



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΕΛΛΕΙΨΗ
ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ ΤΗΣ
6-ΦΩΣΦΟΡΙΚΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

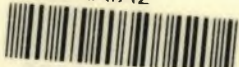
ΚΛΑΔΗ-ΣΚΑΝΔΑΛΗ ΑΘΗΝΑ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4717/1
Ημερ. Εισ.: 08-03-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΚΛΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087833

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, την πολύτιμη βοήθεια του και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κωσταρόπουλο Ιάσονα για την υπομονή του και την πολύτιμη βοήθεια του τόσο κατά την εκπόνηση του πειράματος όσο και στη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Ακόμη ευχαριστώ τον κ. Νικολαΐδη Μιχάλη για τις συμβουλές του σχετικά με την εκτέλεση του πειράματος, τη συγγραφή της συγκεκριμένης εργασίας και την περαιτέρω επαγγελματική μου πορεία..

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Στάγκο Δημήτριο για την ευχάριστη συνεργασία και βοήθεια του στο εργαστήριο καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου Ντάκα Γεωργία, Πάλλη Γιάννη, Σαββάκη Κωνσταντίνο και Κωτσάκη Στάθη για τη βοήθεια τους κατά τη συγγραφή της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
- <i>Οξυγόνο</i>	10
- <i>Ελεύθερες ρίζες</i>	10
Reactive Oxygen Species (ROS) & Reactive Nitrogen Species (RNS)	11
Παραγωγή Ελεύθερων Ριζών	12
Βιολογική Δράση Ριζών	14
- <i>Αντιοξειδωτικά</i>	18
Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά	19
Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά	22
- <i>Οξειδωτικό Στρες</i>	24
- <i>Άσκηση</i>	25
Άσκηση & Οξειδωτικό στρες	26
- <i>Αφυδρογονάση της 6- φωσφορικής γλυκόζης (G6PD)</i>	30
Μεταβολικός ρόλος της Αφυδρογονάσης της 6-Φωσφορικής Γλυκόζης	30
Χαρακτηριστικά του Ενζύμου G6PD	31
Ανεπάρκεια του Ενζύμου G6PD	32
Μεταλλάξεις & Τάξεις της Ανεπάρκειας σε G6PD	3,
Ποικιλίες της Ανεπάρκειας σε G6PD	34
Συχνότητες & Κατανομή των Διαφόρων Ποικιλιών G6PD	35
Ερυθροκύτταρα & Ανεπάρκεια του Ενζύμου G6PD	35
Οξειδωτικό Στρες σε Άτομα με Ανεπάρκεια του Ενζύμου G6PD	36
Οξειδωτικό Στρες Κατά την Άσκηση σε Άτομα με Ανεπάρκεια του Ενζύμου G6PD	36

- Σκοπός της Εργασίας	36
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	37
- Συμμετέχοντες	37
- Σωματομετρικά χαρακτηριστικά & προσδιορισμός μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου	37
- Άσκηση μικρής διάρκειας και μέγιστης έντασης μέχρι εξάντλησης	37
- Ορός αίματος & αιμόλυμα	37
- Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ορού	38
- Μαλονδυαλδεΐδη- TBARS (ThioBarbituric Acid-Reactive Substances)	38
- Καταλάση	39
- Ανηγγμένη Γλουταθειόνη (GSH)	40
- Οξειδωμένη Γλουταθειόνη (GSSG)	40
- Στατιστική Ανάλυση	41
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	42
- Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ορού	42
- Μαλονδυαλδεΐδη- TBARS (ThioBarbituric Acid-Reactive Substances)	43
- Καταλάση	44
- Ανηγγμένη Γλουταθειόνη (GSH)	45
- Οξειδωμένη Γλουταθειόνη (GSSG)	46
- Αναλογία GSH:GSSG	47
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	54

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>Εικόνα 1. Δομή ατόμου και μορίου οξυγόνου</i>	9
<i>Εικόνα 2. Κύκλος φωτοσύνθεσης – κυτταρικής αναπνοής</i>	10
<i>Εικόνα 3. Σχηματισμός ελεύθερων ριζών</i>	10
<i>Εικόνα 4. Μονοπάτι αντιδράσεων ελεύθερων ριζών.</i>	13
<i>Εικόνα 5. Παραγωγή ROS κατά τη φλεγμονή</i>	14
<i>Εικόνα 6. Ρόλος των ROS στην αντιμετώπιση μολύνσεων</i> (Από: Peter H Free Radicals and Human Disease)	15
<i>Εικόνα 7. Υπεροξειδωση Λιπιδίων</i> (Από: C Mylonas & D Kouretas (1999) Lipid Peroxidation and Tissue Damage)	17
<i>Εικόνα 8. Τρισδιάστατη δομή Cu-Zn SOD</i> (Από: www.carnegieinstitution.org/first_light_case.horm/MSI/MSI)	19
<i>Εικόνα 9. Αντίδραση καταλάσης</i> (Από: http://metallo.scripps.edu/Promise)	20
<i>Εικόνα 10. Τρισδιάστατη δομή καταλάσης</i> (Από: Brannon Carter & Robin L. Carter, Catalase: An Enzyme at Work)	20
<i>Εικόνα 11. Τρισδιάστατη δομή GSH-Px</i>	21
<i>Εικόνα 12. Αντίδραση GSH-Px</i> (Από: Lubert Stryer :Βιοχημεί, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 1997(2 ^η έκδοση))	21
<i>Εικόνα 13. Τρισδιάστατη δομή GR</i> (Από: PAI X-RAY CRYSTALLOGRAPHY LAB)	21
<i>Εικόνα 14. Το τριπεπτιδίο & η οξειδωμένη μορφή της GSH</i> (Από: Lubert Stryer :Βιοχημεί, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 1997(2 ^η έκδοση))	22
<i>Εικόνα 15. Σύνθεση GSH, ανακύκλωση GSH –GSSG & συμμετοχή GSH στην αναγωγή της βιταμίνης C</i>	22
<i>Εικόνα 16. Ασκορβικό οξύ</i>	23
<i>Εικόνα 17. Βιταμίνη E</i>	24
<i>Εικόνα 18. Η ιδέα του οξειδωτικού στρες</i> (Από: C Mylonas& D Kouretas (1999) Lipid Peroxidation and Tissue Damage)	25
<i>Εικόνα 19. Παραγωγή ελευθέρων ριζών από το σύστημα της οξειδάσης της ξανθίνης</i> (Από: Crossnan and Moldave, Methods in enzymology, Vol XII, 1967)	28
<i>Εικόνα 20. Δράση του G6PD στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Το NADPH που παράγεται χρησιμοποιείται για την εξουδετέρωση οξειδωτικών μέσω της</i>	30

γλουταθειόνης(*GSH-GSSG*)

(*Από: Hellsten, et. al. Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise*)

Εικόνα 21. Ρόλος G6PD στην προστασία από οξειδωτικό στρες

30

(*Από: Αρχές Ιατρικής Γενετικής Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 2^η έκδοση, 2003*)

Εικόνα 22. Τρισδιάστατη δομή G6PD

31

(*Από: Hellsten, et. al. Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise*)

Εικόνα 23. Γονίδιο του G6PD

32

(*Από: G Jacobasch & S. Rapoport, Hemolytic Anemias Due to Erythrocyte Enzyme Deficiencies*)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ & ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

