού παράγοντα εκφράζεται ως το ποσοστό μείωσης του πληθυσμού των βιώσιμων κυττάρων που παραμένουν μετά την επώαση παρουσία του. Το ποσοστό μείωσης του αριθμού των κυττάρων υπολογίστηκε με τον παρακάτω τύπο:

$$\% = [(N^{\circ}_{\theta} - N^{\circ}_{\delta}) / N^{\circ}_{\theta}] \times 100$$

N°_{θ} : Αριθμός των βιώσιμων κυττάρων του κάθε φορά θετικού μάρτυρα (PBMCs και 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, μ M *t*-BOOH).

N^ο_δ: Αριθμός των βιώσιμων κυττάρων του δείγματος (PBMCs, εκχύλισμα και *t*-BOOH).

2.6.4 Εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης του *t*-BOOH-Πειραματική διαδικασία στα κύτταρα PBMC

Για την εκτίμηση της δράσης του οξειδωτικού παράγοντα στα κύτταρα, αριθμός 1×10^6 PBMCs/πηγάδι προστίθενται στις θέσεις της πλάκας 24 θέσεων σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 εμπλουτισμένο με 1% L-γλουταμίνη, 1% διάλυμα αντιβιοτικών/αντιμυκητιακών και απουσία ορού FBS. Για την παρατήρηση της δράσης των εκχυλισμάτων επιλέχθηκαν μη κυτταροτοξικές για τα PBMCs συγκεντρώσεις, όπως προσδιορίστηκε από την παραπάνω πειραματική διαδικασία. Για την επαγωγή οξειδωτικού στρες στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας *t*-BOOH. Πιο αναλυτικά, μετά την προσθήκη των κυττάρων στην πλάκα ακολουθεί η προσθήκη του *t*-BOOH (80 μ M, 20 μ L). Τα κύτταρα επώάζονται για χρονικό διάστημα 2 ωρών σε θρεπτικό υλικό RPMI-1640 απουσία ορού FBS. Τα δείγματα που περιέχουν τα κύτταρα μόνα τους στο θρεπτικό υλικό αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα ενώ τα δείγματα που περιέχουν τα κύτταρα και τον οξειδωτικό παράγοντα (80 μ M *t*-BOOH) αποτελούν το θετικό μάρτυρα. Ακόμη, τα διαλύματα των εκχυλισμάτων πριν από την προσθήκη τους αποστειρώνονται μετά από πέρασμα με τη βοήθεια σύριγγας από φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,2 μ m. Μετά την επώαση τα κύτταρα συλλέγονται από την πλάκα και φυγοκεντρώνονται (3.000 g, 5 λεπτά, 4°C). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και συλλέγεται το ίζημα των κυττάρων. Τα κύτταρα πλένονται με 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών [PBS (0,01 M, pH = 7,4)] που βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί φυγοκέντρηση (3.000 g, 5

λεπτά, 4°C). Το ίζημα των κυττάρων μετά τις πλύσεις επαναιωρείται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών PBS (0,01 M, pH = 7,4). Τα κύτταρα διαρρηγνύονται μετά από επίδραση υπερήχων για 1 λεπτό με περιοδικές διακοπές των 10 δευτερολέπτων. Ακολούθως, φυγοκεντρούνται (15.000 g, 15 λεπτά, 4°C) και συλλέγεται το υπερκείμενο που είναι το κυτταροπλασματικό αιώρημα. Τέλος, εκτιμάται η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης με τη χρήση του αντιδραστηρίου Bradford πριν τη μέτρηση των βιοδεικτών.

2.6.5 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός βιοδεικτών οξειδωτικού στρες σε κύτταρα PBMCs

Για τις μετρήσεις που αφορούν τον προσδιορισμό βιοδεικτών οξειδωτικού στρες σε κύτταρα PBMCs απαιτείται απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης >30 μg στο προς εξέταση δείγμα. Τα πρωτόκολλα των βιοδεικτών ήταν τα εξής:

❖ *Ολική Αντιοξειδωτική Ικανότητα (TAC) σε κύτταρα PBMCs*

Η μέτρηση της TAC στα PBMCs βασίστηκε στην μέθοδο των Jannaszewska & Bartosz (Jannaszewska & Bartosz, 1984), όπως η αντίστοιχη στο πλάσμα, ελαφρώς παραλλαγμένη. Συγκεκριμένα, προσθέτουμε 50 μl κυτταροπλασματικού αιωρήματος σε 450 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου νατρίου (10 mM pH = 7,4) και 500 μl διαλύματος DPPH* 0,1 mM. Στα δείγματα ελέγχου προσθέτουμε dH₂O αντί για κυτταροπλασματικό αιώρημα. ακολούθως, το δείγμα αναδεύεται και επωάζεται για 60 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, το δείγμα φυγοκεντρείται (20.000 g, 3 λεπτά, 25°C) και η απορρόφηση μετράται στα 517 nm. Ο μηδενισμός του φωτομέτρου γίνεται με αέρα.

Ο υπολογισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας γίνεται σε $\mu\text{mol DPPH}^{\bullet}$ /mg πρωτεΐνης με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{TAC } (\mu\text{mol DPPH}^{\bullet} / \text{mg πρωτεΐνης}) = [(A_0 - A_s) / A_0] \times 0,05 \times 20 / C_s$$

Όπου:

- Το A_0 αντιστοιχεί στη μέση τιμή της απορρόφησης του δείγματος ελέγχου
- Η τιμή A_s : είναι η μέσος όρος των τιμών απορρόφησης του κυτταρικού αιωρήματος
- Η τιμή 0,05 αντιστοιχεί στη συγκέντρωση ($\mu\text{mol} / \text{ml}$) της ρίζας του DPPH^{\bullet} στην αντίδραση
- Η τιμή 20 αφορά τον συντελεστή αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ.αντίδρασης}} / \mu\text{L}$ αιωρήματος [1000 μl / 20 μl]).

❖ ***Ουσίες που αντιδρούν με το Θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) σε κύτταρα PBMCs***

Ο προσδιορισμός έγινε με ένα ελαφρώς τροποποιημένο πρωτόκολλο των Keles (Keles et al. 2001). Πιο αναλυτικά, προσθέτουμε 400 μl από το κυτταρικό αιώρημα σε 500 μl διαλύματος TCA 35% και 500 μl διαλύματος Tris-HCl (200 mM, pH = 7,4). Στη συνέχεια, αφήνουμε το δείγμα για επώαση 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται 1 ml διαλύματος που περιέχει 2 M Na_2SO_4 και 55 mM TBA. Τα δείγματα αφήνονται στο υδατόλουτρο για 45 λεπτά στους 95°C και στη συνέχεια τοποθετούνται σε πάγο για 5 λεπτά. Τέλος, προστίθεται 1 ml διαλύματος TCA 70%, ακολουθεί ανάδευση, φυγοκέντρηση (15.000 g, 3 λεπτά, 25°C) και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του υπερκείμενου διαλύματος στα 530 nm. Ο

υπολογισμός των TBARS γίνεται σε nmol/mg πρωτεΐνης, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση

$$\text{TBARS (nmol / mg πρωτεΐνης)} = [(A_{\delta} - A_0) / 0,156] \times 7,5 / C_{\delta}$$

Όπου:

- Το A_0 αντιστοιχεί στη μέση τιμή της απορρόφησης του δείγματος ελέγχου
- Η τιμή A_{δ} : είναι η μέσος όρος των τιμών απορρόφησης του κυτταρικού αιωρήματος
- Η τιμή 0,156 αντιστοιχεί στο συντελεστή μοριακής απόσβεσης της μαλονδιαλδεύδης
- Η τιμή 7,5 αφορά τον συντελεστή αραιώσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ.αντιδρασης}} / \mu\text{l}$ αιωρήματος [3000 μl / 400 μl]).
- Η τιμή C_{δ} αφορά τη συγκέντρωση mg/ml της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος κυτταρικού αιωρήματος που προσδιορίστηκε με το αντιδραστήριο Bradford.

❖ *Δραστικότητα της καταλάσης (CAT) σε κύτταρα PBMCs*

Η μέτρηση έγινε με τη χρήση του πρωτοκόλου που δημοσιεύτηκε από τον Aebi (Aebi 1984). Σε ειδικά σωληνάρια προστίθενται 150 μl από το κυτταρικό αιώρημα, σε 2845 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου, νατρίου (67 mM pH = 7,4) και τα δείγματα μετά από ανάδευση επωάζονται για 10 λεπτά στον κλίβανο (37°C). Στη συνέχεια μεταφέρεται ποσότητα δείγματος σε κυψελίδα χαλαζία, προστίθενται 5 μl διαλύματος H_2O_2 30% w/v και η κυψελίδα αναδεύεται τρεις φορές. Η μέτρηση της οπτικής απορρόφησης (240 nm) γίνεται σε δυο χρονικές στιγμές, στα 5 και στα 125 δευτερόλεπτα. Αυτό συμβαίνει προκειμένου να εκτιμηθούν τα επίπεδα

δραστηκότητας του ενζύμου μέσω της διάσπασης του H₂O₂. Το φωτόμετρο μηδενίζεται με αέρα.

Ο υπολογισμός των επιπέδων δραστηκότητας της CAT γίνεται σε Units (μmol/λεπτό) με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$U \text{ CAT/ mg πρωτεΐνης} = [(\Delta A_{\text{δείγματος}}/\text{min}/40) \times 20 \times 1000]/C_{\delta}$$

-Το ΔΑ αντιστοιχεί στη μέση τιμή της μεταβολής στην οπτική απορρόφηση του δείγματος κυτταρικού αιωρήματος

-Η τιμή 40 αντιστοιχεί στο συντελεστή μοριακής απόσβεσης του υπεροξειδίου H₂O₂

- Η τιμή 20 αφορά τον συντελεστή αραιώσης του αιωρήματος (V_{τελ.αντίδρασης}/ μl αιωρήματος [3000 μl /150 μl]).

- Η τιμή 1000 αφορά τη μετατροπή mol/l σε μmol/ml

- Η τιμή C_δ αφορά τη συγκέντρωση mg/mL της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος κυτταρικού αιωρήματος που προσδιορίστηκε με το αντιδραστήριο Bradford.

❖ *Ανηγγμένη Γλουταθειόνη σε κύτταρα PBMCs*

Η μέτρηση της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στα κύτταρα PBMCs έγινε με βάση πρωτόκολλο των Reddy et al (Reddy et al. 2004). Πιο αναλυτικά, 150 μl κυτταρικού αιωρήματος προστίθενται σε 520 μl 67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου νατρίου (pH = 8) και 330 μl DTNB 1 mM. Στα τυφλά αντί του ερυθροκυτταρικό αιμολύματος χρησιμοποιείται dH₂O.

Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 15 λεπτά και η οπτική απορρόφηση μετράται στα 412 nm. Ο μηδενισμός του φωτομέτρου γίνεται με αέρα.

Ο υπολογισμός των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης γίνεται σε nmol/mg πρωτεΐνης, σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{nmol GSH/ mg πρωτεΐνης} = [(A_{\delta} - A_0)/13,6] \times 6,6 \times 1000/C_{\delta}$$

Όπου,

- Η τιμή A_{δ} αντιστοιχεί στη μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος
- Η τιμή A_0 αντιστοιχεί στη μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού
- Το 13,6 αντιστοιχεί στο συντελεστή μοριακής απόσβεσης του DTNB
- Η τιμή 6,6 αντιστοιχεί στον συντελεστή αραίωσης του αιωρήματος ($V_{\text{τελ.αντίδρασης}}/ \mu\text{L αιωρήματος μετά από διαίρεση του συνολικού όγκου του τελικού διαλύματος που είναι 1000 } \mu\text{l με τον όγκο του κυτταρικού αιωρήματος (150 } \mu\text{l)}$).
- Η τιμή 1000 αντιστοιχεί στη μετατροπή των mmol/l σε $\mu\text{mol/ml}$
- Η τιμή C_{δ} αφορά τη συγκέντρωση mg/ml της συνολικής πρωτεΐνης του δείγματος κυτταρικού αιωρήματος που προσδιορίστηκε με το αντιδραστήριο Bradford

❖ ***Μέτρηση ολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω της μεθόδου Bradford σε κύτταρα PBMCs***

Για την εκτίμηση της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης η μέθοδος του (Bradford 1976) όπως και στο πλάσμα. Συγκεκριμένα, 20 μl δείγματος προστίθενται σε 1 ml διαλύματος Bradford και μετά από επώαση 10 λεπτών στο σκοτάδι σε

θερμοκρασία δωματίου μετράται η οπτική απορρόφηση στα 595nm. Στα τυφλά δείγματα χρησιμοποιείται dH₂O.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ORP ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΣΚΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΥΣ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

3.1 Μεταβολή των επιπέδων οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε επαγγελματίες αθλητές καλαθοσφαίρισης, στην αρχή και το τέλος μιας αγωνιστικής χρονιάς

3.1.1 Εισαγωγή

Η καλαθοσφαίριση είναι από τα δημοφιλέστερα αθλήματα παγκοσμίως έχοντας κερδίσει το ενδιαφέρον αμέτρητων θεατών λόγω των δυναμικών χαρακτηριστικών του. Η συνολική διάρκεια ενός αγώνα καλαθοσφαίρισης ποικίλει από 40 έως 48 λεπτά κατά τη διάρκεια των οποίων ο αθλητής πραγματοποιεί ένα συνδυασμό πολυδιάστατων κινήσεων όπως είναι το τρέξιμο, το άλμα και η επιτάγχνση. Γίνεται λοιπόν κατανοητό ότι κατά τη διάρκεια ενός αγώνα ο αθλητής ενεργοποιεί τόσο τα αερόβια όσο και τα αναερόβια συστήματα. Ωστόσο, πολλές μελέτες έχουν καταδείξει ότι ο αναερόβιος μεταβολισμός είναι πρωταρχικός σε αθλητές καλαθοσφαίρισης (Ciuti et al. 1996; Crisafulli et al. 2002; Balčiūnas et al. 2006).

Γενικότερα, επαγγελματίες αθλητές του υψηλότερου επιπέδου συμμετέχουν κάθε αγωνιστική χρονιά σε διάφορες διοργανώσεις και συμπληρώνουν έναν αριθμό αγώνων μεγάλης έντασης που μπορεί να ξεπεράσει ακόμα και τους 60. Καθώς έχει δημοσιευτεί ότι η έντονη άσκηση αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών και εν συνεχεία οδηγεί σε οξειδωτικό στρες (Finaud et al. 2006; James E. Turner et al. 2014), η μελέτη ατόμων που υποβάλλονται σε μια τόσο απαιτητική διαδικασία

παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Το γεγονός, επίσης, ότι το οξειδωτικό στρες συσχετίζεται με μια σειρά βλαβών σε βιομόρια του οργανισμού όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA αυξάνει την ανάγκη παρακολούθησης του φαινομένου (Mylonas & Kouretas 1999). Οι πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια μιας έντονης άσκησης ποικίλουν. Όπως έχει προαναφερθεί, κατά τη διάρκεια έντονης αερόβιας άσκησης, όπως είναι ένας αγώνας καλαθοσφαίρισης που απαιτεί την κατανάλωση αρκετών μορίων O_2 , ένα ποσοστό της τάξης του 0,1-1% του καταναλωθέντος από το σκελετικό μυ O_2 είναι πιθανό να αναχθεί ατελώς στην αναπνευστική αλυσίδα παράγοντας ρίζες $O_2^{\cdot-}$. Τα επακόλουθα της παραγωγής των ριζών $O_2^{\cdot-}$ είναι η οξείδωση βιομορίων και σε περίπτωση εκτεταμένης βλάβης ο κυτταρικός θάνατος (Fatouros & Kouretas 2010; Malm et al. 1999; Steinbacher & Eckl 2015).

Ένας αγώνας καλαθοσφαίρισης περιλαμβάνει αρκετές επαναλαμβανόμενες έκκεντρες συστολές των μυών. Ο συγκεκριμένος τύπος άσκησης στη βιβλιογραφία έχει συσχετιστεί με αρκετά μονοπάτια παραγωγής ελευθέρων ριζών όπως είναι η οξειδάση της ξανθίνης και η δραστικότητα της οξειδάσης του NADPH στο φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και τη φαγοκυττάρωση αντίστοιχα. Ακόμα ένας σημαντικός λόγος που οδηγεί σε παραγωγή ελευθέρων ριζών και στη συνέχεια σε οξειδωτικό στρες είναι η φλεγμονώδης αντίδραση του οργανισμού στην προκληθείσα μυϊκή βλάβη κατά την οποία όπου αυξάνονται τα λευκοκύτταρα στο σημείο της φλεγμονής και προκαλούν υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ριζών (Pyne 1994; Fatouros & Kouretas 2010). Ο συνδυασμός όλων αυτών των μηχανισμών καταλήγουν, λοιπόν, σε ευρεία παραγωγή ROS και κατά συνέπεια σε κάματο των μυών, κυτταρική βλάβη και απόπτωση (Phaneuf & Leeuwenburgh 2001; McClung et al. 2010). Ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι η ένταση ενός αγώνα καλαθοσφαίρισης

βρίσκεται σε άμεση εξάρτηση με το επίπεδο της διοργάνωσης. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι παρατηρείται επαγωγή οξειδωτικού στρες σε κορυφαίες αθλητικές ομάδες, ιδιαίτερα μετά από απαιτητικά παιχνίδια (Zembron-Lacny, Slowinska-Lisowska, et al. 2010). Γίνεται, λοιπόν, σαφές ότι η παρακολούθηση των επιπέδων οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε επαγγελματίες αθλητές θα αποτελούσε ένα πολύ σημαντικό δεδομένο για το προσωπικό κάθε ομάδας δίνοντας πληροφορίες για το επίπεδο ετοιμότητας κάθε αθλητή. Παράλληλα, η εξατομικευμένη μελέτη των αθλητών θα μπορούσε να βοηθήσει τον προπονητή της ομάδας να προσαρμόσει το πρόγραμμα προπόνησης και να καθορίσει τη συμμετοχή των παικτών στους αγώνες ανάλογα με το βαθμό επιβάρυνσής τους.

Η παρούσα μελέτη, λοιπόν, επικεντρώθηκε στην εξατομικευμένη ανάλυση των επιπέδων οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε επαγγελματίες καλαθοσφαιριστές μιας κορυφαίας ευρωπαϊκής ομάδας σε δυο χρονικές στιγμές μιας αγωνιστικής περιόδου. Οι χρονικές στιγμές ήταν τον Νοέμβριο του 2014 (Φάση 1), όταν η ομάδα είχε αγωνιστεί σε μόλις 9 αγώνες και τον Μάιο του 2015 (Φάση 2), όταν η ομάδα είχε συμπληρώσει 59 αγώνες στο ενεργητικό της συμμετέχοντας μάλιστα σε 4 εντονότατους και κρίσιμους αγώνες σε διάστημα 10 ημερών πριν τη δειγματοληψία. Στα πλαίσια της εν λόγω μελέτης, πρωταγωνιστικό ρόλο στην μελέτη κατείχε το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS καθώς στόχος ήταν η μελέτη της αξιοπιστίας του εν λόγω μηχανήματος.

Για το σκοπό αυτό, μετρήθηκαν 5 βιοδείκτες προσδιορισμού των επιπέδων οξειδωτικού στρες φασματοφωτομετρικά σε δείγματα αίματος 14 αθλητών. Οι βιοδείκτες αυτοί ήταν τα CARB, τα TBARS, η GSH, η TAC και η δραστικότητα CAT. Τα επίπεδα των βιοδεικτών αυτών σε δείγματα αθλητών και στις δυο χρονικές στιγμές, συγκρίθηκαν και συσχετίστηκαν με τα αντίστοιχα ληφθέντα δεδομένα από

τον βιοδείκτη sORP, του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS. Όπως προαναφέρθηκε, η νέα αυτή μέθοδος, είναι βασισμένη στη μέτρηση της οξειδωτικής-αναγωγής (ORP) και προσδιορίζει την ισορροπία ανάμεσα σε οξειδωτικά και αναγωγικά μόρια (Stagos et al. 2014). Η συσχέτιση, επομένως, με ευρέως χρησιμοποιούμενους βιοδείκτες που εκτιμούν τις οξειδωτικές βλάβες βιομορίων και το αντιοξειδωτικό απόθεμα θα έδινε σαφείς απαντήσεις για την αποτελεσματικότητα και την ακρίβεια του εξεταζόμενου δείκτη.

3.1.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.1.2.1. Συμμετέχοντες

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν συνολικά 14 ενήλικες άντρες αθλητές (ηλικία: $26,8 \pm 1,2$ χρόνια, ύψος: $1,99 \pm 0,02$ μέτρα, βάρος: $101,6 \pm 2,63$ κιλά). Οι αθλητές συμμετείχαν σε όλες τις δραστηριότητες της ομάδας τους τόσο σε εθνικές όσο και σε ευρωπαϊκές διοργανώσεις. Οι πειραματικές διαδικασίες ήταν σε συμφωνία με την συνθήκη του Ελσίνκι (1964) και εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

3.1.2.2. Χρονικές στιγμές δειγματοληψίας

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια μιας αγωνιστικής περιόδου με διαφορά 24 εβδομάδων μεταξύ τους. Η πρώτη χρονική στιγμή δειγματοληψίας (Φάση 1) ήταν τον Νοέμβριο του 2014, όταν η ομάδα είχε αγωνιστεί σε 9 επίσημους αγώνες σε διάστημα 1 μήνα καθώς αγωνιζόταν 2 φορές την εβδομάδα. Η δεύτερη χρονική στιγμή δειγματοληψίας (Φάση 2) ήταν τον Μάιο του 2015, σε μια περίοδο που η ομάδα είχε αγωνιστεί σε 59

επίσημους αγώνες και μάλιστα τις τελευταίες 10 ημέρες πριν τη δειγματοληψία συμμετείχε σε 4 έντονους και απαιτητικούς αγώνες που έκριναν την επίτευξη των στόχων που είχαν τεθεί από την έναρξη της αγωνιστικής περιόδου. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στο διαγνωστικό κέντρο 'Χαρτογράφοι Υγείας' στο Μαρούσι. Τα δείγματα αίματος συλλέχτηκαν σε σωληνάρια EDTA και ηπαρίνης και η διαδικασία ακολουθήθηκε όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.2 της παρούσας διατριβής.

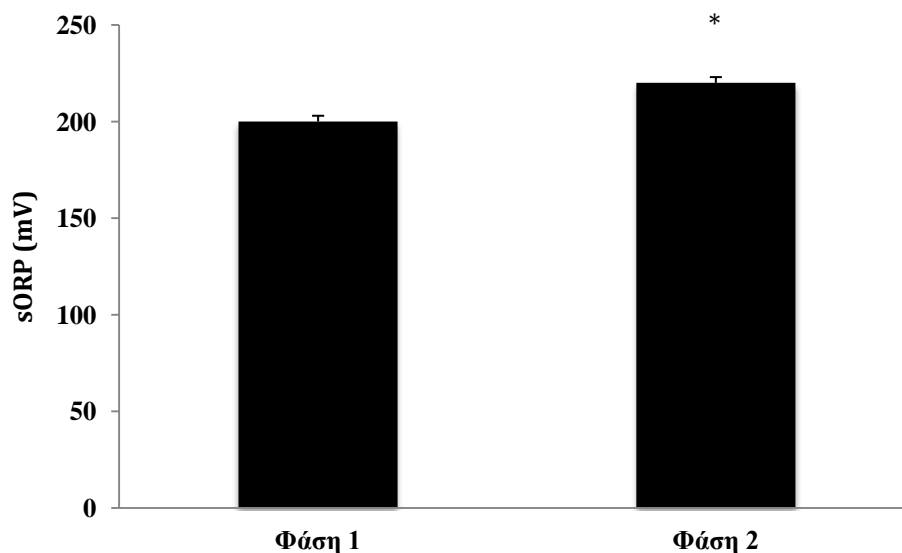
Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μετά την μέτρηση των βιοδεικτών αναλύθηκαν με one-way ANOVA ακολουθούμενα από το Dunnett's test για την εξέταση πολλαπλών συγκρίσεων κατά ζεύγη με το πρόγραμμα SPSS, version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα μέσου όρου (SEM).

3.1.3 Αποτελέσματα

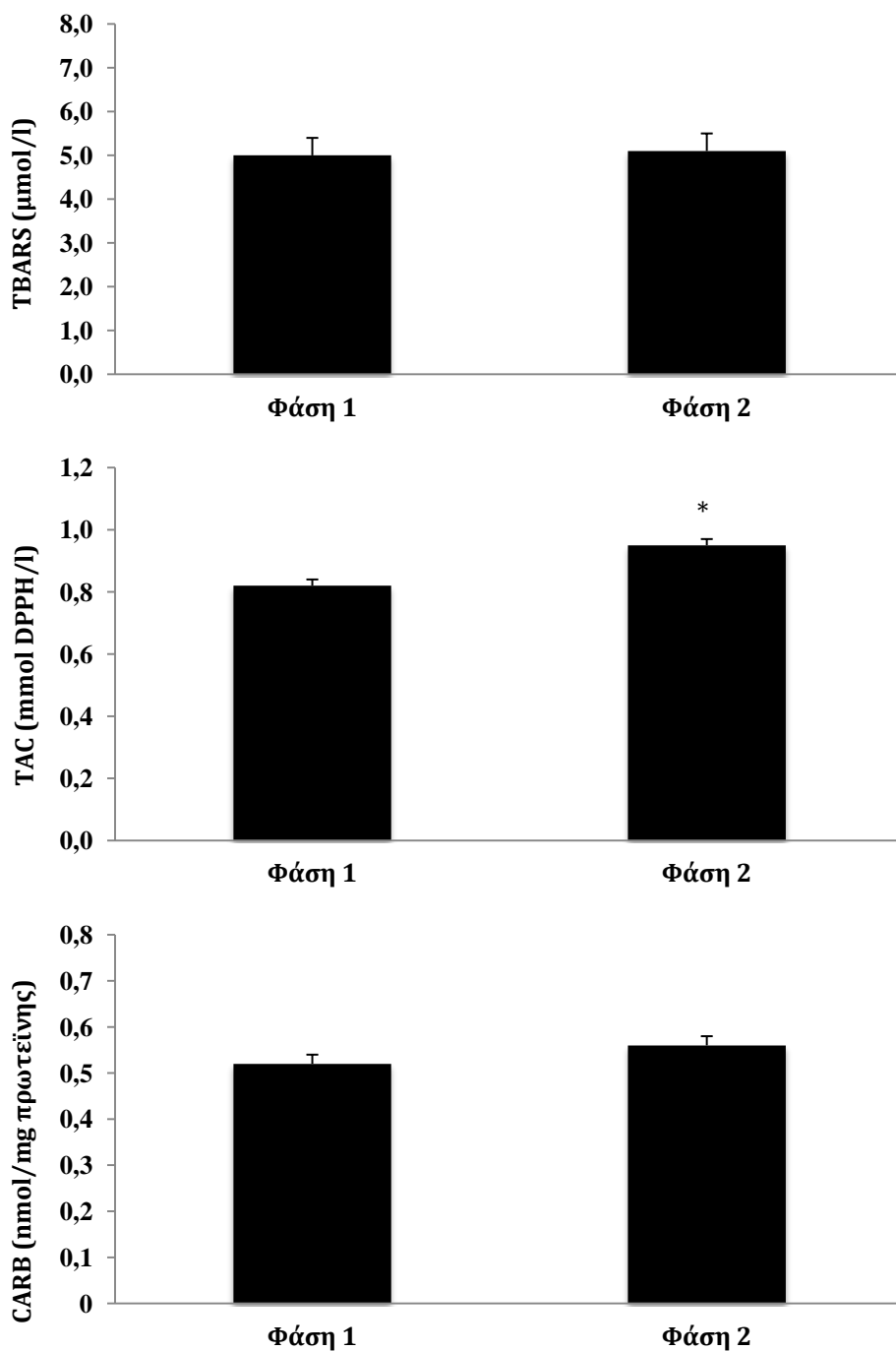
Τα αποτελέσματα της μελέτης κατέδειξαν ότι ο δείκτης sORP που αντιπροσωπεύει το στιγμιαίο οξειδοαναγωγικό δυναμικό αυξήθηκε στατιστικά σημαντικώς ($p < 0,05$) κατά 9,6% στη Φάση 2 σε σύγκριση με τη Φάση 1 (Διάγραμμα 1). Αντιθέτως, στους υπόλοιπους βιοδείκτες που είναι αντιπροσωπευτικοί της οξείδωσης βιομορίων όπως είναι τα CARB και τα TBARS (οξείδωση πρωτεϊνών και λιπιδίων, αντίστοιχα) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δυο

φάσεις (Διάγραμμα 2). Ωστόσο, η TAC αυξήθηκε σημαντικά στη Φάση 2 σε σύγκριση με τη Φάση 1 (Διάγραμμα 2).

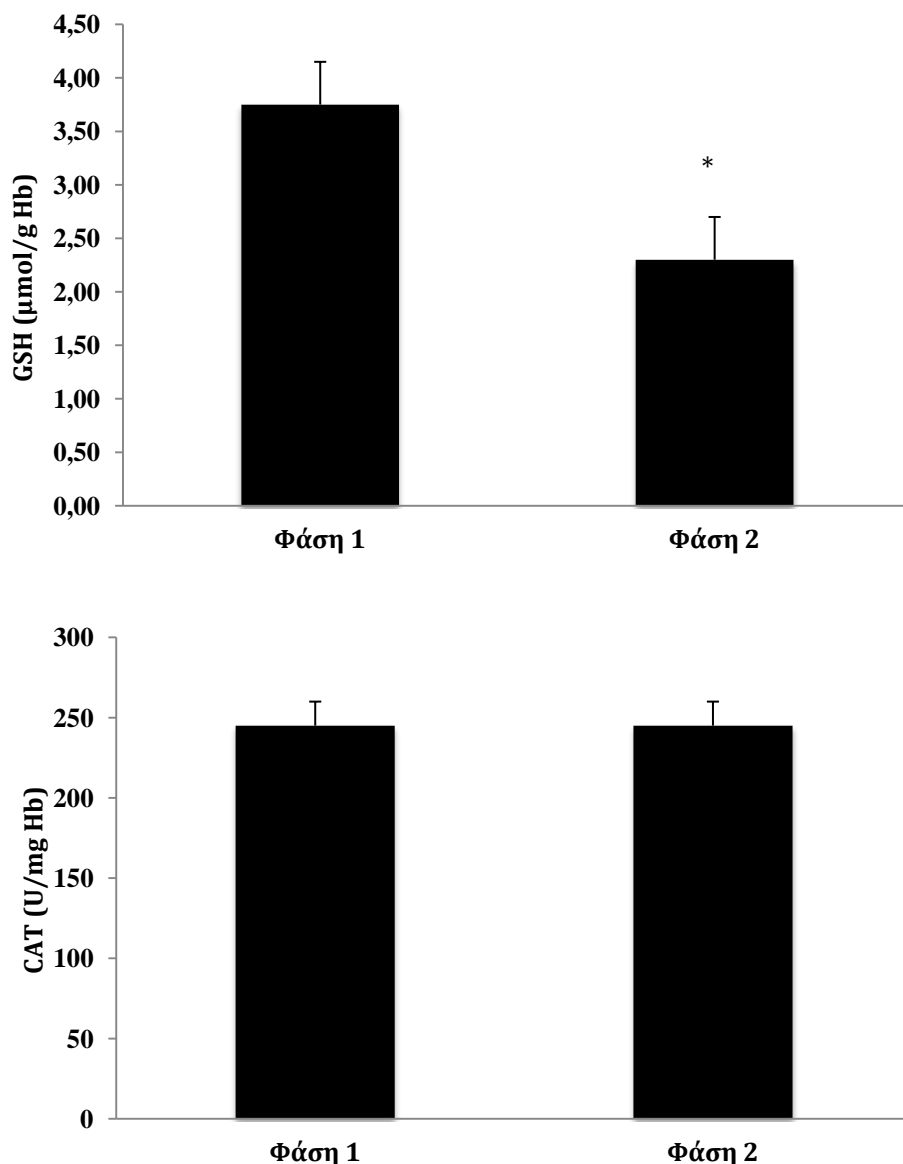


Διάγραμμα 1: Μέσος όρος των τιμών (\pm SEM) των τιμών του δείκτη sORP σε δείγματα πλάσματος αθλητών καλαθοσφαίρισης στην αρχή (Φάση 1) της και το τέλος (Φάση 2) της αγωνιστικής περιόδου. * Σημαντική διαφορά της Φάσης 2 σε σχέση με τη Φάση 1 ($p < 0,05$)

Στην ανάλυση των βιοδεικτών στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, τα επίπεδα της GSH μειώθηκαν στατιστικά σημαντικώς ($p < 0,05$) κατά 35% στη Φάση 2 σε σύγκριση με τη Φάση 1. Αντιθέτως, τα επίπεδα της καταλάσης δεν εμφάνισαν σημαντικές μεταβολές (Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 2: Μέσος όρος των τιμών (\pm SEM) των βιοδεικτών TBARS, TAC, CARB στα δείγματα πλάσματος αθλητών στην αρχή (Φάση 1) της και το τέλος (Φάση 2) της αγωνιστικής περιόδου. * Σημαντική διαφορά της Φάσης 2 σε σχέση με τη Φάση 1 ($p < 0,05$)



Διάγραμμα 3: Μέσος όρος των τιμών (\pm SEM) της GSH και της δραστηρότητας CAT στα δείγματα ερυθροκυτταρικού αιμολύματος αθλητών καλαθοσφαίρισης στα δείγματα πλάσματος αθλητών στην αρχή (Φάση 1) της και το τέλος (Φάση 2) της αγωνιστικής περιόδου. * Σημαντική διαφορά της Φάσης 2 σε σχέση με τη Φάση 1 ($p < 0,05$)

Δεδομένου ότι υπάρχουν ενδείξεις έντονης ανομοιογένειας στα επίπεδα οξειδωτικού στρες μεταξύ διαφορετικών ατόμων μετά από έντονη άσκηση που προέρχονται από μελέτες του εργαστηρίου μας και όχι μόνο (Stagos et al. 2015; Margaritelis et al. 2014; Margaritelis et al. 2015; Rankinen & Bouchard 2008), σε

αυτή τη μελέτη εξετάσαμε τις αλλαγές που εμφανίζονται σε βιοδείκτες οξειδωτικού στρες σε κάθε παίκτη μεταξύ των Φάσεων 1 και 2 της αθλητικής περιόδου τόσο σε απόλυτες τιμές (Πίνακες 1,2) όσο και τις % μεταβολές στη Φάση 2 σε σχέση με τη Φάση 1. Διαπιστώθηκε ότι σε όλους τους παίκτες οι τιμές sORP ήταν υψηλότερες στη Φάση 2 σε σύγκριση με τη Φάση 1 (Διάγραμμα 4 και Πίνακας 1). Παρομοίως, οι τιμές TAC μεταβλήθηκαν με παρόμοιο τρόπο σε σχεδόν όλους τους αθλητές στη Φάση 2 σε σύγκριση με τη Φάση 1 (Διάγραμμα 4 και Πίνακας 1). Ωστόσο, οι αλλαγές στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των TBARS παρατηρήθηκαν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των παικτών. Συγκεκριμένα, οι μισοί παίκτες παρουσίασαν αύξηση στα επίπεδά τους στη Φάση 2 σε σύγκριση με τη Φάση 1, ενώ οι υπόλοιποι μισοί παρουσίασαν μείωση (Διάγραμμα 4 και Πίνακας 1).

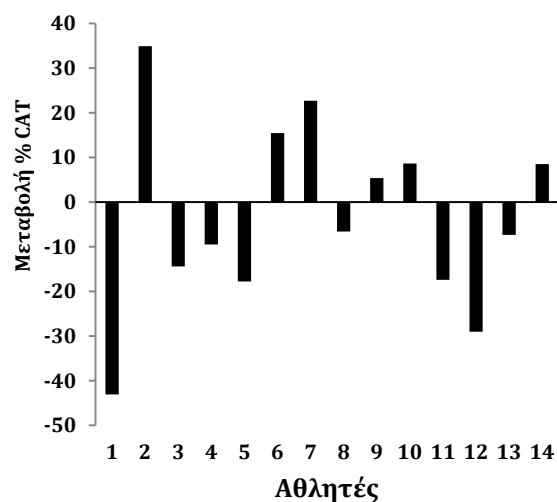
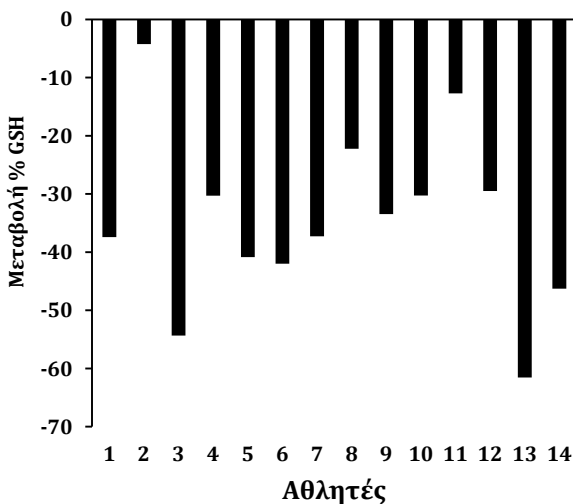
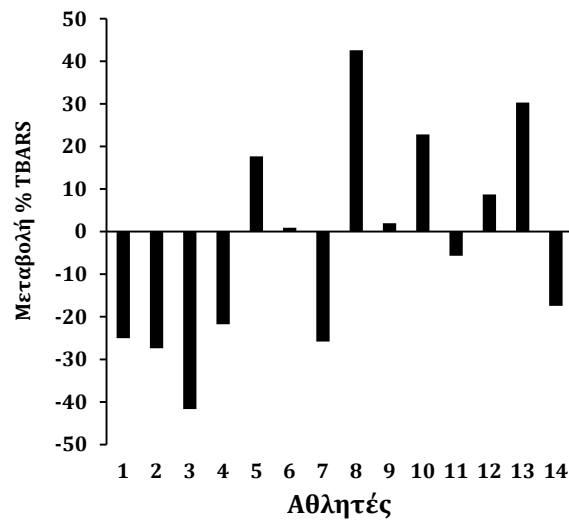
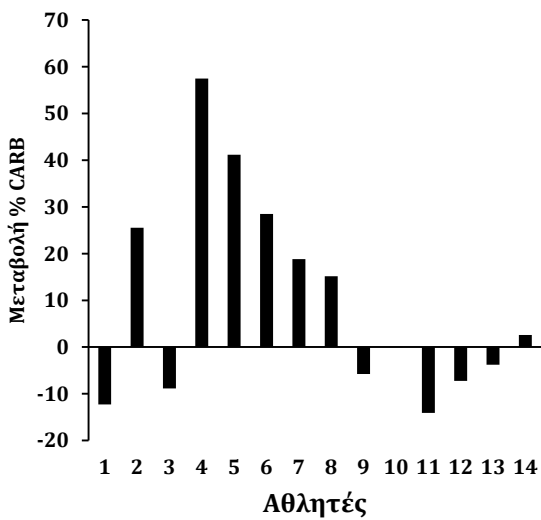
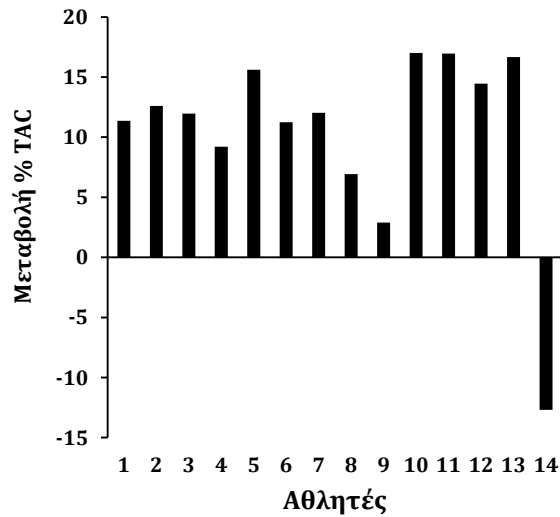
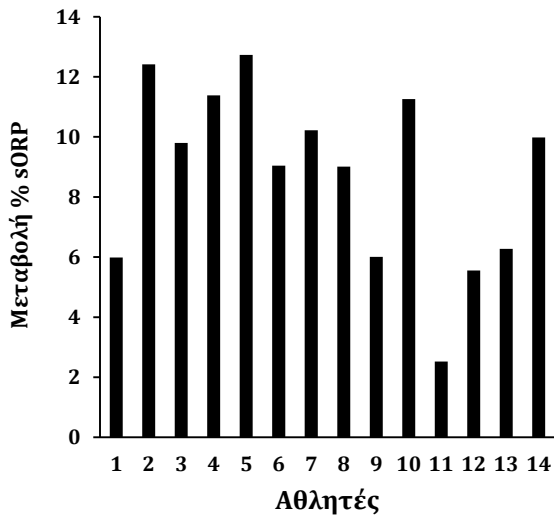
Παρόμοια αποτελέσματα που αποδεικνύουν ένα εντονότερο οξειδωτικό στρες στην Φάση 2 παρουσιάστηκαν στην εξατομικευμένη ανάλυση των επιπέδων GSH καθώς όλοι οι παίκτες είχαν μειωμένα επίπεδα στη Φάση 2 συγκριτικά με τα αντίστοιχα της Φάσης 1 (Διάγραμμα 4 και Πίνακας 2). Ωστόσο, το πιο ενδιαφέρον στοιχείο της συγκεκριμένης μελέτης ανιχνεύθηκε μετά από στατιστική συσχέτιση των επιπέδων μεταβολής των βιοδεικτών (%) από τη Φάση 1 στη Φάση 2. Η ανάλυση κατέδειξε σημαντική συσχέτιση του δείκτη sORP με τα πρωτεϊνικά καρβονύλια της τάξης του $r=0,795$ ($p<0,001$) χρησιμοποιώντας το συντελεστή συσχέτισης Spearman (Πίνακας 3). Οι υπόλοιποι βιοδείκτες δεν εμφάνισαν κάποια σημαντική συσχέτιση μεταξύ τους.

Αθλητής	CARB (nM/mg)		TBARS (μM/L)		TAC (mM DPPH/L)		sORP (mV)	
	Φάση 1	Φάση 2	Φάση 1	Φάση 2	Φάση 1	Φάση 2	Φάση 1	Φάση 2
1	0,57	0,50	5,31	4,05	0,90	1,00	202,6	214,7
2	0,45	0,56	5,42	3,92	0,92	1,04	192,3	216,1
3	0,52	0,47	6,14	3,64	0,94	1,05	187,8	206,2
4	0,40	0,63	5,01	3,91	0,86	0,94	192,3	214,2
5	0,46	0,65	4,22	4,92	0,76	0,88	201,6	227,2
6	0,47	0,60	4,23	4,24	0,88	0,98	202,7	221,0
7	0,47	0,56	6,04	4,54	0,86	0,96	202,9	223,6
8	0,53	0,61	3,53	5,02	0,81	0,87	203,0	221,3
9	0,51	0,48	5,02	5,12	0,82	0,84	208,2	220,7
10	0,63	0,63	4,55	5,55	0,85	0,99	196,6	218,7
11	0,65	0,56	5,60	5,31	0,75	0,88	214,6	220,0
12	0,42	0,39	5,22	5,72	0,86	0,98	203,2	214,5
13	0,53	0,51	4,65	6,02	0,85	0,99	206,9	219,8
14	0,50	0,51	5,60	4,61	0,85	0,74	199,3	219,2

Πίνακας 1: Μεταβολή των απόλυτων τιμών των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μετρήθηκαν στο πλάσμα στη Φάση 1 και στη Φάση 2 της μελέτης.

Αθλητής	GSH (μM/g Hb)		CAT (U/mg Hb)	
	Φάση 1	Φάση 2	Φάση 1	Φάση 2
1	2,22	1,42	202,6	214,7
2	3,13	3,01	192,3	216,1
3	3,41	1,61	187,8	206,2
4	4,44	3,12	192,3	214,2
5	3,83	2,22	201,6	227,2
6	5,01	2,91	202,7	221,0
7	4,32	2,72	202,9	223,6
8	4,44	3,44	203,0	221,3
9	5,22	3,50	208,2	220,7
10	2,82	2,01	196,6	218,7
11	2,83	2,43	214,6	220,0
12	3,61	2,52	203,2	214,5
13	3,92	1,55	206,9	219,8
14	3,54	1,94	199,3	219,2

Πίνακας 2: Μεταβολή των απόλυτων τιμών των βιοδεικτών οξειδοαναγωγικής κατάστασης που μετρήθηκαν στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα στη Φάση 1 και στη Φάση 2 της μελέτης.



Διάγραμμα 4: Ποσοστιαία (%) εξατομικευμένη μεταβολή των επιπέδων των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες κάθε αθλητή καλαθοσφαίρισης στη Φάση 2 της έρευνας σε σύγκριση με τη Φάση 1: Οι εξεταζόμενοι βιοδείκτες στο πλάσμα είναι οι

sORP, CARB, TBARS και TAC και στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα η GSH και η δραστικότητα CAT

	CARB	TBARS	TAC	GSH	CAT	sORP
CARB	-	0,055	-0,213	-0,007	0,477	0,795**
TBARS	0,055	-	0,209	0,051	-0,125	-0,191
TAC	-0,213	0,209	-	0,182	-0,165	0,011
GSH	-0,007	0,051	0,182	-	0,095	-0,064
CAT	0,477	-0,125	-0,165	0,095	-	0,455
sORP	0,795**	-0,191	0,011	-0,064	0,455	-

Πίνακας 3: Στατιστική συσχέτιση των επιπέδων (%) μεταβολής των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες των αθλητών καλαθοσφαίρισης μεταξύ των Φάσεων 1 και 2 του πειράματος. Οι εξεταζόμενοι βιοδείκτες στο πλάσμα είναι οι sORP, CARB, TBARS και TAC και στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα η GSH και η δραστικότητα CAT

** Σημαντική συσχέτιση ($p < 0,01$)

3.1.4 Συζήτηση

Η μελέτη του νέου συστήματος προσδιορισμού του οξειδοαναγωγικού δυναμικού RedoxSYS απαιτούσε την εξέτασή του σε δείγματα ανθρώπων που να έχουν υποβληθεί σε εξαντλητική άσκηση. Ως γνωστόν, η άσκηση μπορεί να προκαλέσει έντονη επαγωγή αυτού του φαινομένου (Sen 1995; James E. Turner et al. 2014), οπότε ο προσδιορισμός των μεταβολών της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας με το εν λόγω μηχανήμα και η σύγκριση με τους υπόλοιπους ευρέως χρησιμοποιούμενους βιοδείκτες θα έδινε σαφείς και έγκυρες εκτιμήσεις σχετικά με τη λειτουργικότητα του συστήματος.

Καθώς υπάρχουν λίγες μόνο μελέτες σχετικά με την αξιολόγηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού καλαθοσφαιριστών, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια μιας

αγωνιστικής χρονιάς, το ενδιαφέρον της παρούσας μελέτης επικεντρώθηκε στην εξέταση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού 14 αθλητών καλαθοσφαίρισης μιας κορυφαίας ευρωπαϊκής ομάδας σε δύο χρονικά σημεία και συγκεκριμένα στην αρχή (Φάση 1) και στο τέλος (Φάση 2) της σεζόν. Στη Φάση 1, οι παίκτες είχαν αγωνιστεί σε μόνο 9 αγώνες. Ωστόσο, στη φάση 2 οι παίκτες έπαιξαν 59 απαιτητικούς αγώνες, έναν αριθμό, ο οποίος θεωρείται πολύ υψηλός για μια ευρωπαϊκή ομάδα. Έτσι, το υψηλό φορτίο άσκησης λόγω του μεγάλου αριθμού αγώνων στη Φάση 2 είχε ως αποτέλεσμα αυξημένο οξειδωτικό στρες σε σύγκριση με τη Φάση 1. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα GSH στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα ήταν σημαντικά χαμηλότερα στη Φάση 2. Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η έντονη αερόβια άσκηση οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της GSH (Finaud et al. 2006). Παράλληλα, παρόμοια μελέτη που έγινε από τους Zembron-Lacny et al. (Zembron-Lacny, Slowinska-Lisowska, et al. 2010) σε επαγγελματίες παίκτες του πολωνικού πρωταθλήματος καλαθοσφαίρισης “Extraleague” έδειξε ότι τα επίπεδα GSH επίσης μειώθηκαν στο τέλος της περιόδου των play-off. Αυτή η μείωση στην GSH συνοδεύτηκε από αυξήσεις των κυτταροκινών αντι-φλεγμονώδους ιντερλευκίνης-6 (IL-6) αλλά και του προ-φλεγμονώδους ογκονεκρωτικού παράγοντα (TNF α) (Zembron-Lacny, Slowinska-Lisowska, et al. 2010). Γενικότερα, υπάρχουν αναφορές ότι η ασκησιογενής αύξηση των ROS ενεργοποιεί προσαρμοστικές αποκρίσεις μέσω μονοπατιών σηματοδότησης ρυθμιζόμενων από τις θειόλες (ανηγμένα και οξειδωμένα επίπεδα γλουταθειόνης) (Margaritelis et al. 2014; Zembron-Lacny, Slowinska-Lisowska, et al. 2010). Οι μεταβολές στην κατάσταση των θειολών προκαλούν έκφραση του Nf-k β και της ενεργοποιητικής πρωτεΐνης-1 (AP-1) που με τη σειρά τους αυξάνουν τις κυτοκίνες IL-6 και TNF α (Melikoglu et al. 2008; Rankinen & Bouchard 2008). Τέλος, οι κυτοκίνες IL-6 και TNF α διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην αναγέννηση των μυών

και στην ανάπτυξη ανοχής μετά από την επαγόμενη από τις ROS μυϊκή βλάβη (Zembron-Lacny, Naczka, et al. 2010). Αντίθετα με τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τη μέτρηση της GSH, η δραστηριότητα της καταλάσης στα ερυθροκύτταρα δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φάσεων. Ωστόσο, πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι η δραστηριότητά της αυξήθηκε μετά από έναν αγώνα μπάσκετ (Chatzinikolaou et al. 2014). Γενικά, δεν είναι σαφές ο τρόπος με τον οποίο η άσκηση επηρεάζει τη δραστηριότητα της καταλάσης αν και οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει ότι δεν την αυξάνει (Kerksick & Willoughby 2005; Steensberg et al. 2000).

Εν τούτοις, το αυξημένο οξειδωτικό περιβάλλον που εμφανίζεται στη Φάση 2 δεν ήταν σε τέτοια έκταση ώστε να προκαλεί υπεροξείδωση λιπιδίων και οξείδωση πρωτεϊνών όπως φαίνεται από τα αμετάβλητα επίπεδα στην ομαδική ανάλυση TBARS και CARB αντιστοίχως. Ομοίως, οι Zembron-Lacny et al. (Zembron-Lacny, Slowinska-Lisowska, et al. 2010) δε βρήκαν καμία αύξηση στα επίπεδα TBARS και CARB σε παίκτες μπάσκετ στο τέλος του γύρου των play-off. Η υπόθεση που αποδεικνύει την απουσία υπεροξείδωσης λιπιδίων και οξείδωσης πρωτεϊνών είναι ότι η έντονη αερόβια άσκηση που προκαλείται από την παραγωγή ROS αυξάνει τους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς μέσω αλλαγών στην κατάσταση της θειόλης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα που δείχνουν μείωση των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (μείωση επιπέδων GSH) επιβεβαιώθηκαν επίσης από την αύξηση του δείκτη sORP. Αυτή ήταν η πρώτη μέτρηση του δείκτη για την αξιολόγηση των επιπέδων οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε επαγγελματίες αθλητές. Εργασία που έχει εκπονηθεί στο εργαστήριό μας αναφέρει ότι το sORP αυξήθηκε στους αθλητές μετά από έναν μαραθώνιο βουνού υποδεικνύοντας επαγωγή οξειδωτικού στρες (Stagos et al. 2014). Παρομοίως, η αύξηση του δείκτη sORP στη

Φάση 2 σε σύγκριση με τη Φάση 1 καταδεικνύει, επίσης, αύξηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες. Επιπλέον, η ποσοστιαία μεταβολή του δείκτη sORP μεταξύ Φάσης 1 και 2 είχε υψηλή συσχέτιση με τις αλλαγές στα πρωτεϊνικά καρβονύλια, αν και όπως αναφέρθηκε παραπάνω δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στα πρωτεϊνικά καρβονύλια στη Φάση 1 σε σύγκριση με τη Φάση 2. Αυτό το εύρημα υποδεικνύει ότι όσο υψηλότερα είναι τα επίπεδα οξειδωτικού στρες, τόσο υψηλότερη είναι η πιθανότητα οξείδωσης πρωτεϊνών στους αθλητές και υποστηρίζει την αξία του sORP ως νέου δείκτη προσδιορισμού της οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Πράγματι, η οξείδωση των πρωτεϊνών είναι ένα επακόλουθο της υπέρμετρης παραγωγής ελευθέρων ριζών. Αυτό ακριβώς προσδιορίζει ο δείκτης sORP σε ένα δείγμα πλάσματος, καθώς το εντονότερο οξειδωτικό περιβάλλον το οποίο καταδεικνύουν οι αυξημένες τιμές sORP είναι η αυτούσια απεικόνιση της παρουσίας ελευθέρων ριζών και η υπερίσχυσή τους έναντι των αναγωγικών μορίων του οργανισμού όπως είναι τα αντιοξειδωτικά μόρια.