ΠΙΝΑΚΕΣ

Πίνακας 1. Reactive Oxygen Species (ROS) (Από: Barry Halliwell., Encyclopedia of life sciences, Nature publishing group,2001)	10
Πίνακας 2. Reactive Nitrogen Species-RNS (Από: Barry Halliwell., Encyclopedia of life sciences, Nature publishing group,2001)	10
Πίνακας 3. Ασθένειες που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες (Από: H. Sharma, M.D., and C. Clark, M.D.)	18
Πίνακας 4. Τύποι Μεταλλάξεων που Οδηγούν σε Έλλειψη του Ενζύμου G6PD (Από: Hellsten, et. al. Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise)	33

ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

Ραβδόγραμμα 1. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ορού	42
Error Bar 1.	42
Ραβδόγραμμα 2. Μαλονδυαλδεύδη-TBARS	43
Error Bar 2.	43
Ραβδόγραμμα 3. Δραστικότητα Καταλάσης	44
Error Bar 3.	44
Ραβδόγραμμα 4. Ανηγγμένη γλουταθειόνη (GSH)	45
Error Bar 4.	45
Ραβδόγραμμα 5. Οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG)	46
Error Bar 5.	46
Ραβδόγραμμα 6. Αναλογία GSH /GSSG	47
Error Bar 6.	47

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADP: Διφωσφορική αδενοσίνη	NAD: Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (οξειδωμένη μορφή)
AMP: Μονοφωσφορική αδενοσίνη	NADH: Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο(ανηγμένη μορφή)
AP-1: Activator protein	NADPH: Φωσφορικό Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη	NF-κB:Nuclear factor-κB
CoA: Συνένζυμο Α	Oxο8-dA: 8-οξύ-2-δεοξαδενοσίνη
DHA: Δεϋδροασκορβικό οξύ	PMN: Πολυμορφοουδετερόφιλα
DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl	PPP: Πορεία φωσφορικών πεντοζών
DTNB: 5,5-DiThio-bis(2-NitroBenzoic acid)	PUFAs:Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
EDTA: Αιθυλενοδιάμινο τετραοξικό οξύ	RNS: Reactive Nitrogen Species
FAD: Φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο	ROS: Reactive Oxygen Species
G6PD:Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης	SOD: Δισμουτάση του υπεροξειδίου
G6PDD:Έλλειψη αφυδρογονάσης της 6-P γλυκόζης	TAC:Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
GR: Αναγωγάση της γλουταθειόνης	TBA: Θειοβαρβιτουρικό οξύ
GSH: Ανηγμένη μορφή γλουταθειόνη	TBARS:Ενώσεις που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ
GSH-Px/GPx: Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	TCA: Τριχλωροξικό οξύ
GSSG: Οξειδωμένη μορφή γλουταθειόνης	UQH [·] : Ημικινόνη
HPLC: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	UQH ₂ : Ουβικινόλη
IL-6: Ιντερλευκίνη-6	VP:Vynilpyridine
MAPK: Mitogen activated protein kinase	WHO:Παγκόσμιος οργανισμός υγείας
MDA: Μαλονδυαλδεϋδη	

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

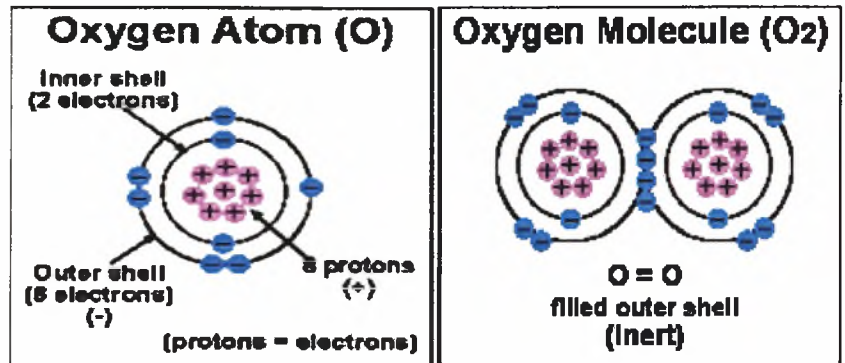
Είναι γνωστό ότι η έντονη άσκηση αποτελεί μια πολύ σημαντική πηγή οξειδωτικού στρες καθώς αυξάνει αισθητά την παραγωγή ελεύθερων ριζών. Επιπλέον η έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) μία πολύ συχνή, κυρίως στις μεσογειακές χώρες, φυλοσύνδετη ασθένεια έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή NADPH, το οποίο χρησιμοποιείται σαν αναγωγική δύναμη σε πολλές αντιδράσεις. Μια τέτοια αντίδραση είναι η αναγέννηση της ανηγμένης γλουταθειόνης από την οξειδωμένη, η οποία καταλύεται από την ρεδουκτάση της γλουταθειόνης, ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο. Σκοπός, λοιπόν της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η μελέτη της προσαρμογής διαφόρων αντιοξειδωτικών μηχανισμών και του προκαλούμενου οξειδωτικού στρες αμέσως μετά το τέλος έντονης άσκησης σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD (G6PDD). Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού, τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG), όπως επίσης και του λόγου GSH/GSSG και η δραστικότητα της καταλάσης του ορού, όσον αφορά τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Επίσης, μετρήθηκαν και τα επίπεδα της μαλονδυαλδεΐδης (MDA), που αποτελεί σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, δείκτη του οξειδωτικού στρες.

Έτσι βρέθηκε ότι η άσκηση δεν μετάβαλε την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού και τα επίπεδα της MDA σε καμία από τις δύο ομάδες ατόμων (φυσιολογικοί & με έλλειψη) και η αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού των φυσιολογικών καθώς και η ποσότητα της MDA δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτήν των G6PDD πριν και μετά την άσκηση. Επίσης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης μεταξύ των G6PDD μετά την άσκηση. Αντίθετα η δραστικότητα της καταλάσης στους φυσιολογικούς δεν επηρεάστηκε μετά την άσκηση και παρέμεινε στα ίδια επίπεδα. Ακόμη, υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της GSH μετά την άσκηση τόσο στους φυσιολογικούς όσο και στους G6PDD. Επιπλέον, υπάρχει σημαντική διαφορά στα επίπεδα της GSH ανάμεσα στις δυο εξεταζόμενες ομάδες τόσο πριν όσο και μετά την άσκηση. Συγκεκριμένα, η ποσότητα της GSH στους φυσιολογικούς είναι περίπου η διπλάσια απ'αυτήν των G6PDD πριν και μετά την άσκηση. Όσον αφορά τη GSSG, παρατηρείται πολύ μικρή μείωση (όχι στατιστικά σημαντική) των επιπέδων της μετά την άσκηση στους φυσιολογικούς, ενώ στους G6PDD τα επίπεδα της GSSG αυξάνονται σε πολύ μικρό βαθμό. Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της GSSG ανάμεσα στους φυσιολογικούς και τους G6PDD τόσο πριν όσο και μετά την άσκηση. Όπως και στην περίπτωση της GSH έτσι και σε αυτήν τα επίπεδα της GSSG στους φυσιολογικούς είναι περίπου διπλάσια από αυτά των G6PDD. Σχετικά με την αναλογία GSH:GSSG παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση μετά την άσκηση τόσο στους φυσιολογικούς όσο και στους G6PDD διαφέρει επίσης στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους φυσιολογικούς και τους G6PDD πριν αλλά και μετά την άσκηση. Από τα αποτελέσματα αυτά προέκυψε ότι η έλλειψη του G6PD έχει σημαντική επίδραση μόνο στη γλουταθειόνη αφήνοντας τους άλλους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ανεπηρέαστους.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οξυγόνο

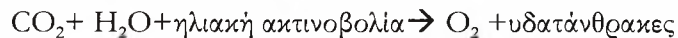
Το οξυγόνο παράγεται από τα φυτά κατά τη φωτοσύνθεση κι είναι απαραίτητο για την αερόβια αναπνοή των ζώων[1]. Το στοιχείο αυτό είναι το πιο άφθονο στον φλοιό της γης και βρίσκεται σε αναλογία 87% κατά βάρος στους ωκεανούς και 20% στην ατμόσφαιρα της Γης.