Ένας ακόμα δείκτης που αξιολόγησε τη συνολική οξειδοαναγωγική κατάσταση ήταν η TAC. Τα επίπεδά της ήταν υψηλότερα στη Φάση 2 απ' ό τι στη Φάση 1, γεγονός που δείχνει αύξηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών στο τέλος της σεζόν. Αυτό το αποτέλεσμα φαίνεται ενδιαφέρον, ειδικά σε σύγκριση με την επαγωγή οξειδωτικού στρες που δείχνουν οι υπόλοιποι βιοδείκτες. Άλλες μελέτες ανέφεραν επίσης αυξήσεις των TAC μετά την άσκηση (Wiggs 2015; Stagos et al. 2014). Αυτό το αντιφατικό στοιχείο εξηγείται αν ληφθεί υπόψη ότι η TAC αξιολογεί τη συνολική ποσότητα μορίων που λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά. Πράγματι, αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η άσκηση ενισχύει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Smuder et al. 2011; Oh-ishi et al. 1997). Ωστόσο, υπάρχει έντονος σκεπτικισμός για την αξιοπιστία της TAC ως ασφαλούς βιοδείκτη για την εκτίμηση της *in vivo*

οξειδοαναγωγικής κατάστασης (Stagos et al. 2014). Η αδυναμία της TAC έγκειται στο γεγονός ότι προσδιορίζει την αντιοξειδωτική ικανότητα των μορίων του πλάσματος μετά από αναγωγή μιας ελεύθερης ρίζας (DPPH). Έτσι, αυτή η μέθοδος αξιολογεί μόνο τα αναγωγικά του πλάσματος. Ωστόσο, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό όπως αυτό υπολογίζεται από το RedoxSYS προσδιορίζεται μετρώντας τόσο τα οξειδωτικά όσο και τα αναγωγικά μόρια στο πλάσμα. Έτσι, το sORP μπορεί να είναι ένας καλύτερος δείκτης από την TAC για την εκτίμηση του ολικού οξειδωτικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού *in vivo*. Σε μελέτη του εργαστηρίου μας, εξετάσαμε επίσης τη χρήση του sORP για τον προσδιορισμό των επιπέδων οξειδωτικού στρες που προκαλείται μετά από έκκεντρη άσκηση και βρήκαμε μεγάλη διακύμανση στις μεταβολές των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες μεταξύ διαφορετικών ατόμων (Stagos et al. 2015).

Γενικά, το θέμα της εξέτασης, όχι μόνο των μέσων ομαδικών αποκρίσεων σε επαγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες αλλά και των εξατομικευμένων μεταβολών παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, καθώς άλλες μελέτες έχουν επίσης πρόσφατα αναφέρει μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ των ατόμων όσον αφορά τις αλλαγές στους βιοδείκτες οξειδωτικού στρες μετά από άσκηση (Vasilaki et al. 2006; Mangner et al. 2013). Τα ευρήματα της έρευνάς μας έχουν επίσης παρουσιάσει μεγάλες διακυμάνσεις στις μεταβολές των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες μεταξύ των Φάσεων 1 και 2. Οι 6 εξεταζόμενοι βιοδείκτες οξειδωτικού στρες μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες με βάση τις μεταβολές των τιμών τους στη Φάση 2 σε σύγκριση με τη Φάση 1. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τους 3 βιοδείκτες οξειδωτικού στρες (sORP, TAC και GSH) στους οποίους όλοι (ή σχεδόν όλοι) οι αθλητές έχουν παρουσιάσει την ίδια κατεύθυνση στην αλλαγή τους στη Φάση 2 σε σύγκριση με τη Φάση 1. Έτσι, το sORP και η GSH αυξήθηκε και μειώθηκε σε όλους

τους αθλητές, αντίστοιχα και η TAC αυξήθηκε σε όλους εκτός από έναν στη Φάση 2 σε σύγκριση με τη Φάση 1. Η αύξηση του sORP σε όλους τους αθλητές αποδεικνύει ότι οξειδωτικό στρες είχε επαχθεί σε όλα αυτά τα άτομα λόγω του επαναλαμβανόμενου υψηλού φορτίου άσκησης και έντασης στη Φάση 2. Η αύξηση της TAC σε όλους εκτός από έναν αθλητή στη Φάση 2 σε σύγκριση με τη Φάση 1 ήταν σύμφωνη με την αύξηση του sORP δεδομένου ότι πρόβαλε την αύξηση των αντιοξειδωτικών μορίων (δηλαδή των αναγωγικών) λόγω της προσαρμοστικής ανταπόκρισης στο οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε στη Φάση 2. Η μείωση του δείκτη TAC σε έναν αθλητή στη Φάση 2 σε σύγκριση με τη Φάση 1 μπορεί να εξηγηθεί από την ανικανότητά του να ενεργοποιήσει αποτελεσματικά προσαρμοστικές αποκρίσεις στο οξειδωτικό στρες. Παράλληλα, μια ακόμα υπόθεση που μπορούμε να κάνουμε αναφορικά με την αύξηση της TAC στους περισσότερους αθλητές αφορά πιθανώς στα υψηλά επίπεδα καταβολισμού πουρινών, καθώς το ουρικό οξύ που αποτελεί περίπου το 60% των αντιοξειδωτικών μορίων στο πλάσμα που υπολογίζει, μπορεί να προέλθει από την οξείδωση των πουρινών (Boban & Modun 2010; Maiuolo et al. 2016).

Καθώς όπως προαναφέραμε η TAC ως βιοδείκτης δε δίνει εκτίμηση για τα οξειδωτικά μόρια του οργανισμού, συνεπώς, δεν υπάρχει πλήρης εικόνα για την οξειδοαναγωγική κατάσταση. Συνυπολογίζοντας το γεγονός ότι το οξειδωτικό στρες αποτελεί την απεικόνιση της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας ενός βιολογικού δείγματος, ο δείκτης sORP θεωρήθηκε εγκυρότερος καθώς βασίζεται στην αξιολόγηση της διαφοράς μεταξύ οξειδωτικών και αναγωγικών.

Αναφορικά με τα επίπεδα της GSH, η μείωση της σε όλους τους αθλητές στη Φάση 2 συγκριτικά με τη Φάση 1 μπορεί να υποδηλώνει τον κρίσιμο και σημαντικότερο ρόλο που παίζει στο ασκησιογενές οξειδωτικό στρες. Όπως

αναφέρθηκε παραπάνω, υπάρχουν ενδείξεις ότι το ασκησιογενές οξειδωτικό στρες ενεργοποιεί προσαρμογές μέσω μονοπατιών σηματοδότησης που ρυθμίζονται από θειόλες (Rankinen & Bouchard 2008; Zembron-Lacny, Naczka, et al. 2010).

Η δεύτερη κατηγορία βιοδεικτών περιλαμβάνει τους 3 βιοδείκτες οξειδωτικής καταπόνησης (TBARS, CARB και CAT) που παρουσίασαν μείωση ή αύξηση μεταξύ των διαφόρων αθλητών στη Φάση 2 σε σύγκριση με τη Φάση 1. Η μεγάλη ποικιλομορφία στα αποτελέσματα αυτών των βιοδεικτών μπορεί να εξηγηθεί από την υψηλή πολυπλοκότητα του μηχανισμού ομοίωσης οξειδοαναγωγής στους ανθρώπους. Αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει ότι διάφοροι παράγοντες όπως οι γενετικοί, φυσιολογικοί, βιοχημικοί και διατροφικοί επηρεάζουν τις τελικές επιδράσεις του οξειδωτικού στρες (Wiecek et al. 2015; Bloomer & Fisher-Wellman 2008).

Τέλος σημαντικό και καθοριστικό εύρημα στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, αποτελεί η πολύ σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων CARB και sORP. Αυτό το στοιχείο αποδεικνύει πως όντως, το υψηλό οξειδωτικό περιβάλλον λόγω της έντονης παρουσίας ελευθέρων ριζών που ανιχνεύθηκε από τα υψηλά επίπεδα sORP, οδήγησε σε μια ευρεία οξείδωση πρωτεϊνών και συνεπώς στα υψηλά επίπεδα CARB. Η συσχέτιση αυτή θεωρήθηκε πολύ σημαντικό στοιχείο καθώς φαίνεται πως υποστηρίζεται η χρήση του δείκτη sORP ως ενός ασφαλή τρόπου εκτίμησης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ατόμων και των πιθανών περαιτέρω επιπτώσεων που μπορεί η ευρεία παραγωγή ελευθέρων ριζών να επιφέρει στα βιομόρια του οργανισμού.

3.2 Μεταβολές των επιπέδων οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε διάστημα 3 ημερών μετά από αγώνα Υπερμαραθωνίου βουνού

Τα τελευταία χρόνια, η δημοτικότητα αγώνων δρόμου μεγάλης απόστασης έχει αυξηθεί κατακόρυφα λόγω των απαιτητικών και δυναμικών χαρακτηριστικών τους. Παρόμοιο ενδιαφέρον εντοπίζεται και στην επιστημονική κοινότητα όπως αντικατοπτρίζεται στον αυξημένο αριθμό δημοσιευμένων μελετών σε αθλητές που συμμετέχουν σε Μαραθωνίους ή Υπερμαραθωνίους δρόμους. Γενικότερα, ως Υπερμαραθώνιος θεωρείται οποιοδήποτε αθλητικό γεγονός που περιλαμβάνει τρέξιμο και περπάτημα σε διάστημα μεγαλύτερο ενός απλού Μαραθωνίου (42.195 μέτρα). Είναι δεδομένο πως τέτοιου είδους αγώνες προκαλούν μεταβολές στην ομοιόσταση του οργανισμού και επάγουν μυϊκούς τραυματισμούς, το σχηματισμό φλεγμονής και την οξείδωση βιομορίων από τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί στο παρελθόν πως η έντονη άσκηση επάγει την ευρεία παραγωγή ROS οδηγώντας σε ένα περισσότερο οξειδωτικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό και συνεπώς στην παθοφυσιολογική κατάσταση του οξειδωτικού στρες (Finaud et al. 2006; Radak et al. 2013; Varamenti et al. 2013). Πλήθος εργασιών έχουν αναφέρει ότι αγώνες δρόμου μεγάλης απόστασης σχετίζονται με την επαγωγή του οξειδωτικού στρες, αφού οι βιοδείκτες που δείχνουν υπεροξείδωση λιπιδίων, οξειδωτική βλάβη DNA, οξείδωση πρωτεϊνών αυξήθηκαν, ενώ τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων (π.χ., δισμουτάση υπεροξειδίου) και μορίων (π.χ. GSH) μειώθηκαν (Briviba et al. 2005; Inayama et al. 1996).

Τα ROS μετά από έντονη άσκηση, και δή μετά από αγώνα μαραθωνίου βουνού που περιλαμβάνει αρκετά αερόβια, αναερόβια και έκκεντρα κομμάτια μπορούν να προέρχονται από μηχανισμούς που περιλαμβάνουν την ατελή μεταφορά

e⁻ κατά την αλυσίδα μεταφοράς e⁻ στα μιτοχόνδρια, τη δραστηριότητα ενζύμων όπως η οξειδάση της ξανθίνης και η NADPH οξειδάση και τον καταβολισμό κατεχολαμινών (Davies et al. 1982; Skenderi et al. 2008; Parker et al. 2017) όπως έχει αναφερθεί εκτεταμένα και στο εισαγωγικό μέρος της παρούσας διατριβής.

Έτσι λοιπόν καθίσταται σαφές πως η μελέτη των επιπέδων οξειδοαναγωγικής κατάστασης των αθλητών που συμμετέχουν σε τέτοιου είδους γεγονότα, μπορούν να δώσουν σημαντικές απαντήσεις για τη συμπεριφορά του οργανισμού σε ακραίες συνθήκες άσκησης. Ο αγώνας στον οποίο έγινε η μελέτη είναι ένας ορεινός υπερμαραθώνιος με την επωνυμία “Olympus Mythical Trail”. Πραγματοποιήθηκε το διάστημα 4-6 Ιουλίου 2015 στο βουνό του Ολύμπου. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του αγώνα είναι ότι έχει μήκος διαδρομής 103 χιλιόμετρα, από τα οποία τα 40 βρίσκονται σε υψόμετρο άνω των 2000 μέτρων, ενώ η διαδρομή φτάνει μέχρι υψόμετρο 2906 μέτρων.

Όπως αναφέρθηκε, ο τύπος της άσκησης που έφεραν εις πέρας οι αθλητές ήταν κυρίως αερόβια με πολλά τμήματα έκκεντρης άσκησης εξαιτίας της κατάβασης σε πολλά σημεία του αγώνα. Σαν αποτέλεσμα ύστερα από αυτή την υπερβολική άσκηση και προσπάθεια που κατέβαλε κάθε αθλητής, ήταν η πρόκληση οξειδωτικού στρες μετά τον αγώνα ενώ σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη το μεγάλο υψόμετρο συμβάλλει και αυτό στην αύξηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες (Bakonyi & Radak 2004). Παράλληλα, το γεγονός ότι η διαδρομή περιλαμβάνει σημεία κατάβασης, όπως είναι φυσικό για έναν αγώνα βουνού, έχει ως αποτέλεσμα την υπερφόρτωση και την εκτεταμένη καταστροφή των μυικών ινών του τετρακεφάλου. Αυτό συμβαίνει, καθώς η έκκεντρη άσκηση, όπως είναι μια διαδρομή κατάβασης, έχει συσχετισθεί με εκτεταμένη μυική βλάβη και φλεγμονή και θεωρείται πιο έντονη

και απαιτητική σε σχέση με την ομόκεντρη ή την ισομετρική άσκηση (DiLorenzo et al. 2014; Liao et al. 2010; Peake et al. 2005; Beaven et al. 2014).

Προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου σε αθλητές που συμμετείχαν σε Μαραθώνιο Βουνού εξέταζε τις διαφορές των επιπέδων των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες μόνο σε ένα χρονικό σημείο αμέσως μετά τον αγώνα, συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα (Stagos et al. 2014). Συνεπώς, σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να επεκτείνει την περίοδο παρακολούθησης μετά από τη συμμετοχή σε Υπερμαραθώνιο σε διάστημα 3 ημερών μετά την ολοκλήρωση του αγώνα (δηλαδή 24, 48 και 72 ώρες μετά τον τερματισμό). Έτσι, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θα συμβάλουν σε μια καλύτερη κατανόηση των προσαρμοστικών μηχανισμών των οργανισμών έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τέτοια αθλητικά γεγονότα και κατά συνέπεια, θα συμβάλει στη βελτίωση της αποθεραπείας (π.χ. μεταβολή της διατροφής ή/και χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων).

Η ανάλυση αυτή βασίστηκε στους ευρέως χρησιμοποιούμενους βιοδείκτες προσδιορισμού οξειδωτικού στρες CARB, TBARS, TAC, GSH, CAT. Η μελέτη των βιοδεικτών αυτών αφενώς θα προσδιορίσει τις οξειδωτικές βλάβες πρωτεϊνών και λιπιδίων, που θα υποστούν πιθανώς οι οργανισμοί μετά από μια τόσο επίπονη άσκηση μετρώντας τους βιοδείκτες CARB και TBARS αντίστοιχα αλλά και θα δώσει μια εκτίμηση για το αντιοξειδωτικό απόθεμα και δράση μετρώντας τους βιοδείκτες GSH, TAC και CAT.

Προσπαθώντας να κατανοήσουμε τι πραγματικά συμβαίνει σχετικά με την οξείδωση των πρωτεϊνών πραγματοποιήσαμε επιπλέον ανάλυση προσδιορισμού των οξειδωμένων επιπέδων αλβουμίνης ανθρώπινου ορού (HSA) σε δείγματα πλάσματος των αθλητών με τη μέθοδο Western-blot. Οπώς αναφέρθηκε, η οξείδωση πρωτεϊνών συνήθως αξιολογείται με τη μέτρηση των επιπέδων καρβονυλίωσης πρωτεϊνών

(μέθοδος CARB) στο πλάσμα. Η HSA αποτελεί την πλέον άφθονη πρωτεΐνη στο πλάσμα (περίπου 50% της συνολικής πρωτεΐνης) (Farrugia 2010; MALIK et al. 2013). Είναι μια πολυλειτουργική, μη γλυκοζυλιωμένη σφαιρική πρωτεΐνη αποτελούμενη από 585 αμινοξέα με μοριακό βάρος 66 kDa και συντίθεται κυρίως στο ήπαρ (Pawar et al. 2016; Ishida et al. 2004). Η δομή της πρωτεΐνης περιέχει ένα κέντρο αποτελούμενο από υδρόφοβες ρίζες που χρησιμοποιούνται ως θέση πρόσδεσης για μόρια, ενώ το εξωτερικό μέρος αποτελείται από υδρόφιλους συνδέτες. Ειδικότερα, η HSA δεσμεύει και μεταφέρει μόρια, όπως χολερυθρίνη, ορμόνες, μεταλλικά ιόντα και ξενοβιοτικά (Doweiko & Nompoggi 1991). Επιπλέον, η HSA διαθέτει μια ελεύθερη ομάδαθειόλης, την Cys34, και έτσι μπορεί να λειτουργήσει ως ένα εξωκυτταρικό αντιοξειδωτικό για την εξουδετέρωση των ROS (Halliwell 1988; Imai et al. 2002). Επιστημονικές ομάδες έχουν δημοσιεύσει μια σειρά μελετών που εξηγούν λεπτομερώς τη συσχέτιση μεταξύ οξειδωτικής βλάβης και αυξημένης οξειδωτικής ευαισθησίας αλβουμίνης ορού βοδιού (BSA) (Davies, Delsignore, et al. 1987; Davies & Delsignore 1987; Davies, Lin, et al. 1987). Συγκεκριμένα, μόρια HSA περιέχουν ομάδες σουλφυδρυλίου κυστεΐνης και μεθειονίνης που αντιδρούν με ROS οδηγώντας στην οξείδωση τηςθειόλης Cys34 (Alvarez et al. 1999; Carballal et al. 2003). Γενικότερα, θεωρείται ότι η HSA δρα ως αντιοξειδωτικό, καθώς η Cys34 της αλβουμίνης που αντιπροσωπεύει περίπου το 80% της συνολικής περιεκτικότητας σεθειόλη στο πλάσμα αντιμετωπίζει τα παραγόμενα ROS (Imai et al. 2002). Ωστόσο, υπό συνθήκες έντονου οξειδωτικού στρες και λόγω αυτής της αλληλεπίδρασης με την ευρέως παραγόμενη ποσότητα ROS, η HSA οξειδώνεται και η Cys34 σχηματίζει δισουλφίδιο μεθειόλες χαμηλού μοριακού βάρους, όπως άλλες κυστεΐνες (πχ GSH) ακόμα και με άλλα μόρια HSA. Έτσι, η προκαλούμενη από τις ελεύθερες ρίζες οξείδωση μπορεί να επηρεάσει τη διαμόρφωση και τη δομή του μορίου (Lamprecht et

al. 2008). Αξίζει να αναφερθεί πως τα διμερή HSA έχουν αναφερθεί ως προϊόντα υπεροξειδωσης που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες και κατά συνέπεια μπορούν να αξιοποιηθούν ως βιοδείκτες εκτίμησης των επιπέδων οξειδωτικού στρες (Ogasawara et al. 2006). Επιπλέον, δεδομένου ότι αρκετές μελέτες έχουν αναφέρει τη σχέση μεταξύ της οξειδωσης της HSA και της άσκησης (Imai et al. 2002; Lamprecht et al. 2008; Veskoukis et al. 2010), ο προσδιορισμός των επιπέδων διμερών HSA, μπορεί να είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξειδωτικού στρες στους αθλητές δίνοντας παράλληλα πληροφορίες σχετικά με το κατά πόσο επηρεάζει η οξείδωση της HSA το σύνολο των οξειδωμένων πρωτεϊνών όπως μετρώνται από τη μέθοδο CARB.

Τέλος, στην παρούσα εργασία, οι βιοδείκτες ORP χρησιμοποιήθηκαν και πάλι για να εξεταστούν αν είναι αποτελεσματικοί για την παρακολούθηση του επαγόμενου οξειδωτικού στρες σε μια βραχυπρόθεσμη περίοδο μετά από άσκηση. Τελικός στόχος της μελέτης μας ήταν να αναλύσουμε σε ατομικό επίπεδο τα επίπεδα μεταβολής του οξειδωτικού στρες, αφού η προαναφερθείσα μεγάλη μεταβλητότητα έχει αναφερθεί μεταξύ διαφορετικών ατόμων σε προηγούμενη μελέτη (Stagos et al. 2015).

3.2.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.2.1 Συμμετέχοντες

Στην συγκεκριμένη έρευνα έλαβαν μέρος δώδεκα άντρες αθλητές (ηλικία: $41,1 \pm 3,2$ χρόνια, ύψος: $1,78 \pm 0,02$ μέτρα, βάρος: $72,9 \pm 2,0$ κιλά) εθελοντικά. Οι αθλητές παρείχαν γραπτή συγκατάθεση για τη συμμετοχή τους στην μελέτη. Οι διαδικασίες ήταν, σύμφωνα με τη Συνθήκη του Ελσίνκι του 1964, όπως αναθεωρήθηκε το 2000 και η έγκριση ελήφθη από την επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Επιπλέον, οι αθλητές δεν έπαιρναν αντιφλεγμονώδη ή άλλα φάρμακα. Όλοι είχαν προγενέστερες εμπειρίες ορεινού τρεξίματος, καθώς ήταν προαπαιτούμενη η συμμετοχή και ο τερματισμός σε έναν αγώνα 80 χιλιομέτρων σε βουνό μέσα στα τρία τελευταία χρόνια για να μπορέσουν να υποβάλουν τη συμμετοχή τους στον συγκεκριμένο αγώνα.

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

3.2.2.2. Χρονικές στιγμές δειγματοληψίας

Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σε τέσσερις χρονικές στιγμές. Η πρώτη χρονική στιγμή ήταν 8 ώρες πριν τον αγώνα στο Κέντρο Υγείας Λιτοχώρου. Οι επόμενες δειγματοληψίες ήταν στις 24, 48 και 72 ώρες μετά τον τερματισμό του κάθε αθλητή. Αθλητές που ήταν κάτοικοι Αθηνών πραγματοποίησαν τις δειγματοληψίες για τις χρονικές στιγμές των 24,48 και 72 ωρών στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών “Ο Ευαγγελισμός” ενώ οι αθλητές που ήταν κάτοικοι Θεσσαλονίκης πραγματοποίησαν τις αντίστοιχες δειγματοληψίες στο “Θεαγένειο” Αντικαρκινικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης.

3.2.2.3 Δειγματοληψία

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάρια EDTA και ηπαρίνης και η διαδικασία ακολουθήθηκε όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.2 της παρούσας διατριβής.

3.2.2.4 Στοιχεία αγώνα ‘‘Olympus Mythical Trail’’

Ο αγώνας πραγματοποιήθηκε το διήμερο 4-6 Ιουλίου 2015 στον Όλυμπο με την επωνυμία ‘‘Olympus Mythical Trail 2015’’. Η απόσταση της διαδρομής ήταν 103 χιλιόμετρα, ενώ η συνολική ανάβαση (δηλ. θετική διαφορά ύψους) έφτασε τα 7200 μ. (περισσότερο από 2 φορές το ύψος του Ολύμπου). Η διαδρομή αποτελούνταν κατά 95% από μονοπάτια και κατά 5% από χωματόδρομους ενώ περίπου 40 χιλιόμετρα της διαδρομής ξεπερνούσαν τα 2000 μ. υψόμετρο. Το μέσο υψόμετρο της διαδρομής ήταν τα 1516 μέτρα, το μέγιστο υψόμετρο έφτανε τα 2905 μέτρα ενώ ο μέγιστος χρόνος για την ολοκλήρωση της κούρσας ήταν οι 28 ώρες.

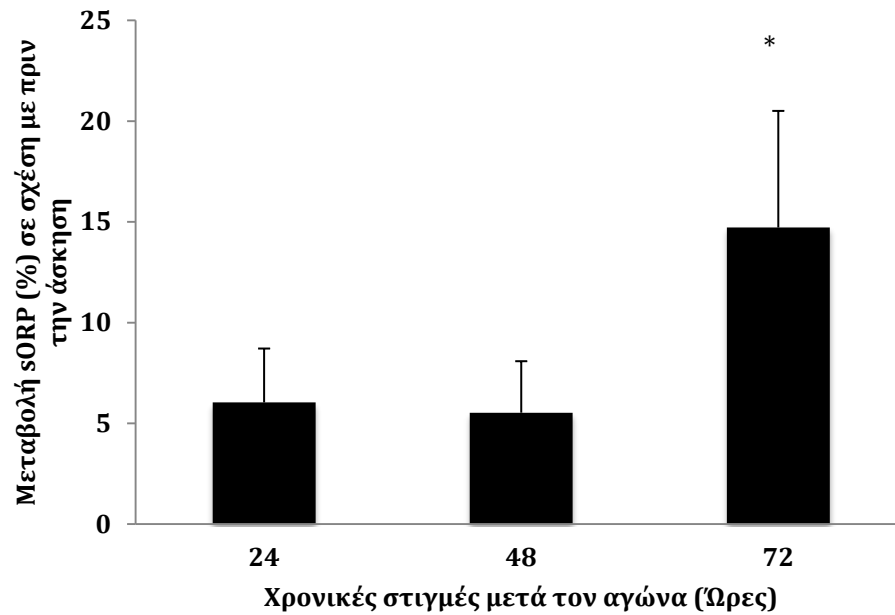
Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μετά την μέτρηση των βιοδεικτών αναλύθηκαν με one-way ANOVA ακολουθούμενα από το Dunnett’s test για την εξέταση πολλαπλών συγκρίσεων κατά ζεύγη με το πρόγραμμα SPSS, version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα μέσου όρου (SEM).

3.2.3 Αποτελέσματα

Όλα τα αποτελέσματα των βιοδεικτών παρουσιάζονται για λόγους σύγκρισης μεταξύ τους σε ποσοστιαίες μεταβολές (%) σε σχέση με το δείγμα που λήφθηκε πριν την άσκηση (pre). Ωστόσο, σε κάθε βιοδείκτη παρουσιάζονται επίσης οι απόλυτες τιμές όπως μετρήθηκαν για κάθε αθλητή σε όλες τις χρονικές στιγμές προκειμένου να γίνει πιο σαφής η διακύμανση των επιπέδων των οξειδοαναγωγικών βιοδεικτών.

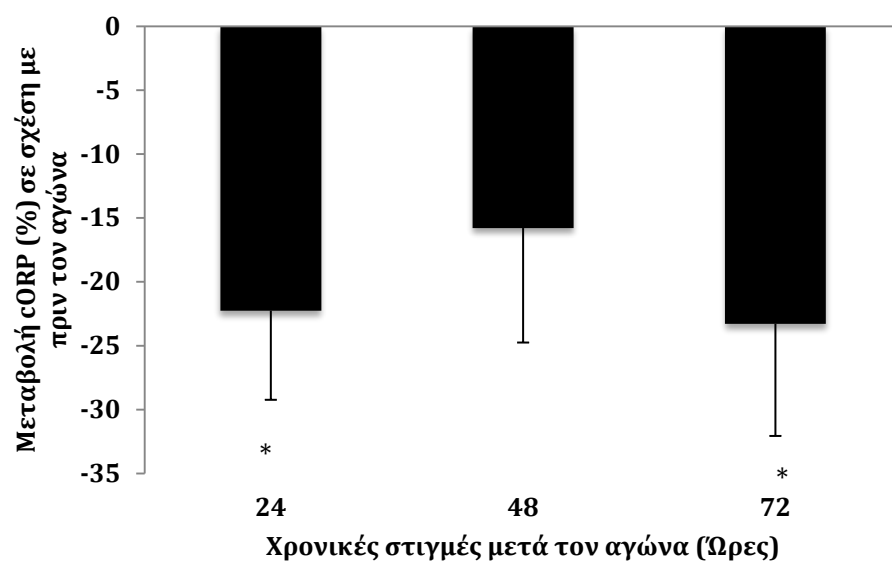
Αρχίζοντας από τους βιοδείκτες ORP, ο βιοδείκτης sORP που αντιπροσωπεύει την παρούσα οξειδοαναγωγική κατάσταση ήταν σημαντικά αυξημένος ($p < 0,05$) κατά 14,29% στις 72 ώρες σε σχέση με τα δείγματα πριν τον αγώνα (Διάγραμμα 5). Αυτή η αύξηση υποδεικνύει ένα αυξημένο οξειδωτικό δυναμικό την παρούσα χρονική στιγμή. Όσον αφορά τον δείκτη cORP που αντιπροσωπεύει το αντιοξειδωτικό απόθεμα, ήταν σημαντικά μειωμένος ($p < 0,05$) στις 24 ώρες και στις 72 ώρες κατά 22,26% και 23,29% αντίστοιχα σε σχέση με τα δείγματα πριν τον αγώνα (Διάγραμμα 6). Αυτή η μείωση υποδεικνύει μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών σε αυτές τις χρονικές στιγμές.



Διάγραμμα 5: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη sORP στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM). *Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Αριθμός Αθλητή	PRE	24h	48h	72h
1	130,15	118,26	115,93	118,8
2	130,2	130,15	131,35	125,35
3	147,33	169,4	159,15	145,8
4	118,2	135,2	129,8	134,9
5	117,85	116,5	121,7	147,7
6	124,65	147,1	144,05	139,5
7	131,8	130,1	125,3	222,65
8	135,1	135,1	138,2	143,85
9	138,45	143,2	148,05	149,3
11	138,3	147,2	143,5	151,8
12	134,53	141,85	146,1	137,86
14	126,45	153,5	155,6	146,2
Μέσος όρος \pm SEM	131,07 \pm 2,46	138,95 \pm 4,28	138,21 \pm 3,91	146,92 \pm 7,44

Πίνακας 4: Τιμές sORP (mV) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές. Παρατίθεται ο μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM)



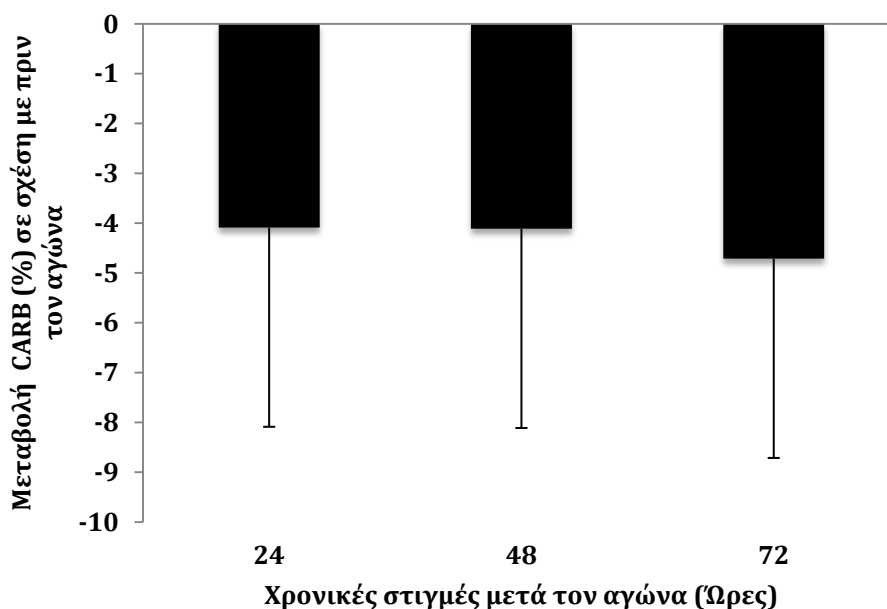
Διάγραμμα 6: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη cORP στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM). *Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$).

Αριθμός Αθλητή	PRE	24h	48h	72h
1	0,59	1,13	0,98	0,96
2	0,49	0,48	0,47	0,39
3	0,31	0,29	0,28	0,41
4	0,79	0,48	0,69	0,73
5	0,91	0,92	0,94	0,44
6	0,87	0,43	0,43	0,57
7	0,54	0,55	0,76	0,14
8	0,47	0,44	0,41	0,48
9	0,47	0,31	0,27	0,33
11	0,49	0,41	0,53	0,40
12	0,74	0,57	0,51	0,71
14	0,89	0,25	0,26	0,38
Μέσος όρος±SEM	0,63±0,05	0,52±0,07	0,54±0,07	0,50±0,06

Πίνακας 5: Τιμές cORP(μC) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές. Παρατίθεται ο μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM)

Αναφορικά με τους υπόλοιπους φωτομετρικούς βιοδείκτες εκτίμησης του οξειδωτικού στρες, τα επίπεδα της γλουταθειόνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα ήταν σημαντικά μειωμένα ($p < 0.05$) σε όλες τις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα, δηλαδή στις 24, στις 48 και στις 72 ώρες κατά 26,78%, 29,04% και 23,19% αντίστοιχα, σε σχέση με πριν τον αγώνα (Διάγραμμα 10).

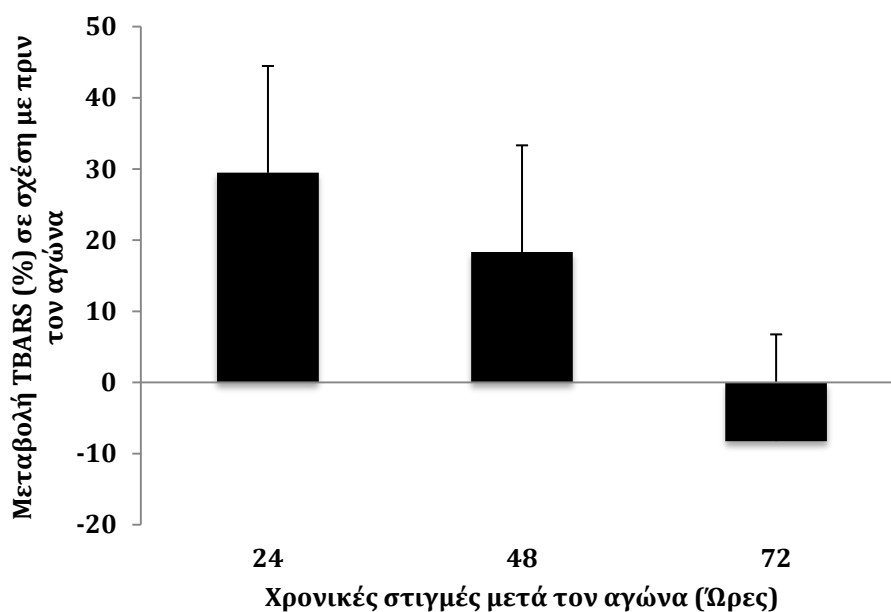
Αντίθετα, κανένας άλλος δείκτης (CAT, TBARS, CARB, TAC) δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές ($p < 0,05$) σε καμία χρονική στιγμή (Διαγράμματα 7,8,9,11) Αυτή η έλλειψη στατιστικά σημαντικών διακυμάνσεων των βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες μετά το πέρας της άσκησης βρίσκει εξήγηση στην μεγάλη ποικιλομορφία που παρουσιάζουν ανά άτομο.



Διάγραμμα 7: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη CARB στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM).

Αριθμός Αθλητή	PRE	24h	48h	72h
1	0,591	0,325	0,526	0,416
2	0,617	0,545	0,461	0,643
3	0,545	0,494	0,305	0,351
4	0,461	0,786	0,325	0,571
5	0,649	0,455	0,370	0,571
6	0,468	0,532	0,682	0,552
7	0,669	0,552	0,552	0,701
8	0,506	0,500	0,571	0,500
9	0,578	0,422	0,656	0,513
10	0,474	0,539	0,519	0,429
11	0,357	0,344	0,448	0,455
12	0,422	0,416	0,481	0,273
Μέσος όρος±SEM	0,528±0,02	0,492±0,03	0,491±0,03	0,498±0,03

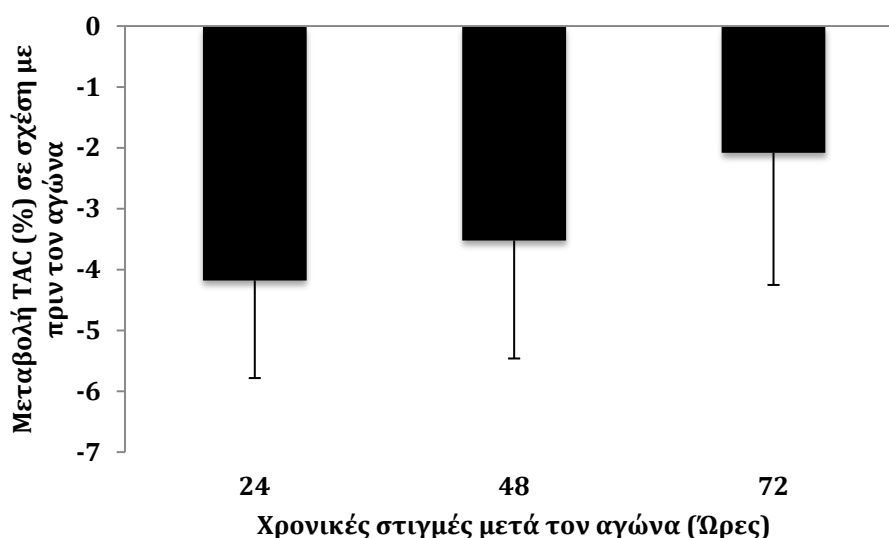
Πίνακας 6: Τιμές του βιοδείκτη CARB (nmol/mg πρωτεΐνης) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές. Παρατίθεται ο μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM)



Διάγραμμα 8: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη TBARS στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα σε σχέση με πριν τον αγώνα (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM).

Αριθμός Αθλητή	PRE	24h	48h	72h
1	6,75	6,06	5,56	5,56
2	4,57	5,29	5,37	4,96
3	4,24	5,23	3,24	3,84
4	5,17	4,77	4,31	4,44
5	5,33	7,42	6,82	4,77
6	3,71	12,2	12,78	4,97
7	5,37	5,3	4,31	5,03
8	5,03	4,84	6,92	4,5
9	6,69	7,02	6,62	6,89
10	9,07	6,96	6,99	4,97
11	7,02	5,43	6,82	5,23
12	7,68	5,83	5,37	7,29
Μέσος όρος±SEM	5,88±0,42	6,77±0,97	6,34±0,75	5,20±0,21

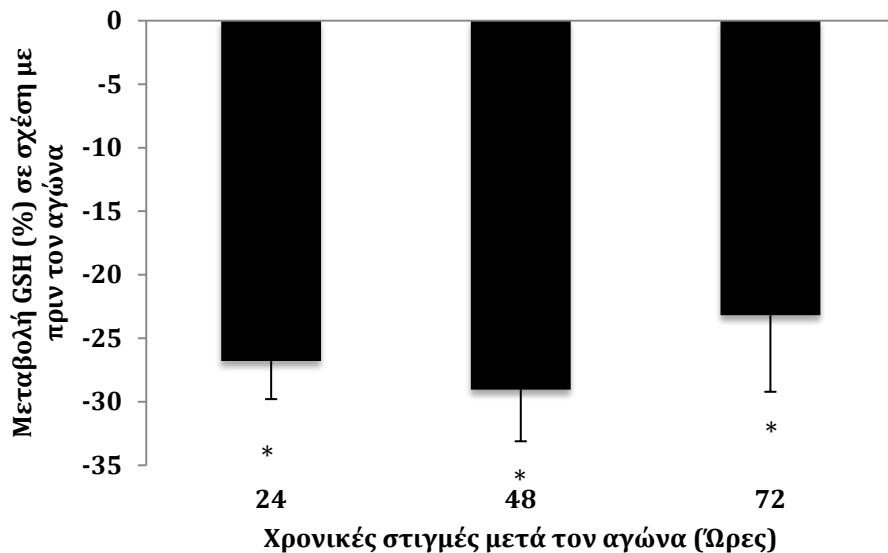
Πίνακας 7: Τιμές TBARS ($\mu\text{M/L}$) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές. Παρατίθεται ο μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM)



Διάγραμμα 9: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη TAC στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM).

Αριθμός Αθλητή	PRE	24h	48h	72h
1	0,84	0,72	0,81	0,81
2	0,78	0,69	0,84	0,93
3	0,93	0,93	0,78	0,92
4	1,01	0,92	0,94	0,92
5	0,87	0,82	0,91	0,91
6	0,88	0,87	0,83	0,92
7	1,06	1,02	1,01	1,01
8	0,91	0,93	0,96	0,9
9	1,05	1,04	1,03	1,05
10	0,94	0,96	0,92	0,98
11	1,01	1,00	0,96	0,97
12	0,84	0,78	0,73	0,56
Μέσος όρος±SEM	0,92±0,02	0,89±0,03	0,89±0,02	0,91±0,03

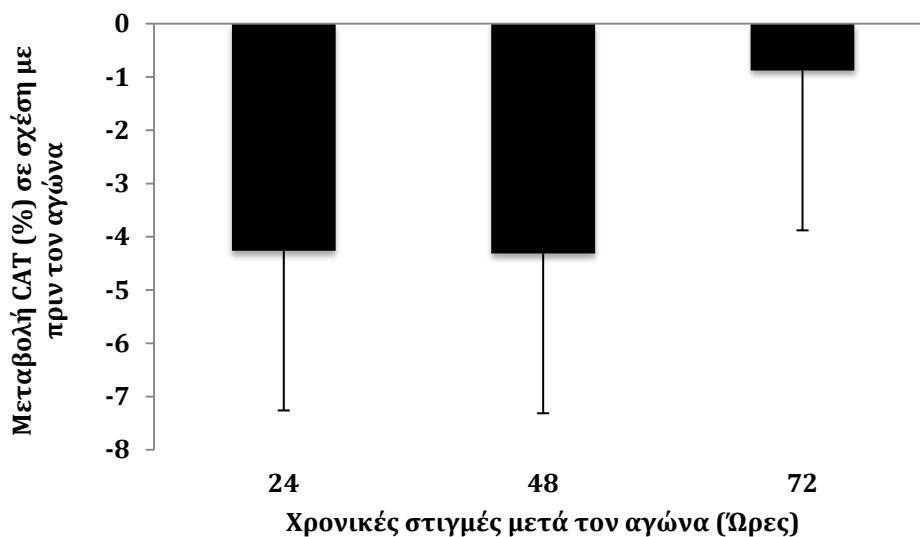
Πίνακας 8: Τιμές του βιοδείκτη TAC (mM DPPH/L πλάσματος) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές. Παρατίθεται ο μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM)



Διάγραμμα 10: Ποσοστιαία μεταβολή (%) της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα (μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM).

Αριθμός Αθλητή	PRE	24h	48h	72h
1	4,49	3,1	3,76	3,48
2	6,41	4,27	4,62	7,2
3	6,29	5,27	4,31	4,22
4	7,53	6,45	6,46	7,61
5	2,63	2,57	2,57	2,6
6	6,27	4,57	3,83	4,39
7	3,99	2,42	1,82	2,06
8	3,16	2,05	1,52	1,86
9	3,99	3,2	2,83	2,74
10	9,05	5,46	7,43	7,44
11	4,49	2,88	3,62	2,34
12	2,89	2,31	2,37	2,99
Μέσος όρος±SEM	5,09±0,66	3,71±0,41	3,76±0,51	4,07±0,62

Πίνακας 9: Τιμές του βιοδείκτη GSH ($\mu\text{M/g Hb}$) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές. Παρατίθεται ο μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM)



Διάγραμμα 11: Ποσοστιαία μεταβολή (%) της δραστηριότητας CAT στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα (μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου, SEM).

Αριθμός Αθλητή	PRE	24h	48h	72h
1	176,74	238,44	239,84	221,69
2	231,03	202,41	189,94	195,48
3	191,1	191,18	171,92	176,91
4	228,12	216,77	221,79	249,29
5	200,84	382,41	340,7	371,46
6	293,67	301,00	313,98	319,76
7	333,91	287,88	316,31	328,82
8	343,38	307,25	271,13	285,96
9	379,62	304,71	344,09	377,53
10	328,71	227,54	272,25	301,69
11	370,07	339,89	368,87	306,94
12	263,20	258,07	208,20	227,75
Μέσος όρος±SEM	278,35±20,91	271,46±16,95	271,58±18,95	277,27±19,05

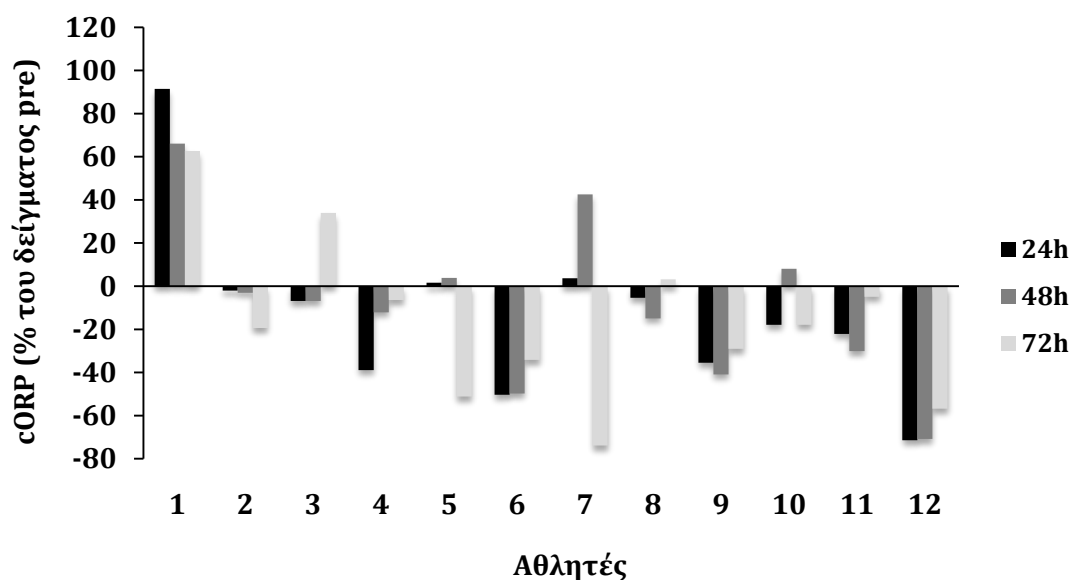
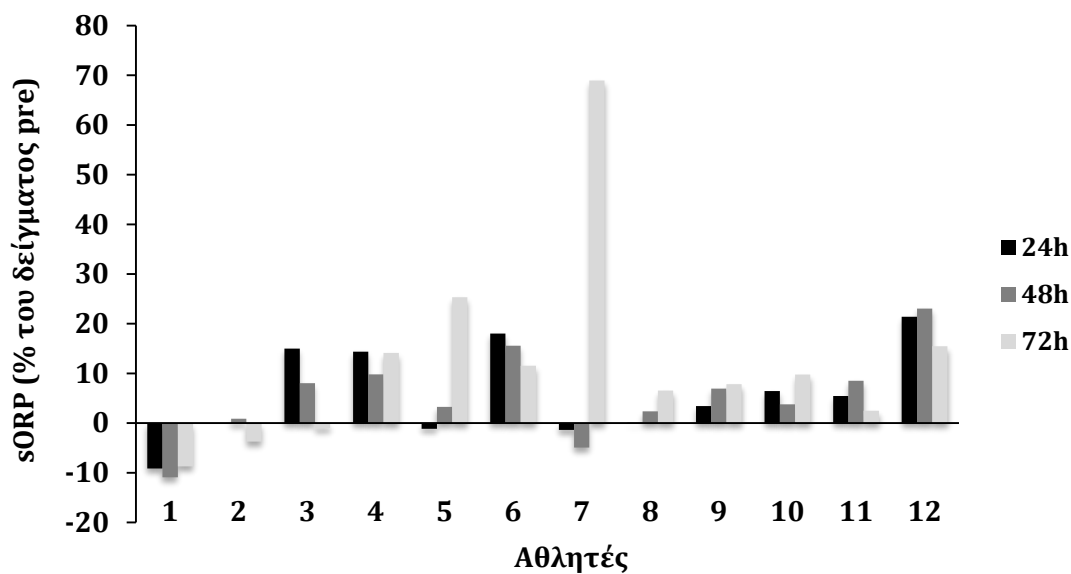
Πίνακας 10: Τιμές δραστηριότητας CAT (U/mg Hb) σε κάθε αθλητή που συμμετείχε στον αγώνα υπερμαραθωνίου βουνού, σε όλες τις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές. Παρατίθεται ο μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM)

Στη συνέχεια, καθώς έχουν αναφερθεί μελέτες που δείχνουν την πιθανή ετερογένεια στην ανταπόκριση διαφορετικών ατόμων ιδιαίτερα μετά από έκκεντρη άσκηση (Margaritelis et al., 2014; Margaritelis et al., 2015; Stagos et al., 2015a), λόγω της μεγάλης επιβάρυνσης του τετρακέφαλου μυός ιδιαίτερα σε κατηφορικές διαδρομές, μας δόθηκε το έναυσμα για μια περαιτέρω ανάλυση. Έτσι, εξετάσαμε τις αλλαγές που συμβαίνουν στους βιοδείκτες οξειδωτικού στρες σε όλα τα χρονικά σημεία για κάθε άτομο (Διαγράμματα 12-14). Παρακάτω παρατίθεται πίνακας (Πίνακας 11) με περιγραφή της επίδοσης κάθε αθλητή. Στους αθλητές που δεν τερμάτισαν αναφέρεται το χιλιόμετρο στο οποίο εγκατέλειψαν τον αγώνα.

Αθλητής	Αποτέλεσμα	Επίδοση
1	Τερμάτισε	19 ώρες 37 λεπτά
2	Τερμάτισε	27 ώρες 26 λεπτά
3	Τερμάτισε	22 ώρες 30 λεπτά
4	Τερμάτισε	20 ώρες 19 λεπτά
5	Τερμάτισε	20 ώρες 27 λεπτά
6	Τερμάτισε	23 ώρες 39 λεπτά
7	Εγκατέλειψε στο 70ο χλμ	15 ώρες 29 λεπτά
8	Εγκατέλειψε στο 60ο χλμ	15 ώρες 01 λεπτό
9	Τερμάτισε	27 ώρες 58 λεπτά
10	Εγκατέλειψε στο 70ο χλμ	18 ώρες 03 λεπτά
11	Τερμάτισε	21 ώρες 25 λεπτά
12	Εγκατέλειψε στο 60ο χλμ	14 ώρες 57 λεπτά

Πίνακας 11: Επίδοση των αθλητών που συμμετείχαν στην έρευνα, στον Υπερμαραθώνιο βουνού ‘‘Olympus Mythical Trail 2015’’

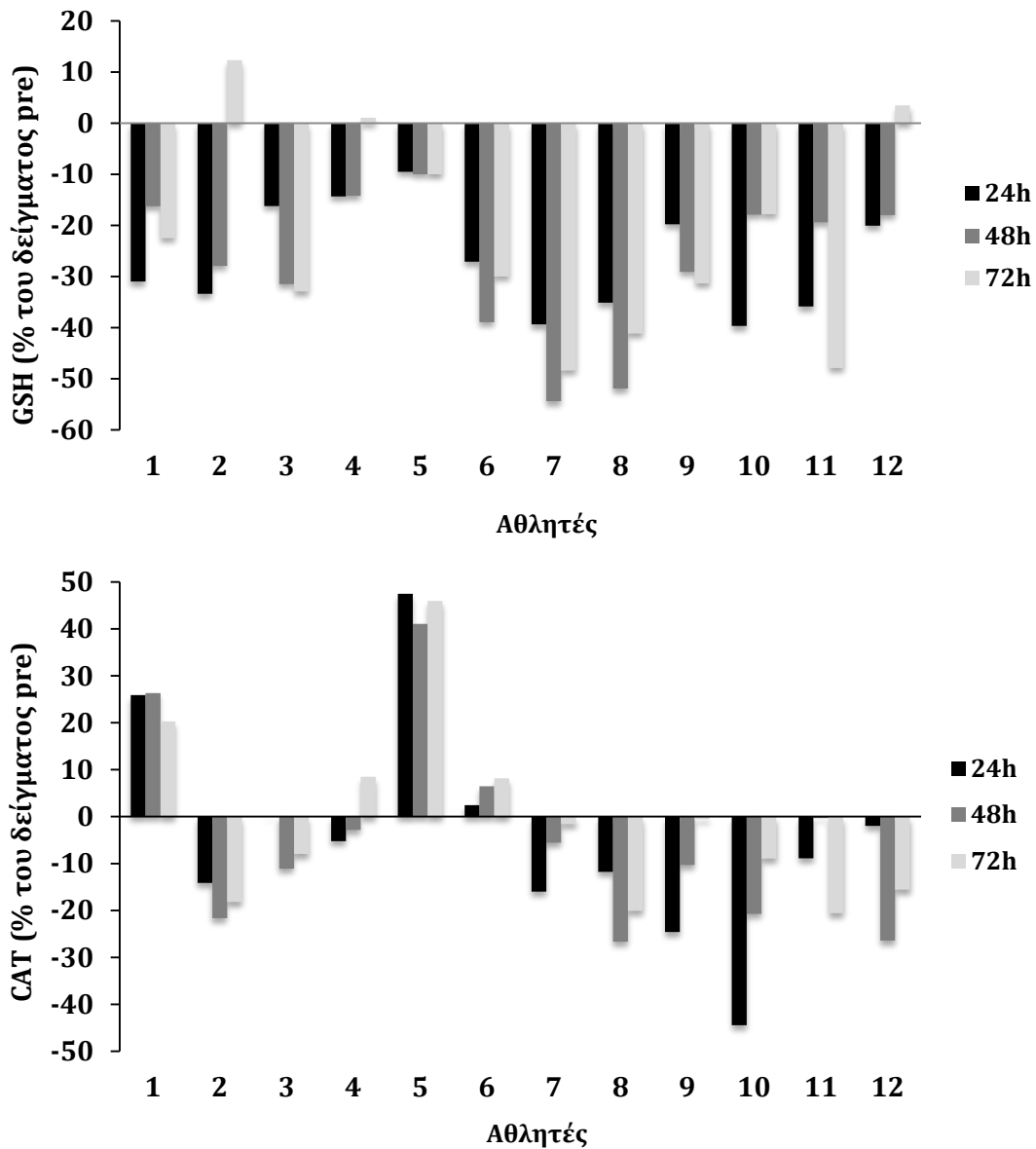
Αποδείχθηκε ότι σε όλους τους δρομείς, εκτός από έναν, οι τιμές sORP αυξήθηκαν σε όλα τα χρονικά σημεία μετά τον αγώνα (Διάγραμμα 12). Ομοίως, στις τιμές cORP (Διάγραμμα 12) όλοι οι δρομείς παρουσίασαν μείωση σε όλα τα χρονικά σημεία μετά τον αγώνα, εκτός από έναν που είχε υψηλότερες τιμές cORP μετά τον αγώνα σε σχέση με πριν. Αξίζει να σημειωθεί ότι το ίδιο άτομο (αθλητής No 1) έδειξε τη διαφορετική συμπεριφορά στα επίπεδα και των δύο βιοδεικτών sORP και cORP (Διάγραμμα 12).



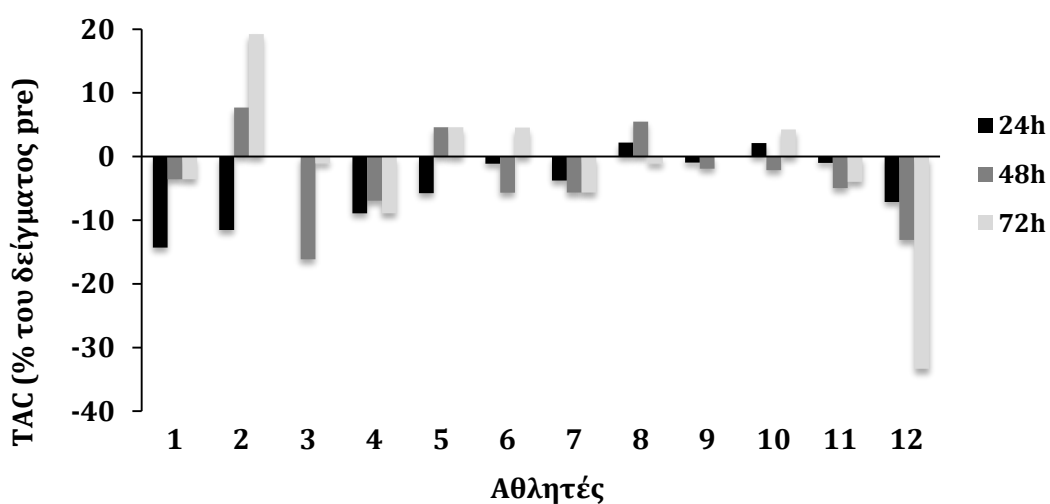
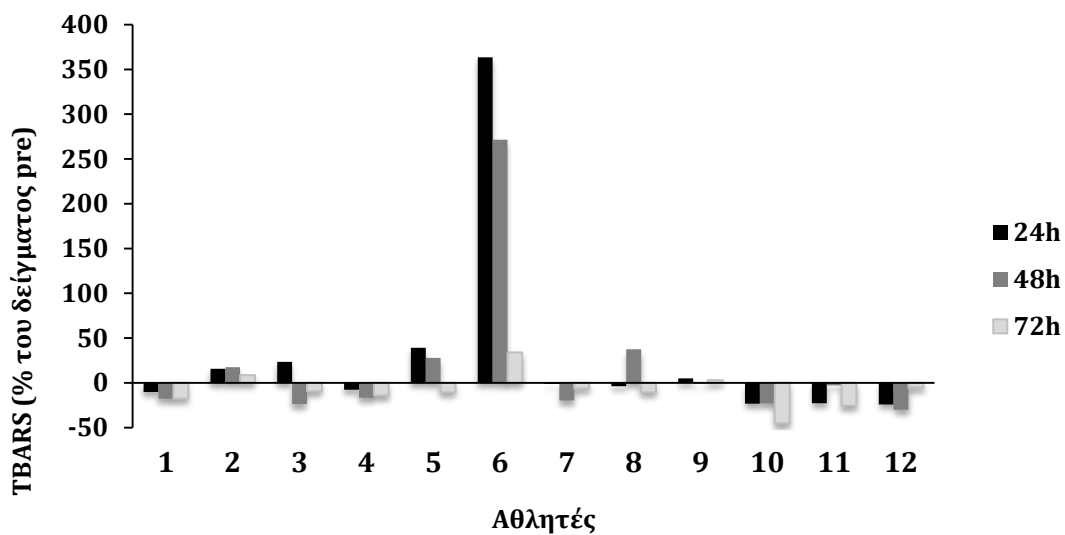
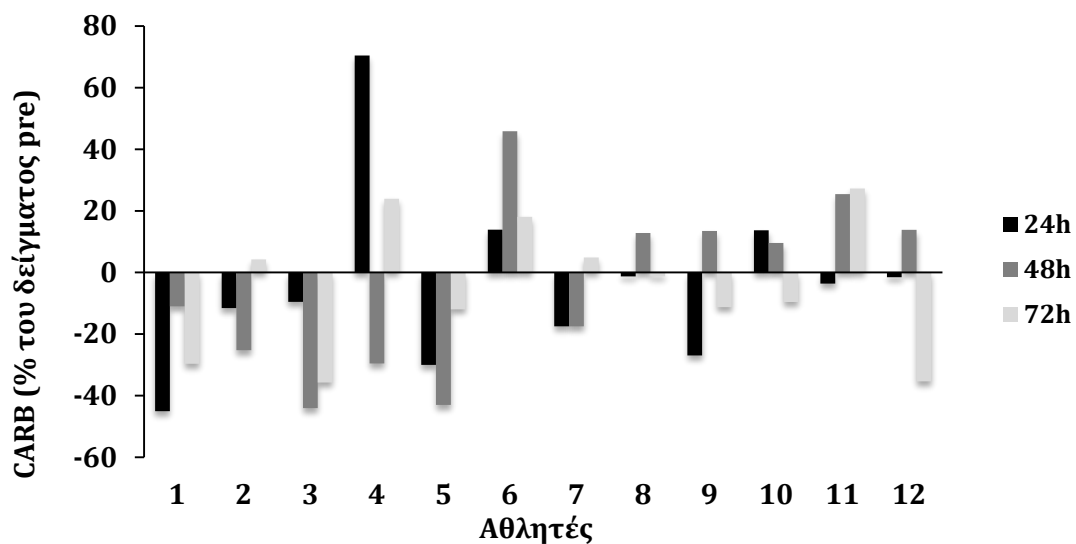
Διάγραμμα 12: Ποσοστιαία μεταβολή (%) των βιοδεικτών sORP και cORP ανά άτομο στις 24, 48 και 72 ώρες μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα.

Όσον αφορά τους βιοδείκτες οξειδωτικού στρες που υπολογίζονται φασματοφωτομετρικά στο πλάσμα (TBARS, CARB, TAC) (Διάγραμμα 14) παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δρομέων υπερ-μαραθωνίου, γεγονός που επίσης εμφανίζεται στη μέτρηση της δραστηριότητας CAT που υπολογίζεται στο

ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (Διάγραμμα 13) Αντιθέτως, η συγκέντρωση GSH μειώθηκε σε όλους τους δρομείς σε όλα τα χρονικά σημεία μετά τον αγώνα συγκριτικά με πριν (Διάγραμμα 13).

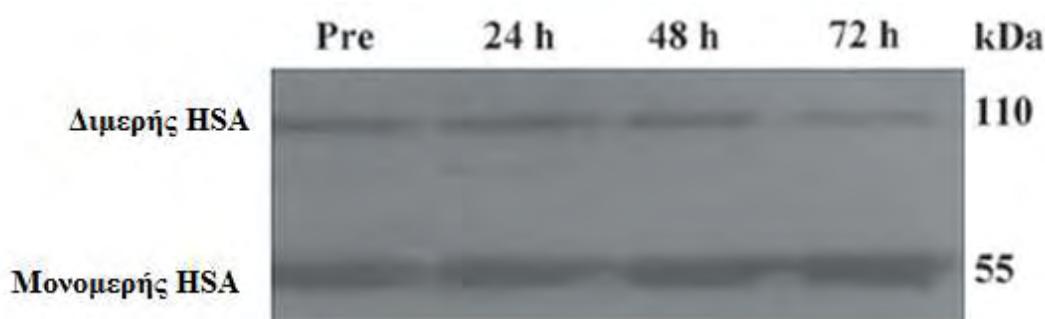


Διάγραμμα 13: Ποσοστιαία μεταβολή (%) των βιοδεικτών GSH και CAT ανά άτομο στις 24, 48 και 72 ώρες μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα.



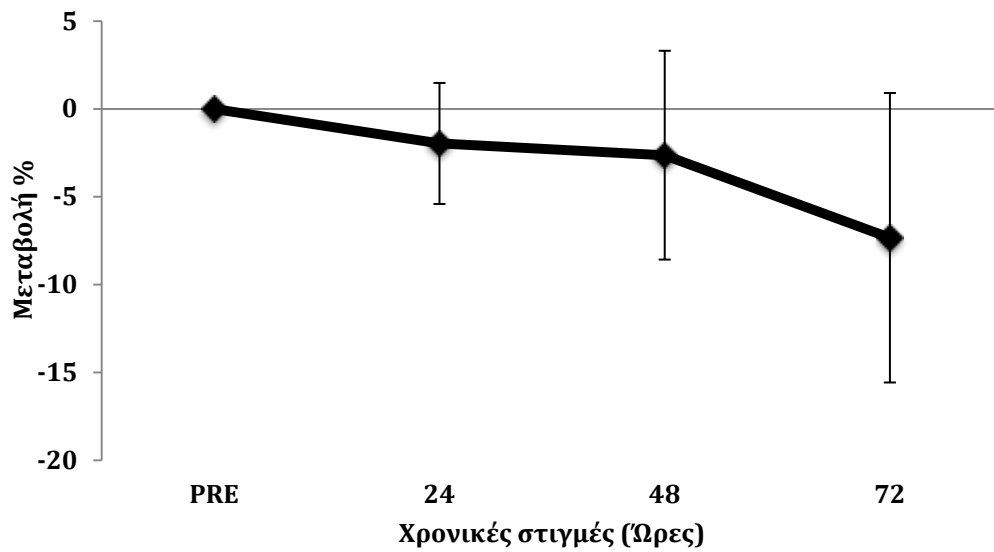
Διάγραμμα 14: Ποσοστιαία μεταβολή (%) των βιοδεικτών CARB , TBARS και TAC ανά άτομο στις 24, 48 και 72 ώρες μετά τον αγώνα συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων οξειδωμένης HSA, χρησιμοποιήθηκε ανάλυση Western για την αξιολόγηση μονομερών και διμερών HSA. Οι ζώνες μονομερούς εμφανίστηκαν στα ~55 kDa, ενώ ο σχηματισμός διμερούς εμφανίστηκε στα περίπου 110 kDa (Διάγραμμα 15). Το χαμηλότερο μοριακό βάρος των διμερών ζωνών σε σύγκριση με το θεωρητικό (~130 kDa) έχει παρατηρηθεί προηγουμένως σε δημοσιευμένη εργασία (Ogasawara et al. 2006).



Διάγραμμα 15: Αντιπροσωπευτική εικόνα από την ανάλυση Western για την ανίχνευση μονομερούς και διμερούς αλβουμίνης ορού (HSA). Συγκεκριμένα, παρουσιάζεται η μπάντα που αντιστοιχεί στην HSA του αθλητή No 2 σε όλα τα χρονικά σημεία (πριν τον αγώνα και 24, 48 και 72 ώρες μετά το τέλος του αγώνα).

Σε κάθε δείγμα, η αναλογία διμερών προς μονομερή υπολογίστηκε σε ποσοστό (%) και θεωρήθηκε ως δείκτης της οξείδωσης HSA. Η συνολική ποσοστιαία μεταβολή της οξειδωμένης HSA των αθλητών [δηλαδή ο λόγος (διμερή/μονομερή)] στις 24, 48 και 72 ώρες μετά το πέρας του αγώνα σε σύγκριση με το δείγμα, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 16. Όπως γίνεται αντιληπτό, δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των χρονικών σημείων μετά και πριν τον αγώνα.



Διάγραμμα 16: Ποσοστιαία μεταβολή των επιπέδων οξειδωμένης HSA (δηλαδή αναλογία διμερών / μονομερών) στα δείγματα πλάσματος από τους αθλητές που συμμετέχουν στον αγώνα Υπερμαραθωνίου βουνού στις 24, 48 και 72 ώρες μετά τον αγώνα σε σύγκριση με τα δείγματα πριν τον αγώνα (PRE). Οι τιμές υποδεικνύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM)

Παρομοίως, ποσοτικοποιήθηκε η εκατοστιαία αναλογία διμερών προς τη συνολική ποσότητα HSA [δηλαδή ο λόγος διμερή / (διμερή + μονομερή)] προκειμένου να σχηματιστεί μια σαφέστερη άποψη σχετικά με τις μεταβολές της πρωτεΐνης μετά τον αγώνα (Πίνακας 12).

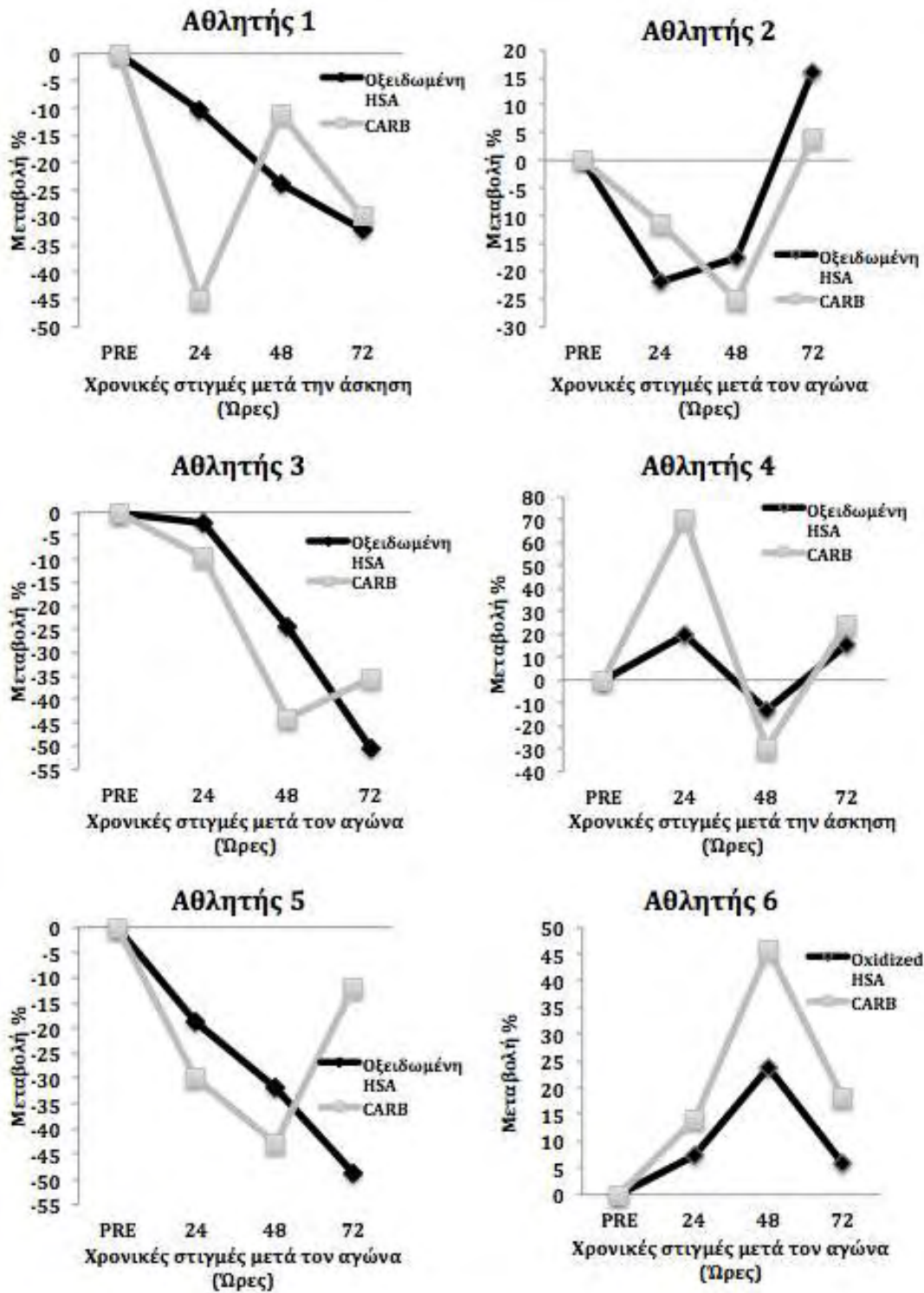
Αθλητής	Χρονική στιγμή (ώρες)			
	PRE	24	48	72
1	36,59	34,12	30,19	27,42
2	39,06	34,27	37,31	44,01
3	45,37	44,84	38,53	29,22
4	28,96	37,98	30,38	37,12
5	36,43	31,74	28,09	22,88
6	36,58	36,04	43,06	34,82
7	38,58	35,12	33,47	39,18
8	21,95	22,92	25,51	24,46
9	25,44	24,68	27,93	15,42
10	39,51	41,73	40,26	39,90
11	30,11	32,19	36,51	37,55
12	35,11	33,60	32,74	35,95
Μέσος Ορος±SEM	34,95±2,02	34,60±1,89	34,17±1,36	32,83±2,53

Πίνακας 12: Ποσοστιαία (%) μεταβολή των επιπέδων οξειδωμένης/ολικής HSA σε κάθε έναν από τους 12 αθλητές σε όλες τις χρονικές στιγμές

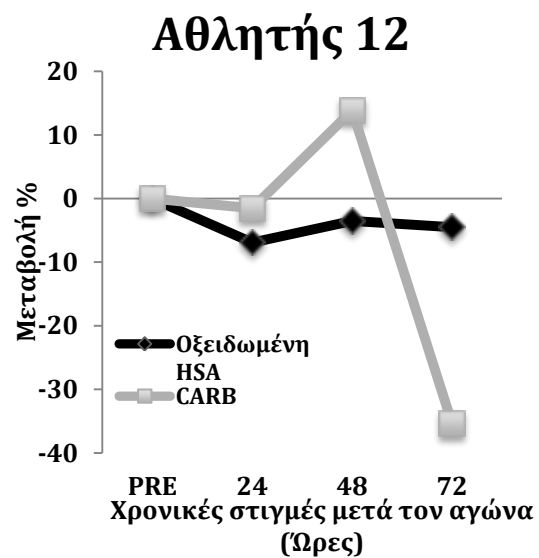
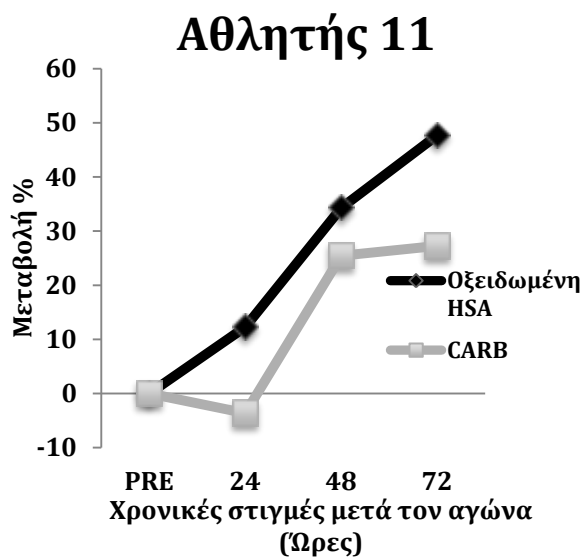
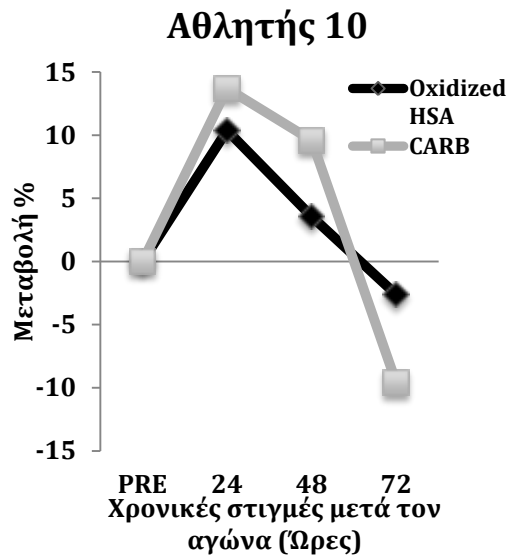
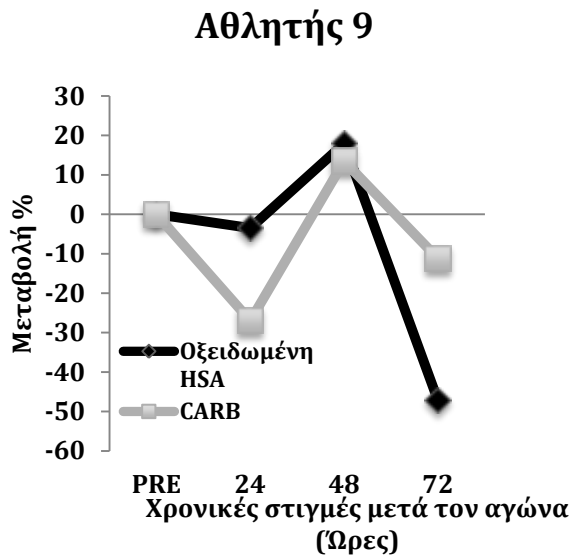
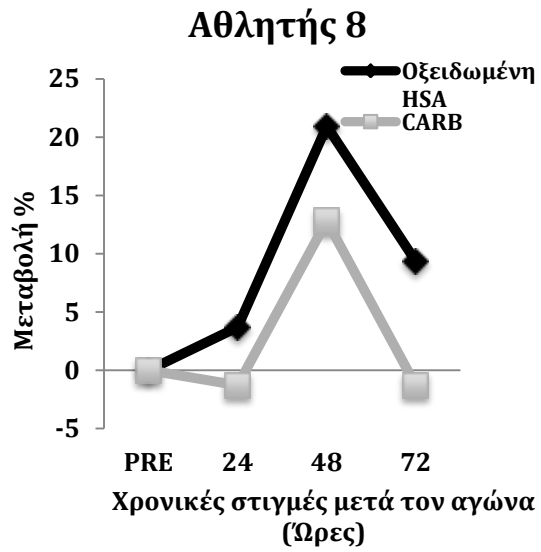
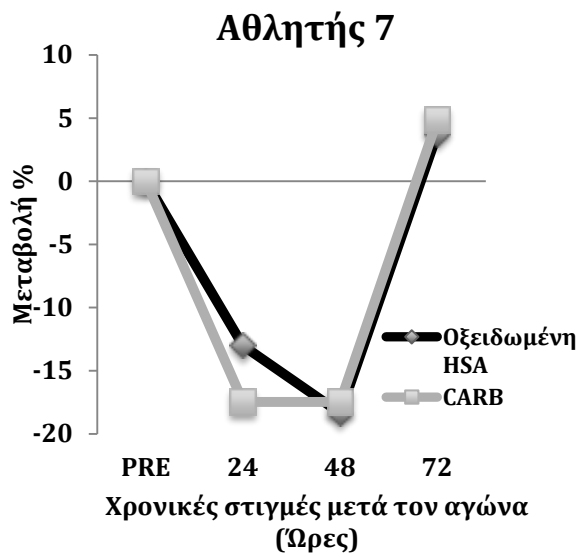
Ακολούθως, οι μεταβολές στην οξείδωση HSA μετά την άσκηση εξετάστηκαν επίσης εξατομικευμένα όπως συνέβη και στους υπόλοιπους βιοδείκτες (Διαγράμματα 17,18). Για αυτή την ατομική ανάλυση, τα κριτήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της αύξησης (ή της μείωσης) της μετά τον αγώνα οξείδωσης HSA σε σύγκριση με πριν τον αγώνα ήταν: i) η οξείδωση της HSA έχει αυξηθεί ή μειωθεί συγκριτικά με το δείγμα πριν τον αγώνα. και ii) η οξείδωση HSA έχει αυξηθεί ή μειωθεί > 20% τουλάχιστον σε ένα χρονικό σημείο μετά τον αγώνα σε σύγκριση με

το δείγμα πριν τον αγώνα. Αυτή η ατομική ανάλυση έδειξε ότι σε μερικούς αθλητές (Αθλητές Νο 6, 8 και 11) η οξειδωση HSA αυξήθηκε μετά τον αγώνα σε σύγκριση με το δείγμα πριν τον αγώνα (Διαγράμματα 17,18). Ωστόσο, σε άλλους αθλητές (Αθλητές Νο 1, 3 και 5), τα ποσοστά οξειδωσης της HSA ήταν χαμηλότερα από τα αντίστοιχα πριν την άσκηση (Διαγράμματα 17,18). Σε 6 αθλητές (Αθλητές Νο. 2, 4, 7, 9, 10 και 12), η οξειδωση της HSA δεν παρουσίασε αλλαγές πριν και μετά τον αγώνα (Διαγράμματα 17,18). Η ατομική σύγκριση μεταξύ της οξειδωσης HSA και των επιπέδων CARB έδειξε ότι σε 6 αθλητές (Αθλητές Νο 2, 3, 7, 8, 9 και 10) οι αλλαγές των δύο βιοδεικτών σε χρονικά σημεία μετά τον αγώνα σε σύγκριση με πριν τον αγώνα ακολούθησαν την ίδια τάση (αύξηση ή μείωση).

Οι δύο βιοδείκτες θεωρήθηκε ότι ακολουθούν την ίδια τάση αν η διαφορά στην ποσοστιαία μεταβολή μεταξύ τους σε κάθε χρονικό σημείο μετά τον αγώνα ήταν <20%. Ωστόσο, σε 2 αθλητές (άτομα 1 και 11), η HSA οξειδώθηκε περισσότερο από την ολική πρωτεΐνη, ενώ σε άλλους αθλητές (Αθλητές Νο 4, 5, 6 και 12) η HSA ήταν περισσότερο προστατευμένη από τα ROS σε σύγκριση με την ολική πρωτεΐνη (Διαγράμματα 17,18).



Διάγραμμα 17: Οι ποσοστιαίες (%) μεταβολές στην αναλογία οξείδωσης HSA (δηλαδή ο λόγος διμερών / μονομερών) και τα επίπεδα CARB των ατόμων 1-6 στις 24, 48 και 72 ώρες μετά το τέλος του αγώνα, σε σύγκριση με το δείγμα πριν τον αγώνα (PRE).



Διάγραμμα 18: Οι ποσοστιαίες (%) μεταβολές στην αναλογία οξειδωσης HSA (δηλαδή ο λόγος διμερών / μονομερών) και τα επίπεδα CARB των ατόμων 7-12 στις 24, 48 και 72 ώρες μετά το τέλος του αγώνα, σε σύγκριση με το δείγμα πριν τον αγώνα (PRE).

Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο της έρευνας αυτής ήταν η στατιστική συσχέτιση μεταξύ των βιοδεικτών των ατόμων, τόσο σε απόλυτες τιμές (Πίνακας 13) όσο και συσχετίζοντας την ποσοστιαία (%) μεταβολή των επιπέδων των βιοδεικτών τις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα (Πίνακας 14). Το ιδιαίτερα ενδιαφέρον στοιχείο που προκύπτει και αφορά τον δείκτη cORP, έγκειται στην αρνητική στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) συσχέτισή του με τον δείκτη CARB τόσο στην ανάλυση των απόλυτων τιμών, όσο και στην ποσοστιαία ανάλυση, κάτι που θεωρείται λογικό σαν αποτέλεσμα καθώς αντιπροσωπεύει τα αντιοξειδωτικά αποθέματα, μείωση των οποίων μπορεί να επιτρέψει την ευρύτερη καρβονυλίωση των πρωτεϊνών. Παράλληλα, σημαντικά αρνητική συσχέτιση ($p < 0,05$) υπήρξε μεταξύ του sORP και cORP κάτι που ήταν πλήρως αναμενόμενο, καθώς οι δυο βιοδείκτες που υπολογίζονται από το διαγνωστικό μηχάνημα RedoxSYS υπολογίζουν την παρουσία οξειδωτικών και αναγωγικών μορίων, αντίστοιχα. Ωστόσο, το στοιχείο αυτό επιβεβαιώνει την ορθή και ασφαλή λειτουργία του μηχανήματος. Επίσης, ο βιοδείκτης sORP κατέδειξε σημαντική συσχέτιση ($p < 0,05$) με το δείκτη CARB τόσο στην συσχέτιση των απόλυτων τιμών όσο και στην ποσοστιαία συσχέτιση επιβεβαιώνοντας αφενός το γεγονός ότι το οξειδωτικό περιβάλλον οδήγησε στην καρβονυλίωση των πρωτεϊνών και αφετέρου την αρνητικά σημαντική συσχέτιση των CARB με το cORP. Αντίστοιχα αποτελέσματα πήραμε από την στατιστική συσχέτιση των ποσοστιαίων επιπέδων (%) οξειδωσης HSA με τους υπόλοιπους βιοδείκτες, όπου παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση ($p < 0,05$) με τα επίπεδα sORP και σημαντικά

αρνητική συσχέτιση με το cORP επιβεβαιώνοντας τον παραπάνω ισχυρισμό. Ταυτόχρονα, υπήρξε μια πολύ σημαντική συσχέτιση των επιπέδων οξειδωσης HSA με τα CARB, κάτι λογικό αν αναλογιστούμε πως η HSA αποτελεί το ~50% των πρωτεϊνών του πλάσματος, των οποίων η οξειδωση εξετάζεται με τη μέθοδο CARB.

Τέλος, στην συσχέτιση των απόλυτων τιμών παρουσιάστηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην CAT και τους βιοδείκτες TBARS και TAC κάτι που ωστόσο δεν επαναλήφθηκε στην ποσοστιαία συσχέτιση.

	CARB	TBARS	TAC	GSH	CAT	sORP	cORP
CARB	-	-0,103	0,200	0,038	0,074	0,018	-0,363*
TBARS	-0,103	-	-0,005	-0,161	0,330*	0,006	0,042
TAC	0,200	-0,005	-	0,059	0,474**	0,162	-0,129
GSH	0,038	-0,161	0,059	-	-0,316	0,006	-0,018
CAT	0,074	0,330*	0,474**	-0,386*	-	0,073	0,108
sORP	0,795**	-0,191	0,011	-0,064	0,455	-	-0,849**
cORP	-0,363*	0,042	-0,129	-0,018	0,108	-0,849**	-

Πίνακας 13: Στατιστική συσχέτιση των απόλυτων τιμών των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες των δειγμάτων αθλητών που συμμετείχαν στον Υπερμαραθώνιο ‘‘Olympus Mythical Trail 2015’’. *Σημαντική συσχέτιση ($p < 0.05$), ** Σημαντική συσχέτιση ($p < 0.01$).

	CARB	TBARS	TAC	GSH	CAT	sORP	cORP	Οξ.HSA
CARB	-	0,020	0,058	-0,081	-0,163	0,429**	-0,377*	0,832**
TBARS	0,020	-	0,304*	0,031	0,223	-0,040	-0,010	-0,252
TAC	0,058	0,304	-	-0,162	-0,128	-0,167	0,151	0,144
GSH	-0,081	0,031	-0,162	-	-0,273	0,176	-0,211	-0,124
CAT	-0,163	0,223	-0,128	0,273	-	0,093	-0,144	-0,300
sORP	0,429**	-0,040	-0,167	0,176	0,093	-	-0,778**	0,397*
cORP	-0,377*	-0,010	0,151	-0,211	-0,144	-0,778**	-	-0,438*
Οξ.HSA	0,832**	-0,252	0,144	0,124	-0,300	0,397*	-0,438*	-

Πίνακας 14: Στατιστική συσχέτιση των μεταβολών (%) των τιμών των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες των δειγμάτων αθλητών που συμμετείχαν στον Υπερμαραθώνιο ‘Olympus Mythical Trail 2015’. *Σημαντική συσχέτιση ($p < 0.05$), ** Σημαντική συσχέτιση ($p < 0.01$)

3.2.4 Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια οι Μαραθώνιοι αγώνες και κυρίως οι μαραθώνιοι βουνού έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον του κοινού χάρη στην απαιτητική τους φύση που τους καθιστά πρόκληση για κάθε αθλητή. Αξίζει να αναφερθεί ότι μόλις τη δεκαετία του 1970 έγινε ο πρώτος αγώνας υπερ-αντοχής, ενώ σήμερα περίπου 1000 αγώνες υπερ-αντοχής πραγματοποιούνται κάθε χρόνο παγκοσμίως. Η συμμετοχή σε τέτοιας φύσης αγώνες προϋποθέτει την ύπαρξη πολύ καλής φυσικής κατάστασης αλλά και μεγάλης εμπειρίας. Ο λόγος είναι ότι οι αθλητές καλούνται να ξεπεράσουν τον εαυτό τους σωματικά καθώς τέτοιου είδους αγώνες προκαλούν υπέρμετρη μυϊκή καταστροφή και καταπόνηση αλλά και αναπνευστική δυσχέρεια κατά τη διάρκεια του αγώνα, ενώ παράλληλα παρατηρείται σημαντική κόπωση και εξουθένωση μετά τον αγώνα.

Το ενδιαφέρον των επιστημόνων μεγαλώνει ολοένα και περισσότερο σχετικά με την ανάλυση παραμέτρων σε αθλητές που συμμετείχαν σε τέτοιου είδους αγώνες,

καθώς η μελέτη της απόκριση των οργανισμών τους σε αυτές τις στρεσογόνες συνθήκες είναι ιδιαίζουσας σημασίας (Degache et al., 2015; Mrakic-Spota et al., 2015; Stagos et al., 2015b; Wilhelm et al., 2014). Ακόμα, μεγαλύτερο ενδιαφέρον έχει όταν τέτοιου είδους μελέτες πραγματοποιούνται σε καλά προπονημένους αθλητές. Για αυτό το λόγο εστίασαμε τη μελέτη στην ανάλυση των μεταβολών της οξειδοαναγωγικής κατάστασης αθλητών που συμμετείχαν σε έναν πολύ απαιτητικό υπερμαραθώνιο βουνού παγκοσμίως που καλείται "Olympus Mythical Trail" (OMT), ο οποίος έλαβε χώρα τον Ιούλιο του 2015 στον Όλυμπο, το πιο φημισμένο Ελληνικό βουνό. Έτσι, δώδεκα έμπειροι άντρες δρομείς συμμετείχαν εθελοντικά στην παρούσα μελέτη και δείγματα αίματος συλλέχθηκαν πριν τον αγώνα αλλά και 24, 48 και 72 ώρες μετά τη λήξη του για τον προσδιορισμό των μεταβολών που συμβαίνουν στην οξειδοαναγωγική τους κατάσταση τις ημέρες μετά τον αγώνα. Να σημειωθεί ότι δεν είχαν επιβληθεί περιορισμοί όσον αφορά την διατροφή αλλά μόνο τη χρήση συμπληρωμάτων. Η εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των αθλητών έγινε εκτιμώντας, πέρα από τους συμβατικούς βιοδείκτες (CARB, TBARS, GSH, TAC, CAT), τους νέους βιοδείκτες εκτίμησης του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (ORP), τον δείκτη δυναμικού της στατικής οξείδωσης-αναγωγής (sORP) και τον δείκτη δυναμικής ικανότητας οξείδωσης-αναγωγής (cORP). Επίσης, ιδιαίτερη έμφαση και ενδιαφέρον δόθηκε στην ανάλυση των επιπέδων οξείδωσης της HSA.

Η HSA είναι η πλέον άφθονη πρωτεΐνη στο πλάσμα καθώς αποτελεί περίπου το ~55% της συνολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (Anderson & Anderson 2002). Η λειτουργία της HSA βασίζεται σε μη ειδικές θέσεις σύνδεσης, οι οποίες της επιτρέπουν να μεταφέρει μια ποικιλία μορίων σε όλο το κυκλοφορικό σύστημα. Συγκεκριμένα, δεσμεύει H₂O, κατιόντα (π.χ. Ca²⁺, Na⁺ και K⁺), λιπαρά οξέα, ορμόνες, φαρμακευτικά προϊόντα και βιταμίνες. Βασική λειτουργία της HSA είναι η

ρύθμιση της κολλοειδούς οσμωτικής πίεσης του αίματος (Quinlan et al. 2005). Έτσι, πολλές από τις ενζυματικές δραστηριότητες της HSA σχετίζονται με τη σύνδεση των μεταβολικών προϊόντων, η οποία επηρεάζει τις σχετικές μεταβολικές οδούς. Γενικότερα, η οξειδωση μιας πρωτεΐνης και πιο συγκεκριμένα της HSA μετά την έκθεση σε ROS οδηγεί στην απώλεια της δομικής και καταλυτικής λειτουργίας της. Η οξειδωση και επομένως ο διμερισμός της HSA παρεμποδίζει τη δραστηριότητα της, καθώς το διμερές είναι πιο άκαμπτο, καθιστώντας τη σύνδεση του υποστρώματος λιγότερο ευνοϊκή (Anraku et al. 2001). Παράλληλα έχει αναφερθεί πως η επαγόμενη από άσκηση αύξηση των ROS ενεργοποιεί προσαρμοστικές αποκρίσεις μέσω μονοπατιών σηματοδότησης ρυθμιζόμενων από την κατάσταση θειόλης, συμπεριλαμβανομένης της ανηγμένης θειόλης Cys34 της HSA (Jung et al. 2014). Τέλος, σημαντικός στόχος της εργασίας ήταν ο έλεγχος της αξιοπιστίας των βιοδεικτών ORP με σύγκριση και συσχέτιση των ληφθέντων δεδομένων από την μελέτη των δειγμάτων των αθλητών με τους βιοδείκτες sORP και cORP με την αντίστοιχη μελέτη με τους υπόλοιπους φασματοφωτομετρικούς βιοδείκτες.

Σε μια προηγούμενη μελέτη που έγινε στο εργαστήριό μας, σε έναν μαραθώνιο βουνού αποκαλύφθηκαν σημαντικές αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των αθλητών αμέσως μετά τον αγώνα, ιδιαίτερα στους βιοδείκτες ORP (Stagos et al., 2015b). Οι αλλαγές σε αυτούς τους βιοδείκτες παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς αντιπροσωπεύουν την τρέχουσα οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού.

Όπως αναφέρθηκε, ο τύπος της άσκησης που έφεραν εις πέρας οι αθλητές ήταν κυρίως αερόβια με πολλά τμήματα έκκεντρης άσκησης εξαιτίας της κατάβασης σε πολλά σημεία του αγώνα. Σαν αποτέλεσμα ύστερα από αυτή την υπερβολικά επίπονη άσκηση και προσπάθεια που κατέβαλε κάθε αθλητής, ήταν η πρόκληση

οξειδωτικού στρες μετά τον αγώνα. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα GSH στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένα σε όλες τις χρονικές στιγμές δειγματοληψίας μετά τον αγώνα συγκριτικά με τα δείγματα που ελήφθησαν πριν την έναρξη του αγώνα. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με την προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας σε μαραθώνιο βουνού (Stagos et al., 2015b), καθώς και με άλλες μελέτες που συσχετίζουν την άσκηση με μειωμένα επίπεδα GSH (Elokda et al., 2010; Gambelunghe et al., 2001; Turner et al., 2014). Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό δεν συμφωνεί με τα δημοσιευμένα αποτελέσματα από μια μελέτη που έγινε σε αθλητές που συμμετείχαν στον υπερμαραθώνιο με την επωνυμία "Σπάρταθλον", που γίνεται στην Ελλάδα και συνδέει την Αθήνα με τη Σπάρτη, όπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα της GSH (Skenderi et al. 2008). Εδώ είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι ο αγώνας "Σπάρταθλον" γίνεται σε επίπεδο έδαφος, σε χαμηλό υψόμετρο και δεν περιλαμβάνει αρκετά κομμάτια έκκεντρης άσκησης. Γενικά, πολλές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η επαγωγή στην παραγωγή ελευθέρων ριζών μετά την πραγματοποίηση άσκησης ευνοεί την προσαρμογή σε νέα ερεθίσματα μέσω μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ελέγχονται από τις θειόλες και κυρίως την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) (Zhang & Forman 2012; Ghanta & Chattopadhyay 2011; Aquilano et al. 2014). Πρόκειται για ένα άκρως σημαντικό στοιχείο, καθώς έπειτα από αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των θειολών επάγεται η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB που επάγει μονοπάτια φλεγμονής και της πρωτεΐνης AP-1, η έκφραση των οποίων ακολούθως οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων τόσο των κυτοκινών ιντερλευκίνης-6 (IL-6) όσο και του ογκογόνου παράγοντα νέκρωσης α (TNF-α) (Ji et al., 2006; Kerksick et al., 2005). Αξίζει να αναφερθεί πως η IL-6 αλλά

και ο TNF-α επηρεάζουν την αναγέννηση του μυός και την ανάπτυξη αντοχής σε μυικές βλάβες που επάγονται από τις ελεύθερες ρίζες (Steensberg et al. 2000).

Όσον αφορά την ανάλυση των επιπέδων οξειδωσης της HSA στο σύνολο των 12 αθλητών, τα παρόντα αποτελέσματα έδειξαν ότι, κατά μέσο όρο, η οξειδωση της HSA δεν αυξήθηκε σε οποιοδήποτε σημείο μετά τον αγώνα συγκριτικά με τα δείγματα πριν τον αγώνα. Παρότι δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή της οξειδωσης των θειολών της HSA μετά τον αγώνα, οι ομάδες θειόλης της GSH των ίδιων δειγμάτων οξειδώθηκαν όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Ως εκ τούτου, η HSA φαίνεται να προστατεύεται περισσότερο από την οξειδωση από την GSH, καθώς η τελευταία μπορεί να εμπλέκεται περισσότερο στην απομάκρυνση των ROS. Επίσης τα συνολικά αποτελέσματα οξειδωσης της HSA συμφωνούν με τα αντίστοιχα των CARB τα οποία επίσης έδειξαν ότι δεν υπήρχε διαφορά στην οξειδωση της ολικής πρωτεΐνης στο πλάσμα, πριν και μετά τον αγώνα.

Η μη εύρεση σημαντικά στατιστικών διαφορών οφείλεται στο ότι η οξειδωση HSA επέδειξε μεγάλη ποικιλία μεταξύ των αθλητών. Καθώς, η οξειδωση της HSA είχε υψηλή συσχέτιση με τα CARB, δηλαδή με την οξειδωση της ολικής πρωτεΐνης πλάσματος, κάθε αθλητής εξετάστηκε ξεχωριστά για να συγκριθούν οι μεταβολές στην οξειδωση HSA και στα επίπεδα CARB, εφόσον η HSA αποτελεί περίπου το 55% της συνολικής περιεκτικότητας πρωτεΐνης στο πλάσμα όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η HSA, καθώς και το ινωδογόνο είναι οι κύριοι στόχοι πρωτεϊνών του οξειδωτικού στρες στο πλάσμα (Margonis et al. 2007; Michailidis et al. 2007; Shacter et al. 1994; Michelis et al. 2003). Επιπλέον, επειδή η HSA αντιπροσωπεύει περίπου το ήμισυ της συνολικής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες στο πλάσμα, ήταν αναμενόμενη μια παρόμοια τάση των επιπέδων οξειδωσης CARB και HSA σε κάθε άτομο μετά τον αγώνα. Ωστόσο, τα

αποτελέσματά μας έδειξαν ότι μετά τον αγώνα η οξειδωση των πρωτεϊνών σε διάφορους αθλητές παρουσίαζε μεγάλες διαφορές σε σχέση με τα επίπεδα CARB. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι παρόμοια επίπεδα οξειδωσης μεταξύ CARB και HSA σε όλες τις χρονικές στιγμές μετά την κούρσα εμφανίστηκαν μόνο σε 6 από τους 12 δρομείς. Σε αυτά τα άτομα, λοιπόν, φαίνεται ότι η μεταβολή της οξειδωσης της HSA δεν επηρεάστηκε σε διαφορετικό βαθμό από τις άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος. Ωστόσο, οι υπόλοιποι 6 αθλητές εμφάνισαν μεγάλες διαφορές στις μεταβολές μεταξύ οξειδωσης CARB και HSA σε ένα ή περισσότερα χρονικά σημεία μετά τον αγώνα. Ήταν αξιοσημείωτο ότι σε 4 αθλητές η HSA προστατεύθηκε περισσότερο από την οξειδωση του συνόλου των πρωτεϊνών του πλάσματος. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με την υπόθεση των Madian και Regnier (Madian & Regnier 2010), σύμφωνα με την οποία ότι παρά την αφθονία της HSA στο πλάσμα, δεν είναι τόσο ευάλωτη στην οξειδωση όπως άλλες πρωτεΐνες (π.χ. το ινωδογόνο) (Michelis et al. 2003). Αντίθετα, σε 2 αθλητές η οξειδωση HSA ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με τις συνολικές πρωτεΐνες πλάσματος. Παράλληλα, ιδιαίτερα ενδιαφέρον στοιχείο ήταν το γεγονός ότι όπως συνέβη και στα επίπεδα CARB, η HSA σε ορισμένους από αυτούς τους αθλητές (άτομα 1, 3 και 5) παρουσίασε μείωση στην οξειδωση και όχι αύξηση μετά τον αγώνα. Η εκδήλωση του αναγωγικού στρες αντί του οξειδωτικού, ιδιαίτερα μετά την έκκεντρη άσκηση, έχει αναφερθεί από εμάς, καθώς και από άλλους ερευνητές, (Stagos et al. 2015; Margaritelis et al. 2014) και έχει μελετηθεί εκτενέστερα σε άλλο κομμάτι της παρούσας Διατριβής. Αυτό το ενδιαφέρον αποτέλεσμα μπορεί να εξηγηθεί από την υψηλή πολυπλοκότητα της ρύθμισης της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης στον άνθρωπο, αφού πολλοί παράγοντες (γενετικοί, φυσιολογικοί, βιοχημικοί ή διαιτητικοί) είναι πιθανό να καθορίσουν το τελικό οξειδοαναγωγικό ερέθισμα.

Στατιστικά σημαντικές αλλαγές παρατηρήθηκαν στους βιοδείκτες sORP και cORP, που μετρήθηκαν κάνοντας χρήση του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS (Luoxis Diagnostics, Inc., Englewood, CO, ΗΠΑ), οι οποίοι αποτελούν τους νέους εξεταζόμενους από την παρούσα διατριβή βιοδείκτες για τη μέτρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του οργανισμού. Συγκεκριμένα, ο δείκτης sORP βρέθηκε σημαντικά αυξημένος 72 ώρες μετά την ολοκλήρωση του αγώνα υποδεικνύοντας ένα οξειδωτικό δυναμικό την παρούσα χρονική στιγμή. Προγενέστερες μελέτες που έγιναν από το εργαστήριο μας έχουν χρησιμοποιήσει εκτενώς αυτό τον δείκτη και τα παρατηρούμενα αποτελέσματα μετά από άσκηση δείχνουν ότι η έντονη αερόβια και έκκεντρη άσκηση είναι πιθανό να οδηγήσει σε αύξηση των επιπέδων sORP (Reddy et al., 2004; Stagos et al., 2015a; Stagos et al., 2015b) υποδηλώνοντας την επαγωγή οξειδωτικού στρες.

Όσον αφορά τον δείκτη cORP, στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στις 24 και στις 72 ώρες μετά τον αγώνα σε σχέση με το δείγμα πριν τον αγώνα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο δείκτης cORP παρουσιάζει το διαθέσιμο αντιοξειδωτικό απόθεμα του οργανισμού. Έτσι, έπειτα από μια τόσο απαιτητική άσκηση τα αποθέματα αντιοξειδωτικών έχουν μειωθεί καθώς οι συμμετέχοντες αθλητές δεν κατάφεραν να ανταπεξέλθουν στο οξειδωτικό στρες ή να αναπληρώσουν τα αντιοξειδωτικά τους αποθέματα μετά την άσκηση. Ωστόσο, αυτό το αποτέλεσμα ήταν αντικρουόμενο σε σχέση με μία άλλη μελέτη η οποία διεξήχθη σε έναν αγώνα ορεινού μαραθωνίου και δεν παρατήρησε σημαντικές αλλαγές μετά τον αγώνα στα επίπεδα cORP (Stagos et al., 2015b). Για την ακρίβεια, η μεγάλη διαφορά μεταξύ της παρούσας και της προαναφερθείσας μελέτης ήταν ότι τα δείγματα πάρθηκαν αμέσως μετά τον τερματισμό του αγώνα για κάθε αθλητή, ενώ στην παρούσα μελέτη η

συλλογή των δειγμάτων αίματος έγινε στις 24, στις 48 και στις 72 ώρες μετά τον τερματισμό του αγώνα για κάθε αθλητή.