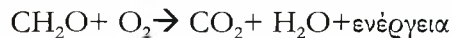
Εικόνα 1. Δομή ατόμου και μορίου οξυγόνου

Το οξυγόνο ανακαλύφθηκε από το Σουηδό *Carl Wilhelm S* το 1771, αλλά η συγκεκριμένη ανακάλυψη δεν έγινε αποδεκτή αμέσως κι έτσι είναι πιο ευρέως γνωστή η ανεξάρτητη προσπάθεια του *Joseph Priestley* το 1774. Η λέξη "οξυγόνο" προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «οξύ» και «γίνομαι» καθώς αρχικά πιστευόταν ότι όλα τα οξέα υποχρεωτικά περιέχουν οξυγόνο.

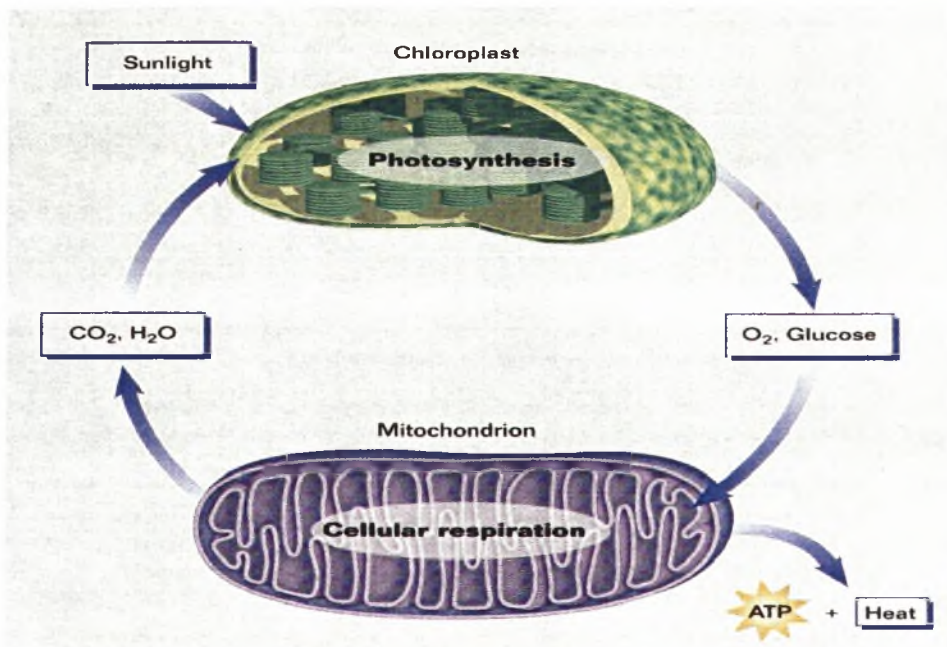
Περίπου 2,5 δις χρόνια πριν συντελείται το πιο σημαντικό, ίσως, βήμα στη εξέλιξη της ζωής. Θαλάσσιοι μονοκύτταροι οργανισμοί χρησιμοποιούν τη φωτοσύνθεση για την παραγωγή της τροφής τους [2]. Με αυτήν τη διαδικασία παγιδεύουν την ηλιακή ενέργεια και την χρησιμοποιούν για τη μετατροπή του H₂O και του CO₂ σε υδατάνθρακες με ταυτόχρονη απελευθέρωση O₂ στην ατμόσφαιρα.



Έτσι καθώς τα φωτοσυνθετικά βακτήρια πλήθαιναν τα ποσά του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα αυξάνονταν συνεχώς, οπότε εμφανίστηκαν οι πρώτοι οργανισμοί οι οποίοι ήταν ανεκτικοί στην υψηλή περιεκτικότητα της ατμόσφαιρας σε οξυγόνο και χρησιμοποιούσαν αυτό το στοιχείο στη διαδικασία μετατροπής της τροφής σε ενέργεια (ATP) [2].



Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή σαν αναπνοή, και επικράτησε κατά την εξέλιξη στους περισσότερους αερόβιους οργανισμούς, καθώς η ενέργεια που παράγεται από την αναπνοή είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτήν της ζύμωσης. [3]. Η αναπνοή μαζί με τη φωτοσύνθεση δημιουργεί έναν κύκλο όπου το οξυγόνο που παράγεται κατά τη φωτοσύνθεση χρησιμοποιείται από άλλους οργανισμούς για την παραγωγή ενέργειας. Το τελικό προϊόν της αναπνοής είναι CO₂ το οποίο χρησιμοποιείται από τα φυτά κλείνοντας έτσι ο κύκλος (εικόνα 2)[4].



Εικόνα 2. Κύκλος Φωτοσύνθεσης – Κυτταρικής αναπνοής

Αναμφισβήτητα το οξυγόνο είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με τη ζωή καθώς η πλειοψηφία των οργανισμών εξελίχθηκε έτσι ώστε να το χρησιμοποιεί για την παραγωγή ενέργειας. Ωστόσο, ο αερόβιος μεταβολισμός πέρα από τα μεγάλα ποσά ενέργειας συνεπάγεται επίσης και την παραγωγή τοξικών προϊόντων όπως για παράδειγμα των ελεύθερων ριζών.

Ελεύθερες Ρίζες

Ελεύθερη Ρίζα είναι ένα χημικό είδος που περιέχει περιττό αριθμό ηλεκτρονίων σθένους και συνεπώς διαθέτει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα [5]. Η διαμόρφωση αυτή είναι εξαιρετικά ασταθής με αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες να αντιδρούν ταχύτατα με άλλα γειτονικά μόρια ή άλλες ελεύθερες ρίζες προκειμένου να αποκτήσουν 4 ζεύγη ηλεκτρονίων στην εξωτερική τους στιβάδα σχηματίζοντας ταυτόχρονα επιπλέον ελεύθερες ρίζες (εικόνα 3.). Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα είναι ένα άτομο H με ένα πρωτόνιο κι ένα μονήρες ηλεκτρόνιο



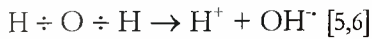
Εικόνα 3. Σχηματισμός ελεύθερων ριζών.