Το εύρημα ότι μπορεί να υπάρχουν αλλαγές με χρονοεξαρτώμενο τρόπο είναι ιδιαίτερα σημαντικό και μπορεί να συσχετισθεί με τη μυϊκή βλάβη που προκαλείται κατά την έκκεντρη άσκηση. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι τα μακροφάγα, τα ηωσινόφιλα και τα ουδετερόφιλα, τα οποία παράγονται από κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος μπορούν, επίσης, να επάγουν την παραγωγή ROS. Τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα είναι σε θέση να παράγουν μεγάλες ποσότητες ROS τις οποίες χρησιμοποιούν εναντίον μικροοργανισμών ως μέρος της ενδογενούς άμυνας του οργανισμού (Smith 1997). Γενικά, το ανθρώπινο σώμα είναι εφοδιασμένο με ένα πλήθος αντιοξειδωτικών μορίων που χρησιμεύουν στην αντιστάθμιση της επίδρασης των οξειδωτικών (Birben et al., 2012). Ωστόσο, όταν υπάρχει έντονο οξειδωτικό στρες, η εξάντληση των αντιοξειδωτικών μορίων συμβαίνει λόγω της προσπάθειας των κυττάρων να εξουδετερώσουν τις οξειδωτικές δράσεις αλλά και να αποκαταστήσουν την οξειδοαναγωγική ισορροπία ρυθμίζοντας γονίδια που έχουν την ικανότητα κωδικοποίησης αμυντικών ενζύμων, μεταγραφικών παραγόντων και δομικών πρωτεϊνών. Υποτίθεται ότι αυτός είναι ο κύριος λόγος των μειωμένων επιπέδων του δείκτη cORP τις ημέρες μετά τον αγώνα που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται αμέσως μετά την ολοκλήρωση του αγώνα.

Ένα άλλο γεγονός που αξίζει να λάβουμε υπόψη είναι η διαφορετική απόκριση ενός αθλητή. Πιο συγκεκριμένα, ο αθλητής Νο 1, που είχε την καλύτερη επίδοση στον αγώνα από τους συμμετέχοντες, παρουσίασε μειωμένα επίπεδα sORP και αυξημένα επίπεδα cORP μετά τον αγώνα, γεγονός που αντιτίθεται στα αποτελέσματα που προέκυψαν από τους υπόλοιπους συμμετέχοντες. Σε μια άλλη μελέτη έχει αναφερθεί επίσης ένα μεγάλο εύρος αποκρίσεων όσον αφορά τον δείκτη cORP έπειτα από

εξουθενωτική έκκεντρη άσκηση (Stagos et al., 2015a). Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι ο συγκεκριμένος αθλητής θα μπορούσε να αντιμετωπίζει το επαγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες με την αύξηση των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων του οδηγώντας ως εκ τούτου σε αυξημένα επίπεδα cORP.

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

Παρομοίως, στα επίπεδα των CARB παρατηρήθηκαν παρόμοιες μεταβολές, καθώς 6 συμμετέχοντες παρουσίασαν αύξηση των επιπέδων, ενώ οι υπόλοιποι 6 παρουσίασαν μείωση. Έτσι, οι μεταβολές αυτές οδηγούν σε μη σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα των CARB, γεγονός που έρχεται επίσης σε αντίθεση με την προηγούμενη μελέτη μας (Stagos et al., 2015b) και με άλλες δημοσιευμένες μελέτες μετά από εντατική άσκηση σε ανθρώπους και σε ζώα (Kobayashi et al., 2014; Rosa-Lima et al., 2015). Ωστόσο, μία άλλη μελέτη σε ποδηλάτες έδειξε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα οξειδωσης των πρωτεϊνών, 24 ώρες μετά την εξαντλητική αερόβια άσκηση, ένα είδος άσκησης που είναι παρόμοιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη (Bloomer et al. 2005). Κατά τον ίδιο τρόπο, τα αποτελέσματα μιας άλλης μελέτης μετά από υπερμαραθώνιο κολύμβησης, που θεωρείται επίσης εξαντλητική αερόβια άσκηση δεν έδειξαν σημαντικές αλλαγές ούτε στα επίπεδα των CARB ούτε των TBARS (Kabasakalis et al. 2011).

Τέλος, οι βιοδείκτες TAC και CAT, που υποδεικνύουν τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα και τη δραστικότητα της καταλάσης αντίστοιχα, επίσης δεν διέφεραν σημαντικά μετά τον αγώνα σε σύγκριση με τις τιμές πριν τον αγώνα. Αξιοσημείωτο είναι ότι παρόμοιες μεταβολές στην ατομική ανάλυση παρατηρήθηκαν και σε αυτούς τους βιοδείκτες. Όσον αφορά την TAC, θα αναμενόταν να αντιστοιχεί με τη μεταβολή της cORP, καθώς και οι δύο βιοδείκτες εκτιμούν την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Το γεγονός πως δεν παρατηρείται σημαντική συσχέτιση ίσως οφείλεται στην διαφορετική προσέγγιση που έχουν οι δυο μέθοδοι για την εκτίμηση τους. Ειδικότερα, η TAC υποδεικνύει την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, με βάση τα επίπεδα αναγωγής μιας ελεύθερης ρίζας (DPPH) από τα αντιοξειδωτικά μόρια του πλάσματος ενώ ο βιοδείκτης cORP βασίζεται στην εκτίμηση της ποσότητας των αναγωγικών μορίων μετά από οξειδωσή όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως.

Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι στα περισσότερα άτομα παρατηρείται μείωση της TAC τις επόμενες ημέρες του αγώνα, αλλά ταυτόχρονα υπάρχουν άτομα που εμφανίζουν αύξηση ειδικά στις 48 και στις 72 ώρες. Η μείωση της TAC σε αυτούς τους αθλητές μετά τον αγώνα σε σύγκριση με πριν, μπορεί να εξηγηθεί από την ανικανότητά τους να ενεργοποιούν αποτελεσματικά αποκρίσεις προσαρμογής στο οξειδωτικό στρες. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση της TAC σε ορισμένα δείγματα φαίνεται ενδιαφέρουσα, δεδομένου ότι εμφανίζει μια αύξηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών μετά από μια τόσο απαιτητική άσκηση, αλλά έχει επίσης αναφερθεί στο παρελθόν ότι η TAC μπορεί να αυξηθεί μετά την άσκηση (Fatouros et al., 2004; Stagos et al., 2015b; Wiecek et al., 2015).

Επιπλέον, η δραστηριότητα της CAT στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα εμφανίζει παρόμοιες μεταβολές αλλά τα μη ομαδοποιημένα αποτελέσματα δεν επιδεικνύουν σημαντικές αλλαγές. Είναι γεγονός πως ακόμα δεν είναι ξεκάθαροι οι μηχανισμοί που επηρεάζουν τα επίπεδα δραστηριότητας της CAT μετά από έκκεντρη και αερόβια άσκηση. Πλήθος μελετών έχουν δημοσιεύσει αμετάβλητα επίπεδα δραστηριότητας καταλάσης μετά από άσκηση (Wiggs 2015; Oh-ishi et al. 1997; Mangner et al. 2013), γεγονός που επαληθεύεται από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Συνοπτικά, πρόκειται για τη πρώτη μελέτη όπου η οξειδοαναγωγική κατάσταση των αθλητών που υποβλήθηκαν σε έναν τόσο απαιτητικό αγώνα δεν ελέγχθηκε αμέσως μετά τον αγώνα, αλλά τις επόμενες τρεις ημέρες, για να ανιχνευθεί η βραχυπρόθεσμη προσαρμογή των ατόμων. Το σημαντικό εύρημα ήταν ότι μπορεί να υπάρξουν αλλαγές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των αθλητών που οδηγούν σε αύξηση των οξειδωτικών έναντι των αναγωγικών, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, ένα άλλο κρίσιμο συμπέρασμα είναι οι διακυμάνσεις των οξειδοαναγωγικών επιπέδων που παρουσιάζονται ανά άτομο. Όπως και άλλες μελέτες

έχουν δείξει (Margaritelis et al., 2014; Stagos et al., 2015a), η έκκεντρη άσκηση προκαλεί αμελητέο οξειδωτικό στρες ή και αναγωγικό στρες σε ένα σημαντικό αριθμό ανθρώπων, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη μας. Μια πιθανή εξήγηση για αυτή τη διακύμανση είναι η υψηλή πολυπλοκότητα της ρύθμισης της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης στον άνθρωπο, καθώς πλήθος γενετικών, φυσιολογικών, βιοχημικών ή διατροφικών παραγόντων μπορούν να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα των οξειδωτικών ερεθισμάτων (Simoneau & Bouchard 1989; Rankinen & Bouchard 2008; Kant & Graubard 2008). Ως εκ τούτου, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι οι μεταβολές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των συμμετεχόντων πρέπει να εξετάζονται ατομικά και όχι ως μια ολόκληρη ομάδα ώστε να γίνεται η κατάλληλη παρέμβαση σε αυτούς βοηθώντας με αυτό τον τρόπο στην ταχύτερη αποκατάσταση μετά τον αγώνα πιθανώς με την αλλαγή της διατροφής ή/και τη χρήση ορισμένων αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων.

Τέλος, πολύ σημαντικό εύρημα είναι η εύρεση συσχετίσεων, τόσο θετικών όσο και αρνητικών, μεταξύ των βιοδεικτών ORP και των υπολοίπων βιοδεικτών οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα, η σημαντική συσχέτιση που παρατηρείται τόσο μεταξύ sORP, CARB και οξειδωμένης HSA τις ημέρες μετά τον αγώνα επιβεβαιώνει πως υφίσταται έντονο οξειδωτικό περιβάλλον που οδήγησε στην καρβονυλίωση των πρωτεϊνών. Επιπλέον, η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώνεται από την σημαντικά αρνητική συσχέτιση μεταξύ cORP, CARB και οξειδωμένης HSA, δείχνοντας εκ νέου ότι ο οργανισμοί των αθλητών, όντας σε χαμηλότερα επίπεδα αντιοξειδωτικής άμυνας, δεν μπόρεσαν να αντιμετωπίσουν αποτελεσματικά την ευρεία παραγωγή ελευθέρων ριζών τις ημέρες μετά την άσκηση και συνεπώς οι πρωτεΐνες δεν προστατεύτηκαν επαρκώς. Παράλληλα, η σωστή λειτουργία του μηχανήματος φαίνεται από την πολύ σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ sORP και cORP κάτι που ήταν αναμενόμενο

καθώς οι δυο βιοδείκτες εκτιμούν δυο αντιστρόφως ανάλογες καταστάσεις, τα οξειδωτικά και τα αναγωγικά μόρια αντίστοιχα. Λαμβάνοντας υπόψιν συνολικά την στατιστική μελέτη, θεωρείται βέβαιο πως το μηχάνημα RedoxSYS και κατά συνέπεια οι βιοδείκτες ORP δίνουν μια ασφαλή εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε δείγματα πλάσματος και επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια σε αντίστοιχες μελέτες σε άτομα που υποβάλλονται σε έντονη και εξαντλητική άσκηση.

Συμπερασματικά, αυτή η μελέτη ρίχνει φως σε ένα δεδομένο που δεν έχει αναλυθεί επαρκώς, αναφορικά με τις ατομικές εναλλαγές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης, τις επόμενες ημέρες από έναν απαιτητικό αγώνα. Ταυτόχρονα, φαίνεται ότι η μέθοδος των CARB δίνει μεν μια ένδειξη για την οξείδωση των πρωτεϊνών στο αίμα, ωστόσο δεν είναι πλήρως αντιπροσωπευτική και δεν δίνει συγκεκριμένες πληροφορίες για οξείδωση σημαντικών μεμονομένων πρωτεϊνών όπως είναι η HSA. Η έρευνα αυτή τονίζει ότι η μελέτη των επιπέδων οξειδωμένης HSA είναι ιδιαίτερα σημαντική παράμετρος στη μελέτη της οξειδοαναγωγικής κατάστασης αθλητών μετά από έντονη αθλητική δραστηριότητα λόγω των πολυάριθμων λειτουργιών που χαρακτηρίζουν την πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος και τη μεταβολή στη δράση της, την οποία πιθανή οξείδωσή της μπορεί να επιφέρει. Το δεδομένο αυτό θα μπορούσε να βοηθήσει αρκετούς αθλητές σε όλο τον κόσμο, οι οποίοι συμμετέχουν σε τέτοιες ακραίες δραστηριότητες άσκησης στην προσπάθειά τους να προσδιορίσουν την ιδανική μέθοδο αποθεραπείας μετά τον αγώνα, μέσω προπόνησης και διατροφής βελτιώνοντας έτσι την κατάσταση της υγείας τους και αποφεύγοντας τυχόν τραυματισμούς.

3.3 Μεταβολές των επιπέδων οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε γυμνασμένους και μη γυμνασμένους ανθρώπους μετά από έκκεντρη άσκηση

3.3.1 Εισαγωγή

Πολλές μελέτες έχουν καταδείξει ότι μετά την άσκηση, η επαγωγή της παραγωγής ROS οδηγεί σε σοβαρή μυϊκή βλάβη και οξειδωτικό στρες (Davies et al. 1982; Finaud et al. 2006; Steinbacher & Eckl 2015). Επιπλέον, έχει προταθεί ότι το εύρος της παραγωγής ROS είναι άμεσα συνδεδεμένο με την ένταση της άσκησης με αποτέλεσμα την υπερβολική αύξηση της παραγωγής ROS μετά από μια έντονη και απαιτητική άσκηση (Nikolaidis, Kyparos, et al. 2007; Palmer et al. 2003).

Ως έκκεντρη άσκηση θεωρείται ένα είδος μιας αρκετά απαιτητικής άσκησης που χαρακτηρίζεται από ενεργή συστολή ενός μυός που συμβαίνει ταυτόχρονα με την επιμήκυνση του μυός. Προκαλεί σοβαρή μυϊκή βλάβη που χαρακτηρίζεται από μειωμένη παραγωγή μυϊκής δύναμης (Serravite et al. 2014; Stupka et al. 2001), αυξημένη δραστηριότητα της κρεατινικής κινάσης (CK) στον ορό (Serravite et al. 2014; Stupka et al. 2001) και φλεγμονώδη απόκριση (DiLorenzo et al. 2014; Liao et al. 2010). Έτσι, αυτή η έκθεση στο στρες οδηγεί σε κυτταρική διαταραχή, απώλεια λειτουργίας, πόνο και διαρροή ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών στη ροή του αίματος (Brentano & Martins Krueel 2011). Εντούτοις, παρά το γεγονός ότι η έκκεντρη άσκηση σχετίζεται με επαγωγή οξειδωτικού στρες, έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διαφορές στα επίπεδα οξειδωτικού στρες μετά από έκκεντρη άσκηση μεταξύ των ατόμων. Δεδομένου ότι η πλειονότητα αυτών των μελετών βασίζονται σε ομαδικές διαφορές, η ανάγκη να βρεθεί ένα χαρακτηριστικό που μπορεί να εξηγήσει την ποικιλομορφία των αποτελεσμάτων μας οδήγησε στο σχεδιασμό αυτής της συγκεκριμένης έρευνας. Ανάλογο πιθανό χαρακτηριστικό μπορεί να είναι το

αθλητικό υπόβαθρο κάθε ατόμου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα ROS που παράγονται κατά τη διάρκεια της κανονικής άσκησης αυξάνουν συνεχώς το επίπεδο προσαρμογής, βελτιώνοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα, τη μιτοχονδριακή βιογένεση, την ευαισθησία στην ινσουλίνη, την κυτταροπροστασία και την αερόβια ικανότητα των σκελετικών μυών (Steinbacher & Eckl 2015). Ως εκ τούτου, επιχειρήσαμε να διευκρινίσουμε αν το αθλητικό ιστορικό κάποιων ανθρώπων επηρεάζει τις μεταβολές των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες σε διαφορετική έκταση από εκείνους που δεν έρχονται σε επαφή με οποιαδήποτε μορφή άσκησης κατά το χρόνο που και οι δύο ομάδες υπέστησαν μια τόσο επίπονη και απαιτητική άσκηση.

Για την εύρεση απαντήσεων σε αυτά τα ερωτήματα, σαράντα άτομα (24 άντρες και 16 γυναίκες) πραγματοποίησαν έκκεντρη άσκηση σε ισοκινητικό δυναμόμετρο τύπου Cybex, και συλλέχθηκαν δείγματα αίματος πριν από την άσκηση και 24, 48 και 72 ώρες μετά το τέλος της εξετάζοντας έτσι την απόκρισή τους στη μυϊκή βλάβη. Οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν σε δύο υποομάδες με βάση το αθλητικό τους υπόβαθρο, δηλαδή τους “Γυμνασμένους” (n=22) και τους “Μη-γυμνασμένους” (n=18). Τα δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν εξετάστηκαν με συμβατικούς φασματοφωτομετρικούς βιοδείκτες, τους βιοδείκτες προσδιορισμού ORP και με τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC-DAD).

Η μέθοδος HPLC-DAD πραγματοποιήθηκε προκειμένου να προσδιοριστούν τα επίπεδα της MDA, ενός ευρέως εξεταζόμενου δείκτη υπεροξειδωσης λιπιδίων στο ανθρώπινο πλάσμα. Η τεχνική αυτή θεωρείται πιο συγκεκριμένη, αξιόπιστη και αναπαραγώγιμη, καθώς η MDA διαχωρίζεται από άλλες παρεμβαλλόμενες ουσίες που μπορεί να επηρεάσουν την ανάλυση κατά τη χρήση του βιοδείκτη TBARS (Grotto et al. 2007).

Στο ίδιο μοτίβο υπήρξε, επίσης, η ανάγκη εκτίμησης της αναγωγικής ισχύος στο πλάσμα που μετρείται σε συγκεκριμένες ελεύθερες ρίζες μετά τον προσδιορισμό των επιπέδων εξουδετέρωσης της ρίζας OH^\cdot [Hydroxyl Radical Scavenging (HRS)], της ρίζας O_2^\cdot [Superoxide Radical Scavenging (SRS)] και της ικανότητας αναγωγής του Fe (III) σε Fe (II) [Reducing Power (RP)]. Η απάντηση στο κρίσιμο ζήτημα του βαθμού αποτελεσματικότητας, με το οποίο κάθε οργανισμός αντιμετωπίζει συγκεκριμένες ελεύθερες ρίζες και η σύγκριση των επιπέδων αποτελεσματικότητάς του για κάθεμια ξεχωριστά αναμένεται να απαντηθεί συγκρίνοντας τα επίπεδα εξουδετέρωσης αυτών των ελεύθερων ριζών στους συμμετέχοντες.

Είναι προφανές ότι ο κύριος σκοπός της συγκεκριμένης έρευνας είναι η συμβολή στην καλύτερη κατανόηση των προσαρμοστικών μηχανισμών κατά του οξειδωτικού στρες και της συνάφειας τους με το αθλητικό υπόβαθρο κάθε ατόμου. Αυτές οι πληροφορίες θα μας βοηθήσουν να βελτιώσουμε την ανταπόκρισή μας και την παρέμβασή μας σχετικά με τη διαδικασία αποκατάστασης και την κατάσταση υγείας της άσκησης.

3.3.2 Πειραματική διαδικασία

3.3.2.1 Συμμετέχοντες

Στην παρούσα μελέτη, συμμετείχαν συνολικά 40 ενήλικες άντρες και γυναίκες (24 άντρες, 16 γυναίκες) (ηλικία: $22,5 \pm 0,58$ χρόνια, ύψος: $1,75 \pm 0,16$ μέτρα, βάρος: $75,4 \pm 2,30$ κιλά). Η επιλογή των συμμετεχόντων βασίστηκε στο αθλητικό τους υπόβαθρο καθώς 22 από αυτούς ήταν αθλητικά δραστήριοι και ιδιαίτερα στην άσκηση αντίστασης (τουλάχιστον 4 φορές/εβδομάδα), ενώ 18 από αυτούς δεν είχαν έρθει ποτέ σε επαφή με οποιαδήποτε μορφή άσκησης. Οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν να αποφύγουν το κάπνισμα, την κατανάλωση αλκοόλ,

τα συμπληρώματα διατροφής καθώς και κάθε είδους άσκηση τις τελευταίες ημέρες πριν από τη μελέτη και κατά τη διάρκεια του πειράματος. Το βάρος του σώματος μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5 κιλών (BeamBalance 710, Seca, Ηνωμένο Βασίλειο), ενώ το ύψος με ακρίβεια 0,5 εκατοστών (Stadiometer 208, Seca). Μια γραπτή έγγραφη συγκατάθεση για τη συμμετοχή στη μελέτη δόθηκε και υπογράφηκε από όλους που συμμετείχαν στην έρευνα αφού ενημερώθηκαν για όλα τα οφέλη, τους κινδύνους και τη διαδικασία της έρευνας. Οι πειραματικές διαδικασίες ήταν σε συμφωνία με την συνθήκη του Ελσίνκι (1964) και εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

3.3.2.2. Χρονικές στιγμές δειγματοληψίας- Δειγματοληψία

Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές χρονικές στιγμές και συγκεκριμένα αμέσως πριν την άσκηση και 24, 48 και 72 ώρες μετά την ολοκλήρωσή της. Η πρώτη δειγματοληψία που αφορά το δείγμα πριν την άσκηση πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο SmArt Lab στα ΤΕΦΑΑ Τρικάλων, ενώ όλες οι ακόλουθες δειγματοληψίες στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας. Τα δείγματα αίματος συλλέχτηκαν σε σωληνάρια EDTA και ηπαρίνης και η διαδικασία ακολουθήθηκε όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.2 της παρούσας διατριβής.

3.3.2.3 Πρωτόκολλο άσκησης

Η πραγματοποίηση της έκκεντρης άσκησης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο SmArt Lab στα ΤΕΦΑΑ Τρικάλων, σε ισοκινητικό δυναμόμετρο τύπου Cybex (Cybex Norm, Ronkonkoma, NY) ακολουθώντας το πρωτόκολλο

προηγούμενης εργασίας που δημοσιεύτηκε από το εργαστήριό μας (Stagos et al. 2015). Η άσκηση έγινε με τους εθελοντές να βρίσκονται σε καθιστή θέση (120° γωνία ισχίου), κατόπιν σταθεροποίησης τους σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι συμμετέχοντες πραγματοποίησαν ζέσταμα 10 λεπτών σε στατικό ποδήλατο (70 rpm, 50W) πριν την εκπόνηση της άσκησης και στη συνέχεια προκειμένου να εξοικειωθούν με το μηχάνημα και τη διαδικασία, ολοκλήρωσαν 1 σετ των 9 ομόκεντρων επαναλήψεων και 1 σετ των 7 έκκεντρων επαναλήψεων στο ισοκινητικό δυναμόμετρο. Μετά την διαδικασία της προθέρμανσης, το πρόγραμμα της άσκησης των εθελοντών περιλάμβανε 5 σετ των 15 μέγιστων έκκεντρων συστολών (γόνατο εύρος, 0° πλήρης έκταση έως 90° κάμψη) με γωνιακή ταχύτητα 60°/s, ενώ δόθηκε χρόνος ξεκούρασης 2 λεπτών ανάμεσα από τα σετ. Η συνολική διάρκεια της άσκησης ήταν 15 λεπτά. Η ανατροφοδότηση της έντασης κατά την διάρκεια της άσκησης παρέχόταν αυτόματα από το δυναμόμετρο. Η πραγματοποίηση της άσκησης έγινε σε πόδι που επέλεξαν οι εθελοντές.

3.3.2.4 Αξιολόγηση του μυϊκού πόνου

Μετά το τέλος της άσκησης αλλά και στις χρονικές στιγμές των 24, 48 και 72 ωρών οι εθελοντές συμπλήρωσαν ειδική φόρμα στην οποία αξιολογούσαν τον καθυστερημένο μυϊκό πόνο (delayed onset muscle soreness, DOMS) που αισθάνονταν στο πόδι που πραγματοποίησε την άσκηση. Η κλίμακα ήταν από το μηδεν (καθόλου πόνος) έως το δέκα (πολύ δυνατός πόνος) με βάση δύο τύπους ασκήσεων, το κάθισμα (DOMSκ) και το περπάτημα (DOMSπ).

3.2.3.5 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μετά την μέτρηση των βιοδεικτών αναλύθηκαν με two-way ANOVA ακολουθούμενα από το Dunnett's test για την

εξέταση πολλαπλών συγκρίσεων κατά ζεύγη με το πρόγραμμα SPSS, version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα μέσου όρου (SEM).

3.3.3 Αποτελέσματα

3.3.3.1 Αξιολόγηση μυϊκού πόνου και μυϊκής βλάβης

Ο δείκτης αξιολόγησης του μυϊκού πόνου παρουσίασε αύξηση μετά την άσκηση από 3,00 στις 4,52 φορές στους γυμνασμένους και από 3,44 έως 5,34 φορές στους μη γυμνασμένους κατά το βάδισμα. Αντίστοιχα, στο κάθισμα ο πόνος μεταβλήθηκε κατά 3,17 έως 4,33 φορές στους γυμνασμένους και κατά 3,44 έως 5,71 φορές στους μη γυμνασμένους. Τόσο στη δοκιμασία του βαδίσματος όσο και σ' αυτή του καθίσματος παρουσιάστηκε μέγιστος μυϊκός πόνος στη χρονική στιγμή των 48 ωρών μετά την ολοκλήρωση της έκκεντρης άσκησης, καθώς είναι εμφανές ότι από τη χρονική στιγμή των 72 ωρών επέρχεται μια επαναφορά των επιπέδων (Πίνακας 16). Αυτό το γεγονός αποδεικνύει ότι την προκλήση μυϊκής βλάβης στους συμμετέχοντες. Επιπλέον, η συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων DOMS και των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες επέδειξε σημαντικές αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ DOMS, cORP και Αναγωγικής δύναμης στην ομάδα των μη γυμνασμένων.

Γυμνασμένοι											
<i>24 ώρες</i>											
	CARB	TBARS	TAC	GSH	CAT	sORP	cORP	SRS	RP	HRS	MDA
DOMS κ.	0,074	0,423	0,141	0,182	0,164	0,191	-0,268	-0,154	0,349	0,336	0,390
DOMS π.	0,093	0,173	0,202	0,122	0,174	0,332	-0,252	-0,136	0,301	-0,50	0,202
<i>48 ώρες</i>											
DOMS κ.	-0,272	-0,016	0,311	0,356	0,012	-0,216	0,060	-0,066	0,011	0,104	0,059
DOMS π.	0,027	0,061	0,221	0,217	0,001	-0,284	0,045	0,023	0,151	0,050	0,064
<i>72 ώρες</i>											
DOMS κ.	-0,286	-0,334	0,120	0,284	0,380	-0,057	0,136	0,369	0,084	0,108	-0,28
DOMS π.	-0,039	-0,372	0,039	0,078	0,389	-0,262	0,410	0,187	0,198	0,132	-0,25
Μη γυμνασμένοι											
<i>24 ώρες</i>											
DOMS κ.	-0,120	0,376	-0,357	0,156	0,029	0,075	-0,234	-0,018	-0,041	-0,13	0,193
DOMS π.	-0,168	0,164	-0,326	0,085	-0,05	-0,085	-0,170	-0,003	0,085	-0,03	0,123
<i>48 ώρες</i>											
DOMS κ.	-0,202	0,296	0,070	0,285	-0,306	-0,085	-0,463*	0,176	-0,084	0,301	0,252
DOMS π.	-0,050	0,368	-0,281	0,227	-0,352	-0,308	-0,330	0,350	0,053	0,087	0,312
<i>72 ώρες</i>											
DOMS κ.	-0,269	-0,194	-0,118	0,146	-0,003	-0,188	-0,164	0,243	0,273	0,244	-0,12
DOMS π.	0,130	0,130	0,072	0,134	0,216	0,018	-0,484*	0,078	0,44*	0,098	0,132

Πίνακας 15: Στατιστική συσχέτιση μεταξύ των DOMS και των μεταβολών των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες. MDA: Μαλονδιαλδεύδη (μετρημένη με Χρωματογραφία από την HPLC-DAD). *Σημαντική συσχέτιση ($p < 0,05$)

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του DOMS στο κάθισμα και του δείκτη cORP 48 ώρες μετά την άσκηση, ενώ επίσης

προέκυψαν αρνητικές συσχετίσεις μεταξύ του περπατήματος DOMS, του cORP και της αναγωγικής δύναμης στις 72 ώρες μετά την εκτέλεση της άσκησης (Πίνακας 15).

	Πριν	Αμέσως μετά	24h	48h	72h
DOMS π.	1,00 ± 0,00	3,94 ± 0,47	3,88 ± 0,44	4,66 ± 0,48	4,01 ± 0,41
DOMS κ.	1,00 ± 0,00	3,44 ± 0,35	4,94 ± 0,47	5,16 ± 0,46	3,64 ± 0,48

Πίνακας 16: Αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου (DOMS) στο περπάτημα (DOMS π.) και στο κάθισμα (DOMS κ.) μετά την έκκεντρη άσκηση. Δίνονται οι μέσες τιμές ± SEM (τυπική απόκλιση).

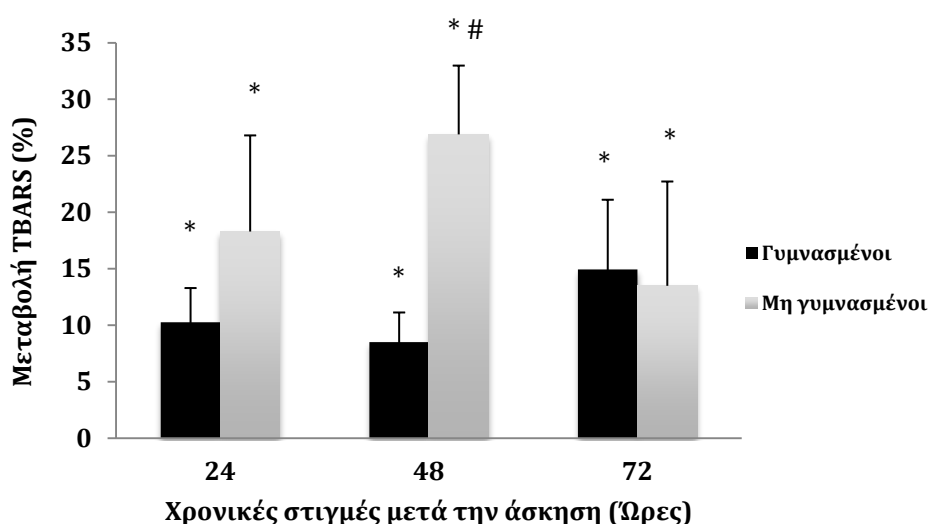
3.3.3.2 Αποτελέσματα φωτομετρικών βιοδεικτών οξειδωτικού στρες

Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά τη μέτρηση και ανάλυση των βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες. Τα αποτελεσματα παρατίθενται ως επι τοις εκατό (%) μεταβολή των τιμών στις 24, 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση σε σχέση με το δείγμα πριν την εκτέλεση της άσκησης που θεωρείται δείγμα ελέγχου. Οι 40 συμμετέχοντες στο πείραμα, χωρίστηκαν σε δυο ομάδες ανάλογα με το αθλητικό τους παρελθόν και παρόν και συγκεκριμένα σε αυτούς που εκτελούν συστηματικά κάποιο είδος άσκησης στην καθημερινότητά τους (Ομάδα γυμνασμένων) και σε αυτούς που δεν έχουν πραγματοποιήσει ποτέ κανένα είδος άσκησης συστηματικά (Ομάδα μη γυμνασμένων). Οι επι τοις εκατό μεταβολές στους βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες στις ημέρες που ακολούθησαν της άσκησης εξετάστηκαν και στις δυο ομάδες και συγκρίθηκαν μεταξύ τους, για να ξεκαθαρίσει η σημασία του αθλητικού ιστορικού στην προσαρμογή του οργανισμού μετά από έντονη έκκεντρη άσκηση. Εκτός από τα διαγράμματα, παρατίθενται και οι πίνακες με

τις απόλυτες τιμές των βιοδεικτών από τις οποίες προέκυψαν οι ποσοστιαίες μεταβολές.

➤ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ ΘΕΙΟΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (TBARS)

Διαχωρίζοντας τους συμμετέχοντες σε γυμνασμένους και μη γυμνασμένους λήφθηκαν τα ακόλουθα δεδομένα:



Διάγραμμα 19: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη TBARS στις χρονικές στιγμές των 24, 48 και 72 ωρών μετά την ολοκλήρωση της άσκησης συγκριτικά με το δείγμα πριν την άσκηση, στις ομάδες γυμνασμένων και μη γυμνασμένων. (*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα πριν την άσκηση ($p < 0,05$) (#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p < 0,05$)

	pre	24 h	48 h	72 h
Γυμνασμένοι ($\mu\text{M/L}$)	7,21 \pm 0,41	7,95 \pm 0,51	7,82 \pm 0,42	8,28 \pm 0,45
Μη γυμνασμένοι ($\mu\text{M/L}$)	6,72 \pm 0,44	7,95 \pm 0,30	8,52 \pm 0,59*#	7,63 \pm 0,49

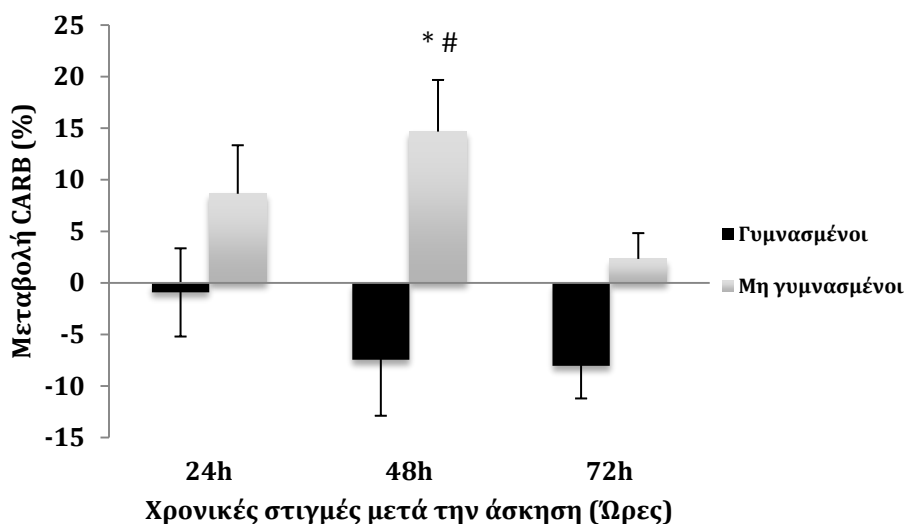
Πίνακας 17: Μεταβολή των απόλυτων τιμών ($\mu\text{M/L}$) του βιοδείκτη TBARS (μέση τιμή \pm SEM) των γυμνασμένων και των μη γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές

στιγμές.(*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα πριν την άσκηση (p<0.05) (#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες (p<0,05)

Από τα δεδομένα αυτά γίνεται αντιληπτή η αύξηση του βιοδείκτη και στις 2 ομάδες στις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση. Στην ομάδα των γυμνασμένων παρατηρήθηκαν σημαντικές αυξήσεις κατά 10,25%, 8,50% και 14,98% στις 24, 28 και 72 ώρες αντίστοιχα. Παρομοίως, στην ομάδα των μη-γυμνασμένων παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στις 24, 48 ώρες και 72 ώρες κατά 18,29%, 26,89% και 13,49 % σε σχέση με το δείγμα pre αντίστοιχα (Διάγραμμα 19 και Πίνακας 17). Επίσης, στις 48 ώρες παρατηρήθηκε σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων με τους μη-γυμνασμένους να έχουν υψηλότερα επίπεδα TBARS.

➤ ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ

Στον βιοδείκτη των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά τη διάκριση σε γυμνασμένους και μη γυμνασμένους, η εικόνα ήταν η εξής:



Διάγραμμα 20: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη CARB στις χρονικές στιγμές των 24, 48 και 72 ωρών μετά την ολοκλήρωση της άσκησης συγκριτικά με το δείγμα

πριν την άσκηση, στις ομάδες γυμνασμένων και μη γυμνασμένων. (*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα πριν την άσκηση ($p < 0,05$) (#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p < 0,05$)

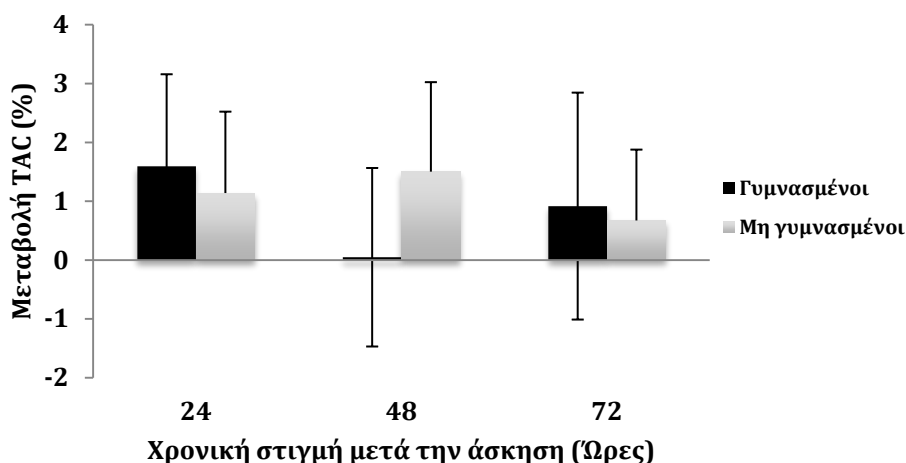
	pre	24 ώρες	48 ώρες	72 ώρες
Γυμνασμένοι (nM/mg πρωτεΐνης)	0,56±0,03	0,56±0,03	0,52±0,03	0,51±0,03
Μη γυμνασμένοι (nM/mg πρωτεΐνης)	0,61±0,04	0,66±0,04	0,70±0,06*#	0,62±0,04

Πίνακας 18: Μεταβολή των απόλυτων τιμών (nM/mg πρωτεΐνης) του βιοδείκτη πρωτεϊνικά καρβονύλια (μέση τιμή±SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές. (#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p < 0,05$) (*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το δείγμα pre ($p < 0,05$)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρείται στατιστικά σημαντικά αύξηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους μη γυμνασμένους στις 48 ώρες σε σχέση με το δείγμα pre κατά 14,67%. Επίσης στην ίδια χρονική στιγμή παρατηρείται σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες των γυμνασμένων και των μη-γυμνασμένων καθώς οι γυμνασμένοι παρουσιάζουν μείωση στα επίπεδα CARB ενώ οι μη γυμνασμένοι αύξηση (Διάγραμμα 20 και Πίνακας 18).

➤ **ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (TAC)**

Όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 21), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στα επίπεδα της TAC.



Διάγραμμα 21: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη TAC στις χρονικές στιγμές των 24, 48 και 72 ωρών μετά την ολοκλήρωση της άσκησης συγκριτικά με το δείγμα πριν την άσκηση, στις ομάδες γυμνασμένων και μη γυμνασμένων

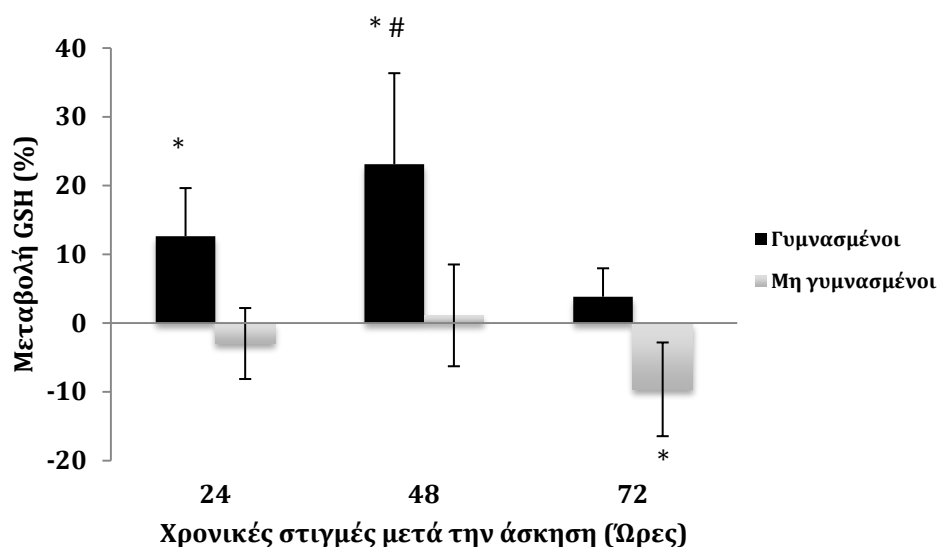
	pre	24 ώρες	48 ώρες	72 ώρες
Γυμνασμένοι (mM DPPH/L πλάσματος)	0,92±0,05	0,93±0,04	0,92±0,05	0,92±0,04
Μη γυμνασμένοι (mM DPPH/L πλάσματος)	0,91±0,04	0,92±0,04	0,92±0,03	0,91±0,03

Πίνακας 19: Μεταβολή των απόλυτων τιμών (DPPH/L πλάσματος) του βιοδείκτη TAC (μέση τιμή±SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές

➤ ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΝΗΓΜΕΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ

Αναφορικά με την ανηγμένη γλουταθειόνη, οι γυμνασμένοι παρουσίασαν πολύ μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων GSH στις 48 ώρες σε σχέση με τους μη-γυμνασμένους, μια διαφορά που χαρακτηρίζεται σημαντική. Ταυτόχρονα, τα επίπεδα GSH για τους γυμνασμένους ήταν σημαντικά αυξημένα 24 και 48 ώρες μετά την

άσκηση κατά 12,63% και 23,09% ενώ αντίστοιχα στους μη γυμνασμένους στις 72 ώρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση κατά 9,64%.



Διάγραμμα 22: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του βιοδείκτη GSH στις χρονικές στιγμές των 24, 48 και 72 ωρών μετά την ολοκλήρωση της άσκησης συγκριτικά με το δείγμα πριν την άσκηση, στις ομάδες γυμνασμένων και μη γυμνασμένων. (*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα πριν την άσκηση ($p < 0,05$) (#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p < 0,05$)

	pre	24 h	48 h	72 h
Γυμνασμένοι (μM/g Hb)	6,92±0,46	7,75±0,47	8,51±0,48*#	7,18±0,49
Μη γυμνασμένοι (μM/g Hb)	7,56±0,34	7,41±0,38	7,64±0,45	6,84±0,46

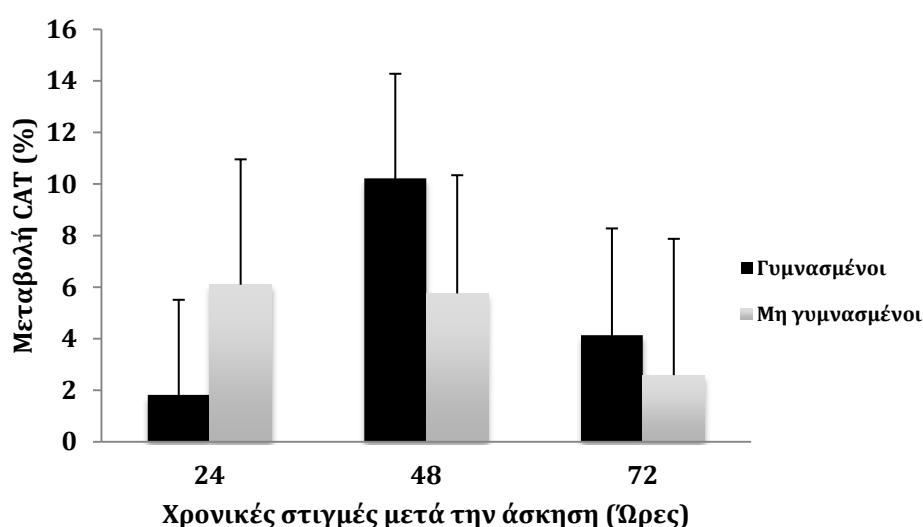
Πίνακας 20: Μεταβολή των απόλυτων τιμών (μM/g Hb) του βιοδείκτη GSH (μέση τιμή±SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές. (#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες (*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το δείγμα pre

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 22, υπάρχει σημαντική διαφορά στις 48 ώρες μετά την άσκηση μεταξύ των μεταβολών των γυμνασμένων και των μη-γυμνασμένων

καθώς οι γυμνασμένοι παρουσίασαν αύξηση κατά 23,09 % ενώ οι μη γυμνασμένοι κατά μόλις 1,11%. Ωστόσο, και στις υπόλοιπες χρονικές στιγμές (24 και 48 ώρες) ενώ οι γυμνασμένοι παρουσίασαν αύξηση, οι μη-γυμνασμένοι παρουσίασαν μείωση των επιπέδων GSH, όπως φαίνεται τόσο στην ποσοστιαία ανάλυση όσο και στις μεταβολές των απόλυτων τιμών (Πίνακας 20).

➤ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ

Όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα (Διάγραμμα 23) αλλά και στους πίνακες (Πίνακας 21), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα δραστηκότητας της CAT, στις χρονικές στιγμές μετά τον αγώνα ανάμεσα στις δυο ομάδες.



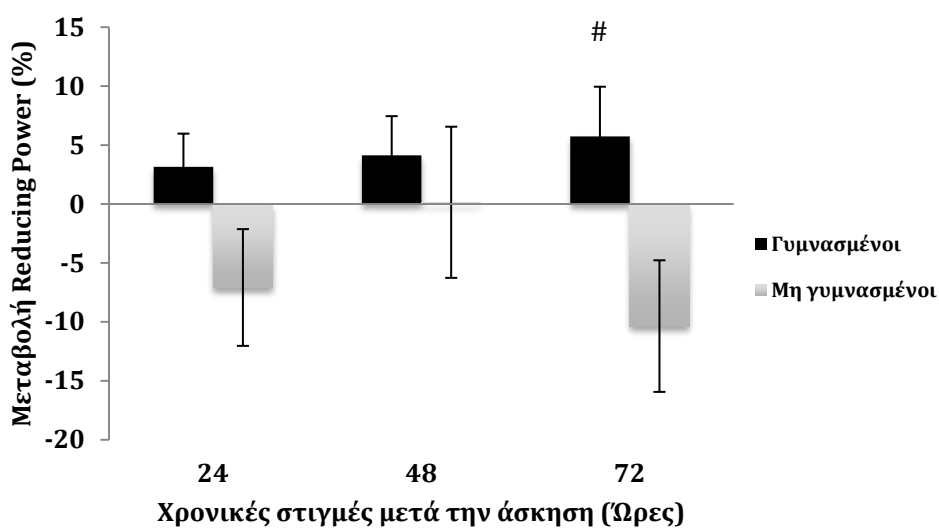
Διάγραμμα 23: Ποσοστιαία μεταβολή (%) της δραστηκότητας CAT στις χρονικές στιγμές των 24, 48 και 72 ωρών μετά την ολοκλήρωση της άσκησης συγκριτικά με το δείγμα pre μετά από διαχωρισμό των συμμετεχόντων σε γυμνασμένους και μη γυμνασμένους

	pre	24 h	48 h	72 h
Γυμνασμένοι (U/mg Hb)	264,35±14,66	269,27±12,61	291,78±14,81	274,64±14,04
Μη γυμνασμένοι (U/mg Hb)	264,21±14,73	279,55±18,63	278,54±18,81	271,02±17,46

Πίνακας 21: Μεταβολή των απόλυτων τιμών (U/mg Hb) του βιοδείκτη CAT (μέση τιμή±SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.

➤ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗ ΔΥΝΑΜΗ (REDUCING POWER)

Στην αναγωγική δύναμη, μετά το διαχωρισμό σε δυο ομάδες παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στις 72 ώρες ανάμεσα στις δυο ομάδες. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στην αναγωγή του Fe (III) σε Fe (II) μπορούν να συμμετάσχουν μόρια όπως το ουρικό οξύ, η α-τοκοφερόλη, η χολερυθρίνη, το ασκορβικό οξύ (Benzie & Strain 1996; Reddy et al. n.d.). Η εικόνα που λάβαμε μετά από ανάλυση των δυο ομάδων ήταν η εξής:

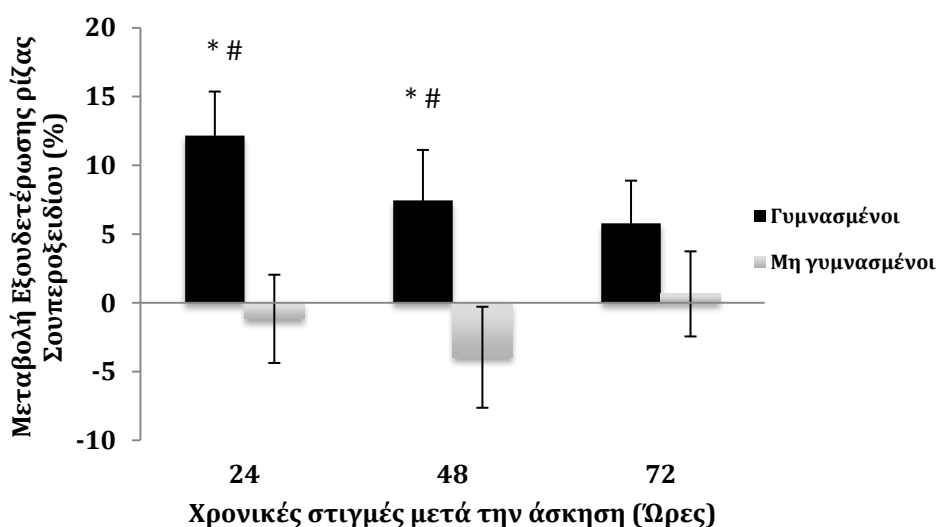


Διάγραμμα 24: Ποσοστιαία (%) μεταβολή του βιοδείκτη Reducing Power (μέση τιμή ± SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές των 24,48 και 72

ωρών μετά την άσκηση σε σύγκριση με το δείγμα pre. (#) Σημαντικά στατιστική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των δύο ομάδων

➤ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΟΥ ΑΝΙΟΝΤΟΣ (SUPEROXIDE RADICAL SCAVENGING)

Μετά το διαχωρισμό σε δυο ομάδες παρατηρούμε στο παρακάτω διάγραμμα ότι οι γυμνασμένοι έχουν σημαντικά αυξημένα τα επίπεδα εξουδετέρωσης της ρίζας O_2^- κατά 12,16% και 7,45% στις 24 και 48 ώρες αντίστοιχα, σε σχέση με το δείγμα pre. Ταυτόχρονα, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δυο ομάδες στις συγκεκριμένες χρονικές στιγμές υποδηλώνοντας αυξημένη δραστικότητα στους γυμνασμένους.



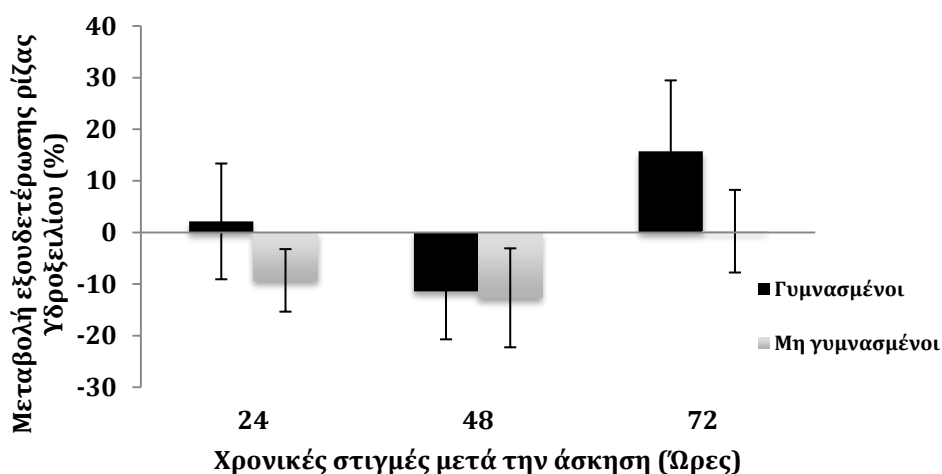
Διάγραμμα 25: Ποσοστιαία (%) μεταβολή του βιοδείκτη εξουδετέρωσης ρίζας σουπεροξειδικού ανιόντος (μέση τιμή \pm SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές των 24,48 και 72 ωρών μετά την άσκηση σε σύγκριση με το δείγμα pre. (*)Σημαντικά στατιστική διαφορά ($p < 0,05$) σε σύγκριση με το δείγμα pre, (#) Σημαντικά στατιστική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των δύο ομάδων

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία κυρίαρχο ρόλο στην εξουδετέρωση της ρίζας O_2^- στο πλάσμα παίζει η SOD (Nimse & Pal 2015). Γενικότερα, έχει τεκμηριωθεί ότι

γυμνασμένοι άνθρωποι παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα SOD (Vaamonde et al. 2016; Ji et al. 1998).