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν μέσω:

1. Απώλειας ενός ηλεκτρονίου από μια μη-ρίζα: $A \rightarrow e^- + A^+$
2. Απόκτησης ενός μονήρους ηλεκτρονίου από μια μη-ρίζα: $A + e^- \rightarrow A^-$

3. Ομολυτικής διάσπασης, όπου ο ομοιοπολικός δεσμός διασπάται συμμετρικά, έτσι ώστε κάθε τμήμα του μορίου λαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο: $\text{H} \div \text{O} \div \text{H} \rightarrow \text{H}^\cdot + \text{OH}^\cdot$

4. Ετερολυτικής διάσπασης, όπου ο ομοιοπολικός δεσμός διασπάται μη-συμμετρικά, έτσι ώστε και τα δύο δεσμικά ηλεκτρόνια παραμένουν στο ίδιο τμήμα, αφήνοντας το άλλο με ένα κενό τροχιακό:



Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να πάρουν μέρος σε δύο είδη αντιδράσεων. Καταρχήν μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους (αντιδράσεις ρίζας-ρίζας) οπότε παράγεται υποχρεωτικά μη-ρίζα και το προϊόν αυτό είναι συνήθως λιγότερο δραστικό από τα αντιδρώντα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων αντιδράσεων είναι:



Επίσης, οι ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με μια μη-ρίζα οπότε σχηματίζεται μια νέα ελεύθερη ρίζα. Συγκεκριμένα, οι ρίζες κατά την αντίδρασή τους με άλλα μόρια, προκειμένου να αποκτήσουν τη συμπληρωμένη οκτάδα ηλεκτρονίων των ευγενών αερίων, μετατρέπουν το μόριο-στόχο σε ρίζα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την έναρξη μίας αλυσιδωτής αντίδρασης, η οποία συνεχίζεται μέχρι να συναντηθούν δύο ρίζες οπότε λαμβάνει χώρα αντίδραση ρίζας-ρίζας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντίδρασης ρίζας-μη ρίζας αποτελεί η αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσής των λιπών που περιγράφεται με λεπτομέρεια παρακάτω [7].

Δραστικά Στοιχεία Οξυγόνου (ROS) & Δραστικά Στοιχεία Αζώτου (RNS)

Σήμερα ο όρος "ελεύθερες ρίζες" τείνει να αντικατασταθεί από τον όρο **Reactive Oxygen Species-ROS**, ο οποίος αναφέρεται στις ρίζες όπου το μονήρες ηλεκτρόνιο εντοπίζεται στο οξυγόνο καθώς επίσης και σε κάποια ιδιαίτερα δραστικά παράγωγα του οξυγόνου που όμως δεν είναι ρίζες [7]. Η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου δίνει μία μεγάλη ποικιλία ROS, τα οποία είναι γενικά βραχύβια και ιδιαίτερα δραστικά (πίνακας1). Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν:

1. Μόρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Το H_2O_2 είναι μοναδικό στο ότι μπορεί να μετατραπεί σε ιδιαίτερα καταστροφικές ρίζες, αλλά μπορεί επίσης να εξουδετερωθεί και να αποβληθεί από τον οργανισμό σαν νερό.

2. Ιόντα, όπως το υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

3. Ελεύθερες ρίζες, όπως το ιόν υδροξυλίου (OH^\cdot). Η ρίζα υδροξυλίου έχει μικρό χρόνο ημιζωής αλλά είναι η πιο καταστροφική καθώς μπορεί να αντιδρά με τα περισσότερα βιομόρια.

4. Το ανιόν του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$), το οποίο προκύπτει όταν το οξυγόνο (O_2) αποκτά ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο με αποτέλεσμα το μόριο να έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Μέσα στα μιτοχόνδρια παρατηρείται

συνεχής παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ κι ο ρυθμός σχηματισμού εξαρτάται από το ποσό του οξυγόνου που ρέει μέσω των μιτοχονδρίων.

<i>Ρίζες</i>	<i>Μη ρίζες</i>
Σουπεροξειδίο ($O_2^{\cdot-}$)	Υπεροξειδίο υδρογόνου (H_2O_2)
Ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot})	Υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$)
Ρίζα αλκοξυλίου (RO^{\cdot})	Υποβρωμιώδες οξύ ($HOBr$)
	Όζον (O_3)
	Singlet oxygen ($^1\Delta_g$)

Πίνακας 1. *Reactive Oxygen Species (ROS)*

Εκτός από τα ROS υπάρχει και μια επιπλέον σημαντική κατηγορία ελεύθερων ριζών, αυτών που δημιουργούνται από το άζωτο (**Reactive Nitrogen Species-RNS**). Τα τελευταία είναι δραστικά μόρια που περιέχουν άζωτο και μπορούν να παίρνουν μέρος σε πολλές αντιδράσεις (πίνακας 2.) [7].

<i>Ρίζες</i>	<i>Μη ρίζες</i>
Μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\cdot})	Νιτρώδες οξύ (HNO_2)
Διοξειδίο του αζώτου (NO_2^{\cdot})	Νιτρικό κατιόν (NO^+)
	Νιτρικό ανιόν (NO^-)
	Τετροξειδίο του αζώτου (N_2O_4)
	Τριοξειδίο του αζώτου (N_2O_3)
	Υπεροξυνιτρικό ($ONOOH$)

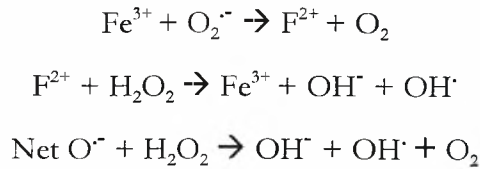
Πίνακας 2. *Reactive Nitrogen Species (RNS)*

Παραγωγή Ελεύθερων Ριζών

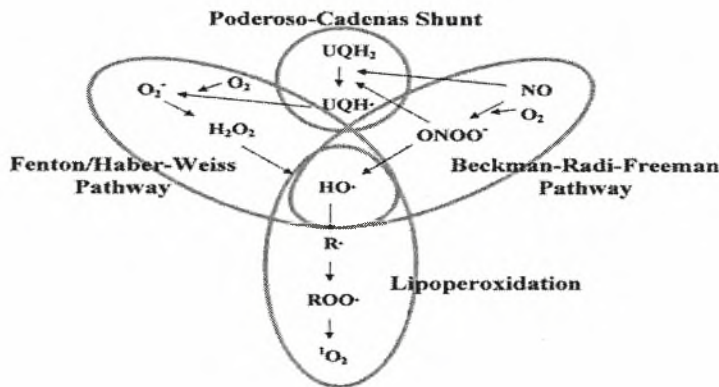
Η παραγωγή ελεύθερων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς είναι συνεχής κι αναπόφευκτη. Υπάρχουν πολλές πηγές παραγωγής ριζών οι οποίες είναι τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς.