➤ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΤΗΣ ΡΙΖΑΣ ΥΔΡΟΞΥΛΙΟΥ (HYDROXYL RADICAL SCAVENGING)

Στα επίπεδα εξουδετέρωσης της ρίζας OH^\cdot , μετά τον διαχωρισμό σε δυο ομάδες δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές σε σχέση με τις τιμές πριν την άσκηση ή διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων.



Διάγραμμα 26: Ποσοστιαία (%) μεταβολή του βιοδείκτη εξουδετέρωσης ρίζας OH^\cdot (μέση τιμή \pm SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές των 24, 48 και 72 ωρών μετά την άσκηση σε σύγκριση με το δείγμα pre.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μόρια που εξουδετερώνουν τη ρίζα OH^\cdot είναι μεταξύ άλλων η μαννιτόλη, η μελατονίνη, η γλουταθειόνη και η κερκετίνη (Nimse & Pal 2015; Shen et al. 1997; Reiter et al. 1995).

➤ **Στατιστική συσχέτιση δεικτών εξουδετέρωσης ρίζας OH^- , O_2^- και Αναγωγικής Δύναμης**

Προκειμένου να εξεταστεί κατά πόσο αντιμετωπίζονται με τον ίδιο ή όχι τρόπο οι ελεύθερες ρίζες στο πλάσμα των εθελοντών πραγματοποιήσαμε στατιστική συσχέτιση στα επίπεδα εξουδετέρωσης της ρίζας OH^- , O_2^- αλλά και στην Αναγωγική Δύναμη χρησιμοποιώντας την εξίσωση Spearman. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρατίθενται στον Πίνακα 22.

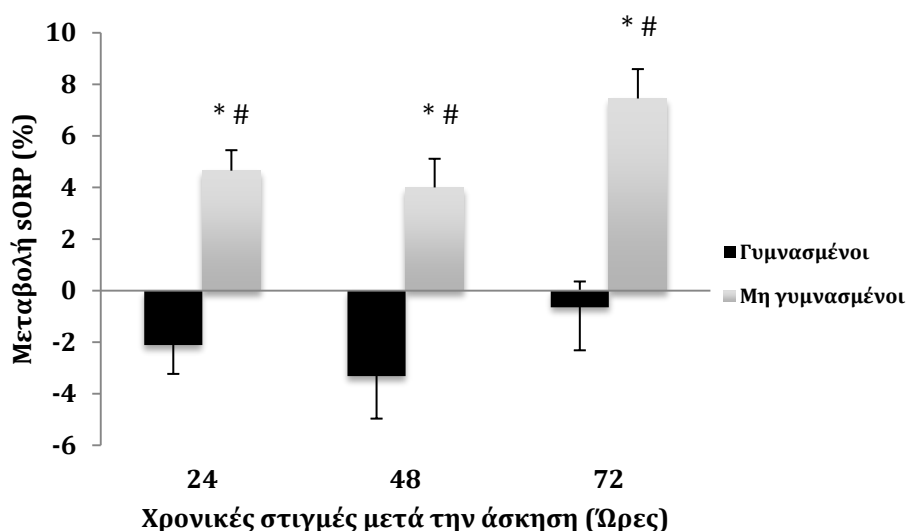
	24 h			48 h			72 h		
	HRS	SRS	RP	HRS	SRS	RP	HRS	SRS	RP
Γυμνασμένοι									
HRS		-0,153	0,514*		-0,081	0,253		0,155	0,336
SRS			-0,107			0,137			-0,068
TAC	0,178	-0,126	0,061	-0,248	0,008	-0,214	-0,137	0,077	-0,327
Μη γυμνασμένοι									
HRS		0,352	-0,117		-0,385	0,166		-0,412	-0,328
SRS			-0,127			-0,069			0,130
TAC	0,230	0,325	-0,199	-0,007	-0,117	0,346	0,356	-0,069	-0,123

Πίνακας 22: Στατιστική συσχέτιση χρησιμοποιώντας την εξίσωση Spearman μεταξύ των βιοδεικτών εξουδετέρωσης ή αναγωγής ριζών. *Σημαντική συσχέτιση ($p < 0,05$)

3.3.3.3 Αποτελέσματα βιοδεικτών ORP

➤ **Static Oxidation Reduction Potential (sORP)**

Στο sORP, πήραμε τα παρακάτω δεδομένα:



Διάγραμμα 27: Ποσοστιαία (%) μεταβολή του βιοδείκτη sORP (μέση τιμή ± SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές των 24,48 και 72 ωρών μετά την άσκηση σε σύγκριση με το δείγμα pre. (*)Σημαντικά στατιστική διαφορά ($p<0,05$) σε σύγκριση με το δείγμα pre, (#) Σημαντικά στατιστική διαφορά ($p<0,05$) μεταξύ των δύο ομάδων

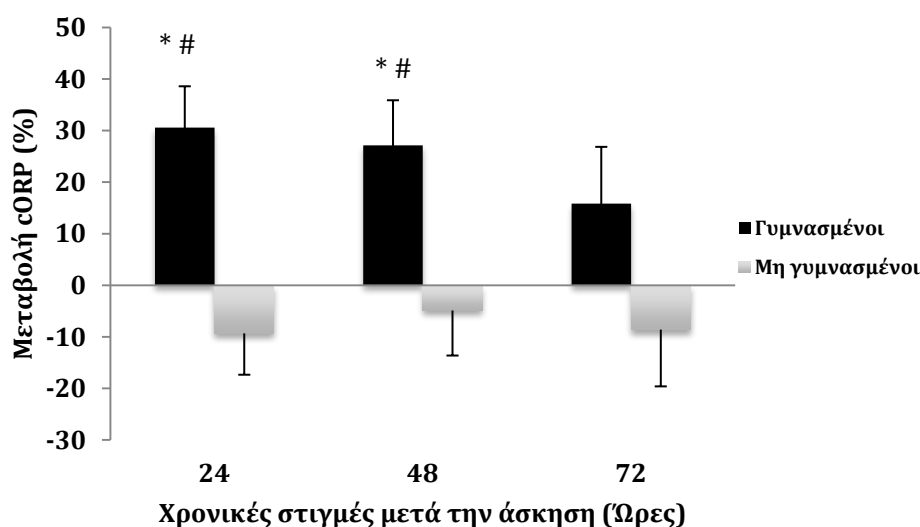
Παρατηρήθηκε σημαντικά στατιστική διαφορά μεταξύ των 2 ομάδων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές (24, 48 και 72 ώρες) μετά την ολοκλήρωση της άσκησης καθώς οι μη γυμνασμένοι είχαν υψηλότερα επίπεδα sORP υποδηλώνοντας εντονότερο οξειδωτικό στρες. Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων sORP σε όλες τις χρονικές στιγμές σε ποσοστό 4,65% , 4,01 % και 7,45 % αντίστοιχα (Διάγραμμα 27 και Πίνακας 23). Φαίνεται, επομένως, ξεκάθαρα ένα εντονότερο οξειδωτικό περιβάλλον στα δείγματα των μη γυμνασμένων.

	pre	24 ώρες	48 ώρες	72 ώρες
Γυμνασμένοι (mV)	129,36±3,63	126,64±3,66	125,37±3,83	128,98±4,63
Μη γυμνασμένοι (mV)	131,27±4,06	136,75±4,16	136,55±4,25	141,05±4,25

Πίνακας 23: Μεταβολή των απόλυτων τιμών (mV) του δείκτη sORP (μέση τιμή±SEM) γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.

➤ Capacity Oxidation Reduction Potential (cORP)

Στον δείκτη cORP, μετά τον διαχωρισμό στις δυο ομάδες παρατηρήθηκε σημαντικά στατιστική διαφορά στις 24 και 48 ώρες μετά την άσκηση, καθώς οι γυμνασμένοι παρουσίασαν αύξηση και οι μη-γυμνασμένοι παρουσίασαν μείωση σε σχέση με πριν την άσκηση. Παράλληλα, οι γυμνασμένοι παρουσίασαν σημαντικά στατιστική αύξηση της τάξης του 30,57% και 27,15% στις 24 και 48 ώρες αντίστοιχα, υποδηλώνοντας αύξηση των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων τους. Στις 72 ώρες ωστόσο φαίνεται ότι αποκαθίσταται εν μέρει η ισορροπία (Διάγραμμα 28 και Πίνακας 24).



Διάγραμμα 28: Ποσοστιαία (%) μεταβολή του βιοδείκτη cORP (μέση τιμή ± SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές των 24,48 και 72 ωρών μετά την άσκηση σε σχέση με το δείγμα pre. (*)Σημαντικά στατιστική διαφορά ($p < 0,05$) σε σύγκριση με το δείγμα pre, (#) Σημαντικά στατιστική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των δύο ομάδων

	pre	24 h	48 h	72 h
Γυμνασμένοι (μC)	0,54±0,07	0,705±0,11*#	0,68±0,07*#	0,63±0,06
Μη γυμνασμένοι (μC)	0,51±0,08	0,46±0,04	0,48±0,05	0,47±0,05

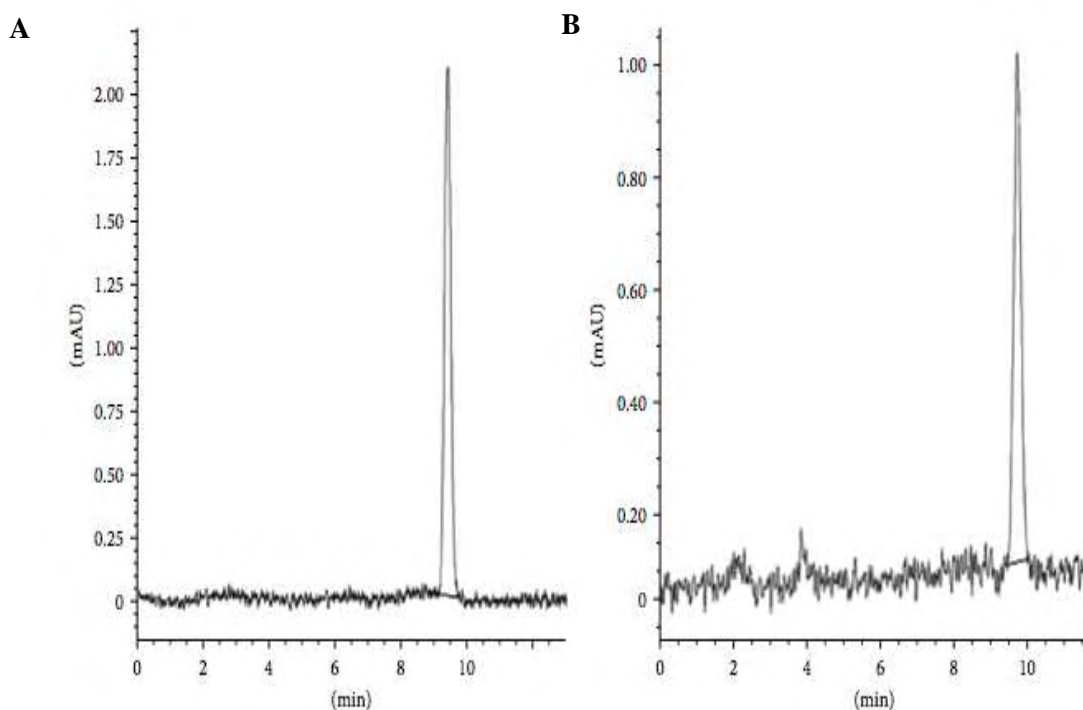
Πίνακας 24: Μεταβολή των απόλυτων τιμών (μC) του βιοδείκτη cORP (μέση τιμή±SEM) γυμνασμένων και μη γυμνασμένων στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές.
 (*) Σημαντικά στατιστική διαφορά (p<0,05) σε σύγκριση με το δείγμα pre
 (#) Σημαντικά στατιστική διαφορά (p<0,05) μεταξύ των δύο ομάδων

3.3.3.3 Αποτελέσματα οξείδωσης των λιπιδίων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC-DAD)

➤ Επικύρωση μεθόδου

Το πρώτο βήμα στην διαδικασία ανάλυσης των επιπέδων MDA με HPLC-DAD αφορούσε την επικύρωση της μεθόδου. Αρχικά, ελήφθη ένα δείγμα ανθρώπινου πλάσματος, στο οποίο είχε προστεθεί με 2, 4, 6, 8, 10 και 12 μM MDA με σκοπό την κατασκευή πρότυπης καμπύλης. Μια παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τον προσδιορισμό της υδατικής καμπύλης χρησιμοποιώντας τις ίδιες συγκεντρώσεις MDA. Η γραμμικότητα και η επαναληψιμότητα αξιολογήθηκαν με γραμμική παλινδρόμηση. Οι εξισώσεις που ελήφθησαν με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων ήταν $y = 3,863x + 11,651$ για την καμπύλη πλάσματος και $y = 4,4151x - 4,1043$ για την υδατική καμπύλη και οι τιμές R^2 ήταν 0,9952 και 0,9982, αντίστοιχα. Επιπλέον, η καμπύλη πλάσματος και η υδατική καμπύλη παρουσίασαν εξαιρετική γραμμικότητα με συντελεστή συσχέτισης μεγαλύτερο από 0,995. Η σχετική ανάκτηση για το σύμπλοκο MDA-TBA αξιολογήθηκε σε τρεις συγκεντρώσεις 0,5, 1,0 και 1,5 μM και η μέση ανάκτηση μετρήθηκε στο 98,06% (κυμαινόταν από 97,54 έως 98,58%). Η ακρίβεια εντός της

ημέρας και μεταξύ των ημερών (intraday, interday test) προσδιορίστηκε με μέτρηση δειγμάτων πλάσματος στα οποία είχε γίνει ένεση πρότυπης συγκέντρωσης MDA. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την ακρίβεια μεταξύ των ημερών (interday test), αναλύθηκαν τρία διαφορετικά διαλύματα πλάσματος (0,5 , 1,0 και 1,5 μM MDA) εις τριπλούν για 5 διαδοχικές ημέρες το καθένα. Η ακρίβεια εντός ημέρας (intraday test) μετρήθηκε με μέτρηση ενός δείγματος πλάσματος με ένεση πρότυπης συγκέντρωσης MDA 1,7 μM με μέτρηση επτά φορές την ίδια ημέρα. Οι ακρίβειες εκφράστηκαν σε % RSD και υπολογίστηκαν στα 0,43% και 0,31% για τις interday και intraday αντιστοίχως οι οποίες βρίσκονται στο εύρος αποδεκτότητας και ακρίβειας. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μέσος χρόνος εμφάνισης της κορυφής ήταν στα 9,55 λεπτά (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα δειγμάτων πλάσματος με ένεση πρότυπου δείγματος 12 $\mu\text{mol/L}$ MDA (A) και πλάσματος εθελοντή χωρίς ένεση πρότυπου δείγματος (B)

➤ **Επίπεδα Μαλονδιαλδεΐδης**

Στην ποσοστιαία ανάλυση των επιπέδων MDA στους γυμνασμένους εθελοντές, τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με τα αντίστοιχα αποτελέσματα των TBARS καθώς σημαντικές αυξήσεις απεικονίζονται κατά 14,07%, 14,70% και 21,79% στις 24, 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση, αντίστοιχα. Αναφορικά με την ποσοστιαία ανάλυση των επιπέδων MDA στους μη γυμνασμένους εθελοντές τα επίπεδα αυξάνονται κατά 15,83%, 14,55% και 23,65% στις ίδιες χρονικές στιγμές. (Πίνακας 25).

	24 ώρες	48 ώρες	72 ώρες
Γυμνασμένοι (%)	14,07 ± 3,21	14,70 ± 4,30	21,79 ± 3,59
Μη γυμνασμένοι (%)	15,83 ± 3,81	14,55 ± 3,71	23,65 ± 4,87

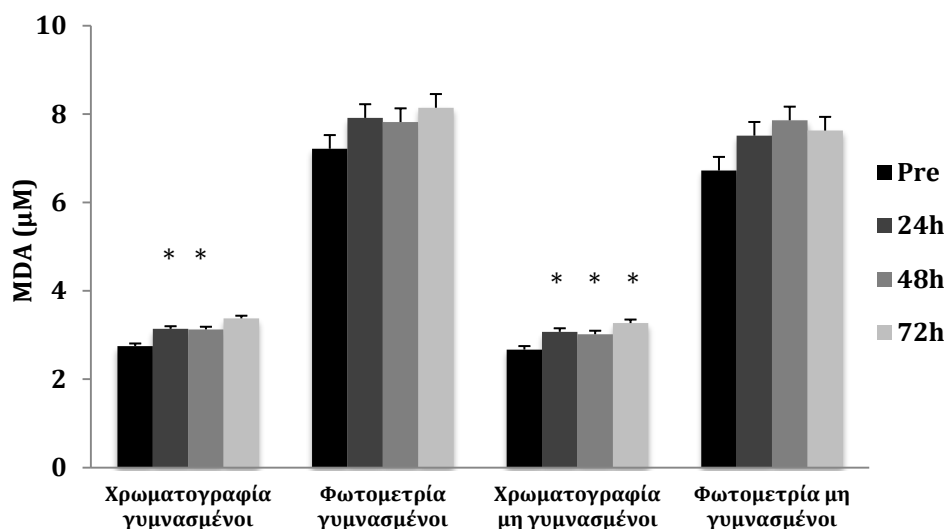
Πίνακας 25: Ποσοστό μεταβολής % των επιπέδων MDA όπως προσδιορίστηκαν με HPLC-DAD (μέση τιμή ± SEM) στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές μετά την ολοκλήρωση της άσκησης, σε σύγκριση με το δείγμα πριν την άσκηση

	pre	24 ώρες	48 ώρες	72 ώρες
Γυμνασμένοι (μM/L)	2,74±0,06	3,14±0,51	3,13±0,11	3,38±0,10
Μη γυμνασμένοι (μM/L)	2,67±0,08	3,07±0,12	3,01±0,11	3,27±0,17

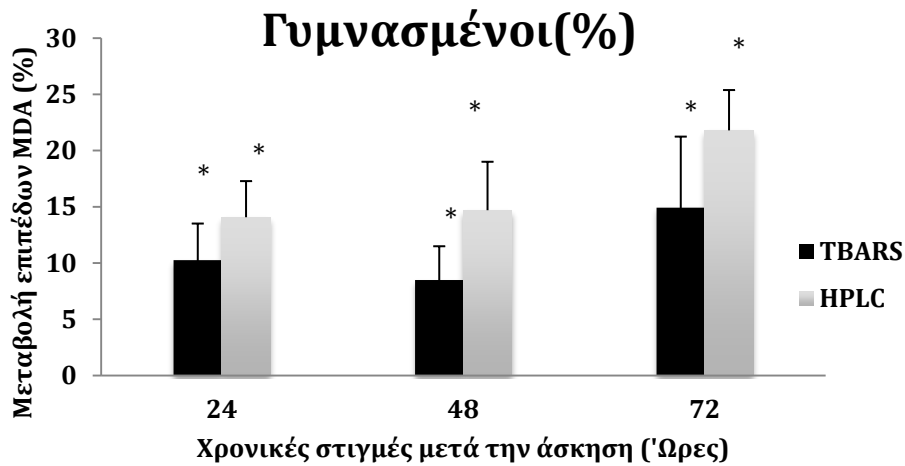
Πίνακας 26: Μεταβολή των απόλυτων τιμών (μM/L) της MDA (μέση τιμή±SEM) αθλούμενων και μη στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές, όπως υπολογίστηκε με HPLC-DAD

➤ Σύγκριση επιπέδων MDA με φωτομετρία και χρωματογραφία

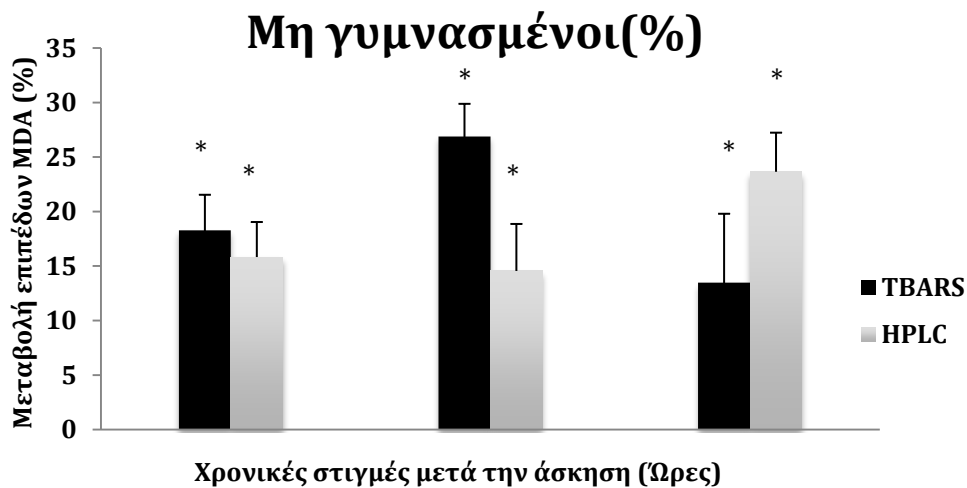
Όταν και οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της MDA συγκρίθηκαν μεταξύ τους, παρατηρήθηκε 2,5-φορές αύξηση της συγκέντρωσης MDA που μετρήθηκε με φασματοφωτομετρία (κυμαίνεται από 5,5-9,2 μM) σε σύγκριση με τη χρωματογραφία (κυμαίνεται από 2,2-4,7 μM , αντίστοιχα) (Διάγραμμα 29 και Πίνακας 26). Ωστόσο, οι ποσοστιαίες μεταβολές των συγκεντρώσεων MDA μετά την άσκηση σε σύγκριση με τα αντίστοιχα δείγματα πριν την άσκηση ήταν παρόμοιες μεταξύ των δύο μεθόδων (Διαγράμματα 30,31). Αυτή η ομοιότητα επιβεβαιώθηκε και από τη σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ποσοστιαίας μεταβολής των τιμών MDA που λαμβάνονται με τις δύο αναλυτικές τεχνικές ($r = 0,703$, $p < 0,01$) (Διάγραμμα 32).



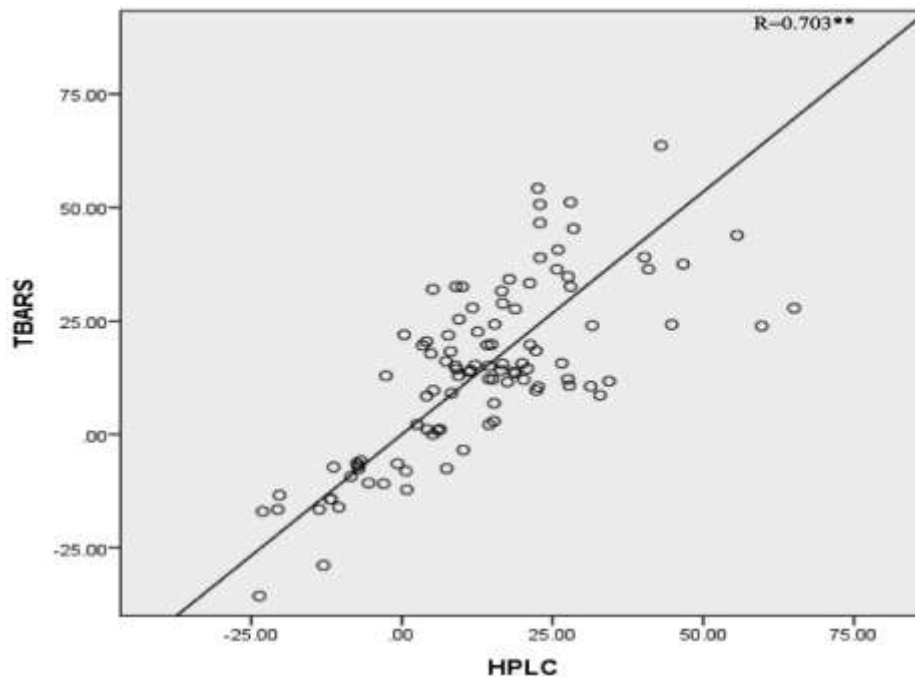
Διάγραμμα 29: Σύγκριση των επιπέδων MDA (μM) όπως μετρήθηκαν με χρωματογραφία (HPLC-DAD) και φασματοφωτομετρία (TBARS) * Σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το δείγμα pre ($p < 0,05$)



Διάγραμμα 30: Μεταβολή επιπέδων (%) MDA στο γκρούπ των γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση όπως μετρήθηκαν με φασματοφωτομετρία (TBARS) και χρωματογραφία (HPLC), σε σχέση με το δείγμα πριν την άσκηση
* Σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το δείγμα πριν την άσκηση ($p < 0,05$)



Διάγραμμα 31: Μεταβολή επιπέδων (%) MDA στο γκρούπ των μη γυμνασμένων στις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση όπως μετρήθηκαν με φασματοφωτομετρία (TBARS) και χρωματογραφία (HPLC), σε σχέση με το δείγμα πριν την άσκηση *
Σημαντική διαφορά σε σύγκριση με το δείγμα πριν την άσκηση ($p < 0,05$)



Διάγραμμα 32: Στατιστική συσχέτιση με βάση την εξίσωση Spearman των μεταβολών (%) των επιπέδων MDA όπως μετρήθηκαν με χρωματογραφία (HPLC) και φασματοφωτομετρία (TBARS)

3.3.4 Συζήτηση

Υπάρχουν διαφορετικοί τύποι άσκησης στις οποίες ένα άτομο μπορεί να υποβληθεί στην καθημερινή του ρουτίνα, όπως το περπάτημα, το τρέξιμο, η άρση βαρών, οι οποίες συνεπάγονται διαφορετικές μυϊκές συσπάσεις. Αυτές οι συστολές περιλαμβάνουν κυρίως ισομετρικές, ομόκεντρες και έκκεντρες μυϊκές δράσεις που εμπλέκονται σε όλες σχεδόν τις δραστηριότητες άσκησης (Jamurtas & Fatouros 2012). Μεταξύ αυτών, η έκκεντρη συστολή, ένας τύπος συστολής όπου ο μυς επιμηκώνεται με σκοπό να υπερνικήσει μια εξωτερική αντίσταση έχει συσχετιστεί με μεγαλύτερη μυϊκή βλάβη και ευρύτερη απόκριση φλεγμονής σε άτομα (Jamurtas & Fatouros 2012).

Προηγούμενες εργασίες αποδείκνυαν ότι άτομα που έχουν υποβληθεί σε έκκεντρη άσκηση παρουσιάζουν διακυμάνσεις στην οξειδωτική τους κατάσταση

(Stagos et al. 2015; Margaritelis et al. 2014). Έτσι, το ενδιαφέρον μας επικεντρώθηκε στη μεταβολή του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από την προκληθείσα φλεγμονή μετά την έκκεντρη άσκηση και τη σύγκριση της προόδου της αποθεραπείας τις επόμενες ημέρες μετά την άσκηση μεταξύ γυμνασμένων και μη γυμνασμένων ατόμων.

Μια πρώτη προσέγγιση στην αξιολόγηση της μυϊκής βλάβης που προκλήθηκε από την άσκηση ήταν η εκτίμηση του μυϊκού πόνου, καθώς η έκκεντρη άσκηση έχει αποδειχθεί ότι παράγει το μεγαλύτερο ποσοστό καθυστερημένης εκδήλωσης μυϊκού πόνου (DOMS) (Jamurtas & Fatouros 2012). Το DOMS θεωρείται η κύρια αιτία μειωμένης απόδοσης άσκησης, μυϊκής δύναμης και εύρους κίνησης για γυμνασμένα και μη γυμνασμένα άτομα (Mckune et al. 2012; Serinken et al. 2013). Στην παρούσα μελέτη, τα επίπεδα DOMS στην ομάδα γυμνασμένων ήταν χαμηλότερα από αυτά της ομάδας μη γυμνασμένων. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί ότι ο μέγιστος μυϊκός πόνος ανιχνεύθηκε στις 48 ώρες μετά το πέρας της άσκησης και στις δύο εξεταζόμενες ομάδες, συμφωνώντας με παλαιότερες μελέτες (Hilbert et al. 2003). Η αύξηση στο DOMS δεν έχει ακόμη γίνει πλήρως κατανοητή αλλά έχει αποδοθεί σε βιοχημικές αλλαγές μετά από μυϊκή βλάβη και όχι σε ένα μοναδικό γεγονός βλάβης (Kim & Lee 2014). Συγκεκριμένα, ο τραυματισμός στον μυ μπορεί να προκαλέσει φλεγμονώδη απόκριση, μια παθοφυσιολογική κατάσταση που αλλάζει την ομοιόσταση ενός κυττάρου με στόχο την επισκευή των ιστών και την αποκατάσταση των μυών (Fatouros & Kouretas 2010). Η βλάβη των ιών του σκελετικού μυός μετά από έντονη άσκηση έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση χημειοκινών (IL-6, TNF-α), την ενεργοποίηση φλεγμονωδών κυττάρων (μακροφάγα, ηωσινόφιλα), την αύξηση των προσταγλανδινών και την παραγωγή αραχιδονικού οξέος που, τελικά, μπορεί να επηρεάσει τους υποδοχείς πόνου (Kim & Lee 2014). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η

παραγωγή ελευθέρων ριζών μετά την εκτέλεση έκκεντρης άσκησης σχετίζεται με την εμφάνιση φλεγμονής, καθώς οδηγεί στη μετανάστευση φαγοκυττάρων στον κατεστραμμένο ιστό (Fatouros & Kouretas 2010). Η επερχόμενη αναπνευστική έκρηξη έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή OH^- και O_2^- (Stagos et al. 2015). Η στατιστική ανάλυση επιβεβαίωσε την προαναφερθείσα υπόθεση, καθώς τα DOMS στην ομάδα μη γυμνασμένων παρουσίασαν σημαντική αρνητική συσχέτιση με το cORP και το RP, τα οποία απεικονίζουν τα αντιοξειδωτικά και την αναγωγική δραστηριότητα αντίστοιχα. Εντούτοις, ο βαθμός προσαρμογής του μυός στον τύπο της άσκησης μπορεί να μειώσει την ευαισθησία στην ανταπόκριση της φλεγμονής μετά από μια νέα εκτέλεση έκκεντρης άσκησης και κατά συνέπεια η φλεγμονώδης απόκριση δεν είναι τόσο έντονη, με αποτέλεσμα την εξασθένηση του μυϊκού πόνου. Ο τελευταίος επιβεβαιώνει την έννοια της σχέσης μεταξύ της φλεγμονώδους απόκρισης και της απόκρισης του πόνου και μπορεί να ερμηνεύσει τη διαφορά στον μυϊκό πόνο μεταξύ των δύο εξεταζόμενων ομάδων της μελέτης μας (Nikolaidis, Paschalis, et al. 2007).

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκε η οξειδωτική βλάβη που προκλήθηκε από τα ROS σε βιομόρια. Αρχικά, μελετήθηκε η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών που προκαλείται μετά από την εκτέλεση έκκεντρης άσκησης λόγω κυρίως της εισβολής φαγοκυττάρων στον κατεστραμμένο ιστό μέχρι και 48 ώρες μετά την ολοκλήρωση της άσκησης και μπορεί να παράγει μια σημαντική ποσότητα ROS μέσω πολλαπλών μηχανισμών (Goldfarb et al. 2005). Έτσι, η ευρεία παραγωγή ROS και η αυξημένη πρόσληψη οξυγόνου κατά τη διάρκεια της άσκησης οδηγούν σε οξείδωση πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων και κατακερματισμό πολυπεπτιδίων καθώς όλα τα αμινοξέα είναι ευάλωτα σε μεταλλο-καταλυόμενη οξείδωση (Radak et al. 2001).

Τα αποτελέσματα έδειξαν μια πιο αποτελεσματική προστασία από την οξειδωση των πρωτεϊνών στους γυμνασμένους εθελοντές σε σύγκριση με τους μη γυμνασμένους τις ημέρες που ακολούθησαν την άσκηση. Τα δεδομένα αυτά, καταδεικνύουν ότι το αθλητικό υπόβαθρο θα μπορούσε να εξηγήσει, τουλάχιστον εν μέρει, τη μεγάλη διαφοροποίηση που παρατηρείται στην οξειδωση πρωτεϊνών μεταξύ διαφορετικών ατόμων τόσο από εμάς όσο και από άλλες μελέτες (Stagos et al. 2015; Margaritelis et al. 2014). Ενδιαφέρον στοιχείο αποτελεί το γεγονός ότι μια ακόμα μελέτη έχει δείξει αύξηση των επιπέδων οξειδωσης πρωτεϊνών σε γυμνασμένες γυναίκες που ωστόσο δεν είχαν κάποια εξοικείωση σε άσκηση με αντίσταση μετά από πραγματοποίηση έκκεντρης άσκησης (Goldfarb et al. 2005). Λαμβάνοντας υπόψη ότι στο πείραμά μας η πλειοψηφία των γυμνασμένων ατόμων (17/22) πραγματοποιεί συστηματικά άσκηση με αντίσταση, φαίνεται ότι ο τύπος της άσκησης μπορεί να επηρεάσει το φάσμα των μυϊκών βλαβών και την επικείμενη καρβονυλίωση πρωτεϊνών.

Όσον αφορά τα επίπεδα GSH, ήταν σε υψηλότερα επίπεδα σε γυμνασμένους εθελοντές σε σύγκριση με μη γυμνασμένους στις εξεταζόμενες χρονικές στιγμές και ειδικά στις 48 ώρες. Η GSH αποτελεί την πιο άφθονη μη πρωτεϊνική θειόλη (Smith et al. 1996) και ο ρόλος της είναι κομβικός για την αντιοξειδωτική άμυνα του μυός μετά από άσκηση, διατηρώντας την οξειδοαναγωγική κατάσταση και εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες όπως το OH^- και O_2^- που παράγονται μετά το σχηματισμό φλεγμονής (Kim & Lee 2014). Με βάση τα παραπάνω, αναμενόταν μείωση των επιπέδων GSH μετά την εκτέλεση έκκεντρης άσκησης (Margaritelis et al. 2014). Στην πραγματικότητα, μια περίοδος εξαντλητικής άσκησης οδηγεί σε αυξήσεις στα επίπεδα ROS, οι οποίες δεν μπορούν να ρυθμιστούν από ενδογενή αντιοξειδωτικά όπως η GSH, ειδικά σε μη γυμνασμένους ανθρώπους. Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας,

αποκάλυψαν ότι τα γυμνασμένα άτομα έχουν αναπτύξει πιθανώς προσαρμοστικές αντιδράσεις στην άσκηση. Γενικά, έχει προταθεί ότι η τακτική άσκηση μπορεί σταδιακά να αυξήσει το επίπεδο προσαρμογής με την επανειλημμένη ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών γονιδίων και πρωτεϊνών που οδηγούν σε υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και, κατά συνέπεια, σε μια πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση των παραγόμενων ROS (Radak et al. 2001). Οι προαναφερθείσες αντιδράσεις προκαλούνται κυρίως από την ενεργοποιημένη πρωτεΐνη κινάση μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMPK), από το μεταγραφικό παράγοντα NF-κB, τη p38 MAPK, μέλη της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων FoxO και από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf-2, που όλα ενεργοποιούνται σε χαμηλά επίπεδα ROS, και κατά συνέπεια μετά από τακτικές περιόδους άσκησης (Dodd et al. 2010; Derbre et al. 2012; Kröller-Schön et al. 2012). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η άσκηση προκαλεί την ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών MAPK, όπως η p38, η ERK1 και η ERK2, οι οποίες ακολούθως ενεργοποιούν τον NF-κB σε μυϊκό γαστροκνήμιο αρουραίου και συνεπώς την έκφραση σημαντικών ενζύμων που σχετίζονται με την άμυνα εναντίον των ROS (δηλαδή SOD, CAT και GPX1) συντελώντας έτσι στην καλύτερη προσαρμογή στην άσκηση (Ji et al. 2006; Gomez-Cabrera et al. 2008). Τα συναφή με την GSH αντιοξειδωτικά ένζυμα, συμπεριλαμβανομένης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) και της συνθετάσης της GSH, ένζυμα που παίζουν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση και αναγέννηση της GSH, είναι επίσης προϊόντα της ενεργοποίησης των παραπάνω παραγόντων (Espinosa-Diez et al. 2015) εξηγώντας επαρκώς την αύξηση της GSH στους γυμνασμένους συμμετέχοντες.

Όπως και οι βιοδείκτες CARB και GSH, έτσι και οι βιοδείκτες ORP έδειξαν επίσης ότι το οξειδωτικό στρες ήταν χαμηλότερο σε γυμνασμένα άτομα από ότι σε μη γυμνασμένα. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα sORP στους μη γυμνασμένους βρέθηκαν όχι

μόνο σημαντικά υψηλότερα στις χρονικές στιγμές μετά την ολοκλήρωση της άσκησης συγκριτικά με τα δείγματα πριν την άσκηση αλλά επίσης υψηλότερα σε σύγκριση με τους γυμνασμένους συμμετέχοντες, γεγονός που υποδηλώνει επαγωγή οξειδωτικού στρες στους μη γυμνασμένους. Σε προηγούμενες μελέτες, δείξαμε επίσης ότι αυτός ο δείκτης αυξήθηκε και συσχετίστηκε με επαγωγή οξειδωτικού στρες μετά από έντονη άσκηση αντοχής (Stagos et al. 2014). Ο δείκτης cORP, που δείχνει την αντιοξειδωτική ικανότητα, ήταν επίσης σύμφωνος με το sORP, καθώς ήταν υψηλότερος στο πλάσμα των γυμνασμένων συμμετεχόντων σε σχέση με τους μη γυμνασμένους. Έτσι, οι μη γυμνασμένοι φαίνεται ότι είναι πιο ευάλωτοι στην παραγωγή ROS μετά από τραυματισμό των μυών όπως απεικονίζεται στο υψηλότερο sORP και τα χαμηλότερα επίπεδα cORP μετά την άσκηση. Η βελτιωμένη ικανότητα των γυμνασμένων ατόμων να περιορίσουν τα επίπεδα ROS μπορεί να εξηγήσει την καλύτερη προστασία τους από την οξειδωτική βλάβη τις ημέρες μετά την πραγματοποίηση της άσκησης.

Η αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα της ομάδας των γυμνασμένων επιβεβαιώθηκε, επίσης, από τα αποτελέσματα της δραστηριότητας εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών. Συγκεκριμένα, τα γυμνασμένα άτομα εμφάνισαν σημαντική αύξηση της εξουδετέρωσης ριζών O_2^- μετά από την άσκηση συγκριτικά με τα αντίστοιχα επίπεδα των δειγμάτων πριν την άσκηση καθώς και σε σύγκριση με την ομάδα των μη γυμνασμένων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η SOD παίζει κυρίαρχο ρόλο στην απομάκρυνση του O_2^- στο πλάσμα (Nimse & Pal 2015). Είναι ενδιαφέρον ότι μελέτες έχουν δείξει ότι τα γυμνασμένα άτομα παρουσίαζαν υψηλά επίπεδα SOD και έτσι είναι λογικό το O_2^- να αντιμετωπίζεται αποτελεσματικότερα (Vaamonde et al. 2016).

Ομοίως, τα επίπεδα αναγωγής του Fe (III) σε Fe (II) όπως καθορίστηκε με τη δοκιμασία Reducing Power ήταν υψηλότερη στους γυμνασμένους σε σύγκριση με τους μη γυμνασμένους, ειδικά σε 72 ώρες μετά την άσκηση. Ίσως αυτό μεταφράζεται στο γεγονός ότι τα αντιοξειδωτικά μόρια του πλάσματος όπως το ουρικό οξύ, η α-τοκοφερόλη, η χολερυθρίνη και το ασκορβικό οξύ που μπορούν να ανάγουν τον Fe (III) σε Fe (II) ήταν πιο αυξημένα σε άτομα με αθλητικό υπόβαθρο (Benzie & Strain 1996; Reddy et al. 2010). Επίσης, τα υψηλά επίπεδα GSH στην ομάδα γυμνασμένων ίσως παίζουν ρόλο στην ικανότητα αναγωγής του Fe (III) σε Fe (II), δεδομένου ότι η GSH δρα ως αντιοξειδωτικό και χορηγώντας ένα άτομο υδρογόνου συμμετέχει στην αναγέννηση των αντιοξειδωτικών βιταμινών E και C (Goldfarb et al. 2005). Πράγματι, το δευδροασκορβικό οξύ μπορεί να μετατραπεί ξανά στο ασκορβικό οξύ από την GSH (Dadheech et al. 2006). Ταυτόχρονα, οι ρίζες τοκοφερόλης που σχηματίζονται μετά την οξείδωση των α-τοκοφερολών μπορούν να αναγεννηθούν ξανά στην α-τοκοφερόλη από την GSH, μια αντίδραση η οποία καταλύεται από μια αναγωγή ελεύθερης ρίζας (Haafte et al. 2003).

Από την άλλη πλευρά, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα εξουδετέρωσης της ρίζας OH^- μετά την άσκηση συγκριτικά με τα δείγματα πριν την άσκηση, κάτι που δύναται να εξηγηθεί από την υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των συμμετεχόντων. Ωστόσο, τα γυμνασμένα άτομα ήταν και πάλι πιο αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση του OH^- στις 72 ώρες μετά την άσκηση σε σύγκριση με τους μη γυμνασμένους. Τα μόρια στο πλάσμα που παίζουν ρόλο στην εξουδετέρωση των ριζών OH^- είναι μεταξύ άλλων μαννιτόλη, μελατονίνη, GSH, κερκετίνη και αλβουμίνη (Shen et al. 1997; Lipinski 2011; Reiter et al. 1995; Nimse & Pal 2015).

Η υπεροξειδωση λιπιδίων (δηλαδή η συγκέντρωση MDA) όπως μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά με τη δοκιμασία TBARS δεν έδειξε σημαντικές μεταβολές μεταξύ των δυο ομάδων. Η MDA συνήθως παράγεται από αρκετές ώρες έως ημέρες μετά από την έντονη άσκηση αντίστασης και πιθανώς προκλήθηκε από διείσδυση λευκοκυττάρων και μακροφάγων ή/και ενεργοποίηση της οξειδάσης της ξανθίνης λόγω ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (Avery et al. 2003). Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, οι προαναφερθείσες υψηλές συγκεντρώσεις TBARS στο πλάσμα των συμμετεχόντων στη μελέτη μας πιθανότατα προκλήθηκαν από υπεροξειδωση λιπιδίων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και βλάβης μεμβρανών μεμβρανών μυών (Hulbert 2005). Η μέθοδος των TBARS είναι υπο αμφισβήτηση στην βιβλιογραφία λόγω έλλειψης εξειδίκευσης, καθώς το TBA αντιδρά εκτός από το MDA και με άλλες ενώσεις όπως τα σάκχαρα, τα αμινοξέα και άλλες αλδεΐδες (Grotto et al. 2007; L Spirlandeli et al. 2013; Moselhy et al. 2013). Έτσι, πραγματοποιήσαμε μια πιο ειδική μέθοδο για τον προσδιορισμό MDA στο πλάσμα, με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC-DAD), για λόγους σύγκρισης. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία αύξηση της τάξης των 2,5 φορές περίπου των επιπέδων MDA που μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά σε σύγκριση με τα αποτελέσματα χρωματογραφίας και στις δύο ομάδες. Η παραπάνω διαπίστωση επιβεβαίωσε ότι ο προσδιορισμός MDA είναι πιο ευαίσθητος με την πραγματοποίηση μίας μεθόδου HPLC σε σχέση με τη δοκιμασία TBARS. Μια παρόμοια διαφορά μεταξύ των δύο δοκιμασιών έχει επίσης αναφερθεί σε άλλες μελέτες (L Spirlandeli et al. 2013; Moselhy et al. 2013). Ωστόσο, η δοκιμασία TBARS επέδειξε σημαντική συσχέτιση με τη μέθοδο HPLC όσον αφορά τις μεταβολές της MDA μετά την άσκηση. Η παρατηρούμενη διαφορά μεταξύ των επιπέδων MDA μετρημένης με TBARS και HPLC, η οποία επιβεβαιώνεται επίσης στη βιβλιογραφία, υποδηλώνει ότι

μια εξίσωση (Εξίσωση 1) μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές μελέτες για τον ακριβή υπολογισμό των επιπέδων MDA, όταν διεξάγεται η φωτομετρική δοκιμασία TBARS.

$$MDA (\mu\text{mol/L}) = 0,4xTBARS (\mu\text{mol/L}) \text{ (Εξίσωση 1)}$$

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί η έλλειψη σημαντικών συσχετίσεων μεταξύ των εξεταζόμενων βιοδεικτών (εκτός από την Αναγωγική δύναμη και την εξουδετέρωση της ρίζας OH^- στην ομάδα γυμνασμένων στις 72 ώρες μετά την άσκηση). Το παραπάνω επιβεβαιώνει την αντίληψη ότι η επαγωγή οξειδωτικού στρες και οι ακόλουθες προσαρμογές που βασίζονται στην ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που εξαρτάται από διάφορους φυσιολογικούς, βιοχημικούς και γενετικούς παράγοντες που ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ διαφορετικών ατόμων (Kant & Graubard 2008; Rankinen & Bouchard 2008). Το συμπέρασμα αυτό θεωρείται σημαντικό καθώς προτείνει μια εξατομικευμένη προσέγγιση για την αντιμετώπιση της επαγωγής οξειδωτικού στρες μετά από επίπονη άσκηση όπως η διαμόρφωση της δίαιτας κάθε ατόμου ξεχωριστά προκειμένου να ληφθούν τα κατάλληλα και απαραίτητα αντιοξειδωτικά μέσω της τροφής. Έτσι, μια εξατομικευμένη διατροφική προσέγγιση θα μπορούσε να βοηθήσει στην τελειοποίηση της διαδικασίας αποκατάστασης και κατά συνέπεια στη βελτίωση της κατάστασης υγείας και των επιδόσεων μετά από έκκεντρη άσκηση.

Τέλος σημαντικό συμπέρασμα είναι ότι ο οργανισμός κάθε ατόμου είναι μοναδικός και οι γενικές συστάσεις για ανάρρωση μετά από μια έντονη άσκηση πρέπει να αποφεύγονται. Σε συνέχεια αυτής της ιδέας, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι το αθλητικό υπόβαθρο μπορεί να είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τον προσδιορισμό του οξειδωτικού στρες και τις ακόλουθες προσαρμογές για την αντιμετώπιση του.

3.4 Μελέτη της επαγόμενης κυτταροτοξικότητας του οξειδωτικού παράγοντα *t*-BOOH στα ανθρώπινα μονοκύτταρα περιφερικού αίματος (PBMCs) μετά από έκκεντρη άσκηση

3.4.1 Εισαγωγή

Η άσκηση έχει συσχετιστεί ευρέως με την παραγωγή ελεύθερων ριζών και την επαγωγή οξειδωτικού στρες με τρόπο που εξαρτάται από την ένταση λόγω των διάφορων μηχανισμών που εμπλέκονται (Steinbacher & Eckl 2015; Cooper et al. 2002). Γενικότερα, κατά τις τελευταίες δεκαετίες, καλλιεργήθηκε η αντίληψη ότι η οξειδοαναγωγική κατάσταση μιας ομάδας ατόμων καθώς και η αντίστοιχη παρέμβαση μέσω λήψης αντιοξειδωτικών σκευασμάτων μπορεί να είναι αρκετή χωρίς να λαμβάνεται υπόψιν η εξατομικευμένη ανάλυση (Margaritelis et al. 2014; Veskoukis et al. 2008; Radak et al. 2013). Ωστόσο, η προσέγγιση αυτή φαίνεται λανθασμένη. Πράγματι, μελέτες έχουν δείξει ότι η οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων μετά από άσκηση είναι σε άμεση συνάρτηση με τα αντίστοιχα αρχικά επίπεδα των εξεταζόμενων βιοδεικτών (Margaritelis et al. 2014; Block et al. 2008). Συγκεκριμένα, υπάρχει δημοσιευμένη έρευνα που δείχνει πως η πρόσληψη συμπληρωμάτων που περιέχουν τις βιταμίνες C και E, μειώνει τα επίπεδα οξειδωτικού στρες μόνο όταν οι αρχικές του τιμές είναι υψηλές (Block et al. 2008). Επίσης, έχει αναφερθεί πως η έκκεντρη άσκηση επάγει σε μικρότερο βαθμό την αύξηση των επιπέδων βιοδεικτών οξειδωτικού στρες (F2-ισοπροστάνια και CARB) όταν οι αρχικές τιμές GSH είναι υψηλές (Margaritelis et al. 2014). Από την άλλη πλευρά, σύμφωνα με εργασία του εργαστηρίου μας, η έκκεντρη άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες μόνο στους συμμετέχοντες με χαμηλά αρχικά επίπεδα αντιοξειδωτικών αποθεμάτων (Stagos et al.

2015). Έτσι, είναι προφανές ότι οι αρχικές τιμές των βιοδεικτών οξειδοαναγωγής πρέπει να ληφθούν υπόψη για να δηλωθεί ότι ένα οξειδοαναγωγικό ερέθισμα προκαλεί οξειδωτικό ή αναγωγικό στρες ή reductive stress όπως είναι γνωστό στη βιβλιογραφία.

Το αναγωγικό στρες που προκαλείται από την άσκηση είναι ένα βιολογικό αποτέλεσμα και μια κατάσταση που έχει κερδίσει πρόσφατα πολλούς υποστηρικτές (Veskoukis et al. 2012). Πράγματι, υπάρχουν στοιχεία που προέρχονται από την ερευνητική μας ομάδα και υποστηρίζουν την ύπαρξη αναγωγικού περιβάλλοντος σε άτομα μετά την εκτέλεση έκκεντρης και όχι μόνο άσκησης (Stagos et al. 2015). Η αντίληψη που επικρατούσε μέχρι πριν από μια δεκαετία ήταν ότι το οξειδωτικό στρες και οι ελεύθερες ρίζες είναι επιβλαβείς για την κανονική λειτουργία του ιστού. Παρόλα αυτά, σήμερα γνωρίζουμε ότι είναι μια απαραίτητη προϋπόθεση για θεμελιώδεις βιολογικές διαδικασίες, όπως η μεταγωγή σήματος (Radak et al. 2013). Θα μπορούσε μάλιστα να υποθεθεί ότι το αναγωγικό στρες είναι απαραίτητο καθώς η ύπαρξη λιγότερων ελευθέρων ριζών δεν θα απαιτούσε την εξάντληση των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων. Αλλά αυτό φαίνεται να απέχει πολύ από την πραγματικότητα.

Από τη μία πλευρά, υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι το αναγωγικό στρες μπορεί να είναι επιβλαβές για τα ευκαρυωτικά κύτταρα με ειδική αναφορά στην ανηγμένη (GSH) και οξειδωμένη (GSSG) γλουταθειόνη και την αναλογία γλουταθειόνης (GSH / GSSG) (Korge et al. 2015). Αναλυτικότερα, στο αναγωγικό στρες, η παραγωγή ROS δεν υπερβαίνει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών μηχανισμών να τις εξουδετερώσουν. Δυο αντιοξειδωτικά ένζυμα, οι αναγωγάσες της γλουταθειόνης και της θειορεδοξίνης προσφέρουν ηλεκτρόνια στο O_2 παράγοντας έτσι H_2O_2 , κυρίως λόγω της έλλειψης των φυσιολογικών οξειδωμένων υποστρωμάτων τους που είναι η GSSG και η οξειδωμένη θειορεδοξίνη.

Από την άλλη πλευρά, έχει δειχθεί ότι η ύπαρξη αναγωγικού στρες μετά την άσκηση προκαλεί ευεργετικά αποτελέσματα (Stagos et al. 2015). Σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα, η GSH βρίσκεται στο προσκήνιο καθώς θεωρείται κρίσιμη για την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου δεδομένου ότι είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας εξουδετέρωσης οξειδωτικών μορίων και θεωρείται ως βασικός ρυθμιστής της παραγωγής ROS από τα μιτοχόνδρια και εν συνεχεία του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού περιβάλλοντος (Shen et al. 2005). Ωστόσο, όλες αυτές οι παρατηρήσεις ενισχύουν την αντίληψη που έχουν αναπτυχθεί από τους Aon και Cortassa, σύμφωνα με την οποία τόσο το οξειδωτικό όσο και το αναγωγικό στρες αποτελούν ακραίες βιολογικές συνθήκες, καθώς οι αντιοξειδωτικές άμυνες των κυτταρικών πληθυσμών, όπως τα ανθρώπινα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMCs) πιθανότατα είναι επηρεασμένες (Cortassa et al. 2014; Aon et al. 2010).

Είναι ευρέως γνωστό ότι τα PBMCs είναι κύτταρα αίματος που βρίσκονται στην πρώτη γραμμή του ανθρώπινου ανοσοποιητικού συστήματος (Pourahmad & Salimi 2015). Είναι οι πιο σημαντικοί μεσολαβητές του οξειδωτικού στρες και της φλεγμονής με την παραγωγή κυτοκινών, χημειοκινών και αυξητικών παραγόντων που μπορεί να οδηγήσουν σε ευεργετικές ή ακόμα και παθολογικές επιδράσεις στους ιστούς. Η έντονη και απαιτητική άσκηση όπως είναι η έκκεντρη, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των PBMCs στην κυκλοφορία του αίματος (Nielsen 2003; Shephard 2003). Έτσι, είναι ευαίσθητα σε παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν μεταβολή στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών συνεπώς και μπορούν να θεωρηθούν ένα κατάλληλο μοντέλο για τον έλεγχο της βιολογικής επίδρασης του αναγωγικού στρες και της οξειδοαναγωγικής ατομικότητας.

Λαμβάνοντας υπόψη την άποψη ότι μικρές συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών είναι επιθυμητες ή ακόμα και απαραίτητες για φυσιολογική μυϊκή λειτουργία ή/και

αναγέννηση των μυών, παραμένει ασαφές αν μια αναγωγική οξειδοαναγωγική κατάσταση είναι ευεργετική ή όχι (Stagos et al. 2015; Margaritelis et al. 2014). Έτσι, στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να εξετάσει τις επιδράσεις του αναγωγικού στρες, όπως καθορίστηκε από τα υψηλά επίπεδα της GSH στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, στην ικανότητα των PBMCs να αντιμετωπίσουν το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο οξειδωτικό παράγοντα, το tert-Butyl Hydroperoxide (*t*-BOOH).

3.4.2 Υλικά και Μέθοδοι

3.4.2.1 Συμμετέχοντες

Στην παρούσα μελέτη, συμμετείχαν συνολικά 10 ενήλικες άντρες και γυναίκες (7 άντρες, 3 γυναίκες) (ηλικία: $23,6 \pm 0,81$ χρόνια, ύψος: $179,1 \pm 1,86$ εκατοστά, βάρος: $76,86 \pm 3,71$ κιλά). Οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν να αποφύγουν το κάπνισμα, την κατανάλωση οινοπνεύματος, τα συμπληρώματα διατροφής καθώς και κάθε είδους άσκηση τις τελευταίες ημέρες πριν από τη μελέτη και κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η ακρίβεια μέτρησης του βάρους ήταν 0,5 κιλά (BeamBalance 710, Seca, Ηνωμένο Βασίλειο), ενώ τα άτομα ήταν ελαφρώς ντυμένα και ξυπόλυτα. Η ακρίβεια μέτρησης του ύψους ήταν 0,5 εκατοστά (Stadiometer 208, Seca). Οι αθλητές συμπλήρωσαν έντυπο στο οποίο παραχωρούσαν την γραπτή τους συγκατάθεση για τη συμμετοχή στην έρευνα, αφού είχαν ήδη ενημερωθεί για τα οφέλη και τους κινδύνους της διαδικασίας. Οι πειραματικές διαδικασίες ακολούθησαν τους κανόνες από τη Συνθήκη του Ελσίνκι (1964) και εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

3.4.2.2 Πρωτόκολλο άσκησης

Η πραγματοποίηση της έκκεντρης άσκησης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο SmArt Lab στα ΤΕΦΑΑ Τρικάλων, σε ισοκινητικό δυναμόμετρο τύπου Cybex (Cybex Norm, Ronkonkoma, NY) ακολουθώντας το πρωτόκολλο προηγούμενης εργασίας που δημοσιεύτηκε από το εργαστήριό μας (Stagos et al. 2015). Η άσκηση έγινε με τους εθελοντές να βρίσκονται σε καθιστή θέση (120° γωνία ισχίου), κατόπιν σταθεροποίησης τους σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Οι συμμετέχοντες πραγματοποίησαν ζέσταμα 10 λεπτών σε στατικό ποδήλατο (70 rpm, 50W) πριν την εκπόνηση της άσκησης και στη συνέχεια προκειμένου να εξοικειωθούν με το μηχάνημα και τη διαδικασία, ολοκλήρωσαν 1 σετ των 9 ομόκεντρων επαναλήψεων και 1 σετ των 7 έκκεντρων επαναλήψεων στο ισοκινητικό δυναμόμετρο. Μετά την διαδικασία της προθέρμανσης, το πρόγραμμα της άσκησης των εθελοντών περιλάμβανε 5 σετ των 15 μέγιστων έκκεντρων συστολών (γόνατο εύρος, 0° πλήρης έκταση έως 90° κάμψη) με γωνιακή ταχύτητα 60 °/s, ενώ δόθηκε χρόνος ξεκούρασης 2 λεπτών ανάμεσα από τα σετ. Η συνολική διάρκεια της άσκησης ήταν 15 λεπτά. Η ανατροφοδότηση της έντασης κατά την διάρκεια της άσκησης παρέχόταν αυτόματα από το δυναμόμετρο. Η πραγματοποίηση της άσκησης έγινε σε πόδι που επέλεξαν οι εθελοντές.

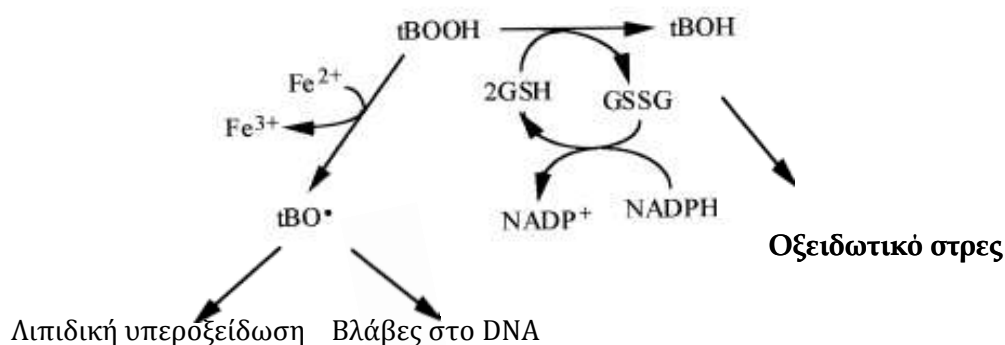
3.4.2.3 Συλλογή αίματος, διαχωρισμός σε πλάσμα και ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, απομόνωση και καλλιέργεια PBMCs

Τα δείγματα αίματος συλλέχτηκαν πριν και 48 ώρες μετά την άσκηση. Δέκα (10) ml αίματος λήφθηκαν από τον βραχίονα με τους εθελοντές να βρίσκονται σε καθιστή θέση και κατόπιν χωρίστηκαν σε δύο σωλήνες EDTA. Η πρώτη (6 ml) χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση των PBMCs και η δεύτερη (4ml) για τον

προσδιορισμό βιοδεικτών οξειδοαναγωγής στο πλάσμα και στο ερυθροκυτταρικό αιμόλημα. Ο διαχωρισμός του αίματος σε πλάσμα και ερυθροκυτταρικό αιμόλημα έγινε όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2 της παρούσας διατριβής. Η απομόνωση κυττάρων PBMCs, η καλλιέργεια των κυττάρων, η επεξεργασία με το *t*-BOOH και η μέτρηση των βιοδεικτών περιγράφονται αναλυτικά στις ενότητες 2.6.1 έως 2.6.5 της παρούσας διατριβής.

3.4.2.4 Μηχανισμός δράσης του οξειδωτικού παράγοντα *t*-BOOH

Η χρήση του οξειδωτικού παράγοντα *t*-BOOH είναι ένα συνηθισμένο μοντέλο για την εκτίμηση των μηχανισμών των κυτταρικών μεταβολών που συμβαίνουν λόγω επαγωγής του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα και τους ιστούς. Το *t*-BOOH μπορεί να μεταβολιστεί ακολουθώντας δυο μονοπάτια τα οποία επάγουν το οξειδωτικό στρες. Το πρώτο μονοπάτι μεταβολισμού παρέχεται από το κυτόχρωμα P450 και οδηγεί στην παραγωγή ριζών υδροξυλίου και αλκοξυλίου που εν συνεχεία μπορούν να προκαλέσουν εκτεταμένες βλάβες στα λιπίδια των μεμβρανών και μετέπειτα αλλοιώσεις της ρευστότητας και της διαπερατότητας της μεμβράνης (Alia et al. 2005; Lima et al. 2006). Το δεύτερο μονοπάτι αξιοποιεί την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Το *t*-BOOH αποτοξινώνεται σε *tert*-βουτανόλη και η γλουταθειόνη οξειδώνεται στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) (Lima et al. 2006; Martin et al. 2001) (Εικόνα 27). Η οξείδωση των λιπιδίων και η οξείδωση της GSH είναι γενικότερα μηχανισμοί που εμπλέκονται άμεσα με την κυτταρική βλάβη που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες. Έχει, επίσης, προταθεί ότι το *t*-BOOH αλληλεπιδρά με ιόντα Fe^{+2} σχηματίζοντας τελικά ρίζες *t*-BO[•] (Lima et al. 2006; Martin et al. 2001). Συνεπώς, η χρήση του *t*-BOOH ως εξωγενή επαγωγέα του οξειδωτικού στρες προσομοιώνει μια κατάσταση οξειδωτικού στρες στα κύτταρα προκειμένου να κατανοήσουμε συγκεκριμένους μηχανισμούς.



Εικόνα 27: Μηχανισμός δράσης του οξειδωτικού παράγοντα *t*-BOOH.

3.4.2.5 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μετά την μέτρηση των βιοδεικτών αναλύθηκαν μέσω της one-way ANOVA ακολουθούμενα από το Dunnett's test για την εξέταση πολλαπλών συγκρίσεων κατά ζεύγη με το πρόγραμμα SPSS, version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM).

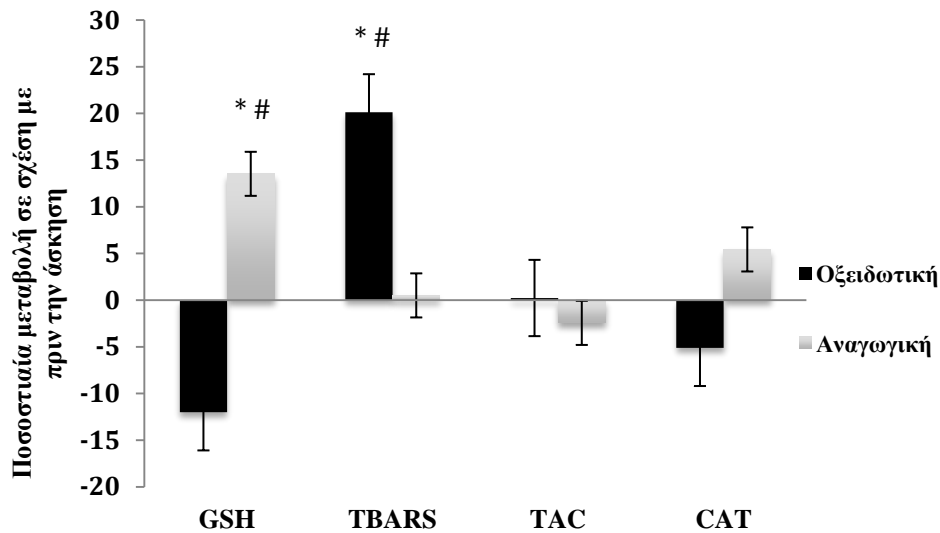
3.4.3 Αποτελέσματα

Οι συμμετέχοντες χωρίστηκαν με βάση τα επίπεδα GSH στα RBCL σε αυτούς που είχαν αυξημένη GSH (κατά 13,5%) στις 48 ώρες μετά την άσκηση, αποτελώντας την αναγωγική ομάδα και σε αυτούς που είχαν μειωμένη GSH (κατά 12,1%) στην ίδια χρονική στιγμή αποτελώντας την οξειδωτική ομάδα (Διάγραμμα 33). Κάθε ομάδα αποτελούνταν από 5 συμμετέχοντες. Το αθλητικό ιστορικό των συμμετεχόντων δε θεωρήθηκε κριτήριο αφού η αναγωγική ομάδα αποτελούνταν από 3 άτομα που γυμνάζονταν τακτικά με άσκηση αντίστασης, ενώ 2 άτομα δεν είχαν έρθει ποτέ σε επαφή με οποιοδήποτε είδος άσκησης. Η αντίστροφη αναλογία υπήρξε στην οξειδωτική ομάδα, η οποία αποτελούνταν από 2 γυμνασμένα και 3 μη

γυμνασμένα άτομα. Όσον αφορά τα επίπεδα των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες στο πλάσμα και το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, παρατηρήθηκε μια σημαντική διαφορά στα επίπεδα GSH μεταξύ αυτών των δύο ομάδων, όπως άλλωστε αναμένονταν. Ομοίως, σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων παρατηρήθηκε επίσης στα επίπεδα TBARS, καθώς αυξήθηκαν σημαντικά κατά 20,1% στην οξειδωτική ομάδα εν αντιθέση με την αναγωγική ομάδα που παρέμειναν αμετάβλητα (Διάγραμμα 33). Επομένως, οι συμμετέχοντες στην αναγωγική ομάδα φαίνεται να προστατεύονται από την επαγόμενη από την άσκηση υπεροξειδωση λιπιδίων. Επιπλέον, δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα TAC και CAT μεταξύ των δύο ομάδων. Οι απόλυτες τιμές από τις οποίες προέκυψαν οι προαναφερθείσες αναβολές παρατίθενται στον πίνακα 27.

Βιοδείκτης	Αναγωγική ομάδα		Οξειδωτική ομάδα	
	pre	48 ώρες	pre	48 ώρες
GSH ($\mu\text{M/g Hb}$)	3,81 \pm 0,58	4,28 \pm 0,59	5,05 \pm 0,83	4,47 \pm 0,78
TBARS ($\mu\text{M/L}$)	5,68 \pm 0,48	5,73 \pm 0,56	5,20 \pm 0,64	6,17 \pm 0,57
CAT (U/mg Hb)	284,85 \pm 4,15	302,07 \pm 4,75	325,95 \pm 5,98	309,18 \pm 6,09
TAC (mmol DPPH/L)	0,94 \pm 0,02	0,92 \pm 0,02	0,91 \pm 0,03	0,91 \pm 0,02

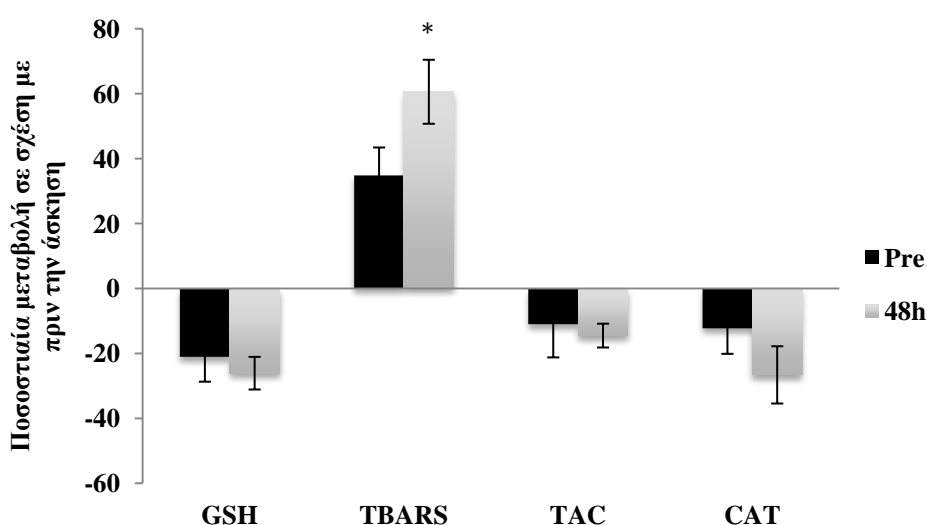
Πίνακας 27: Τιμές των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες σε απόλυτες τιμές, στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (GSH, CAT) και στο πλάσμα (TBARS, TAC) πριν την άσκηση και 48 ώρες μετά την ολοκλήρωση της άσκησης. Οι μεταβολές αναφέρονται τόσο στην οξειδωτική όσο και στην αναγωγική ομάδα). Οι τιμές υποδεικνύουν το μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM)



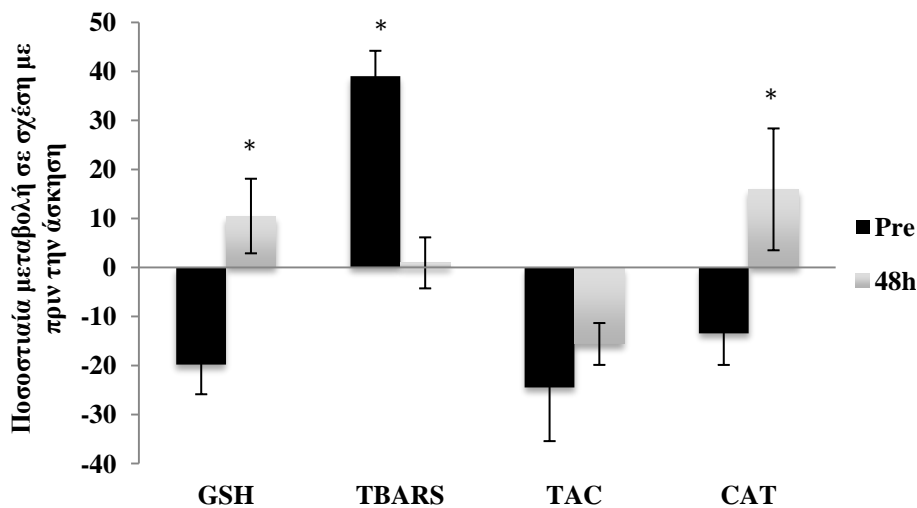
Διάγραμμα 33: Ποσοστιαία (%) μεταβολή των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (GSH, CAT) και στο πλάσμα (TBARS, TAC) στις 48 ώρες μετά την ολοκλήρωση της άσκησης, συγκριτικά με πριν την άσκηση. Οι μεταβολές αναφέρονται τόσο στην οξειδωτική όσο και στην αναγωγική ομάδα. * Σημαντική ($p < 0,05$) διαφορά συγκριτικά με πριν την άσκηση, # Σημαντική ($p < 0,05$) διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων

Οι αναλύσεις των βιοδεικτών οξειδοαναγωγής που ελέγχθηκαν στα PBMC βασίστηκαν στη σύγκριση των επιπέδων τους ανάμεσα στα PBMCs στα οποία χορηγήθηκε *t*-BOOH σε σύγκριση με αντίστοιχα κύτταρα PBMCs που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου. Η σύγκριση αφορούσε τόσο στην αναγωγική όσο και στην οξειδωτική ομάδα. Οι διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων εκφράστηκαν ως ποσοστιαία μεταβολή. Στα επίπεδα TBARS της οξειδωτικής ομάδας παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στο χρονικό σημείο των 48 ωρών μετά την άσκηση συγκριτικά με την τιμή πριν την εκτέλεση της άσκησης υποδηλώνοντας ότι η έκκεντρη άσκηση προκάλεσε υψηλότερο επίπεδο υπεροξειδωσης λιπιδίων (Διάγραμμα 34). Δεν υπήρξαν σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα GSH, TAC και CAT μεταξύ των δύο χρονικών στιγμών. Αντίθετα, οι αναλύσεις στην αναγωγική ομάδα αποκάλυψαν στατιστικά σημαντικές αυξήσεις των επιπέδων GSH και CAT στις 48 ώρες μετά την

άσκηση, συγκριτικά με τις τιμές πριν την άσκηση (Διάγραμμα 35). Παρομοίως, φάνηκε επίσης σημαντική μείωση των επιπέδων TBARS μετά την άσκηση, γεγονός που δείχνει ότι τα λιπίδια στην αναγωγική ομάδα προστατεύονται σε μεγαλύτερο βαθμό από το οξειδωτικό στρες που προκλήθηκε από την άσκηση. Το τελευταίο εύρημα είναι αντίθετο με τα αντίστοιχα δεδομένα που προέρχονται από την οξείδωση των λιπιδίων στην οξειδωτική ομάδα (Διάγραμμα 34).



Διάγραμμα 34: Ποσοστιαία (%) μεταβολή των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες (GSH, TBARS, TAC, CAT) σε κύτταρα που έχει χορηγηθεί *t*-BOOH σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου [(κύτταρα που έχει χορηγηθεί *t*-BOOH)/(κύτταρα ελέγχου)] τόσο πριν την άσκηση (Pre) όσο και στις 48 ώρες μετά την άσκηση. Το διάγραμμα αφορά την οξειδωτική ομάδα. * Σημαντική ($p < 0.05$) διαφορά συγκριτικά με το δείγμα πριν την άσκηση # Σημαντική ($p < 0.05$) διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων



Διάγραμμα 35: Ποσοστιαία (%) μεταβολή των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες (GSH, TBARS, TAC, CAT) σε κύτταρα που έχει χορηγηθεί *t*-BOOH σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα ελέγχου [(κύτταρα που έχει χορηγηθεί *t*-BOOH)/(κύτταρα ελέγχου)] τόσο πριν την άσκηση (Pre) όσο και στις 48 ώρες μετά την άσκηση. Το διάγραμμα αφορά την αναγωγική ομάδα. * Σημαντική ($p < 0.05$) διαφορά συγκριτικά με το δείγμα πριν την άσκηση # Σημαντική ($p < 0.05$) διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων

3.4.4. Συζήτηση

Παρόλο που η έκκεντρη άσκηση σχετίζεται με αξιοσημείωτη μυϊκή βλάβη, τα πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι μεταξύ ατόμων παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές όσον αφορά την οξειδωτική τους κατάσταση μετά την άσκηση. Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες καταβάλλουν σοβαρές προσπάθειες για να προσεγγίσουν το φαινόμενο του αναγωγικού στρες, μια κατάσταση στην οποία τα κύτταρα βρίσκονται σε αναγωγικό περιβάλλον (αυξημένη αντιοξειδωτική άμυνα και εξασθενημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών) μετά από ερέθισμα (π.χ. άσκηση) (Veskoukis et al. 2012). Σε αυτή τη μελέτη αναφέρουμε ότι οι επιδράσεις ενός οξειδωτικού παράγοντα (*t*-BOOH) στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των PBMCs που απομονώνονται από το αίμα εθελοντών μετά από έντονη έκκεντρη άσκηση εξαρτώνται από τις τιμές της GSH στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Καθώς η GSH

θεωρείται το πιο σημαντικό και άφθονο ενδογενές μη ενζυμικό αντιοξειδωτικό, χωρίσαμε τους συμμετέχοντες σε δύο ομάδες σύμφωνα με τα αρχικά επίπεδα GSH (Espinosa-Diez et al. 2015). Συγκεκριμένα, οι μισοί από τους συμμετέχοντες που είχαν αυξημένα επίπεδα GSH στις 48 ώρες μετά από μία περίοδο έκκεντρης άσκησης αποτέλεσαν την αναγωγική ομάδα. Τα υπόλοιπα 5 άτομα, συμπεριλήφθηκαν στην οξειδωτική ομάδα, επειδή είχαν μειωμένα επίπεδα GSH στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα στις 48 ώρες μετά την άσκηση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, στα PBMCs στα οποία χορηγήθηκε ο οξειδωτικός παράγοντας *t*-BOOH, τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης όπως απεικονίζονται από τα επίπεδα TBARS παρέμειναν αμετάβλητα στην αναγωγική ομάδα σε αντίθεση με την παρατηρούμενη αύξηση στην οξειδωτική ομάδα. Επιπλέον, τα επίπεδα GSH και η δραστικότητα CAT αυξήθηκαν στην αναγωγική ομάδα, ενώ δεν επηρεάστηκαν στην οξειδωτική ομάδα. Φαίνεται λοιπόν ότι η παραγωγή ROS μετά την άσκηση ακολουθούμενη από τη χορήγηση ενός οξειδωτικού παράγοντα μπορεί να ρυθμιστεί επιτυχώς σε περιπτώσεις όπου χαρακτηρίζονται από υψηλά βασικά επίπεδα GSH, εξασφαλίζοντας έτσι επαρκή προστασία έναντι της επαγόμενης από τα ROS οξείδωσης. Δανοί ερευνητές ανέφεραν ότι η έντονη άσκηση οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα κυκλοφορίας προφλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως είναι τα PBMCs και αυξημένη έκφραση αυξητικών παραγόντων που συνδέονται με τα PBMCs όπως η επιρεγουλίνη και αυξητικούς παράγοντες που εξαρτώνται από τα αιμοπετάλια, οι οποίοι είναι αποτελεσματικοί στην επούλωση τραυμάτων και στην αναγέννηση μυικών κυττάρων (Ostrowski et al. 1999) (Draper et al. 2003). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα PBMCs θα μπορούσαν επίσης να συμβάλλουν στην ανάπτυξη και την επιδιόρθωση των ιστών (Ostrowski et al. 1999). Με βάση τα παραπάνω και καθώς οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται κρίσιμα σηματοδοτικά μόρια για προσαρμογές

στην άσκηση (Schieber & Chandel 2014), ερευνήσαμε κατά πόσο η αναγωγική ομάδα θα μπορούσε να ωφεληθεί από την άσκηση στον ίδιο βαθμό σε σύγκριση με την οξειδωτική ομάδα. Προκειμένου να απαντηθεί το ερώτημα αυτό εστίασαμε στα PBMCs καθώς είναι κύτταρα μείζονος σημασίας στο ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα και εξετάσαμε την απόκριση αυτής της σειράς κυττάρων που απομονώθηκαν από άτομα μετά την άσκηση, σε ένα ισχυρό, ευρέως χρησιμοποιούμενο οξειδωτικό παράγοντα (Autissier et al. 2010). Υποθέσαμε ότι τα PBMCs που απομονώνονται από τους εθελοντές της αναγωγικής ομάδας θα μπορούσαν να αντισταθμίσουν αποτελεσματικότερα την οξείδωση που προέρχεται από το *t*-BOOH. Τα δεδομένα που προέκυψαν από το πείραμά μας επιβεβαίωσαν τον παραπάνω ισχυρισμό. Παραδόξως, στην αναγωγική ομάδα, το *t*-BOOH οδήγησε σε επαγωγή της δραστηριότητας CAT και των επιπέδων GSH στα κύτταρα PBMCs. Η επαγωγή τόσο της GSH όσο και της CAT φαίνεται να αντιπροσωπεύει έναν προστατευτικό μηχανισμό κατά της υπεροξειδωσης των λιπιδίων καθώς τα επίπεδα των TBARS παρέμειναν αμετάβλητα μετά την άσκηση ακόμη και αν το *t*-BOOH προκάλεσε σοβαρή οξείδωση.

Λαμβάνοντας υπόψη τον μηχανισμό της δράσης του *t*-BOOH όταν χορηγείται σε PBMCs, τα αποτελέσματά μας αποκτούν επιπρόσθετη αξία. Τυπικά, το *t*-BOOH είναι ένα οργανικό υδροϋπεροξείδιο το οποίο βρίσκει εφαρμογή σε μελέτες ως τοξικός, οξειδοαναγωγικός παράγοντας (Alia et al. 2005). Είναι γνωστό ότι το *t*-BOOH μεταβολίζεται από τη περοξειδάση της GSH (GPx) παράγοντας GSSG μέσω οξείδωσης της GSH (Lima et al. 2006; Martin et al. 2001). Όπως έχει ήδη δειχθεί, τα αυξημένα επίπεδα GSH μπορούν να καταστούν επιβλαβή για τα φυσιολογικά κύτταρα καθώς τα ελεύθερα ηλεκτρόνια κατευθύνονται στο O₂ δεδομένου ότι δεν υπάρχουν διαθέσιμοι φυσικοί δέκτες ηλεκτρονίων όπως είναι τα οξειδωμένα

υποστρώματα (π.χ. GSSG) δημιουργώντας έτσι επιπλέον ρίζες (Korge et al. 2016; Bauersachs & Widder 2010). Αν και αυτό μπορεί να συμβαίνει στη μελέτη μας, φαίνεται ότι οι αυξημένες τιμές της GSH δεν είναι επιβλαβείς καθώς λόγω της παρουσίας ενός ισχυρού οξειδωτικού παράγοντα οξειδώνονται για να σχηματίσουν GSSG. Έτσι, το αναγωγικό στρες είναι ίσως ένας μηχανισμός προστασίας όταν ακολουθείται από ένα ερέθισμα που επάγει οξειδωτικό στρες, όπως η χορήγηση του *t*-BOOH. Είναι προφανές, συνεπώς, ότι η παραγωγή ελεύθερων ριζών μπορεί να μειώσει περαιτέρω τα επίπεδα GSH, να βλάψει τους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας και να επαχθεί έτσι η υπεροξείδωση των λιπιδίων. Αυτή η μείωση στα επίπεδα της GSH υποδηλώνει ότι είναι ένας προστατευτικός μηχανισμός που δρα σε περιπτώσεις αναγωγικού στρες μετά την έκθεση σε κάποιο οξειδωτικό παράγοντα.

Οι παρατηρούμενες αποκρίσεις θα μπορούσαν να αποδοθούν κυρίως σε μοριακό επίπεδο σε συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες, όπως μεταξύ άλλων ο NF-κB, p38 MAPK, μέλη της οικογένειας FoxO και ο Nrf2, οι οποίοι ενεργοποιούνται από χαμηλά επίπεδα ROS (Dodd et al. 2010; Derbre et al. 2012). Εστιάζοντας στον Nrf2, έχει προταθεί ότι είναι σημαντικός για τη ρύθμιση της ενδοκυτταρικής οξειδοαναγωγής (Kerasioti et al. 2016; Priftis et al. 2018). Η ενεργοποίησή του και η πρόσδεσή του σε συγκεκριμένη αλληλουχία DNA που ονομάζεται ARE (Antioxidant Response Elements) έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων (Garbin et al. 2009). Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα που σχετίζονται με την GSH, όπως η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και η συνθετάση της GSH είναι επίσης προϊόντα της ενεργοποίησης των παραπάνω παραγόντων, εξηγώντας ικανοποιητικώς την αύξηση της GSH στην αναγωγική ομάδα (Espinoza-Diez et al., 2015). Ως εκ τούτου, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ο Nrf2 είναι ένας βασικός παράγοντας στον έλεγχο των μεταβολών της οξειδοαναγωγικής

κατάστασης που προκύπτουν λόγω άσκησης και λόγω παρουσίας ενός οξειδωτικού παράγοντα.

Συμπερασματικά, είναι γεγονός ότι υπάρχει μια συζήτηση στη σχετική βιβλιογραφία σχετικά με το αν το φαινόμενο του αναγωγικού στρες είναι ευεργετικό ή επιζήμιο. Σε αυτή τη μελέτη αναφέρουμε ότι οι επιδράσεις ενός οξειδωτικού παράγοντα στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των PBMCs που απομονώνονται από το αίμα των εθελοντών μετά από έντονη έκκεντρη άσκηση είναι σε άμεση συνάρτηση με τις αρχικές τιμές της GSH στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα. Με άλλα λόγια, με βάση τα αποτελέσματά μας, το αναγωγικό στρες που ορίζεται από τα αυξημένα επίπεδα GSH είναι ένας μηχανισμός προστασίας, τουλάχιστον όταν ακολουθείται από ένα οξειδωτικό ερέθισμα. Αυτά τα ευρήματα μπορούν να θεωρηθούν ως σημείο εκκίνησης στην προσπάθεια να εξεταστεί η νέα έννοια του αναγωγικού στρες μετά την άσκηση και να ριχτεί άπλετο φως στην ενδεχόμενη ευεργετική επίδρασή της στην διατήρηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ενός ατόμου μετά από προσβολή από κάποιο οξειδωτικό παράγοντα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ-

*ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΟΑΝΑΓΩΓΙΚΟΥ
ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ORP ΣΕ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ
ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΥΣ
ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ*

4.1 Προσδιορισμός των επιπέδων οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 και Μεταβολικό Σύνδρομο

4.1.1 Εισαγωγή

Μία από τις παθοφυσιολογικές καταστάσεις που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες είναι το μεταβολικό σύνδρομο (ΜΣ) (Ford et al. 2003). Το ΜΣ ορίζεται ως ένα σύμπλεγμα παραγόντων κινδύνου για το καρδιαγγειακό σύστημα και τον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 (ΔΤ2) (Jahan-Mihan et al. 2015). Το ΜΣ διαγιγνώσκεται όταν ένας ασθενής έχει τουλάχιστον τρεις από τους ακόλουθους παράγοντες κινδύνου: υπεργλυκαιμία, υψηλή αρτηριακή πίεση, υψηλά επίπεδα τριγλυκεριδίων, χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (HDL) και παχυσαρκία (Jahan-Mihan et al. 2015). Υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στις παθήσεις που σχετίζονται με το ΜΣ, συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης και της υπέρτασης (Hansson 2005). Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη σε ασθενείς με ΜΣ υποδηλώνοντας ότι είναι ένας κρίσιμος παράγοντας στην εξέλιξη αυτής της παθολογικής κατάστασης και όχι μόνο μια συνέπεια (Ford et al. 2003; Urakawa et al. 2003; Katsuki et al. 2004).

Όπως είναι ήδη γνωστό, το ΜΣ μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη του ΔΤ2, μιας από τις πιο συχνές μεταβολικές διαταραχές παγκοσμίως (Nikooyeh & Neyestani 2015). Ο ΔΤ2 χαρακτηρίζεται από υπεργλυκαιμία (δηλαδή, υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα) που συμβαίνει λόγω της αντίστασης στην ινσουλίνη, δηλαδή της αδυναμίας του κυττάρου να ανταποκριθεί κανονικά στην ορμόνη ινσουλίνη (Nikooyeh & Neyestani 2015). Επίσης, ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι το οξειδωτικό στρες συνδέεται με το ΔΤ2 και ιδιαίτερα με τις επιπλοκές του (Nikooyeh & Neyestani 2015;

Giacco & Brownlee 2010). Συγκεκριμένα, ορισμένα συμπτώματα του ΔΤ2 όπως η υπεργλυκαιμία αλλά και η αντίσταση στην ινσουλίνη οδηγούν σε οξειδωτικό στρες μέσω διαφόρων μηχανισμών (Nikooyeh & Neyestani 2015; Giacco & Brownlee 2010; Folli et al. 2011). Τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες που συναντώνται σε ασθενείς με ΔΤ2 με τη σειρά τους επιδεινώνουν ορισμένες από τις σχετιζόμενες επιπλοκές, ιδιαίτερα αυτές που αφορούν το καρδιαγγειακό και το νευρικό σύστημα (Nikooyeh & Neyestani 2015; Folli et al. 2011; Yorek 2003).

Δεδομένου ότι το οξειδωτικό στρες συνδέεται με το ΜΣ και το ΔΤ2, η εκτίμησή του σε ασθενείς που πάσχουν από αυτές τις διαταραχές είναι χρήσιμη για την παρακολούθηση της προόδου και της θεραπείας τους, καθώς και για τη βελτίωση των επιπλοκών που σχετίζονται με την υγεία. Έτσι, διάφοροι βιοδείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες στους ανθρώπους (Dalle-Donne et al. 2006). Ωστόσο, η αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης παραμένει μια χρονοβόρα διαδικασία στην κλινική πράξη και έτσι υπάρχει μεγάλη ανάγκη για ανάπτυξη νέων βιοδεικτών (Ogino & Wang 2007). Τη λύση σε αυτό το ζήτημα την δίνει η εφαρμογή των δεικτών ORP του διαγνωστικού συστήματος Luoxis.

Με βάση τα παραπάνω, βασικός στόχος της συγκεκριμένης έρευνας ήταν η εξέταση της αποτελεσματικότητας του sORP για τον προσδιορισμό των επιπέδων οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με συμπτώματα τόσο του ΜΣ όσο και του ΔΤ2. Επιπλέον, για λόγους σύγκρισης και συσχέτισης μετρήθηκαν στο αίμα των ασθενών οι συμβατικοί, φασματοφωτομετρικοί, βιοδείκτες οξειδωτικού στρες CARB, TBARS, TAC, CAT, GSH.

4.1.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.1.2.1 Συμμετέχοντες

Στην παρούσα εργασία συμμετείχαν 75 άτομα που παρουσίαζαν συμπτώματα ΔΤ2 και ΜΣ καθώς και 35 υγιείς εθελοντές. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες έγιναν ακολουθώντας τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης που ορίστηκαν στη Συνθήκη του Ελσίνκι του 1964 και εγκρίθηκαν από το Επιτροπή Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

4.1.2.2 Συλλογή αίματος

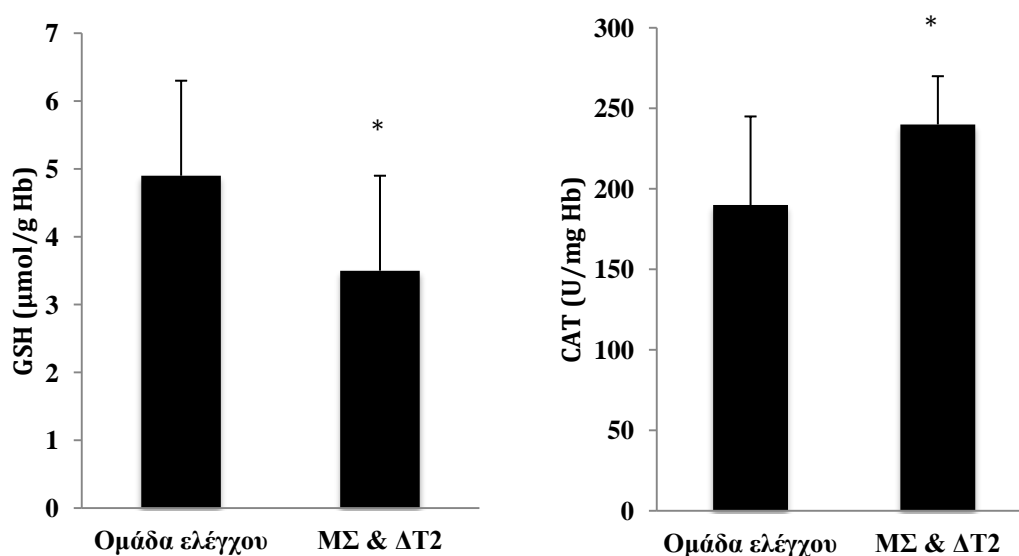
Οι συμμετέχοντες επισκέφθηκαν το Διαγνωστικό Κέντρο «Χαρτογράφοι Υγείας» στο Μαρούσι και συλλέχθηκαν δείγματα αίματος, τα οποία αποθηκεύτηκαν σε σωλήνες EDTA (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, ΗΠΑ) για τη μέτρηση των TBARS, CARB και GSH, TAC και CAT και σε σωλήνες ηπαρίνης για την μέτρηση του sORP. Η διαδικασία επεξεργασίας του αίματος ακολουθήθηκε όπως περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 2.2. της παρούσας διατριβής.

4.1.2.3 Στατιστική ανάλυση

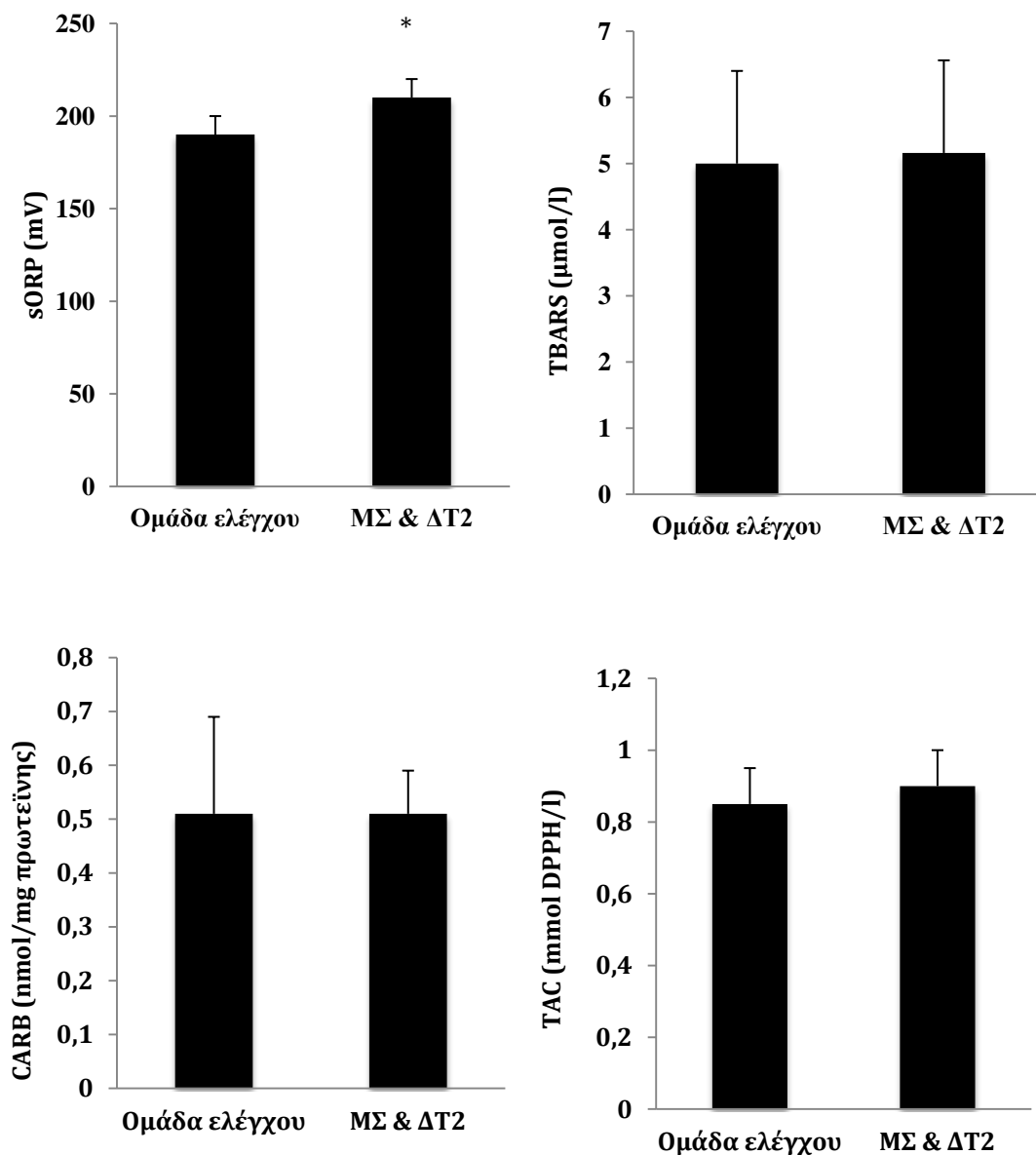
Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μετά την μέτρηση των βιοδεικτών αναλύθηκαν μέσω της two-way ANOVA ακολουθούμενα από το Dunnett's test για την εξέταση πολλαπλών συγκρίσεων κατά ζεύγη με το πρόγραμμα SPSS, version 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM).

4.1.3 Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι τα επίπεδα GSH στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) χαμηλότερα κατά 27,7% στους ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 σε σύγκριση με τους υγιείς ανθρώπους (Διάγραμμα 36) ενώ η δραστικότητα CAT στα ερυθροκύτταρα ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) υψηλότερη κατά 23,3% στους ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 σε σύγκριση με τους υγιείς (Διάγραμμα 36). Επίσης, οι τιμές sORP στο πλάσμα ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) υψηλότερες κατά 13,4% στους ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 σε σύγκριση με τους υγιείς ανθρώπους υποδηλώνοντας εμφάνιση οξειδωτικού στρες (Διάγραμμα 37). Δεν υπήρξαν σημαντικές στατιστικά διαφορές στα επίπεδα CARB και TBARS και TAC στο πλάσμα μεταξύ των ασθενών με ΜΣ και ΔΤ2 και των μαρτύρων (Διάγραμμα 37).



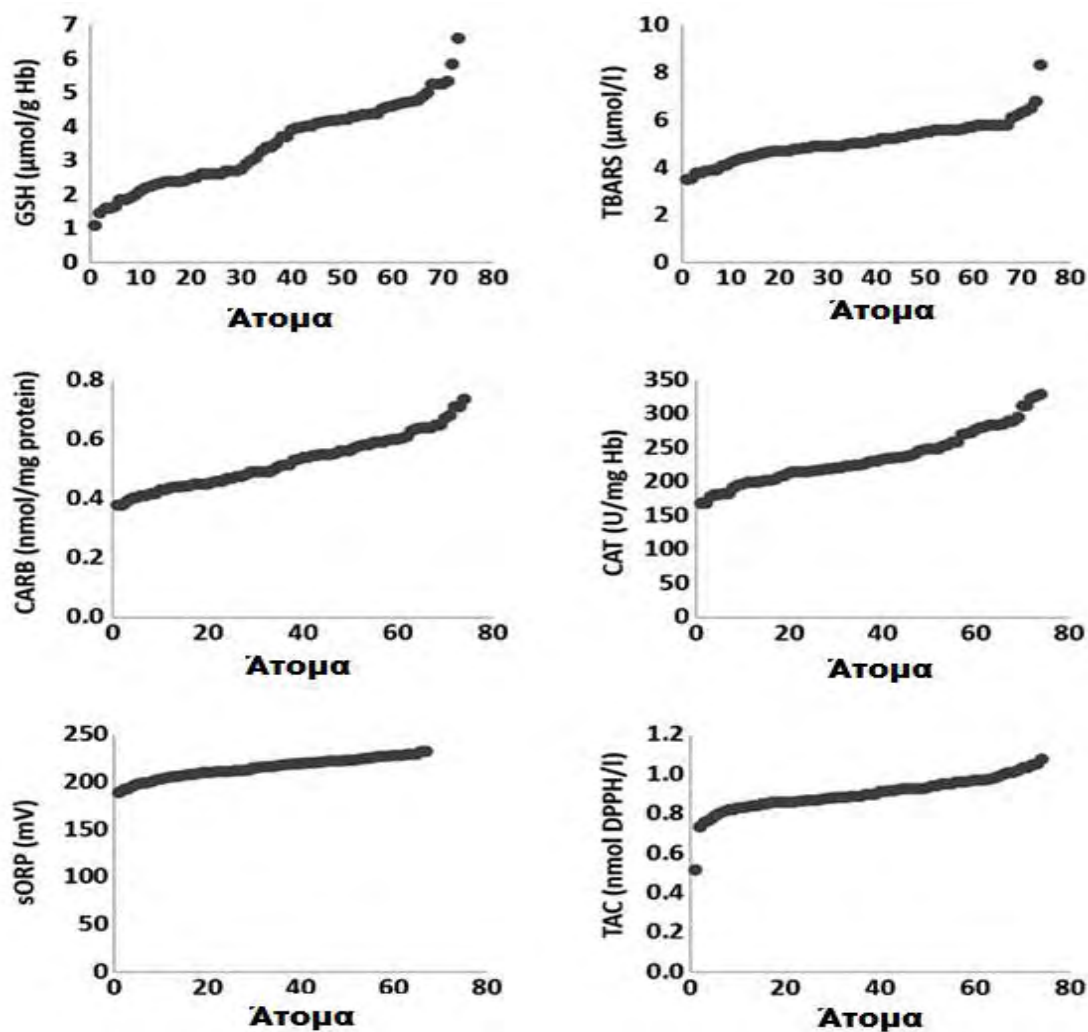
Διάγραμμα 36: Επίπεδα των GSH και CAT στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα μετρημένα σε άτομα με ΔΤ2 και ΜΣ αλλά και σε ομάδα ελέγχου. * Σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο εξεταζόμενων ομάδων ($p < 0,05$)



Διάγραμμα 37: Επίπεδα βιοδεικτών οξειδωτικού στρες (sORP, TBARS, CARB, TAC) στο πλάσμα μετρημένα σε άτομα με ΔT2 και ΜΣ αλλά και σε ομάδα ελέγχου.
 * Σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο εξεταζόμενων ομάδων ($p < 0,05$)

Επιπλέον, όπως παρατίθεται στον πίνακα 28, το sORP εμφάνισε σημαντική συσχέτιση με τα CARB όπως επίσης και σημαντικά αρνητική συσχέτιση με την GSH ($p < 0,05$). Επίσης, σημαντικά αρνητική συσχέτιση παρουσιάστηκε ανάμεσα στο CARB και την GSH ($p < 0,05$). Έχει διαπιστωθεί ότι η επαγωγή οξειδωτικού στρες επιδεικνύει μεγάλη μεταβλητότητα μεταξύ διαφορετικών ατόμων, καθώς το

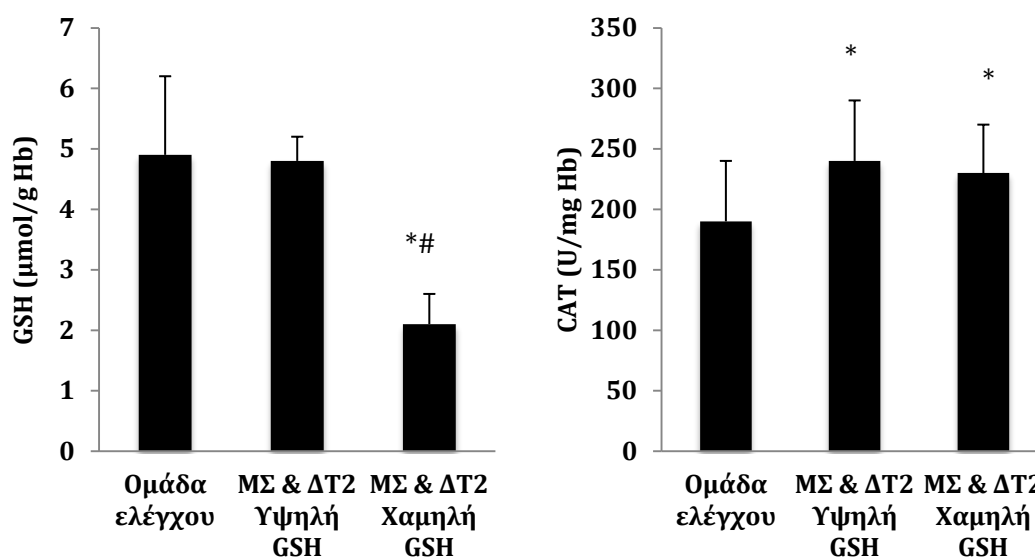
αποτέλεσμα ενός οξειδωτικού ερεθίσματος μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους διαφορετικούς παράγοντες (π.χ., γενετικούς, παθοφυσιολογικούς και βιοχημικούς) (Stagos et al. 2015; Patsoukis et al. 2004). Με βάση αυτή το δεδομένο, εξετάστηκε η ατομική μεταβλητότητα των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 (Διάγραμμα 38). Μεταξύ αυτών των βιοδεικτών, ο δείκτης GSH εμφάνισε τη μεγαλύτερη μεταβλητότητα καθώς υπήρχε μια 6-πλάσια διαφορά ανάμεσα στην υψηλότερη και τη χαμηλότερη τιμή (Διάγραμμα 38). Η GSH ήταν, επίσης, ένας από τους τρεις βιοδείκτες που παρουσίαζαν σημαντική διαφορά στα επίπεδα της μεταξύ των ασθενών με ΜΣ και ΔΤ2 και των υγιών εθελοντών. Επιπλέον, η GSH θεωρείται ένα από τα σημαντικότερα ενδογενή αντιοξειδωτικά μόρια και ένας σημαντικός παράγοντας στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων των ζώων οργανισμών (Ristoff & Larsson 2002). Έτσι, οι ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 χωρίστηκαν σε 2 υποομάδες. Η πρώτη αποτελούνταν από άτομα με χαμηλά επίπεδα GSH (Ομάδα χαμηλής GSH) ($n = 31$, $GSH < 3 \mu\text{mol/g Hb}$) και η δεύτερη από άτομα με υψηλά επίπεδα GSH (Ομάδα υψηλής GSH) ($n = 35$, $GSH > 4 \mu\text{mol/g Hb}$). Εννέα ασθενείς είχαν ενδιάμεσες τιμές GSH, δηλαδή μεταξύ 3,1 και 3,9 $\mu\text{mol/g Hb}$, και έτσι δεν συμπεριλήφθηκαν σε καμία από τις 2 υποομάδες έτσι ώστε να υπάρχει σαφής διάκριση των ασθενών όσον αφορά τα επίπεδα GSH. Μεταξύ των μέσων τιμών αυτών των 2 υποομάδων GSH υπήρξε μια στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) κατά 51,7% (Διάγραμμα 39). Επιπλέον, τα επίπεδα GSH ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) χαμηλότερα, κατά 52,9%, στη ομάδα χαμηλής GSH σε σύγκριση με τους μάρτυρες (Διάγραμμα 39).