1. Η σημαντικότερη, ίσως, ενδογενής πηγή ελεύθερων ριζών είναι η διαδικασία της **οξειδωτικής φωσφορυλίωσης** που λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και υπολογίζεται ότι 2-5% περίπου του οξυγόνου που χρησιμοποιείται για τον αερόβιο μεταβολισμό μετατρέπεται σε ROS. Όπως είναι γνωστό η απαραίτητη, για τους οργανισμούς, ενέργεια (ATP) παράγεται κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας στο οξυγόνο. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, κάποια ηλεκτρόνια διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών σαν παραπροϊόντα. Συγκεκριμένα, ένα ποσοστό των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται για την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε σουπεροξειδίο ($O_2^{\cdot-}$) από την ημικινοή (UQH^{\cdot}) της NADH-αναγωγάσης του συνενζύμου Q (το πρώτο ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας) [8]. Ένα μέρος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) ανάγεται και δίνει υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), μια αντίδραση που καταλύεται από την Mn- σουπεροξειδική δισμουτάση

(Mn-SOD). Η παραγωγή αυτών των δύο ROS μπορεί να προκαλέσει την έναρξη κάποιας αλυσιδωτής αντίδρασης ριζών λόγω παραγωγής της ρίζας υδροξυλίου (OH[•]) μέσω της αντίδρασης Fenton- Haber Weiss:



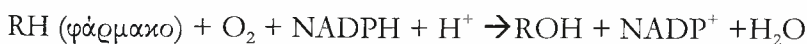
Μέσα στο μιτοχόνδριο παράγεται επίσης μονοξείδιο του αζώτου (NO) απ'την ενζυμική δράση της συνθάσης του NO η οποία βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) αντιδρά με το σουπεροξειδίο (O₂^{•-}) και παράγει υπεροξυνιτρικό (ONOO[•]), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ (ONOOH) [9]. Από το τελευταίο τελικά σχηματίζονται οι ρίζες OH[•] και NO₂[•] [10]. Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH₂) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH[•]) η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου (O₂^{•-}), όπως προαναφέρθηκε (εικόνα 4) [8]. Τέλος, οι αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων του ενδοπλασματικού δικτύου και των χλωροπλαστών αποτελούν, επίσης πηγές ελεύθερων ριζών[11].



Εικόνα 4. Μονοπάτια αντιδράσεων ελεύθερων ριζών. Ο σχηματισμός του υπεροξειδίου(O₂^{•-}) και του μονοξειδίου του αζώτου οδηγεί στην παραγωγή της ρίζας υδροξυλίου

2. Μία άλλη ενδογενής πηγή ROS, κυρίως υπεροξειδίου του υδρογόνου(H₂O₂), είναι τα **υπεροξειδιοσώματα**, μικρά μεμβρανικά κυστίδια που περιέχουν εξειδικευμένα ένζυμα τα οποία μεσολαβούν σε ποικίλες αντιδράσεις οξειδωσης [12].

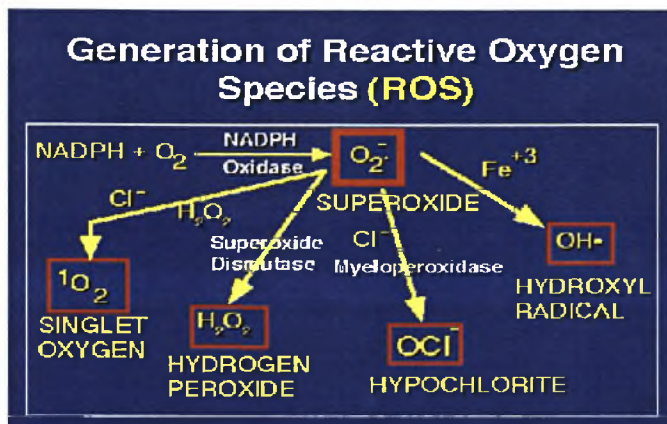
3. Επίσης, το **σύστημα του κυτοχρώματος P-450** αποτελεί μία σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών. Τα ένζυμα της ομάδας του κυτοχρώματος P-450 εμπλέκονται στην "αποτοξίνωση" ξενοβιοτικών παραγόντων (π.χ. φάρμακα, εντομοκτόνα κ.α.) μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο και οξειδώνοντας το υπόστρωμα (π.χ. φάρμακο).



Κατά την αντίδραση αυτή παράγονται ROS σαν παραπροϊόντα [13].

4. Ακόμη, διάφορα βιομόρια μεταξύ των οποίων, φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες, και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) [14].

5. Οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις, ιδιαίτερα οι χρόνιες, μπορεί να αποτελέσουν μία σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών. Τα λευκοκύτταρα όπως τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα απελευθερώνουν έναν μεγάλο αριθμό ROS μεταξύ των οποίων υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), ρίζα υδροξυλίου (OH^{\cdot}), υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$) και μονοξειδίου του αζώτου (NO^{\cdot}) (εικόνα 5)[15,16].



Εικόνα 5. Παραγωγή ROS κατά τη φλεγμονή

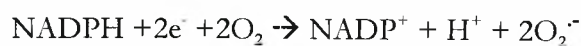
Από την άλλη στις εξωγενείς πηγές ελεύθερων ριζών περιλαμβάνονται το κάπνισμα, η ρύπανση του περιβάλλοντος, η κατανάλωση αλκοόλ, η άσκηση, (η υποξία ή υπεροξία), η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (συμπεριλαμβανομένης της ηλιακής) και διάφορα συντηρητικά τροφών. Συγκεκριμένα αυξημένα επίπεδα 8-υδροξυγουανίνης (μεταλλαξιγόνος βάσης που είναι αποτέλεσμα δράσης ελεύθερων ριζών) έχουν παρατηρηθεί στα λευκοκύτταρα μετά από άσκηση [17,18], κάπνισμα [19,20], έκθεση σε καπνό [21] και κατανάλωση αλκοόλ [22]. Επίσης, πολλές τροφές περιέχουν διάφορα χημικά, όπως εντομοκτόνα και φυτοφάρμακα, που οδηγούν στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών μέσα στο σώμα και κάποιες έτοιμες τροφές περιέχουν σε υψηλά επίπεδα υπεροξειδία λιπιδίων τα οποία σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες που βλάπτουν το καρδιαγγειακό σύστημα. Τέλος, μία άλλη πολύ σημαντική πηγή ελεύθερων ριζών είναι το **άγχος**. Το τελευταίο ενεργοποιεί την απόκριση του σώματος στο στρες η οποία έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών. Επιπλέον, οι ορμόνες που εμπλέκονται στην απόκριση στο στρες όπως η κορτιζόλη και οι κατεχολαμίνες αποικοδομούνται σε ιδιαίτερα καταστροφικές ελεύθερες ρίζες.

Βιολογική Δράση Ριζών

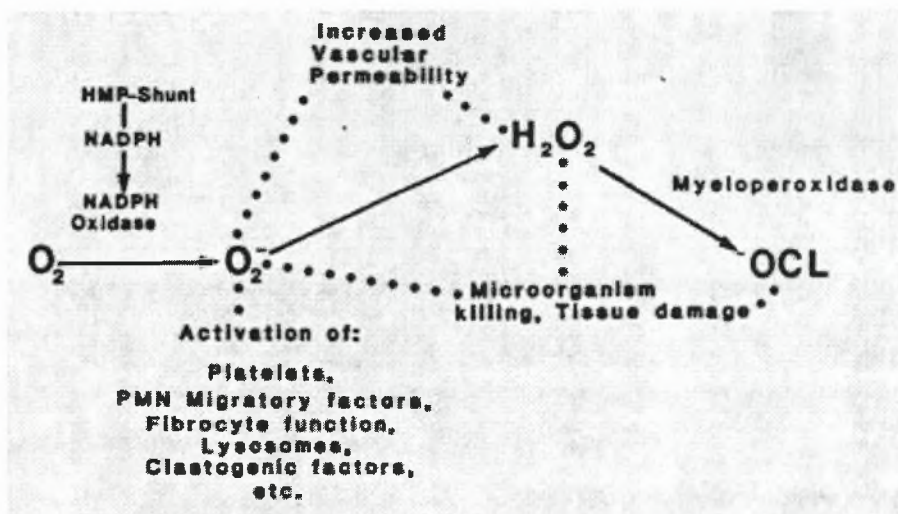
Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται συνεχώς μέσα στον οργανισμό και η βιολογική τους δράση μπορεί να έχει τόσο θετικές όσο και αρνητικές επιδράσεις.