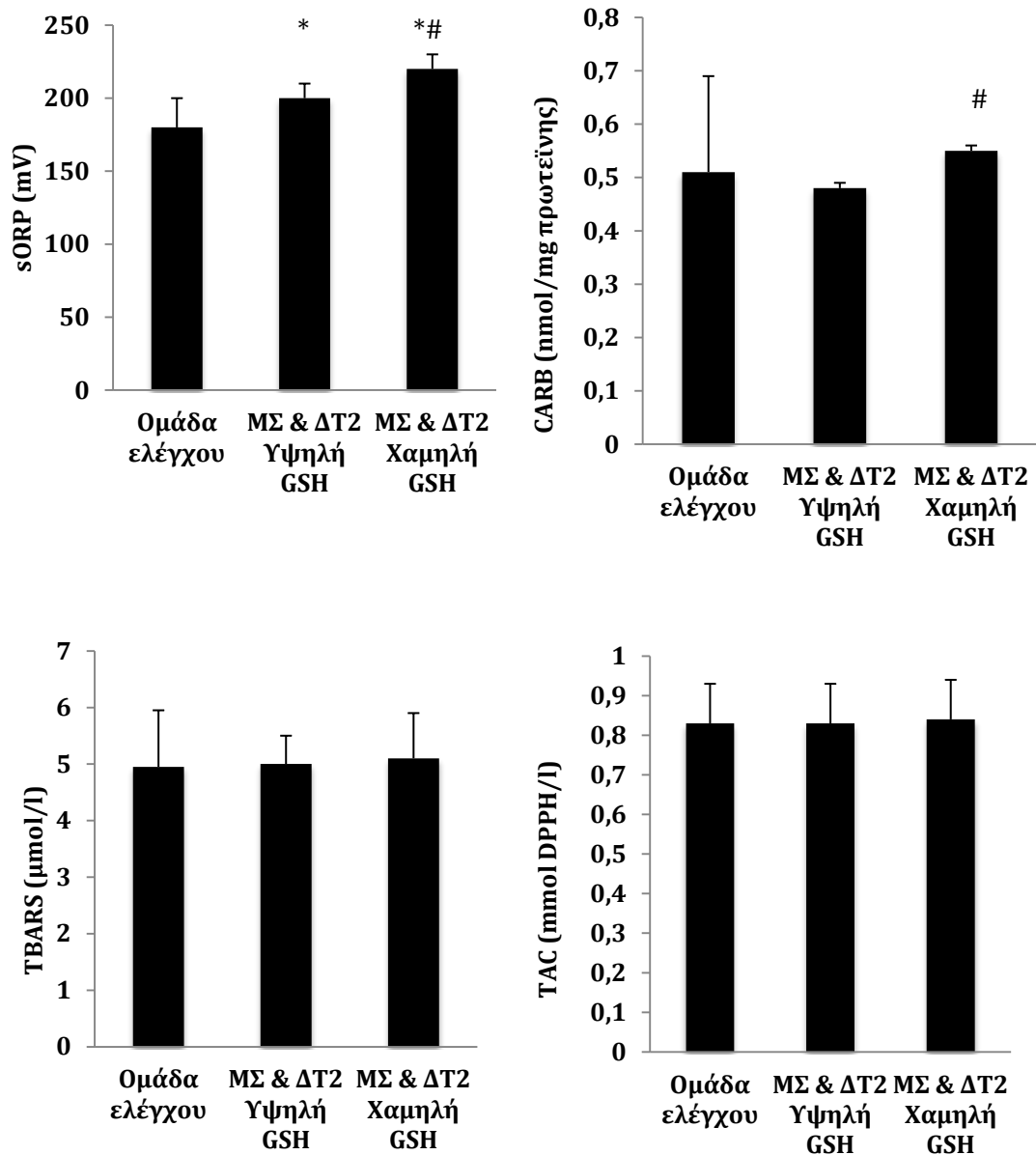
Διάγραμμα 38: Τιμές των βιοδεικτών (GSH, TBARS, CARB, CAT, sORP, TAC) κάθε ασθενή με ΜΣ και ΔΤ2

Επιπλέον, σε αυτές τις 2 υποομάδες εξετάστηκαν οι διαφορές μεταξύ των υπολοίπων βιοδεικτών οξειδωτικού στρες. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι η δραστητικότητα CAT ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) υψηλότερη στις ομάδες χαμηλής και υψηλής GSH κατά 20,4 και 26,7%, αντίστοιχα σε σύγκριση με τους υγιείς εθελοντές (Διάγραμμα 39). Οι τιμές sORP στο πλάσμα των ασθενών στη ομάδα χαμηλής GSH ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) υψηλότερες (κατά 8,1%) σε σύγκριση με εκείνες των ασθενών στην ομάδα υψηλής GSH (Διάγραμμα 40). Επιπλέον, οι τιμές sORP ήταν σημαντικά ($p < 0,05$) υψηλότερες στους ασθενείς στις ομάδες χαμηλής και υψηλής GSH (κατά 15,6 και 6,9% αντίστοιχα) σε σύγκριση με τους υγιείς ανθρώπους (Διάγραμμα 40). Επιπλέον, τα

επίπεδα CARB στο πλάσμα ήταν σημαντικά ($p<0,05$) υψηλότερα κατά 16,7%, στη ομάδα χαμηλής GSH σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής GSH (Διάγραμμα 40). Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα TBARS και TAC στο πλάσμα μεταξύ των 2 ομάδων GSH (Διάγραμμα 40).



Διάγραμμα 39: Επίπεδα GSH και CAT σε ασθενείς με ΔΤ2 και ΜΣ που ανήκουν στην ομάδα χαμηλής (ΜΣ & ΔΤ2 Χαμηλή GSH) και υψηλής GSH (ΜΣ & ΔΤ2 Υψηλή GSH) αλλά και σε ομάδα ελέγχου. * Σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο εξεταζόμενων ομάδων ($p<0,05$) # Σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ($p<0,05$)



Διάγραμμα 40: Επίπεδα sORP, CARB, TBARS, TAC μετρημένα σε ασθενείς με ΔΤ2 και ΜΣ που ανήκουν στην ομάδα χαμηλής (ΜΣ & ΔΤ2 Χαμηλή GSH) και υψηλής GSH (ΜΣ & ΔΤ2 Υψηλή GSH) αλλά και σε ομάδα ελέγχου. * Σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων ($p < 0,05$) # Σημαντική διαφορά σε σχέση με το control ($p < 0,05$)

	CARB	TBARS	TAC	GSH	CAT	sORP
CARB	-	0,028	0,035	-0,329*	0,077	0,353*
TBARS	0,028	-	0,217	-0,018	0,001	0,060
TAC	0,035	0,217	-	-0,064	-0,158	0,068
GSH	-0,329	-0,018	-0,064	-	0,224	-0,325*
CAT	0,077	-0,001	-0,158	0,224	-	0,146
sORP	0,353*	0,060	0,068	-0,325*	0,146	-

Πίνακας 28: Στατιστική συσχέτιση των απόλυτων τιμών των βιοδεικτών CARB, TBARS, TAC, GSH, CAT, sORP στα δείγματα των δειγμάτων ασθενών με ΜΣ και ΔΤ2. *Σημαντική συσχέτιση ($p < 0,05$)

4.1.4 Συζήτηση

Η παθογένεια του ΜΣ αφορά περίπου το 22,9% του πληθυσμού των ΗΠΑ και το 36% των Ευρωπαίων πολιτών ηλικίας 40-55 ετών (Wilson & Grundy 2003; Balkau et al. 2002). Το ΜΣ είναι επίσης ένας παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη του ΔΤ2, ενός άλλου τύπου μεταβολικής διαταραχής που χαρακτηρίζεται βασικά από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα λόγω της αντίστασης στην ινσουλίνη και επηρεάζει περίπου 380 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως (Nikooyeh & Neyestani 2015). Και οι δύο αυτές διαταραχές σχετίζονται επίσης με το οξειδωτικό στρες (Furukawa et al. 2004; Roberts & Sindhu 2009). Είναι τεκμηριωμένο πως το οξειδωτικό στρες που εμφανίζεται σε ασθενείς με ΜΣ και τον ΔΤ2 ενδέχεται να επιδεινώσει περαιτέρω τις σχετιζόμενες επιπλοκές, ιδιαίτερα αυτές που αφορούν το καρδιαγγειακό σύστημα (Folli et al. 2011; Yorek 2003). Έτσι, η αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 θεωρείται χρήσιμη για την παρακολούθηση της κατάστασης της υγείας τους (Akbar et al. 2011; Neyestani et al. 2007). Για το λόγο αυτό, προσπαθήσαμε να εκτιμήσουμε την αποτελεσματικότητα

του sORP ως βιοδείκτη αξιολόγησης του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς που εκδηλώνουν τόσο ΜΣ όσο και ΔΤ2.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας έδειξαν ότι οι τιμές sORP στο πλάσμα ήταν σημαντικά υψηλότερες στους ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 σε σύγκριση με τους υγιείς ανθρώπους, υποδεικνύοντας την επαγωγή οξειδωτικού στρες στους ασθενείς που αντιμετωπίζουν αυτές τις δύο μεταβολικές διαταραχές. Τα σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα GSH στα ερυθροκύτταρα των ασθενών με ΜΣ και ΔΤ2 σε σύγκριση με τους υγιείς, υποστήριξαν επίσης την επαγωγή οξειδωτικού στρες στους ασθενείς κάτι που επιβεβαιώνεται από άλλες μελέτες που ανέφεραν επίσης μειωμένα επίπεδα GSH σε ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 (Vánrová et al. 2013; Hakki Kalkan & Suher 2013; Seghrouchni et al. 2002). Η GSH είναι ένας από τους σημαντικότερους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στους ζώντες οργανισμούς και συνεπώς τα χαμηλά επίπεδα GSH συνδέονται με το οξειδωτικό στρες και την εκδήλωση διαφόρων ασθενειών (Mazzetti et al. 2015; Pérez et al. 2015). Όσον αφορά τους μηχανισμούς μέσω των οποίων ο ΔΤ2 σχετίζεται με χαμηλά επίπεδα GSH, έχει προταθεί ότι σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας χρησιμοποιείται γλυκόζη μέσω του μονοπατιού των πολυολών με αποτέλεσμα τη μείωση του NADPH που είναι απαραίτητο για την αναγέννηση της GSH από την οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) από το ένζυμο αναγωγάσης GSH (GSH reductase) (Lee & Chung 1999).

Επίσης, στη μελέτη μας οι ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 παρουσίασαν σημαντική αύξηση της δραστηριότητας CAT σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Η CAT είναι ο κύριος ρυθμιστής του μεταβολισμού του H_2O_2 , το οποίο συνδέεται με το διαβήτη, όπως η έκφραση του υποδοχέα της γλυκόζης και της έκκρισης ινσουλίνης (Goth 2006). Άλλες μελέτες έχουν δείξει αντικρουόμενα αποτελέσματα αναφέροντας είτε μείωση, είτε αύξηση είτε καμία αλλαγή στη δραστηριότητα της CAT σε

υπεργλυκαιμικές καταστάσεις (Goth 2006; Weidig et al. 2004; Manea et al. 2004). Έχει προταθεί ότι ένας οργανισμός μπορεί να αυξάνει τη δραστηριότητα της CAT σε μερικά κύτταρα, όπως τα ερυθροκύτταρα, προκειμένου να προστατευθεί από την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες κυτταρική βλάβη στο διαβήτη ιδιαίτερα σε κύτταρα με χαμηλή δραστικότητα CAT, όπως τα βήτα κύτταρα του παγκρέατος (Abiles et al. 2006). Έτσι, η αύξηση της δραστικότητας της CAT πιθανότατα να καταδεικνύει την επαγωγή οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2, όπως επίσης απεικονίζεται από τους βιοδείκτες sORP και GSH.

Ωστόσο, στη μελέτη μας δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα επίπεδα των TBARS και των CARB στο πλάσμα των ασθενών με ΜΣ και ΔΤ2 σε σχέση πάντα με την ομάδα ελέγχου. Αν και προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι ο ΔΤ2 συνοδεύεται από αυξημένη οξείδωση λιπιδίων, η τελευταία δεν αποτελεί προϋπόθεση για την κατάσταση του ΜΣ (Venturini et al. 2015; Seghrouchni et al. 2002). Αντίθετα, φαίνεται ότι για κάποιο λόγο η υπεροξείδωση λιπιδίων μπορεί ακόμη και να μειωθεί σε ασθενείς με ΜΣ (Sohet et al. 2009). Έτσι, η συνυπάρχουσα εμφάνιση τόσο του ΜΣ όσο και του ΔΤ2 στους ασθενείς, μπορεί να εξηγήσει την απουσία αυξημένων επιπέδων TBARS στο πλάσμα τους. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε αύξηση στα επίπεδα CARB σε ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, αν και η οξείδωση πρωτεΐνης θεωρείται χαρακτηριστικό είτε του ΜΣ είτε του ΔΤ2 (Venturini et al. 2015; Tabak et al. 2011).

Επιπλέον, τα επίπεδα της TAC δε διέφεραν σημαντικά μεταξύ των ασθενών με ΜΣ και ΔΤ2 και των υγιών ανθρώπων, εύρημα που έρχεται σε αντίθεση με την επαγωγή οξειδωτικού στρες που υποδεικνύεται από άλλους βιοδείκτες (θα αναμέναμε μείωση της TAC). Ωστόσο, αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να εξηγηθεί όταν θεωρήσουμε ότι η TAC βασίζεται στην εκτίμηση των αναγωγικών ενώσεων, οι

οποίες μαζί με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα αποτελούν τους αντιοξειδωτικούς αμυντικούς μηχανισμούς. Αν και τα επίπεδα ορισμένων αντιοξειδωτικών (π.χ. GSH) μειώνονται στις καταστάσεις του ΜΣ και του ΔΤ2, έχει αναφερθεί ότι κάποια άλλα όπως το ουρικό οξύ παρουσιάζουν αύξηση (Venturini et al. 2015). Το ουρικό οξύ που αντιπροσωπεύει περίπου το 60% της αντιοξειδωτικής δράσης στο ανθρώπινο πλάσμα πιστεύεται ότι είναι αυξημένο σε άτομα με ΜΣ καθώς η ινσουλίνη μπορεί να μειώσει την αποβολή του ουρικού οξέος στα ούρα (Venturini et al. 2015; Muscelli et al. 1996). Έτσι, αν και η TAC μπορεί να παραμείνει αμετάβλητη λόγω αυτής της παράλληλης αύξησης και μείωσης των διαφορετικών αντιοξειδωτικών στις συνθήκες ΜΣ και ΔΤ2, το οξειδωτικό στρες παρατηρείται καθώς οι οξειδωτικές ενώσεις αυξάνονται περισσότερο από τα αντιοξειδωτικά.

Σε αυτή τη μελέτη, οι ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 εμφάνισαν μεγάλες διακυμάνσεις στις τιμές των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες, ιδιαίτερα της GSH και έτσι οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 υποομάδες, μία με χαμηλή GSH (<3 $\mu\text{mol/g Hb}$) και μια με υψηλά επίπεδα GSH (>4 $\mu\text{mol/g Hb}$). Η στατιστική σύγκριση των βιοδεικτών οξειδωτικού στρες μεταξύ των δύο υποομάδων έδειξε ότι η ομάδα χαμηλής GSH είχε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα sORP από την ομάδα υψηλής GSH, υποδεικνύοντας οξειδωτικό στρες. Αυτό το εύρημα υποστηρίχθηκε, επίσης, από τα υψηλότερα επίπεδα οξείδωσης πρωτεϊνών όπως φαίνεται από το δείκτη CARB στην ομάδα χαμηλής GSH σε σύγκριση με την ομάδα υψηλής GSH. Από την άλλη, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην TAC και στα επίπεδα CAT και TBARS μεταξύ των δύο ομάδων GSH. Δεδομένου ότι το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί με τη σοβαρότητα των επιπλοκών σε ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 (Furukawa et al. 2004; Roberts & Sindhu 2009; Ceriello & Motz 2004; Armutcu et al. 2008), η παρατηρούμενη διακύμανση της επαγωγής οξειδωτικού στρες σε τέτοια

άτομα τονίζει την ανάγκη για αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής τους κατάστασης. Συγκεκριμένα, τα υψηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 μπορεί να είναι ένα ανησυχητικό σημάδι για την εφαρμογή κατάλληλων παρεμβάσεων (π.χ. λήψη εξωγενών αντιοξειδωτικών) έτσι ώστε να περιοριστεί η επιδείνωση των επιπλοκών (Nikooyeh & Neyestani 2015; Akbar et al. 2011).

Επιπλέον, η αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης μπορεί να είναι σημαντική σε κατάσταση προδιαβήτη. Σύμφωνα με μια θεωρία που προτάθηκε από τους Watson και Sharoff, μπορεί να υπάρχει στενή συσχέτιση μεταξύ του ΔΤ2 και της οξειδοαναγωγικής κατάστασης (Watson 2014; Sharoff et al. 2010). Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, μια βασική αιτία του διαβήτη είναι το αναγωγικό περιβάλλον στο ενδοπλασματικό δίκτυο που μειώνει τον σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών (δεσμοί S-S) που απαιτούνται για τη σταθεροποίηση της τρισδιάστατης διαμόρφωσης των φυσιολογικά ενεργών πρωτεϊνών (Watson 2014). Δηλαδή, το οξειδωτικό περιβάλλον φαίνεται να απαιτείται για την σωστή αναδίπλωση και την κανονική λειτουργία των πρωτεϊνών. Σημαντικό στοιχείο που υποστηρίζει αυτή τη θεωρία είναι ότι σε τρωκτικά που εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη παρατηρούνται αρκετές μη σωστά αναδιπλωμένες πρωτεΐνες λόγω έλλειψης S-S δεσμών, από ότι εμφανίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο κυττάρων σε υγιή τρωκτικά (Ron & Harding 2012; Nardai et al. 2005). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η πρόσληψη εξωγενών αντιοξειδωτικών μειώνει την ικανότητα της άσκησης να κάνει τα κύτταρα πιο ευαίσθητα στην ινσουλίνη (Ristow et al. 2009). Επίσης, τα άτομα που φέρουν μεταλλάξεις που βλάπτουν τη σύνθεση αντιοξειδωτικών μορίων εκδηλώνουν αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη (Schoenmakers et al. 2010). Με βάση αυτή τη θεωρία, τα ευρήματά μας που δείχνουν ότι τα επίπεδα οξειδωτικού στρες ποικίλουν σημαντικά μεταξύ των ατόμων που έχουν ΜΣ και ΔΤ2 υπογραμμίζουν την ανάγκη

για αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε προδιαβητικές καταστάσεις, γεγονός που μπορεί να βοηθήσει στο να διακρίνουμε εκείνα με αναγωγική οξειδοαναγωγική κατάσταση από αυτά με οξειδωτική και να προβούμε στις κατάλληλες παρεμβάσεις. Δυστυχώς, είναι γενικώς γνωστό πως η πρόσληψη αντιοξειδωτικών συστήνεται σε μεγάλο βαθμό σε άτομα που βρίσκονται σε προδιαβητική κατάσταση, αν και όπως εξηγήθηκε παραπάνω αυτό μπορεί να είναι επιβλαβές για όσους έχουν αναγωγική οξειδοαναγωγική κατάσταση.

Συμπερασματικά, και σύμφωνα με όσα διατυπώθηκαν, τα παρόντα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το sORP μπορεί να είναι ένας αποτελεσματικός βιοδείκτης για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες στους ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2. Επιπλέον, ο sORP διέκρινε αποτελεσματικά τα επίπεδα οξειδωτικού στρες μεταξύ των ασθενών με ΜΣ και ΔΤ2 καθώς οι τιμές του συσχετίζονται σημαντικά με τα χαμηλά επίπεδα GSH και υψηλά επίπεδα CARB. Έτσι, η χρήση ενός τέτοιου βιοδείκτη μπορεί να είναι χρήσιμη για τον γρήγορο, άμεσο και οικονομικό προσδιορισμό των υψηλών επιπέδων οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με ΜΣ και ΔΤ2 και συνεπώς τη μείωση των επιπλοκών με την πραγματοποίηση των κατάλληλων παρεμβάσεων. Επιπλέον, ο sORP μπορεί να είναι χρήσιμος βιοδείκτης στο να διακρίνει τα υψηλά επίπεδα από τα χαμηλά επίπεδα οξειδωτικού στρες σε προδιαβητικά άτομα, τα οποία μπορεί επίσης να καθορίσουν τον τύπο παρέμβασης και πρόληψης εξέλιξης της ασθένειας.

4.2 Προσδιορισμός βιοδεικτών οξειδοαναγωγικού δυναμικού σε άτομα με Σήψη και Παχυσαρκία, με τη χρήση των βιοδεικτών ORP

4.2.1. Εισαγωγή

Έχουν αναπτυχθεί αρκετοί βιοδείκτες για την αξιολόγηση οξειδωτικού στρες στους ανθρώπους. Αυτοί οι βιοδείκτες βοηθούν να αξιολογηθεί η κατάσταση οξειδοαναγωγής ενός ατόμου και κατά συνέπεια να προβλεφθεί η πιθανή εκδήλωση παθολογικής κατάστασης ή η πρόοδος μιας ήδη υπάρχουσας νόσου. Ωστόσο, η μέτρηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες εξακολουθεί να είναι ατελής, χρονοβόρα και μη πρακτική σε κλινικό περιβάλλον και έτσι υπάρχει μεγάλη ανάγκη χρησιμοποίησης και εφαρμογής νέων τεχνικών για να καταστεί απλούστερη η εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ανθρώπων (Ogino & Wang 2007). Αυτή την ανάγκη έρχεται να καλύψει το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS (Luoxis Diagnostics, Inc., Englewood, CO, USA).

Σε προηγούμενες μελέτες δείξαμε ότι οι βιοδείκτες ORP θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από φυσιολογικές συνθήκες όπως άσκηση (Harris & Hansen 2012; Spanidis, Stagos, et al. 2017; Stagos et al. 2015; Stagos et al. 2014). Στην παρούσα μελέτη, οι βιοδείκτες ORP χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες σε μια παθολογική κατάσταση όπως η σήψη. Η σήψη είναι ένας συνδυασμός της παθολογικής λοίμωξης και φυσιολογικών αλλαγών, που είναι γνωστά ως “Σύνδρομο Συστημικής Φλεγμονώδους Απόκρισης (Systemic Inflammatory Response Syndrome-SIRS) (Bone et al. 1992). Πιο συγκεκριμένα, οι ερευνητές περιγράφοντας την κατάσταση αυτή λαμβάνουν υπόψη παθολογικές καταστάσεις όπως είναι η

σηψαιμία, το σηψαιμικό σοκ, η βακτηριαιμία, η διαδεδομένη μυκητιακή λοίμωξη και η διάδοση μυκητιακής ενδοκαρδίτιδας (Martin et al. 2003). Τα μικροβιακά αίτια περιλαμβάνουν μόλυνση από θετικά κατά Gram και αρνητικά κατά Gram βακτήρια, μύκητες ή και από τα δύο. Αξίζει να αναφερθεί πως συναφείς παράγοντες όπως ο διαβήτης, η μεταμόσχευση, η χειρουργική επέμβαση, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια, η συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και η νεφρική νόσο μπορεί είτε να αυξήσουν την ευαισθησία ενός ατόμου σε σήψη είτε να επιδεινώσουν την κλινική σημασία τους.

Σε κατάσταση σήψης, οι φλεγμονώδεις κυτοκίνες όπως ο TNF- α , IL-1 α , IL-1 β και IL-6, και χημειοκίνες όπως IL-8 που παράγονται από ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στη σοβαρότητα της κατάστασης. Έχει επίσης αναφερθεί, ότι η έκφραση πολλών προ-φλεγμονωδών παραγόντων ρυθμίζεται από τον μεταγραφικό παράγοντα NF κ B (Macdonald et al. 2003). Ανάμεσα στους βιοχημικούς παράγοντες που σχετίζονται με τη σήψη, έχει βρεθεί ότι η υπερπαραγωγή της ρίζας νιτρικού οξέος NO \cdot προκαλεί μειωμένο αγγειακό τόνο και κατά συνέπεια υπόταση, που είναι χαρακτηριστικό αυτού του συνδρόμου. Συγκεκριμένα, η μεγάλη παραγωγή NO \cdot στη σηψαιμία φαίνεται να προκύπτει από τη δραστηριότητα της συνθάσης του NO \cdot (iNOS). Επιπλέον, άλλα δραστικά είδη που συμμετέχουν στην παθογένεση σηψαιμίας περιλαμβάνουν τις ρίζες O $_2^{\cdot-}$, OH $^{\cdot-}$, το H $_2$ O $_2$, το HOCl και τον περοξεινιτρίτη (ONOO $^{\cdot-}$) (Parihar et al. 2008). Η δράση των ριζών αυτών μπορεί να οδηγήσει σε κατάσταση έντονου οξειδωτικού στρες και κατά συνέπεια σε βλάβες σε βιομόρια του οργανισμού. Οι πιθανές επιδράσεις του, προκαλούμενου από την παχυσαρκία, οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με σήψη ήταν επίσης σημαντικό αντικείμενο έρευνας. Στην εργασία αυτή, μελετήθηκαν τα δείγματα ατόμων με Σήψη, Σήψη και παχυσαρκία και συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα υγείων

ατόμων. Για την ολοκληρωμένη μελέτη της κατάστασης αυτής αλλά και για λόγους σύγκρισης και συσχέτισης των βιοδεικτών, εκτός από τους βιοδείκτες ORP, χρησιμοποιήθηκαν οι φωτομετρικοί βιοδείκτες CARB, TBARS, TAC.

4.2.2 Υλικά και Μέθοδοι

4.2.2.1 Συμμετέχοντες

Σε αυτήν την μελέτη, συνολικά 42 άτομα επισκέφτηκαν το Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών προκειμένου να υποβληθούν σε αιμοληψίες. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες. Τα κριτήρια ένταξης για κάθε ομάδα ήταν:

- Ομάδα ελέγχου (Control) ($n = 11$): άτομα με δείκτη μάζας σώματος (BMI) $< 30 \text{ kg} / \text{m}^2$ χωρίς κλινικά εργαστηριακά σημάδια λοίμωξης.
- Ομάδα παχυσαρκίας ($n = 10$): άτομα με BMI $\geq 30 \text{ kg} / \text{m}^2$ χωρίς κλινικά εργαστηριακά σημάδια λοίμωξης
- Ομάδα σήψης ($n = 12$): άτομα με BMI $< 30 \text{ kg} / \text{m}^2$ με σήψη.
- Ομάδα σήψης και παχυσαρκίας ($n = 9$): άτομα με BMI $\geq 30 \text{ kg} / \text{m}^2$ με σήψη.

Η σήψη καθορίστηκε σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια: α) α θερμοκρασία σώματος $> 38^\circ\text{C}$ ή $< 36^\circ\text{C}$, (β) καρδιακός ρυθμός > 90 κτύποι ανά λεπτό, (γ) ταχύπνοια, που εκδηλώνεται με αναπνευστικό ρυθμό > 20 αναπνοών ανά λεπτό ή υπεραερισμό, που υποδεικνύεται από συγκέντρωση $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mm Hg}$ και (δ) έναν τροποποιημένο αριθμό λευκών αιμοσφαιρίων > 12000 ή < 4000 κυττάρων ανά mm^3 ή την παρουσία $> 10\%$ μη ώριμων κυττάρων.

4.2.2.2 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν μετά τη μέτρηση των βιοδεικτών αναλύθηκαν μέσω της two-way ANOVA ακολουθούμενα από το Dunnett's test για την εξέταση πολλαπλών συγκρίσεων κατά ζεύγη με το πρόγραμμα SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, ΗΠΑ). Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται ως μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM).

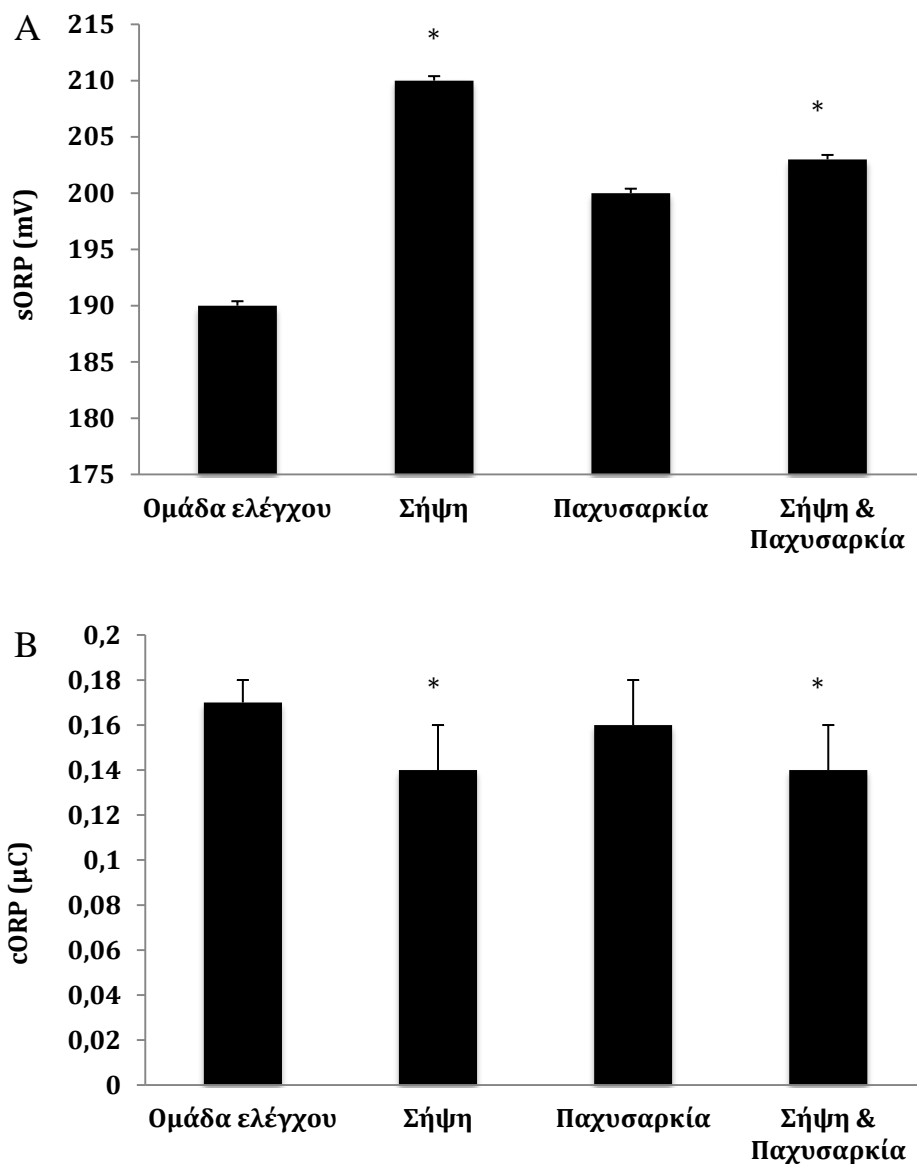
4.2.3 Αποτελέσματα

Από τους δύο βιοδείκτες ORP που εκτιμήθηκαν με τη χρήση του Διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS, το sORP αυξήθηκε σημαντικά ($p < 0,05$) κατά 9,3% στην ομάδα σήψης και κατά 6,9% στην ομάδα σήψης και παχυσαρκίας συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, δείχνοντας έτσι ένα εντονότερο οξειδωτικό περιβάλλον στις ομάδες αυτές (Διάγραμμα 41A). Αντιθέτως, το cORP, που αντικατοπτρίζει τα αποθέματα αντιοξειδωτικών ήταν σημαντικά χαμηλότερο κατά 11,8% στην ομάδα σήψης και κατά 17,7% στην ομάδα σήψης και παχυσαρκίας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Διαγραμμα 41B). Κανείς από αυτούς τους δύο βιοδείκτες, ωστόσο, δεν διέφερε σημαντικά στην ομάδα παχυσαρκίας σε σύγκριση με τον ομάδα ελέγχου (Διαγράμματα 41A,B).

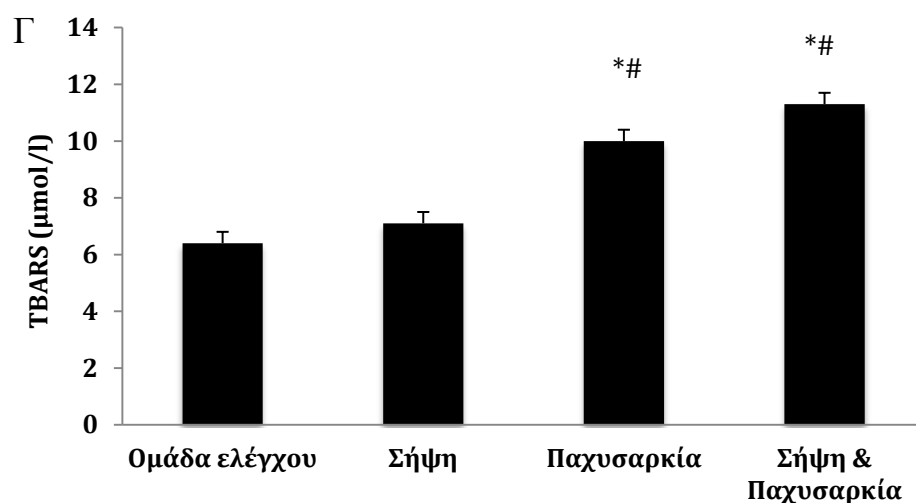
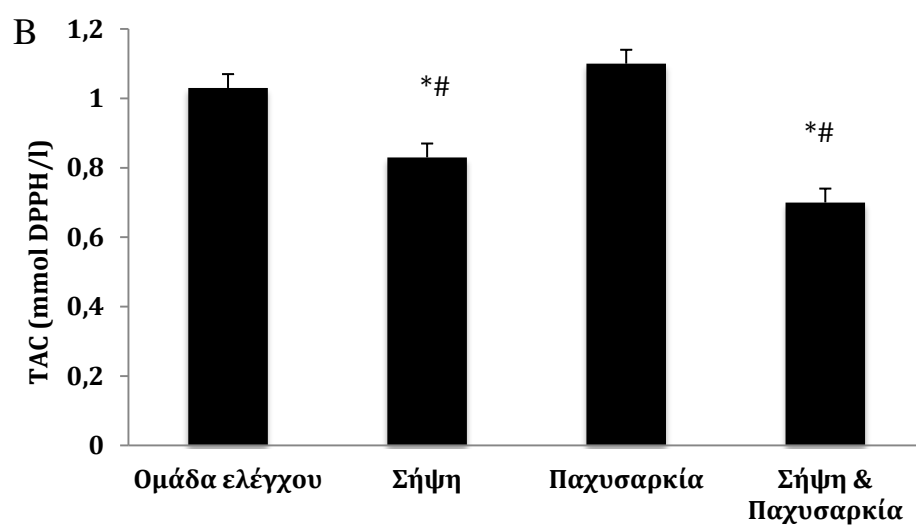
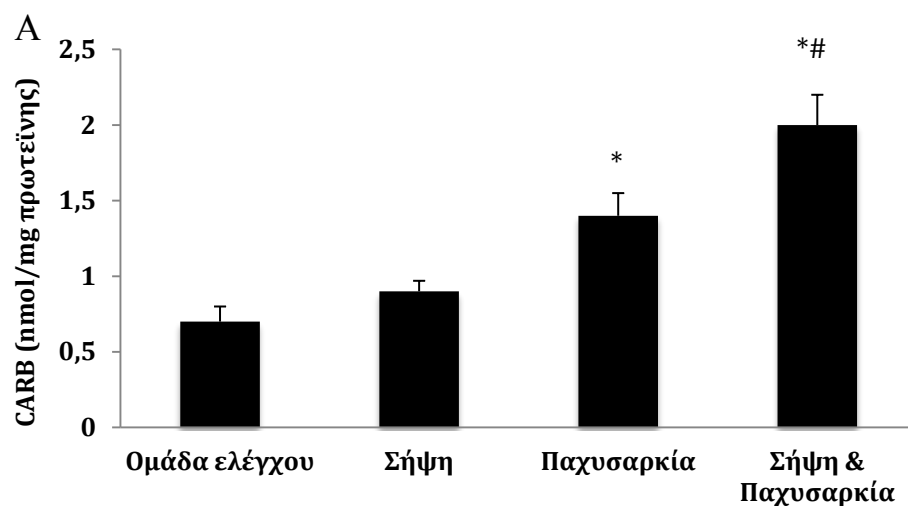
Αναφορικά με τα αποτελέσματα των συμβατικών, φασματοφωτομετρικών βιοδεικτών οξειδωτικού στρες, τα επίπεδα CARB στο ήταν σημαντικά αυξημένα ($p < 0,05$) κατά 73,8% στην ομάδα παχυσαρκίας και κατά 167,5% στην ομάδα σήψης και παχυσαρκίας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ δεν υπήρξε σημαντική αλλαγή στην ομάδα της σήψης. Επιπλέον, στην ομάδα σήψης και παχυσαρκίας τα επίπεδα CARB αυξήθηκαν σημαντικά ($p < 0,05$) κατά 130,1% και κατά 53,9% σε

σύγκριση με την ομάδα σήψης και της ομάδας παχυσαρκίας, αντίστοιχα (Διάγραμμα 42Α).

Ο βιοδείκτης TAC ήταν σε σημαντικά ($p<0,05$) χαμηλότερα επίπεδα της τάξης του 20,6% στην ομάδα σήψης και κατά 30,8% στην ομάδα σήψης και παχυσαρκίας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στη σύγκριση της ομάδας ελέγχου με την ομάδα παχυσαρκίας (Διάγραμμα 42B). Στις ομάδες σήψης και σήψης-παχυσαρκίας η TAC ήταν σημαντικά ($p<0,05$) χαμηλότερη κατά 23,4% και 33,3% σε σύγκριση με την ομάδα παχυσαρκίας αντίστοιχα (Διάγραμμα 42B). Όσον αφορά τα TBARS, ήταν σημαντικά ($p<0,05$) υψηλότερα κατά 59,1% στην ομάδα παχυσαρκίας και κατά 83,6% στην ομάδα σήψης και παχυσαρκίας σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Διάγραμμα 42Γ). Τέλος, στην ομάδα της παχυσαρκίας και την ομάδα σήψης-παχυσαρκίας, τα επίπεδα των TBARS ήταν σημαντικά υψηλότερα κατά 42,8% και 64,8%, ($p<0,05$) σε σύγκριση με τα επίπεδα της ομάδας σήψης (Διάγραμμα 42Γ).



Διάγραμμα 41: Επίπεδα των βιοδεικτών ORP , sORP (A) και cORP (B) σε άτομα με Σήψη, Παχυσαρκία και Σήψη με Παχυσαρκία καθώς και στην ομάδα ελέγχου (control). * Σημαντική ($p < 0,05$) διαφορά σε σχέση με την ομάδα Σήψης



Διάγραμμα 42: Επίπεδα βιοδεικτών CARB (A), TAC (B), TBARS (Γ) σε άτομα με Σήψη, Παχυσαρκία και Σήψη με Παχυσαρκία αλλά και στην ομάδα ελέγχου (Control). *Σημαντική ($p < 0,05$) διαφορά συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (control). # Σημαντική ($p < 0,05$) διαφορά συγκριτικά με την ομάδα Σήψης

4.2.4 Συζήτηση

Η Σήψη αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως το σύνδρομο της συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης που αποδίδεται σε λοίμωξη (Deutschman & Tracey 2014; Green 2015). Πολλές δημοσιευμένες εργασίες έχουν τονίσει την ύπαρξη υψηλότερων επιπέδων οξειδωτικού στρες και χαμηλότερων αντιοξειδωτικών αποθεμάτων σε ασθενείς με σήψη τις πρώτες ώρες ή ημέρες σε σύγκριση με τους υγιείς ανθρώπους (Alonso de Vega et al. 2002; Victor et al. 2009). Στην εργασία αυτή δόθηκε βάρος στην εξέταση της αξιοπιστίας των βιοδεικτών ORP που προσδιορίζονται από το Διαγνωστικό Σύστημα RedoxSYS ως προς την έγκυρη αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με σήψη. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τόσο το sORP όσο και το cORP ανιχνεύουν την μεταβολή της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας που προκαλείται σε καταστάσεις σήψης. Συγκεκριμένα, η σήψη αύξησε το sORP αντανακλώντας ένα περισσότερο οξειδωτικό οξειδοαναγωγικό περιβάλλον σε άτομα που αντιμετωπίζουν την ασθένεια. Επιπλέον, η σήψη προκάλεσε μείωση των επιπέδων cORP που αντικατοπτρίζουν το αντιοξειδωτικό απόθεμα του οργανισμού. Έχει προταθεί, ότι το επαγόμενο από σήψη οξειδωτικό στρες οφείλεται στη συνεχή φλεγμονώδη απόκριση κατά τη διάρκεια της σήψης που οδηγεί σε μεγάλη αύξηση των επιπέδων των ελεύθερων ριζών, νιτρικού οξειδίου και φλεγμονωδών κυτοκινών (Victor et al. 2009).

Παράλληλα, τα αποτελέσματα από την μέτρηση της TAC έδειξαν επίσης ένα εντονότερο οξειδωτικό περιβάλλον σε ασθενείς με σήψη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, σε αντίθεση με τα CARB και τα TBARS που δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές. Τα αποτελέσματα αυτά, συμφωνούσαν με μία από τις προηγούμενες μελέτες στο συγκεκριμένο πεδίο ενδιαφέροντος, στις οποίες υπήρχε έντονο οξειδωτικό στρες σε άτομα με σήψη (Kolyva et al. 2014). Ωστόσο, σε μια

άλλη μελέτη στην οποία εξετάστηκε η μεταβλητότητα του οξειδωτικού στρες σε άτομα με σοβαρά επίπεδα σήψης που οδηγούν σε θάνατο παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα CARB χωρίς να μεταβάλλονται τα επίπεδα TAC (Karapetsa et al. 2013). Προφανώς, μια εξήγηση για αυτή την μεταβλητότητα μπορεί να εντοπιστεί στην κρισιμότητα της ασθένειας καθώς όπως είναι αντιληπτό, τα επίπεδα σήψης μπορούν να επηρεάσουν το οξειδοαναγωγικό προφίλ του ατόμου. Από την άλλη πλευρά, ωστόσο, τονίζεται η ανάγκη για εξεύρεση νέων βιοδεικτών που θα αξιολογούσαν με μεγαλύτερη εγκυρότητα την οξειδοαναγωγική κατάσταση σε άτομα με σήψη. Μέχρι σήμερα, η αξιολόγηση των επιπέδων οξειδωτικής καταστροφής γίνεται μόνο μέσω μελέτης μιας παραμέτρου (π.χ. υπεροξειδωση λιπιδίων, οξείδωση πρωτεΐνης) ή των επιπέδων δράσης αντιοξειδωτικών μορίων (π.χ. επίπεδα GSH, δραστηριότητα CAT, δραστηριότητα δισμουτάσης υπεροξειδίου).

Έτσι λοιπόν, οι παράμετροι αυτοί θα πρέπει να εξετάζονται συνολικά και όχι μεμονωμένα. Ωστόσο, η μέτρηση αρκετών βιοδεικτών οξειδωτικού στρες είναι χρονοβόρα και καθόλου οικονομική με συνέπεια να μην είναι πρακτικά εφαρμόσιμη σε περιπτώσεις που απαιτείται άμεσο αποτέλεσμα. Συνεπώς, οι βιοδείκτες ORP που μπορούν να μετρήσουν άμεσα, αξιόπιστα και με μικρό κόστος την οξειδοαναγωγική κατάσταση ενός ατόμου ίσως προσφέρουν μια ασφαλή λύση. Σε αυτό συνηγορεί το γεγονός ότι οι βιοδείκτες ORP συνιστούν μια ολοκληρωμένη μέτρηση του οξειδωτικού στρες, δεδομένου ότι αξιολογούν την ολική ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αναγωγικών (δηλαδή το sORP) ή την ολική αντιοξειδωτική άμυνα (δηλαδή cORP) και καθώς δεν απαιτεί χρόνο και εξοπλισμό, θα μπορούσε να βρει εφαρμογή στην άμεση εξέταση των επιπέδων οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με σήψη ακόμα και στο δωμάτιο του νοσοκομείου που νοσηλεύεται ο ασθενής.

Οι βιοδείκτες ORP χρησιμοποιήθηκαν επίσης για να εκτιμήσουν το βαθμό που η παχυσαρκία επηρεάζει τα επίπεδα οξειδωτικού στρες σε άτομα με σήψη καθώς έχει αναφερθεί πως η παχυσαρκία από μόνη της επάγει το φαινόμενο αυτό. Έχει αναφερθεί πως το οξειδωτικό στρες που οφείλεται στην παχυσαρκία σχετίζεται με την υπεργλυκαιμία, την αυξημένη μυϊκή δραστηριότητα που απαιτείται για την μετακίνηση ενός παχύσαρκου ατόμου, τα αυξημένα επίπεδα λιπιδίων ιστών και τη χαμηλή ενδοτοξαίμια λόγω δυσλειτουργίας του φραγμού του εντέρου (Vincent & Taylor 2006). Σε μια προηγούμενη εργασία, αναφέρθηκε ότι η παχυσαρκία σχετίζονταν με αυξημένο οξειδωτικό στρες σε ασθενείς με σήψη (Kolyva et al. 2014), κάτι που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματά μας καθώς φαίνεται πως ίσως η παχυσαρκία συντελεί στην αύξηση των επιπέδων οξείδωσης πρωτεϊνών και λιπιδίων σε σηψαιμικούς ασθενείς. Αυτές οι επιδράσεις οφείλονται πιθανώς στο συνδυασμό των παραγόντων που προκαλούν οξειδωτικό στρες σε καθεμία από τα δύο καταστάσεις, σήψη και παχυσαρκία. Ωστόσο, οι βιοδείκτες ORP κατέδειξαν σημαντική αύξηση των επιπέδων οξειδωτικού στρες στα άτομα με παχυσαρκία και σήψη σε σύγκριση με τα άτομα που είχαν μόνο σήψη. Επιπλέον, δεν έδειξαν αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες σε παχύσαρκα άτομα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Παρομοίως με τους βιοδείκτες ORP, ο βιοδείκτης TAC, που, επίσης, προσδιορίζει την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, δεν αυξήθηκε στα παχύσαρκα άτομα συγκρίνοντας με τα δείγματα της ομάδας ελέγχου, ενώ τα άτομα με παχυσαρκία εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικής και λιπιδικής οξείδωσης. Άλλη μελέτη έχει δείξει ότι σε παχύσαρκα άτομα μειώνεται η TAC, αλλά η συγκεκριμένη μελέτη ήταν ευρείας κλίμακας με 1500 δείγματα ατόμων (Chrysohoou et al. 2007).

Συμπερασματικά, τα δεδομένα της μελέτης μας υποδηλώνουν ότι οι βιοδείκτες ORP που μετρήθηκαν από το RedoxSYS μπορούν να χρησιμοποιηθούν με

ασφάλεια για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες σε ασθενείς που υποφέρουν από σήψη. Όπως προαναφέρθηκε, ο άμεσος προσδιορισμός της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ατόμων που επιτυγχάνεται με τη χρήση των βιοδεικτών αυτών δίνει τη δυνατότητα άμεσης εκτίμησης της κατάστασης από έναν ιατρό προκειμένου να γίνει η κατάλληλη παρέμβαση (π.χ. χορήγηση αντιοξειδωτικών) (Mishra 2007). Η σπουδαιότητα του παραπάνω γεγονότος που υπερτονίζει την αξία της άμεσης εκτίμησης των επιπέδων οξειδωτικού στρες υποδεικνύεται από μελέτες που έχουν δείξει ότι η έγκαιρη χορήγηση αντιοξειδωτικών σκευασμάτων είναι περισσότερο αποτελεσματική σε βαριά άρρωστους ασθενείς σε αντίθεση με την καθυστερημένη χορήγηση (Lovat & Preiser 2003).

Συμπεράσματα-Προοπτικές

Η εκπόνηση της συγκεκριμένης διατριβής, είχε ως βασικό στόχο την εξέταση της αξιοπιστίας και την εξέλιξη του διαγνωστικού συστήματος RedoxSYS της εταιρίας Luoxis και πιο συγκεκριμένα των βιοδεικτών οξειδοαναγωγής sORP και cORP. Η μελέτη επικεντρώθηκε τόσο σε άτομα που αντιμετωπίζουν κάποια παθολογική κατάσταση, όσο και σε άτομα που έχουν πραγματοποιήσει ένα είδους άσκησης. Ο λόγος ήταν ότι και στις δυο περιπτώσεις έχει τεκμηριωθεί πως επάγεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια αυξάνονται τα επίπεδα οξειδωτικού στρες. Συνεπώς η εξέταση των βιοδεικτών σε δείγματα ατόμων που αντιμετωπίζουν την κατάσταση του οξειδωτικού στρες και η σύγκριση με αντίστοιχους και ευρέως χρησιμοποιούμενους φωτομετρικούς δείκτες θα έδινε ξεκάθαρες απαντήσεις στα ερωτήματά μας για την αξιοπιστία και την ακρίβεια των εν λόγω δεικτών.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τα πειράματα και πιο συγκεκριμένα η μεγάλη συσχέτιση των βιοδεικτών αυτών με αντίστοιχους ευρέως χρησιμοποιούμενους φασματοφωτομετρικούς βιοδείκτες οξειδωτικής βλάβης και αντιοξειδωτικής άμυνας κατέδειξαν ότι η χρήση των εν λόγω βιοδεικτών είναι αξιόπιστη και αναμένεται να συμβάλει στον έγκαιρο και οικονομικό προσδιορισμό της οξειδοαναγωγικής κατάστασης ανθρώπων. Η συσχέτιση αυτή παρατηρήθηκε τόσο μετά από πραγματοποίηση έντονης άσκησης όσο και σε παθολογικές καταστάσεις, καλύπτοντας έτσι ένα ευρύ φάσμα συνθηκών κάτω από τις οποίες είναι πιθανή η επαγωγή του οξειδωτικού στρες. Αντίστοιχα ευρήματα βρέθηκαν και μετά απο μέτρηση ατόμων που υποβλήθηκαν σε έντονη άσκηση, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία του εν λόγω μηχανήματος. Το γεγονός αυτό θα αποτελέσει σημαντικό στοιχείο για ιατρούς, νοσοκομεία, κλινικές και διαγνωστικά κέντρα ανά τον κόσμο προκειμένου να γίνεται ταχύτερα και οικονομικότερα η εκτίμηση της κατάστασης και

εν συνεχεία η κατάλληλη παρέμβαση προς αποφυγή των δυσάρεστων επιπτώσεων που το οξειδωτικό στρες μπορεί να επιφέρει στον οργανισμό.

Ωστόσο, κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, προέκυψαν, παράλληλα, σημαντικά ευρήματα που δίνουν κρίσιμες απαντήσεις σε ερωτήματα που κυριαρχούσαν στην βιβλιογραφία. Καταρχάς, ιδιαίτερο εύρημα ήταν η ανομοιογένεια που παρατηρείται στην απόκριση των οργανισμών στην έντονη άσκηση, καταδεικνύοντας ότι η ομαδική ανάλυση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης αθλητών αποτελεί μια λανθασμένη προσέγγιση και κατά συνέπεια οι γενικές συστάσεις θα πρέπει να αποφεύγονται. Μάλιστα, φάνηκε ότι το αθλητικό υπόβαθρο των ατόμων είναι καθοριστικός παράγοντας για την διακύμανση των επιπέδων της οξειδοαναγωγικής κατάστασης μετά από μια περίοδο έντονης άσκησης και θα πρέπει να λαμβάνετε υπόψη για την εύρεση της ενδεδειγμένης αποθεραπείας.

Ταυτόχρονα, ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο, αποτέλεσε η αποσαφήνιση του ρόλου της κατάστασης του αναγωγικού στρες μετά από άσκηση σε κύτταρα του αίματος όπως είναι τα PBMCs. Συγκεκριμένα, πλησιάζοντας το τέλος του πειραματικού μέρους της διατριβής, και έχοντας ήδη διαπιστώσει πως σε ορισμένα άτομα παρουσιάζεται αναγωγικό στρες μετά από άσκηση, σχεδιάστηκε πείραμα που εστίαζε στα PBMCs καθώς είναι κύτταρα μείζονος σημασίας στο ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα κύτταρα αυτά, απομονώθηκαν από άτομα μετά την άσκηση και εκτέθηκαν σε ένα ισχυρό και ευρέως χρησιμοποιούμενο οξειδωτικό παράγοντα με σκοπό να διαπιστωθεί η επίδραση της άσκησης στην αντιμετώπιση ενός εξωτερικού οξειδωτικού ερεθίσματος. Πράγματι, φάνηκε πως άτομα που εμφανίζουν αναγωγικό στρες -όπως ορίζεται από τα υψηλότερα επίπεδα GSH στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα μετά από άσκηση- μπορούν αποτελεσματικότερα να αντιμετωπίσουν τις επιπτώσεις ενός εξωγενούς οξειδωτικού παράγοντα στα κύτταρα

PBMCs. Συνεπώς, η άσκηση μπορεί να οδηγήσει σε ευεργετικές συνέπειες ως προς την αντιμετώπιση οξειδωτικών ερεθισμάτων, ενώ παράλληλα η εμφάνιση αναγωγικού στρες ίσως είναι ένας μηχανισμός προστασίας όταν ακολουθείται από ένα τέτοιο ερέθισμα. Το τελευταίο συμπέρασμα είναι ιδιαίζουσας σημασίας καθώς ανατρέπει αρκετές αναφορές στην βιβλιογραφία αναφορικά με τις δυσάρεστες συνέπειες που μπορεί η κατάσταση του αναγωγικού στρες να αποφέρει σε έναν οργανισμό, θέτοντας νέα δεδομένα και βάσεις για περαιτέρω μελέτη και ενδελεχή εξέταση του φαινομένου. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω η παρούσα διδακτορική διατριβή και οι δημοσιευμένες εργασίες αποτελούν, αναμφισβήτητα, σημαντικό λιθαράκι στην προσπάθεια κατανόησης και επεξήγησης σημαντικών αποκρίσεων του ανθρώπινου οργανισμού μετά από έντονη άσκηση.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abiles, J. et al., 2006. Oxidative stress is increased in critically ill patients according to antioxidant vitamins intake, independent of severity: a cohort study. *Critical care (London, England)*, 10(5), p.R146.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, 105, pp.121–126.
- Akbar, S., Bellary, S. & Griffiths, H.R., 2011. Dietary antioxidant interventions in type 2 diabetes patients: a meta-analysis. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, 11 (2), pp.62–68.
- Alessio, H.M. et al., 2000. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, 32(9), pp.1576–1581.
- Alia, M. et al., 2005. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 19(2), pp.119–128.
- Allen, D.G. et al., 2010. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 88(2), pp.83–91.
- Alonso de Vega, J.M. et al., 2002. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Critical care medicine*, 30(8), pp.1782–1786.
- Altieri, F. et al., 2008. DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & redox signaling*, 10(5), pp.891–937.
- Alvarez, B. et al., 1999. Kinetics of peroxy nitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *The Journal of biological chemistry*, 274(2), pp.842–848.
- Ames, B.N., 1986. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Progress in clinical and biological research*, 206, pp.3–32.
- Ames, B.N. et al., 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(11), pp.6858–6862.
- Anderson, N.L. & Anderson, N.G., 2002. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 1(11), pp.845–867.
- Anraku, M. et al., 2001. Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharmaceutical research*, 18(5), pp.632–639.
- 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), pp.1260–1267.
- Aon, M.A., Cortassa, S. & O'Rourke, B., 2010. Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1797(6-7), pp.865–877.
- Aquilano, K., Baldelli, S. & Ciriolo, M.R., 2014. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Frontiers in Pharmacology*, 5, p.196.
- Armutcu, F. et al., 2008. Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*, 46(6), pp.785–790.
- Ashton, T. et al., 1998. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 77(6), pp.498–502.
- ASMUSSEN, E., 1956. Observations on experimental muscular soreness. *Acta rheumatologica Scandinavica*, 2(2), pp.109–116.
- Autissier, P. et al., 2010. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77(5), pp.410–419.
- Avery, N.G. et al., 2003. Effects of vitamin E supplementation on recovery from repeated bouts of resistance exercise. *Journal of strength and conditioning research*, 17(4), pp.801–809.
- Bakonyi, T. & Radak, Z., 2004. High Altitude and Free Radicals. *Journal of Sports Science & Medicine*, 3(2), pp.64–69.
- Balagopalakrishna, C. et al., 1996. Production of superoxide from hemoglobin-bound oxygen under hypoxic conditions. *Biochemistry*, 35(20), pp.6393–6398.
- Balčiūnas, M. et al., 2006. Long Term Effects of Different Training Modalities on Power, Speed, Skill and Anaerobic Capacity in Young Male Basketball Players. *Journal of Sports Science & Medicine*, 5(1), pp.163–170.
- Balkau, B. et al., 2002. Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes & metabolism*, 28(5), pp.364–376.
- Banerjee, B.D. et al., 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology letters*, 107(1-3), pp.33–47.
- Barja, G., 2000. The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging (Milan, Italy)*, 12(5), pp.342–355.
- Bartesaghi, S. & Radi, R., 2018. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite

- and protein tyrosine nitration. *Redox Biology*, 14, pp.618–625.
- Bauersachs, J. & Widder, J.D., 2010. Reductive stress: linking heat shock protein 27, glutathione, and cardiomyopathy? *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 55(6), pp.1299–1300.
- Beaven, C.M. et al., 2014. Physiological Comparison of Concentric and Eccentric Arm Cycling in Males and Females A. Lucia, ed. *PLoS ONE*, 9(11), p.e112079.
- Beckman, J.S. & Koppenol, W.H., 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology*, 271(5 Pt 1), pp.C1424–37.
- Bedard, K. & Krause, K.-H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, 87(1), pp.245–313.
- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), pp.70–76.
- Berg, A.T. et al., 2010. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4), pp.676–685.
- Bielski, B.J. & Cabelli, D., 1995. Superoxide and Hydroxyl Radical Chemistry in Aqueous Solution. In C. Foote et al., eds. *Active Oxygen in Chemistry SE - 3. Structure Energetics and Reactivity in Chemistry Series (SEARCH Series)*. Springer Netherlands, pp. 66–104.
- Birben, E. et al., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization journal*, 5(1), pp.9–19.
- Block, G. et al., 2008. The effect of vitamins C and E on biomarkers of oxidative stress depends on baseline level. *Free radical biology & medicine*, 45(4), pp.377–384.
- Bloomer, R.J. et al., 2005. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*, 19(2), pp.276–285.
- Bloomer, R.J. & Fisher-Wellman, K.H., 2008. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gender medicine*, 5(3), pp.218–228.
- Boban, M. & Modun, D., 2010. Uric Acid and Antioxidant Effects of Wine. *Croatian Medical Journal*, 51(1), pp.16–22.
- Bone, R.C. et al., 1992. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for

- the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest*, 101(6), pp.1644–1655.
- Booth, F.W. et al., 2000. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 88(2), pp.774–787.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, pp.248–254.
- Brantley, R.E.J. et al., 1993. The mechanism of autooxidation of myoglobin. *The Journal of biological chemistry*, 268(10), pp.6995–7010.
- Breen, A.P. & Murphy, J.A., 1995. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free radical biology & medicine*, 18(6), pp.1033–1077.
- Brentano, M.A. & Martins Krueel, L.F., 2011. A review on strength exercise-induced muscle damage: applications, adaptation mechanisms and limitations. *The Journal of sports medicine and physical fitness*, 51(1), pp.1–10.
- Briviba, K. et al., 2005. A half-marathon and a marathon run induce oxidative DNA damage, reduce antioxidant capacity to protect DNA against damage and modify immune function in hobby runners. *Redox report: communications in free radical research*, 10(6), pp.325–331.
- Buettner, G.R. & Moseley, P.L., 1993. EPR spin trapping of free radicals produced by bleomycin and ascorbate. *Free radical research communications*, 19 Suppl 1, pp.S89–93.
- Cadet, J., Douki, T. & Ravanat, J.-L., 2010. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. *Free radical biology & medicine*, 49(1), pp.9–21.
- Calabrese, E.J. & Mattson, M.P., 2017. How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine? *npj Aging and Mechanisms of Disease*, 3(1), p.13.
- Carballal, S. et al., 2003. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry*, 42(33), pp.9906–9914.
- Cataldo, F., 2006. DNA degradation with ozone. *International journal of biological macromolecules*, 38(3-5), pp.248–254.
- Ceriello, A. & Motz, E., 2004. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 24(5), pp.816–823.
- Cerutti, P.A., 1985. Prooxidant states and tumor promotion. *Science (New York, N.Y.)*, 227(4685), pp.375–381.
- Chalansonnet, M. et al., 2013. Study of the potential oxidative stress induced by six

- solvents in the rat brain. *Neurotoxicology*, 35, pp.71–83.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 59(3), pp.527–605.
- Chang, C.-N., Cheng, H.-B. & Chao, A.C., 2004. Applying the Nernst equation to simulate redox potential variations for biological nitrification and denitrification processes. *Environmental science & technology*, 38(6), pp.1807–1812.
- Chatzinikolaou, A. et al., 2014. The microcycle of inflammation and performance changes after a basketball match. *Journal of sports sciences*, 32(9), pp.870–882.
- Cheeseman, K.H. & Slater, T.F., 1993. An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49(3), pp.481–493.
- Childs, A. et al., 2001. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free radical biology & medicine*, 31(6), pp.745–753.
- Chrysohoou, C. et al., 2007. The implication of obesity on total antioxidant capacity in apparently healthy men and women: the ATTICA study. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, 17(8), pp.590–597.
- Chung, S.-K., Osawa, T. & Kawakishi, S., 1997. Hydroxyl Radical-scavenging Effects of Spices and Scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(1), pp.118–123.
- Ciuti, C. et al., 1996. Improved aerobic power by detraining in basketball players mainly trained for strength. *Sports Medicine, Training and Rehabilitation*, 6(4), pp.325–335.
- Conner, E.M. & Grisham, M.B., 1996. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 12(4), pp.274–277.
- Cooper, C.E. et al., 2002. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society transactions*, 30(2), pp.280–285.
- Cortassa, S., O'Rourke, B. & Aon, M.A., 2014. Redox-optimized ROS balance and the relationship between mitochondrial respiration and ROS. *Biochimica et biophysica acta*, 1837(2), pp.287–295.
- Cramer, R.M. et al., 2004. Changes in satellite cells in human skeletal muscle after a single bout of high intensity exercise. *The Journal of Physiology*, 558(Pt 1), pp.333–340.
- Crisafulli, A. et al., 2002. External mechanical work versus oxidative energy consumption ratio during a basketball field test. *The Journal of sports medicine and physical fitness*, 42(4), pp.409–417.
- Cyrne, L. et al., 2010. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is largely

- unresponsive to low regulatory levels of hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Biochemistry*, 11(1), p.49.
- Czaja, M.J. et al., 1994. Induction of MnSOD gene expression in a hepatic model of TNF-alpha toxicity does not result in increased protein. *The American journal of physiology*, 266(4 Pt 1), pp.G737–44.
- Dadheech, G. et al., 2006. Oxidative stress, α -tocopherol, ascorbic acid and reduced glutathione status in schizophrenics. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 21(2), pp.34–38.
- Dalle-Donne, I. et al., 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical chemistry*, 52(4), pp.601–623.
- Davies, K.J. et al., 1982. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical and biophysical research communications*, 107(4), pp.1198–1205.
- Davies, K.J. & Delsignore, M.E., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *The Journal of biological chemistry*, 262(20), pp.9908–9913.
- Davies, K.J., Delsignore, M.E. & Lin, S.W., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *The Journal of biological chemistry*, 262(20), pp.9902–9907.
- Davies, K.J., Lin, S.W. & Pacifici, R.E., 1987. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *The Journal of biological chemistry*, 262(20), pp.9914–9920.
- Degache, F. et al., 2015. Running Mechanics During the World's Most Challenging Mountain Ultra-Marathon. *International journal of sports physiology and performance*.
- Dekkers, J.C., van Doornen, L.J. & Kemper, H.C., 1996. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 21(3), pp.213–238.
- Delwing-de Lima, D. et al., 2017. Effects of two aerobic exercise training protocols on parameters of oxidative stress in the blood and liver of obese rats. *The journal of physiological sciences : JPS*.
- Derbre, F. et al., 2012. Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol prevents skeletal muscle atrophy: role of p38 MAPKinase and E3 ubiquitin ligases. *PloS one*, 7(10), p.e46668.
- Deutschman, C.S. & Tracey, K.J., 2014. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity*, 40(4), pp.463–475.
- Dickinson, D.A. & Forman, H.J., 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism.

Biochemical pharmacology, 64(5-6), pp.1019–1026.

- DiLorenzo, F.M., Drager, C.J. & Rankin, J.W., 2014. Docosahexaenoic acid affects markers of inflammation and muscle damage after eccentric exercise. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*, 28(10), pp.2768–2774.
- Dizdaroglu, M. et al., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free radical biology & medicine*, 32(11), pp.1102–1115.
- Dodd, S.L. et al., 2010. Ros-mediated activation of NF-kappaB and Foxo during muscle disuse. *Muscle & nerve*, 41(1), pp.110–113.
- Douki, T. & Cadet, J., 1996. Peroxynitrite mediated oxidation of purine bases of nucleosides and isolated DNA. *Free radical research*, 24(5), pp.369–380.
- Doweiko, J.P. & Nompleggi, D.J., 1991. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, 15(2), pp.207–211.
- Draper, B.K. et al., 2003. Epiregulin is more potent than EGF or TGFalpha in promoting in vitro wound closure due to enhanced ERK/MAPK activation. *Journal of cellular biochemistry*, 89(6), pp.1126–1137.
- Elokda, A. et al., 2010. Effects of exercise induced oxidative stress on glutathione levels in Parkinson's disease on and off medication. *Journal of neurology*, 257(10), pp.1648–1653.
- Elosua, R. et al., 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(2), pp.327–334.
- Espinosa-Diez, C. et al., 2015. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*, 6, pp.183–197.
- Faller, P., Pascal, A. & Rutherford, A.W., 2001. β -Carotene Redox Reactions in Photosystem II: Electron Transfer Pathway. *Biochemistry*, 40(21), pp.6431–6440.
- Fang, Y.-Z., Yang, S. & Wu, G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 18(10), pp.872–879.
- Farrugia, A., 2010. Albumin Usage in Clinical Medicine: Tradition or Therapeutic? *Transfusion Medicine Reviews*, 24(1), pp.53–63.
- Fatouros, I.G. et al., 2004. Oxidative stress responses in older men during endurance training and detraining. *Medicine and science in sports and exercise*, 36(12), pp.2065–2072.
- Fatouros, I.G. & Jamurtas, A.Z., 2016. Insights into the molecular etiology of

- exercise-induced inflammation: opportunities for optimizing performance. *Journal of inflammation research*, 9, pp.175–186.
- Fatouros, I.G. & Kouretas, D., 2010. Exercise, Oxidative Stress, and Inflammation. *Exercise Physiology: From a Cellular to an Integrative Approach*, 75, p.245.
- Fernstrom, J.D. & Fernstrom, M.H., 2007. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *The Journal of nutrition*, 137(6 Suppl 1), p.1539S–1547S; discussion 1548S.
- Finaud, J., Lac, G. & Filaire, E., 2006. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 36(4), pp.327–358.
- Folli, F. et al., 2011. The role of oxidative stress in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus micro- and macrovascular complications: avenues for a mechanistic-based therapeutic approach. *Current diabetes reviews*, 7(5), pp.313–324.
- Ford, E.S. et al., 2003. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes*, 52(9), pp.2346–2352.
- Freeman, B.A. & Mudd, J.B., 1981. Reaction of ozone with sulfhydryls of human erythrocytes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 208(1), pp.212–220.
- Furukawa, S. et al., 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 114(12), pp.1752–1761.
- Gaetani, G.F. et al., 1996. Active involvement of catalase during hemolytic crises of favism. *Blood*, 88(3), pp.1084–1088.
- Gambelunghe, C. et al., 2001. Physical exercise intensity can be related to plasma glutathione levels. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 57(1), pp.9–14.
- Garbin, U. et al., 2009. Cigarette smoking blocks the protective expression of Nrf2/ARE pathway in peripheral mononuclear cells of young heavy smokers favouring inflammation. *PloS one*, 4(12), p.e8225.
- Ghanta, S. & Chattopadhyay, S., 2011. Glutathione as a signaling molecule: Another challenge to pathogens. *Plant Signaling & Behavior*, 6(6), pp.783–788.
- Giacco, F. & Brownlee, M., 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*, 107(9), pp.1058–1070.
- Giles, G.I. & Jacob, C., 2002. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biological chemistry*, 383(3-4), pp.375–388.
- Givli, S., 2015. Contraction induced muscle injury: towards personalized training and recovery programs. *Annals of biomedical engineering*, 43(2), pp.388–403.
- Goldfarb, A.H., Bloomer, R.J. & McKenzie, M.J., 2005. Combined antioxidant

- treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, 37(2), pp.234–239.
- Gomez-Cabrera, M.-C. et al., 2005. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *The Journal of Physiology*, 567(Pt 1), pp.113–120.
- Gomez-Cabrera, M.-C., Domenech, E. & Vina, J., 2008. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free radical biology & medicine*, 44(2), pp.126–131.
- Goth, L., 2006. Reactive oxygen species, hydrogen peroxide, catalase and diabetes mellitus. *Redox report : communications in free radical research*, 11(6), pp.281–282.
- Green, J.M., 2015. Essentials of sepsis management. *The Surgical clinics of North America*, 95(2), pp.355–365.
- De Grey, A.D.N.J., 2002. HO₂*: the forgotten radical. *DNA and cell biology*, 21(4), pp.251–257.
- Grotto, D. et al., 2007. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 43(2), pp.619–624.
- Haafteen, R. et al., 2003. *Effect of Vitamin E on Glutathione-Dependent Enzymes*,
- de Haan, J.B. et al., 1998. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry*, 273(35), pp.22528–22536.
- Hajizadeh Maleki, B. et al., 2017. Low-to-moderate intensity aerobic exercise training modulates irritable bowel syndrome through antioxidative and inflammatory mechanisms in women: Results of a randomized controlled trial. *Cytokine*, 102, pp.18–25.
- Hakki Kalkan, I. & Suher, M., 2013. The relationship between the level of glutathione, impairment of glucose metabolism and complications of diabetes mellitus. *Pakistan journal of medical sciences*, 29(4), pp.938–942.
- Halliwell, B., 1988. Albumin--an important extracellular antioxidant? *Biochemical pharmacology*, 37(4), pp.569–571.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, 52(8 Pt 1), pp.253–265.
- Halliwell, B., 2001. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.

- Halliwell, B., 1989. Tell me about free radicals, doctor: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82(12), pp.747–752.
- Halliwell, B., 2009. The wanderings of a free radical. *Free radical biology & medicine*, 46(5), pp.531–542.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C., 2015. *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, USA.
- Hamada, K. et al., 2005. Senescence of human skeletal muscle impairs the local inflammatory cytokine response to acute eccentric exercise. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(2), pp.264–266.
- Hansson, G.K., 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine*, 352(16), pp.1685–1695.
- Harris, C. & Hansen, J.M., 2012. Oxidative stress, thiols, and redox profiles. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 889, pp.325–346.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B. & Ames, B.N., 1999. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods in enzymology*, 300, pp.156–166.
- Herrero, A. & Barja, G., 1997. ADP-regulation of mitochondrial free radical production is different with complex I- or complex II-linked substrates: implications for the exercise paradox and brain hypermetabolism. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 29(3), pp.241–249.
- Hilbert, J.E., Sforzo, G.A. & Swensen, T., 2003. The effects of massage on delayed onset muscle soreness. *British journal of sports medicine*, 37(1), pp.72–75.
- Hippeli, S. & Elstner, E.F., 1997. OH-radical-type reactive oxygen species: a short review on the mechanisms of OH-radical- and peroxyxynitrite toxicity. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 52(9-10), pp.555–563.
- Hiraku, Y. et al., 2010. The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1203, pp.15–22.
- Hopps, E. & Caimi, G., 2013. Protein oxidation in metabolic syndrome. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale*, 36(1), pp.E1–8.
- Hulbert, A.J., 2005. On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *Journal of theoretical biology*, 234(2), pp.277–288.
- Imai, H. et al., 2002. Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. *The Japanese journal of physiology*, 52(2), pp.135–140.

- Inayama, T. et al., 1996. Plasma protein-bound sulfhydryl group oxidation in humans following a full marathon race. *Life sciences*, 59(7), pp.573–578.
- Ishida, K., Sawada, N. & Yamaguchi, M., 2004. Expression of albumin in bone tissues and osteoblastic cells: involvement of hormonal regulation. *International journal of molecular medicine*, 14(5), pp.891–895.
- Jablonska-Skwiecinska, E. et al., 1999. Several mutations including two novel mutations of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene in Polish G6PD deficient subjects with chronic nonspherocytic hemolytic anemia, acute hemolytic anemia, and favism. *Human mutation*, 14(6), pp.477–484.
- Jahan-Mihan, A. et al., 2015. The Role of Maternal Dietary Proteins in Development of Metabolic Syndrome in Offspring. *Nutrients*, 7(11), pp.9185–9217.
- Jamurtas, T. & Fatouros, I., 2012. *Eccentric Exercise, Muscle Damage and Oxidative Stress*,
- 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), pp.231–236.
- Ji, L.I.L.I. et al., 1998. Oxidative Stress and Aging: Role of Exercise and Its Influences on Antioxidant Systems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1), pp.102–117.
- 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, pp.425–435.
- Jomova, K. & Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3), pp.65–87.
- Jones, D.P., 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10), pp.1865–1879.
- Jung, T., Höhn, A. & Grune, T., 2014. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II – protein oxidation and proteasomal degradation. *Redox Biology*, 2, pp.99–104.
- Kabasakalis, A. et al., 2011. Blood oxidative stress markers after ultramarathon swimming. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*, 25(3), pp.805–811.
- Kant, A.K. & Graubard, B.I., 2008. Ethnic and socioeconomic differences in variability in nutritional biomarkers. *The American journal of clinical nutrition*, 87(5), pp.1464–1471.
- Kanter, M.M. et al., 1988. Serum creatine kinase and lactate dehydrogenase changes

- following an eighty kilometer race. Relationship to lipid peroxidation. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, 57(1), pp.60–63.
- Karapetsa, M. et al., 2013. Oxidative status in ICU patients with septic shock. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 61, pp.106–111.
- Katsuki, A. et al., 2004. Increased Oxidative Stress Is Associated With Serum Levels of Triglyceride, Insulin Resistance, and Hyperinsulinemia in Japanese Metabolically Obese, Normal-Weight Men. *Diabetes Care*, 27 (2), pp.631–632.
- Kayanoki, Y. et al., 1996. The protective role of glutathione peroxidase in apoptosis induced by reactive oxygen species. *Journal of biochemistry*, 119(4), pp.817–822.
- Keles, M.S. et al., 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), pp.141–143.
- Kelner, M.J. et al., 1995. Heterologous Expression of Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase Affords Cellular Resistance to Paraquat. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 323(1), pp.40–46.
- Kerasioti, E. et al., 2012. Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(8), pp.2805–2810.
- Kerasioti, E. et al., 2016. Increase in antioxidant activity by sheep/goat whey protein through nuclear factor-like 2 (Nrf2) is cell type dependent. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 97, pp.47–56.
- 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, pp.38–44.
- Kim, J. & Lee, J., 2014. A review of nutritional intervention on delayed onset muscle soreness. Part I. *Journal of Exercise Rehabilitation*, 10(6), pp.349–356.
- Kobayashi, K., 2001. Role of catecholamine signaling in brain and nervous system functions: new insights from mouse molecular genetic study. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings*, 6(1), pp.115–121.
- Kobayashi, Y. et al., 2014. Intense Exercise Increases Protein Oxidation in Spleen and Liver of Mice. *Nutrition and Metabolic Insights*, 7, pp.1–6.
- Kolyva, A.S. et al., 2014. The role of obesity in the immune response during sepsis.

Nutrition & diabetes, 4, p.e137.

- Korge, P., Calmettes, G. & Weiss, J.N., 2015. Increased reactive oxygen species production during reductive stress: The roles of mitochondrial glutathione and thioredoxin reductases. *Biochimica et biophysica acta*, 1847(6-7), pp.514–525.
- Korge, P., Calmettes, G. & Weiss, J.N., 2016. Reactive oxygen species production in cardiac mitochondria after complex I inhibition: Modulation by substrate-dependent regulation of the NADH/NAD⁺ ratio. *Free Radical Biology and Medicine*, 96, pp.22–33.
- Kröller-Schön, S. et al., 2012. α 1AMP activated protein kinase mediates the vascular protective effects of exercise. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(7), p.10.1161/ATVBAHA.111.243980.
- Kuwahata, M. et al., 2017. An oxidized/reduced state of plasma albumin reflects malnutrition due to an insufficient diet in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 60(1), pp.70–75.
- Kwok, C.J. et al., 2002. G6PDdb, an integrated database of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations. *Human mutation*, 19(3), pp.217–224.
- Lamprecht, M. et al., 2008. Single bouts of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups on plasma protein of trained men in a workload-dependent manner. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 104(6), pp.1611–1617.
- Laumonier, T. & Menetrey, J., 2016. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *Journal of Experimental Orthopaedics*, 3, p.15.
- Lee, A.Y. & Chung, S.S., 1999. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(1), pp.23–30.
- Leeuwenburgh, C. et al., 1999. Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free radical biology & medicine*, 27(1-2), pp.186–192.
- Lerner, R.A. & Eschenmoser, A., 2003. Ozone in biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(6), pp.3013–3015.
- Levine, R.L., 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free radical biology & medicine*, 32(9), pp.790–796.
- Liao, P. et al., 2010. Eccentric contraction induces inflammatory responses in rat skeletal muscle: role of tumor necrosis factor- α . *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 298(3), pp.R599–607.

- Liebler, D.C. & McClure, T.D., 1996. Antioxidant reactions of beta-carotene: identification of carotenoid-radical adducts. *Chemical research in toxicology*, 9(1), pp.8–11.
- Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M. & Pereira-Wilson, C., 2006. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life sciences*, 79(21), pp.2056–2068.
- Linnane, A.W. et al., 2002. Human aging and global function of coenzyme Q10. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, pp.395–396.
- Lipinski, B., 2011. *Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease*,
- Liu, Q. et al., 2009. Free radical scavenging activity of porcine plasma protein hydrolysates determined by electron spin resonance spectrometer. *LWT - Food Science and Technology*, 42(5), pp.956–962.
- Lobo, V. et al., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), pp.118–126.
- Loeb, L.A. & Preston, B.D., 1986. Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. *Annual review of genetics*, 20, pp.201–230.
- Long, N.C. et al., 2001. Ozone causes lipid peroxidation but little antioxidant depletion in exercising and nonexercising hamsters. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 91(4), pp.1694–1700.
- Lovat, R. & Preiser, J.-C., 2003. Antioxidant therapy in intensive care. *Current opinion in critical care*, 9(4), pp.266–270.
- Lubos, E., Loscalzo, J. & Handy, D.E., 2011. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & redox signaling*, 15(7), pp.1957–1997.
- Macdonald, J., Galley, H.F. & Webster, N.R., 2003. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *British journal of anaesthesia*, 90(2), pp.221–232.
- Madian, A.G. & Regnier, F.E., 2010. Profiling Carbonylated Proteins in Human Plasma. *Journal of Proteome Research*, 9(3), pp.1330–1343.
- Maiuolo, J. et al., 2016. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*, 213, pp.8–14.
- MALIK, A. et al., 2013. Isolation and characterization of serum albumin from *Camelus dromedarius*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 6(2), pp.519–524.
- Malm, C., Lenkei, R. & Sjodin, B., 1999. Effects of eccentric exercise on the immune system in men. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 86(2), pp.461–468.

- Manea, A. et al., 2004. Changes in oxidative balance in rat pericytes exposed to diabetic conditions. *Journal of cellular and molecular medicine*, 8(1), pp.117–126.
- Mangner, N. et al., 2013. Exercise training prevents TNF-alpha induced loss of force in the diaphragm of mice. *PloS one*, 8(1), p.e52274.
- Margaritelis, N. V et al., 2015. Blood reflects tissue oxidative stress: a systematic review. *Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 20(2), pp.97–108.
- Margaritelis, N. V et al., 2014. Reductive stress after exercise: The issue of redox individuality. *Redox biology*, 2, pp.520–528.
- Margonis, K. et al., 2007. Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free radical biology & medicine*, 43(6), pp.901–910.
- Martin, C. et al., 2001. tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals. *Biochemical pharmacology*, 62(6), pp.705–712.
- Martin, G.S. et al., 2003. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine*, 348(16), pp.1546–1554.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C. & Nunez de Castro, I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*, 32(8), pp.595–603.
- Mazzetti, A.P. et al., 2015. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochemistry international*, 82, pp.10–18.
- McClung, J.M. et al., 2010. Overexpression of antioxidant enzymes in diaphragm muscle does not alter contraction-induced fatigue or recovery. *Experimental physiology*, 95(1), pp.222–231.
- Mckune, A., Semple, S. & Peters-Futre, E., 2012. *Acute Exercise-Induced Muscle Injury*,
- Melikoglu, M.A. et al., 2008. The effect of regular long term training on antioxidant enzymatic activities. *The Journal of sports medicine and physical fitness*, 48(3), pp.388–390.
- Messan, F. et al., 2017. Comparison of Catecholamine Values Before and After Exercise-Induced Bronchospasm in Professional Cyclists. *Tanaffos*, 16(2), pp.136–143.
- Michailidis, Y. et al., 2007. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Medicine and science in sports and exercise*, 39(7), pp.1107–1113.

- Michelis, R. et al., 2003. Carbonyl stress induced by intravenous iron during haemodialysis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 18(5), pp.924–930.
- Milne, G.L., Musiek, E.S. & Morrow, J.D., 2005. F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 10 Suppl 1, pp.S10–23.
- Mishra, V., 2007. Oxidative stress and role of antioxidant supplementation in critical illness. *Clinical laboratory*, 53(3-4), pp.199–209.
- Moselhy, H.F. et al., 2013. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. *Journal of lipid research*, 54(3), pp.852–858.
- Mrakic-Sposta, S. et al., 2015. Effects of Mountain Ultra-Marathon Running on ROS Production and Oxidative Damage by Micro-Invasive Analytic Techniques. *PLoS one*, 10(11), p.e0141780.
- Müller, M. et al., 1996. The Assessment of Ozone Stress by Recording Chromosomal Aberrations in Root Tips of Spruce Trees [*Picea abies* (L) Karst]. *Journal of Plant Physiology*, 148(1), pp.160–165.
- Muscelli, E. et al., 1996. Effect of insulin on renal sodium and uric acid handling in essential hypertension. *American journal of hypertension*, 9(8), pp.746–752.
- Mylonas, C. & Kouretas, D., 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In vivo (Athens, Greece)*, 13(3), pp.295–309.
- Nardai, G. et al., 2005. Diabetic changes in the redox status of the microsomal protein folding machinery. *Biochemical and biophysical research communications*, 334(3), pp.787–795.
- Nelson, M. & Anderson, E.J., 2016. 345 - Catecholamine Metabolism via Monoamine Oxidase Disrupts Oxidative Phosphorylation Efficiency in Glutathione Peroxidase-4 Deficient Mouse and Human Myocardium. *Free Radical Biology and Medicine*, 100, p.S147.
- Netto, L.E.S. et al., 1996. Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *The Journal of biological chemistry*, 271(26), pp.15315–15321.
- Neyestani, T.R. et al., 2007. Physiological dose of lycopene suppressed oxidative stress and enhanced serum levels of immunoglobulin M in patients with Type 2 diabetes mellitus: a possible role in the prevention of long-term complications. *Journal of endocrinological investigation*, 30(10), pp.833–838.
- Nielsen, H.B., 2003. Lymphocyte responses to maximal exercise: a physiological

- perspective. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 33(11), pp.853–867.
- Nieman, D.C. et al., 2003. Immune and oxidative changes during and following the Western States Endurance Run. *International journal of sports medicine*, 24(7), pp.541–547.
- Niess, A.M. et al., 1996. DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *International journal of sports medicine*, 17(6), pp.397–403.
- Nikolaidis, M.G., Kyparos, A., et al., 2007. Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, 32(2), pp.197–205.
- Nikolaidis, M.G., Paschalis, V., et al., 2007. Decreased blood oxidative stress after repeated muscle-damaging exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, 39(7), pp.1080–1089.
- Nikooyeh, B. & Neyestani, T.R., 2015. Oxidative stress, type 2 diabetes and vitamin D: past, present and future. *Diabetes/metabolism research and reviews*.
- Nimse, S.B. & Pal, D., 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), pp.27986–28006.
- Noda, Y. et al., 1997. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochemistry and molecular biology international*, 42(1), pp.35–44.
- Ogasawara, Y. et al., 2006. Formation of albumin dimers induced by exposure to peroxides in human plasma: a possible biomarker for oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 340(2), pp.353–358.
- Ogino, K. & Wang, D.-H., 2007. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: an approach to disease prevention. *Acta medica Okayama*, 61(4), pp.181–189.
- Oh-ishi, S. et al., 1997. Effects of endurance training on superoxide dismutase activity, content and mRNA expression in rat muscle. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 24(5), pp.326–332.
- Oowada, S. et al., 2012. Multiple free-radical scavenging capacity in serum. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 51(2), pp.117–121.
- Ostrowski, K. et al., 1999. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *The Journal of physiology*, 515 (Pt 1, pp.287–291.
- Padayatty, S.J. et al., 2003. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), pp.18–35.
- Paiva, S.A. & Russell, R.M., 1999. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(5), pp.426–433.

- Palmer, F.M. et al., 2003. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *European journal of applied physiology*, 89(1), pp.100–107.
- Parihar, A. et al., 2008. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 34(1), pp.6–17.
- Parker, L. et al., 2017. Exercise and Glycemic Control: Focus on Redox Homeostasis and Redox-Sensitive Protein Signaling. *Frontiers in Endocrinology*, 8, p.87.
- Patsoukis, N. et al., 2004. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience letters*, 357(2), pp.83–86.
- Pattison, D.I., Hawkins, C.L. & Davies, M.J., 2007. Hypochlorous acid-mediated protein oxidation: how important are chloramine transfer reactions and protein tertiary structure? *Biochemistry*, 46(34), pp.9853–9864.
- Paulsen, G. et al., 2012. Leucocytes, cytokines and satellite cells: what role do they play in muscle damage and regeneration following eccentric exercise? *Exercise immunology review*, 18, pp.42–97.
- Pawar, S.K. et al., 2016. Spectroscopic and molecular modeling approaches to investigate the binding of proton pump inhibitors to human serum albumin. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, pp.1–16.
- Peake, J., Nosaka, K. & Suzuki, K., 2005. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. *Exercise immunology review*, 11, pp.64–85.
- Pérez, S. et al., 2015. Redox signaling in acute pancreatitis. *Redox Biology*, 5, pp.1–14.
- Petersen, A.M.W. & Pedersen, B.K., 2005. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 98(4), pp.1154–1162.
- Phaneuf, S. & Leeuwenburgh, C., 2001. Apoptosis and exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, 33(3), pp.393–396.
- Phillips, T. et al., 2003. A dietary supplement attenuates IL-6 and CRP after eccentric exercise in untrained males. *Medicine and science in sports and exercise*, 35(12), pp.2032–2037.
- Pi, J. et al., 2010. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function. *Toxicology and applied pharmacology*, 244(1), pp.77–83.
- Pisoschi, A. & Petre Negulescu, G., 2012. *Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review*,
- Polson, D., Villalba, N. & Freeman, K., 2018. Optimization of a diagnostic platform

- for oxidation-reduction potential (ORP) measurement in human plasma. *Redox report : communications in free radical research*, 23(1), pp.125–129.
- Pourahmad, J. & Salimi, A., 2015. Isolated Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC), a Cost Effective Tool for Predicting Immunosuppressive Effects of Drugs and Xenobiotics. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 14(4), p.979.
- Powers, S.K. & Jackson, M.J., 2008. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, 88(4), pp.1243–1276.
- Priftis, A. et al., 2018. Cellspecific and roastingdependent regulation of the Keap1/Nrf2 pathway by coffee extracts. *Molecular medicine reports*, 17(6), pp.8325–8331.
- Prutz, W.A., 1996. Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Archives of biochemistry and biophysics*, 332(1), pp.110–120.
- Pyne, D.B., 1994. Exercise-induced muscle damage and inflammation: a review. *Australian journal of science and medicine in sport*, 26(3-4), pp.49–58.
- Quinlan, G.J., Martin, G.S. & Evans, T.W., 2005. Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*, 41(6), pp.1211–1219.
- Raastad, T. et al., 2003. Temporal relation between leukocyte accumulation in muscles and halted recovery 10-20 h after strength exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 95(6), pp.2503–2509.
- Radak, Z. et al., 2001. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exercise immunology review*, 7, pp.90–107.
- Radak, Z. et al., 2013. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxidants & redox signaling*, 18(10), pp.1208–1246.
- Rankinen, T. & Bouchard, C., 2008. Gene-physical activity interactions: overview of human studies. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 16 Suppl 3, pp.S47–50.
- Reddy, P. et al., 2010. *Ferric reducing ability of plasma and Lipid Peroxidation in Hemodialysis patients: Intradialytic changes*,
- Reddy, P.E. et al., Ferric Reducing Ability of Plasma and Lipid Peroxidation in Hemodialysis patients: Intradialytic changes. *Nephrourol Mon*, 02(03 SP 414-421).
- Reddy, Y.N. et al., 2004. *Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients*,

- Reichhold, S. et al., 2009. Endurance exercise and DNA stability: Is there a link to duration and intensity? *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(1), pp.28–38.
- Reiter, R.J. et al., 1995. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of pineal research*, 18(1), pp.1–11.
- Renke, J. et al., 2000. Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis. *Free radical biology & medicine*, 29(2), pp.101–104.
- Rimbach, G. et al., 1999. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archiv fur Tierernahrung*, 52(3), pp.203–222.
- Ristoff, E. & Larsson, A., 2002. Oxidative stress in inborn errors of metabolism: lessons from glutathione deficiency. *Journal of inherited metabolic disease*, 25(3), pp.223–226.
- Ristow, M. et al., 2009. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(21), pp.8665–8670.
- Roberts, C.K. & Sindhu, K.K., 2009. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sciences*, 84(21–22), pp.705–712.
- Robinson, J.M., 2008. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(2), pp.281–297.
- Roche, M. et al., 2008. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters*, 582(13), pp.1783–1787.
- Ron, D. & Harding, H.P., 2012. Protein-folding homeostasis in the endoplasmic reticulum and nutritional regulation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12).
- Sakellariou, G.K., Jackson, M.J. & Vasilaki, A., 2014. Redefining the major contributors to superoxide production in contracting skeletal muscle. The role of NAD(P)H oxidases. *Free radical research*, 48(1), pp.12–29.
- Sakelliou, A. et al., 2016. Evidence of a Redox-Dependent Regulation of Immune Responses to Exercise-Induced Inflammation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, p.2840643.
- Sannigrahi, S. et al., 2010. Antioxidant Potential of Crude Extract and Different Fractions of Enhydra fluctuans Lour. *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 9(1), pp.75–82.
- Schieber, M. & Chandel, N.S., 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Current biology : CB*, 24(10), pp.R453–R462.

- Schoenmakers, E. et al., 2010. Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans. *The Journal of clinical investigation*, 120(12), pp.4220–4235.
- Sciorati, C. et al., 2010. Co-administration of ibuprofen and nitric oxide is an effective experimental therapy for muscular dystrophy, with immediate applicability to humans. *British journal of pharmacology*, 160(6), pp.1550–1560.
- Seghrouchni, I. et al., 2002. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 321(1-2), pp.89–96.
- Sen, C.K., 2001. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Medicine and science in sports and exercise*, 33(3), pp.368–370.
- Sen, C.K., 1999. Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements. *Molecular and cellular biochemistry*, 196(1-2), pp.31–42.
- Sen, C.K., 1995. Oxidants and antioxidants in exercise. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 79(3), pp.675–686.
- Sen, C.K., 1998. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochemical pharmacology*, 55(11), pp.1747–1758.
- Sen, C.K. & Packer, L., 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(7), pp.709–720.
- Serinken, M.A., Gencoglu, C. & Kayatekin, B.M., 2013. The effect of eccentric exercise-induced delayed-onset muscle soreness on positioning sense and shooting percentage in wheelchair basketball players. *Balkan medical journal*, 30(4), pp.382–386.
- Serravite, D.H. et al., 2014. Effect of whole-body periodic acceleration on exercise-induced muscle damage after eccentric exercise. *International journal of sports physiology and performance*, 9(6), pp.985–992.
- Settle, T., 2014. *The Role of Uric Acid as an Antioxidant in Selected Neurodegenerative Disease Pathogenesis: A Short Review*,
- Shacter, E. et al., 1994. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: Examination by western blot immunoassay. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(5), pp.429–437.
- Sharoff, C.G. et al., 2010. Combining short-term metformin treatment and one bout of exercise does not increase insulin action in insulin-resistant individuals. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 298(4), pp.E815–23.

- Sheffield, W.P., McCurdy, T.R. & Bhakta, V., 2005. Fusion to albumin as a means to slow the clearance of small therapeutic proteins using the *Pichia pastoris* expression system: a case study. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 308, pp.145–154.
- Shen, B., Jensen, R.G. & Bohnert, H.J., 1997. Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. *Plant Physiology*, 115(2), pp.527–532.
- Shen, D. et al., 2005. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *The Journal of biological chemistry*, 280(27), pp.25305–25312.
- Shephard, R.J., 2003. Adhesion molecules, catecholamines and leucocyte redistribution during and following exercise. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 33(4), pp.261–284.
- Sies, H. & Jones, D., 2007. Oxidative Stress. In *Encyclopedia of Stress*. pp. 45–48.
- Simoneau, J.A. & Bouchard, C., 1989. Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities. *The American journal of physiology*, 257(4 Pt 1), pp.E567–72.
- Skenderi, K.P. et al., 2008. Changes in free radical generation and antioxidant capacity during ultramarathon foot race. *European journal of clinical investigation*, 38(3), pp.159–165.
- Smith, C. et al., 2008. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 38(11), pp.947–969.
- Smith, C. V et al., 1996. Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicology and applied pharmacology*, 140(1), pp.1–12.
- Smith, J.A., 1997. Exercise immunology and neutrophils. *International journal of sports medicine*, 18 Suppl 1, pp.S46–55.
- Smuder, A.J. et al., 2011. Exercise protects against doxorubicin-induced oxidative stress and proteolysis in skeletal muscle. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 110(4), pp.935–942.
- Sohet, F.M. et al., 2009. Lipid peroxidation is not a prerequisite for the development of obesity and diabetes in high-fat-fed mice. *The British journal of nutrition*, 102(3), pp.462–469.
- von Sonntag, C., 1991. The Chemistry of Free-Radical-Mediated DNA Damage. In W. Glass & M. Varma, eds. *Physical and Chemical Mechanisms in Molecular Radiation Biology SE - 10*. Basic Life Sciences. Springer US, pp. 287–321.
- Spanidis, Y., Priftis, A., et al., 2017. Oxidation of human serum albumin exhibits inter-individual variability after an ultra-marathon mountain race. *Experimental*

- and therapeutic medicine*, 13(5), pp.2382–2390.
- Spanidis, Y., Stagos, D., et al., 2017. Variations in Oxidative Stress Levels in 3 Days Follow-up in Ultramarathon Mountain Race Athletes. *Journal of strength and conditioning research*, 31(3), pp.582–594.
- L Spirlandeli, A., Deminice, R. & Jordao, A., 2013. *Plasma Malondialdehyde as Biomarker of Lipid Peroxidation: Effects of Acute Exercise*,
- St-Pierre, J. et al., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of biological chemistry*, 277(47), pp.44784–44790.
- Stadtman, E.R., 2015. Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, ageing and neutrophil function. *Trends in Biochemical Sciences*, 11(1), pp.11–12.
- Stagos, D. et al., 2014. Application of a new oxidation-reduction potential assessment method in strenuous exercise-induced oxidative stress. *Redox report: communications in free radical research*.
- Stagos, D. et al., 2015. Assessment of eccentric exercise-induced oxidative stress using oxidation-reduction potential markers. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015, p.204615.
- Steensberg, A. et al., 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, pp.237–242.
- Steinbacher, P. & Eckl, P., 2015. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules*, 5(2), pp.356–377.
- Stupka, N. et al., 2001. Cellular adaptation to repeated eccentric exercise-induced muscle damage. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 91(4), pp.1669–1678.
- Suzuki, Y.J., Carini, M. & Butterfield, D.A., 2010. Protein Carbonylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(3), pp.323–325.
- Svensson, M.B. et al., 2002. Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta physiologica Scandinavica*, 176(1), pp.43–56.
- Szweda, P.A., Friguet, B. & Szweda, L.I., 2002. Proteolysis, free radicals, and aging. *Free radical biology & medicine*, 33(1), pp.29–36.
- Tabak, O. et al., 2011. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale*, 34(3), pp.E163–71.

- Toft, A.D. et al., 2002. Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. *American journal of physiology. Cell physiology*, 283(1), pp.C289–95.
- Townsend, D.M., Tew, K.D. & Tapiero, H., 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 57(3-4), pp.145–155.
- Turell, L. et al., 2009. Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment . *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* , 42 , pp.305–311.
- Turner, J.E. et al., 2011. Prolonged depletion of antioxidant capacity after ultraendurance exercise. *Medicine and science in sports and exercise*, 43(9), pp.1770–1776.
- Turner, J.E. et al., 2014. Ultra-endurance exercise: unanswered questions in redox biology and immunology. *Biochemical Society Transactions*, 42(4), pp.989–995.
- Turner, J.E. et al., 2014. Ultra-endurance exercise: unanswered questions in redox biology and immunology. *Biochemical Society transactions*, 42(4), pp.989–995.
- Urakawa, H. et al., 2003. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88(10), pp.4673–4676.
- Vaamonde, D., Du Plessis, S.S. & Agarwal, A., 2016. *Exercise and human reproduction: induced fertility disorders and possible therapies*, Springer.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T. & Fiotakis, C., 2009. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, 27(2), pp.120–139.
- Valko, M. et al., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), pp.44–84.
- Varamenti, E.I. et al., 2013. Oxidative stress, inflammation and angiogenesis markers in elite female water polo athletes throughout a season. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 61, pp.3–8.
- Vasilaki, A. et al., 2006. Genetic modification of the manganese superoxide dismutase/glutathione peroxidase 1 pathway influences intracellular ROS generation in quiescent, but not contracting, skeletal muscle cells. *Free radical biology & medicine*, 41(11), pp.1719–1725.
- Vávrová, L. et al., 2013. Altered Activities of Antioxidant Enzymes in Patients with Metabolic Syndrome. *Obesity Facts*, 6(1), pp.39–47.

- Venturini, D., Simão, A.N.C. & Dichi, I., 2015. Advanced oxidation protein products are more related to metabolic syndrome components than biomarkers of lipid peroxidation. *Nutrition Research*, 35(9), pp.759–765.
- Vernon, P.J. & Tang, D., 2013. Eat-me: autophagy, phagocytosis, and reactive oxygen species signaling. *Antioxidants & redox signaling*, 18(6), pp.677–691.
- Veskoukis, A. et al., 2018. A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Current Opinion in Toxicology*.
- Veskoukis, A.S. et al., 2010. Differential effects of xanthine oxidase inhibition and exercise on albumin concentration in rat tissues. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 35(3), pp.244–250.
- Veskoukis, A.S. et al., 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), pp.1140–1154.
- Veskoukis, A.S. et al., 2016. Spectrophotometric assays for measuring redox biomarkers in blood. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 21(3), pp.208–217.
- Veskoukis, A.S., Tsatsakis, A.M. & Kouretas, D., 2012. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress & Chaperones*, 17(1), pp.11–21.
- Victor, V.M. et al., 2009. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis: a potential therapy with mitochondria-targeted antioxidants. *Infectious disorders drug targets*, 9(4), pp.376–389.
- Vina, J. et al., 2006. Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signalling and gene expression. Role of reactive oxygen species and (phyto)estrogens in the modulation of adaptive response to stress. *Free radical research*, 40(2), pp.111–119.
- Vincent, H.K. & Taylor, A.G., 2006. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *International journal of obesity (2005)*, 30(3), pp.400–418.
- Watson, J.D., 1AD. Type 2 diabetes as a redox disease. *The Lancet*, 383(9919), pp.841–843.
- Weidig, P., McMaster, D. & Bayraktutan, U., 2004. High glucose mediates pro-oxidant and antioxidant enzyme activities in coronary endothelial cells. *Diabetes, obesity & metabolism*, 6(6), pp.432–441.
- Weydert, C.J. & Cullen, J.J., 2010. MEASUREMENT OF SUPEROXIDE

DISMUTASE, CATALASE, AND GLUTATHIONE PEROXIDASE IN CULTURED CELLS AND TISSUE. *Nature protocols*, 5(1), pp.51–66.

- Wiecek, M. et al., 2015. Changes in oxidative stress and acid-base balance in men and women following maximal-intensity physical exercise. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 64(1), pp.93–102.
- Wiggs, M.P., 2015. Can endurance exercise preconditioning prevention disuse muscle atrophy? *Frontiers in Physiology*, 6(63).
- Wilhelm, M. et al., 2014. Inflammation and atrial remodeling after a mountain marathon. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 24(3), pp.519–525.
- Wilson, P.W.F. & Grundy, S.M., 2003. The metabolic syndrome: practical guide to origins and treatment: Part I. *Circulation*, 108(12), pp.1422–1424.
- Yamauchi, R., 1997. *Vitamin E: Mechanism of Its Antioxidant Activity*,
- Yen, G.C. & Duh, P. Der, 1994. Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(3), pp.629–632.
- Yermilov, V., Rubio, J. & Ohshima, H., 1995. Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS letters*, 376(3), pp.207–210.
- Yorek, M.A., 2003. The role of oxidative stress in diabetic vascular and neural disease. *Free radical research*, 37(5), pp.471–480.
- Young, I.S. & McEneny, J., 2001. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society transactions*, 29(Pt 2), pp.358–362.
- Young, I.S. & Woodside, J. V, 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), pp.176–186.
- Zembron-Lacny, A., Naczka, M., et al., 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), pp.945–951.
- Zembron-Lacny, A., Slowinska-Lisowska, M. & Ziemba, A., 2010. Integration of the thiol redox status with cytokine response to physical training in professional basketball players. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 59(2), pp.239–245.
- Zhang, H. & Forman, H.J., 2012. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Seminars in cell & developmental biology*, 23(7), pp.722–728.