Θετικές Επιδράσεις

1. Η παραγωγή ελεύθερων ριζών από φαγοκύτταρα αποτελεί το σημαντικότερο μικροβιοκτόνο μηχανισμό και μπορεί επίσης να μεσολαβεί σε πολλά στάδια της φλεγμονώδους αντίδρασης. Συγκεκριμένα, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα διαθέτουν μια μεμβρανική NADPH οξειδάση η οποία καταλύει την αντίδραση:



Στη συνέχεια η σουπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το $O_2^{\cdot-}$ σε H_2O_2 το οποίο καταστρέφει τα εγκλωπωμένα βακτήρια. Στα ουδετερόφιλα η μυελοϋπεροξειδάση μετατρέπει το H_2O_2 σε μικροβιοκτόνα συστατικά μεταξύ των οποίων πιθανόν είναι και το υποχλωριώδες οξύ (εικόνα 6). Αυτή η δράση των ROS είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην προστασία του οργανισμού από διάφορους μολυσματικούς παράγοντες [14].



Εικόνα 6. Ρόλος των ROS στην αντιμετώπιση μολύνσεων

2. Πολλά στοιχεία δείχνουν ότι τα ROS συμμετέχουν σε πολλά ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Για παράδειγμα συμμετέχουν στη ρύθμιση των υποδοχέων ινσουλίνης με δράση κινάσης τυροσίνης [23,24]. Επίσης ενεργοποιούν τις κυτταροπλασματικές πρωτεϊνικές κινάσες [25-28], τον καταρράκτη κινασών MAPK καθώς και τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1[29-33] και NF- κ B [34]. Επιπλέον τα ROS ρυθμίζουν μία ποικιλία μοριακών μηχανισμών που συνδέονται με την ανοσία, την προσκόλληση κυττάρου-κυττάρου, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό και την απόπτωση[35].

3. Το H_2O_2 έχει επίσης πολλές χρήσιμες λειτουργίες. Για παράδειγμα, χρησιμοποιείται από το ένζυμο θυρεοειδική υπεροξειδάση και βοηθά στην παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών. Επίσης, συχνά χρησιμοποιείται σαν διακυτταρικό σηματοδοτικό μόριο και τέλος μπορεί να αναστέλλει τις πρωτεϊνικές φωσφατάσες αυξάνοντας έτσι το δίκτυο φωσφορύλιωσης των πρωτεϊνών [7].

4. Το NO παίζει διαφορετικούς ρόλους στις φυσιολογικές λειτουργίες δρώντας σαν διακυτταρικό σήμα σε πολλά κυτταρικά μονοπάτια [36]. Το NO έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την κυτταρική αναπνοή[37] και την παραγωγή ενέργειας καθώς και να μεταβάλλει το μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου από απόπτωση σε νέκρωση σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Αυτές οι δράσεις του NO οφείλονται στην ικανότητα του να αναστέλλει την μιτοχονδριακή παραγωγή ενέργειας [38]. Το NO επίσης, βοηθά στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος και συμμετέχει στην εξουδετέρωση των παράσιτων από τα μακροφάγα.

Αρνητικές Επιδράσεις

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών είναι αποτέλεσμα πολλών φυσιολογικών διεργασιών κι αναμφισβήτητα έχουν σημαντική βιολογική δράση μέσα στο σώμα. Ωστόσο, δεν μπορούν να παραβλεφθούν οι αρνητικές τους επιδράσεις οι οποίες μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

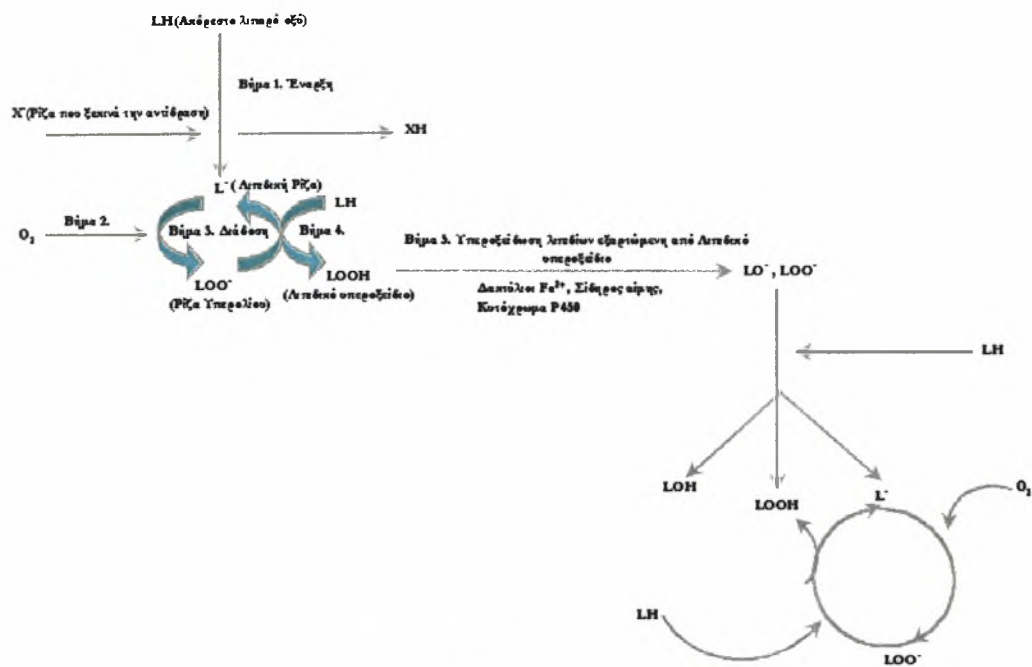
1. Επίθεση σε μακρομόρια
2. Γήρανση
3. Πρόκληση ασθενειών

Επίθεση σε μακρομόρια: Η μακροπρόθεσμη έκθεση του οργανισμού στα ROS έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση βιολογικών μορίων όπως το DNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες [39].

Τα ROS μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις, καταστροφή του DNA και των χρωμοσωμάτων και να επάγουν την κυτταρική διαίρεση. Επίσης πιστεύεται ότι μέσω της καταστροφής του DNA επηρεάζουν τη λειτουργία των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου[40-45].

Η έκθεση των ζωντανών οργανισμών στην ιονίζουσα ακτινοβολία οδηγεί στην *in vivo* ομολυτική σύντηξη των δεσμών O-H στα μόρια νερού με αποτέλεσμα την παραγωγή OH[•] και H[•]. Οι ρίζες υδροξυλίου είναι ιδιαίτερα δραστικές και καταστρέφουν το DNA κι άλλα βιομόρια. Συγκεκριμένα, η ρίζα OH[•] αντιδρά με τη γουανίνη του DNA παράγοντας τη ρίζα [8-υδροξυγουανίνη][•]. Η τελευταία μπορεί στη συνέχεια να χάσει ένα ηλεκτρόνιο και να σχηματίσει τη μεταλλαξιγόνο βάση 8-υδροξυγουανίνη. Η βάση αυτή προκαλεί μεταλλάξεις GC→TA[46]. Επίπλέον, τόσο η αδενίνη όσο και οι πυριμιδίνες μπορούν να τροποποιηθούν μετά από αλληλεπίδραση με τη ρίζα OH[•] [47]. Για παράδειγμα, η αλληλεπίδραση με τον C8 της αδενίνης οδηγεί στο σχηματισμό 8-οξυ-2-δεοξυαδενοσίνη (oxo8dA), η οποία σχετίζεται με μεταλλάξεις A→G,C. Επίσης, η οξείδωση της κυτοσίνης δίνει 5,6-διυδρο-5,6-διυδροξυ-2-δεοξουριδίνη, η οποία επάγει C→T μεταλλάξεις. Τέλος, η οξείδωση της θυμίνης δίνει thymidine glycol η οποία επάγει T→C μεταλλάξεις.

Όλα τα βιομόρια δέχονται επιθέσεις από τις ελεύθερες ρίζες αλλά τα λιπίδια είναι τα πιο επιδεκτικά. Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (**PolyUnsaturated Fatty Acids-PUFAs**), τα οποία προσβάλλονται από ελεύθερες ρίζες οδηγώντας έτσι σε μία διαδικασία που είναι γνωστή σαν **υπεροξειδωση λιπιδίων**. Η υπεροξειδωση λαμβάνει χώρα μέσω μίας αλυσιδωτής αντίδρασης ριζών η οποία αρχίζει με την οξείδωση ενός PUFA από μία ελεύθερη ρίζα οδηγώντας στο σχηματισμό μίας λιπιδιακής ρίζας. Η τελευταία αντιδρά με το οξυγόνο παράγοντας μία ρίζα υπεροξυλίου. Η ρίζα αυτή προκαλεί την διατήρηση της αντίδρασης και την υπεροξειδωση επιπλέον λιπιδίων, καθώς οξειδώνει ένα νέο PUFA οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό λιπιδικών υπεροξειδίων. Τα τελευταία μπορούν να διασπασθούν σε διάφορες ελεύθερες ρίζες και κυρίως αλδεύδες. Η καταστροφή των μεμβρανικών λιπιδίων και τα τελικά προϊόντα της υπεροξειδωσής τους είναι επικίνδυνα για την επιβίωση των κυττάρων ακόμα και των ιστών (εικόνα 7) [47].



Εικόνα 7. Υπεροξείδωση Λιπιδίων

Τέλος, οι πρωτεΐνες αποτελούν επίσης μακρομόρια που επηρεάζονται από τις ελεύθερες ρίζες. Μερικά ROS, όπως οι ρίζες υδροξυλίου και αλκοξυλίου εμπλέκονται κυρίως στην οξείδωση των πρωτεϊνών και μπορούν να αντιδράσουν είτε με την πρωτεΐνη κατευθείαν είτε με μόρια όπως σάκχαρα και λιπίδια παράγοντας προϊόντα που αντιδρούν με τις πρωτεΐνες. Οι τροποποιήσεις που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγή της λειτουργίας των πρωτεϊνών, σε χημική διάσπασή τους ή σε αυξημένη επιδεικτικότητα σε πρωτεόλυση[23-25]. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η καταστροφή των πρωτεϊνών αυξάνεται με την ηλικία [48] και ότι η υπεροξείδωση των λιπιδίων διαταράσσει τη λειτουργία των πρωτεϊνών που βρίσκονται προσδεμένες στη μεμβράνη [49]. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες είναι πιθανόν να ενεργοποιήσουν την παραγωγή αντισωμάτων και αυτοάνοσες διαδικασίες.

Γήρανση: Η άποψη ότι η γήρανση είναι αποτέλεσμα της δράσης των ελεύθερων ριζών προτάθηκε για πρώτη φορά το 1956 από τον *Harman* (J. Gerontol II, 298 (1956)) και έκτοτε έχουν γίνει πολλές μελέτες τα αποτελέσματα των οποίων υποστηρίζουν αυτήν τη θεωρία. Σύμφωνα με αυτή, η γήρανση είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης οξειδωτικών καταστροφών οι οποίες προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Σήμερα υπάρχουν πολλά πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται στη διαδικασία της γήρανσης. Η γήρανση που οφείλεται στη δράση των ελεύθερων ριζών λαμβάνει χώρα μέσω καταστροφής του μιτοχονδριακού DNA (το οποίο σε αντίθεση με το πυρηνικό διαθέτει λιγότερους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς και συνεπώς είναι πιο ευαίσθητο σε οξειδωτικές βλάβες[50]) και απενεργοποίησης κάποιων ειδικών πρωτεϊνών, όπως η μετατοπάζη ATP-ADP. Η διαδικασία αυτή οδηγεί στην δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, τα οποία δεν μπορούν να διατηρήσουν το δυναμικό της μεμβράνης και τη σύνθεση του ATP. Τα "ελαττωματικά" μιτοχόνδρια απελευθερώνουν ιόντα Ca²⁺ και κυτόχρωμα C στο κυτταρόπλασμα και σηματοδοτούν την καταστροφή των κυτταρικών οργανιδίων και την απόπτωση των κυττάρων.

Πρόκληση ασθενειών: Οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται στην παθολογία πάνω από 100 ανθρωπινων ασθενειών, από το αιμορραγικό σοκ μέχρι την κυστική ίνωση και το AIDS. Η δράση των ελεύθερων ριζών και των ROS συμβάλλει σε πολλά από τα λιγότερο σοβαρά συμπτώματα της γήρανσης όπως οι ρυτίδες και τα γκριζα μαλλιά, και τουλάχιστον το 85% των χρόνιων και εκφυλιστικών ασθενειών οφείλεται στην οξειδωτική καταστροφή [51] (πίνακας 3).

Ασθένειες που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες

Καρκίνος

Ρευματοειδής αρθρίτιδα (Cross et al 1987, Greenwald & Moy 1979, 1980, Halliwell 1981, 1989, Del Maestro et al 1982, Fligel et al 1984)

Αρτηριοσκληρόνωση

Έλκος

Καρδιακές νόσοι

Ηλιακό έγκαυμα

Εγκεφαλικό

Καταρράκτης (Niwa & Hansen, 1989, Yagi 1977)

Εμφύσημα (Cross et al., 1987)

Γήρανση

Σακχαρώδης διαβήτης (Sato et al., 1979)

Νόσος Parkinson

Οστεοπόρωση (Hooper 1989, Stringer et al 1989)

Νόσος Alzheimer

Πίνακας 3. Ασθένειες που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες

Αντιοξειδωτικά

Τα συστατικά των ζωντανών κυττάρων είναι ευπαθή σε επιθέσεις ελεύθερων ριζών, κι έτσι η φυσική επιλογή οδήγησε κατά την εξέλιξη στη δημιουργία ενός αριθμού ενδοκυτταρικών μηχανισμών που εξισορροπούν ή ελέγχουν τη δραστηριότητα των ROS [3]. Υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία αντιοξειδωτικών μηχανισμών (ενζυμικών και μη) στα ανθρώπινα κύτταρα που παρέχουν προστασία από τη δράση των ελεύθερων ριζών. Επιπρόσθετα, υπάρχουν και πολλά διαιτητικά αντιοξειδωτικά που συμμετέχουν κι αυτά στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών. Ο όρος "αντιοξειδωτικό" αναφέρεται σε οποιαδήποτε ουσία, η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτές ενός υποστρώματος που μπορεί να οξειδωθεί, καθυστερεί ή εμποδίζει σε σημαντικό βαθμό την οξείδωση αυτού του υποστρώματος. Τα αντιοξειδωτικά είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά καθώς μπορούν να προσφέρουν τα ηλεκτρόνιά τους στις ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα οι τελευταίες να μην χρειάζεται να επιτεθούν σε κυτταρικά συστατικά κι έτσι να τερματίζεται η αλυσιδωτή αντίδραση. Μετά την αντίδραση τα αντιοξειδωτικά μετατρέπονται σε ρίζες οι οποίες όμως δεν είναι δραστικές. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να καταταχτούν σε τέσσερις κατηγορίες ανάλογα με τη λειτουργία τους [52]:

1. Αντιοξειδωτικά που καταστέλλουν το σχηματισμό ελεύθερων ριζών (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, καταλάση, σεληνιοπρωτεΐνες, τρανσφερρίνη, φερριτίνη, λακτοφερρίνη, καρτενοειδή). Τα αντιοξειδωτικά αυτά αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια στις ελεύθερες ρίζες.
2. Αντιοξειδωτικά που εμποδίζουν την έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων και/ή διακόπτουν τη διάδοση της αντίδρασης. Αυτά ανήκουν στη δεύτερη γραμμή άμυνας
3. Επιδιορθωτικά και *de novo* αντιοξειδωτικά (πρωτεολυτικά ένζυμα, ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA).

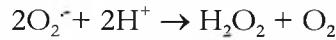
4. Η τέταρτη γραμμή άμυνας είναι μία προσαρμογή όπου το σήμα για την παραγωγή και τις αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών ενεργοποιεί το σχηματισμό και τη μεταφορά των κατάλληλων αντιοξειδωτικών στη σωστή θέση.

Επιπλέον, τα αντιοξειδωτικά του σώματός μας μπορούν να καταταχθούν σε δυο κατηγορίες ανάλογα με τη χημική τους φύση:

1. Ενζυμικά
2. Μη ενζυμικά

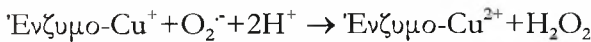
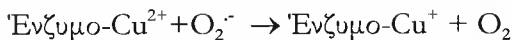
Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

1. **Σουπεροξειδική Δισμουτάση (SOD):** Η SOD αποτελεί το πιο σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού και καταλύει την παρακάτω αντίδραση:

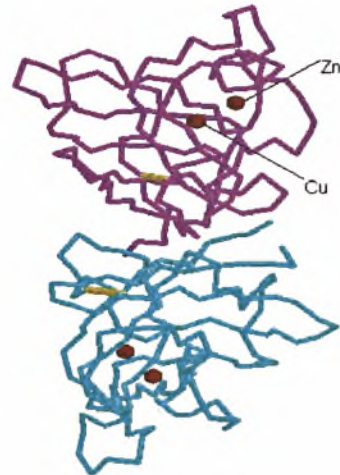


Υπάρχουν τρεις τύποι SOD: 1) η κυτταροπλασματική Cu-Zn SOD, 2) η μιτοχονδριακή Mn-SOD και 3) η εξωκυτταρική SOD.

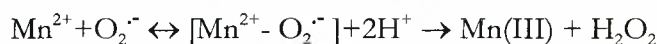
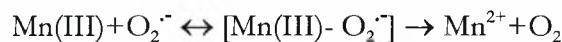
Οι **Cu-Zn SOD** (εικόνα 8) που έχουν απομονωθεί από ευκαρυωτικούς οργανισμούς αποτελούνται από δύο υπομονάδες από τις οποίες η μία φέρει ένα άτομο Zn και η άλλη ένα άτομο Cu και έχουν μοριακό βάρος περίπου ίσο με 32000. Το ιόν χαλκού φαίνεται πως συμμετέχει στην αντίδραση της δισμουτάσης και υφίσταται διαδοχικά οξείδωση και αναγωγή, δηλαδή:



Το ιόν Zn^{2+} δεν συμμετέχει στον καταλυτικό κύκλο αλλά συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το ιόν Cu^{2+} είναι αναντικατάστατο στο ολόενζυμο, ενώ το ιόν Zn^{2+} μπορεί να αντικατασταθεί από άλλα μέταλλα όπως το κοβάλτιο, ο υδράργυρος και το κάδμιο.



Η **Mn-SOD** εντοπίζεται σε βακτήρια, φυτά και ζώα, σχεδόν αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια. Έχει μοριακό βάρος περίπου ίσο με 40000 και περιέχει στο ενεργό της κέντρο ένα ιόν μαγγανίου. Η αντίδραση που καταλύει είναι συνοπτικά η:

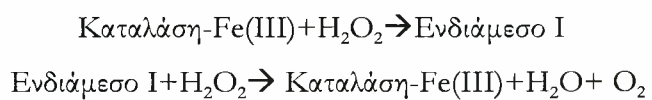
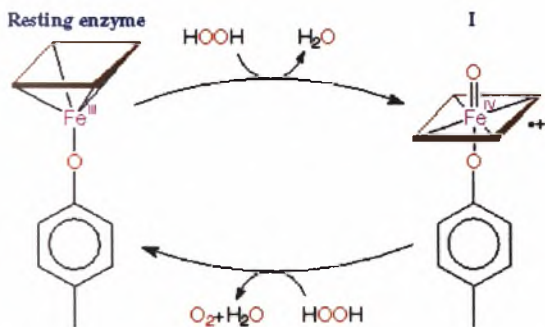


Σε αντίθεση με την Cu-Zn SOD η δραστηρότητά της μειώνεται σε αλκαλικό pH. Η Mn-SOD των ανώτερων οργανισμών αποτελείται από 4 υπομονάδες και περιέχει 0,5-1,0 ιόν μαγγανίου ανά υπομονάδα. Το ιόν

μαγγανίου είναι απαραίτητο για τη δραστηριότητα του ένζυμο καθώς η απομάκρυνσή του έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της δραστηριότητας της Mn-SOD.

Τέλος, η **εξωκυτταρική SOD** έχει σχετικά υψηλό μοριακό βάρος σε σύγκριση με τους άλλους δύο (περίπου 135000) και είναι μια τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη στην οποία κάθε υπομονάδα περιέχει ένα άτομο χαλκού και ένα άτομο ψευδαργύρου. Υπάρχουν αρκετές μορφές εξωκυτταρικής SOD (A, B και C) και έχει παρατηρηθεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό της είναι προσδεδεμένο στην επιφάνεια του κυττάρου μαζί με υδρογονάνθρακες, ιδιαίτερα στους πνεύμονες και στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων.

2. Καταλάση: Στα περισσότερα αερόβια κύτταρα ανιχνεύεται δραστηριότητα καταλάσης. Η καταλάση, ένα σημαντικό ενζυμικό αντιοξειδωτικό, αποτελείται από τέσσερις πρωτεϊνικές υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει μία ομάδα αίμης στην ενεργό της περιοχή. Επιπλέον κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH το οποίο συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου. Η καταλάση είναι ένα πολύ σημαντικό ένζυμο το οποίο καταλύει, μέσω των ομάδων αίμης, την μετατροπή του H_2O_2 σε νερό και μοριακό οξυγόνο(εικόνα 9):



Εικόνα 9. Αντίδραση καταλάσης

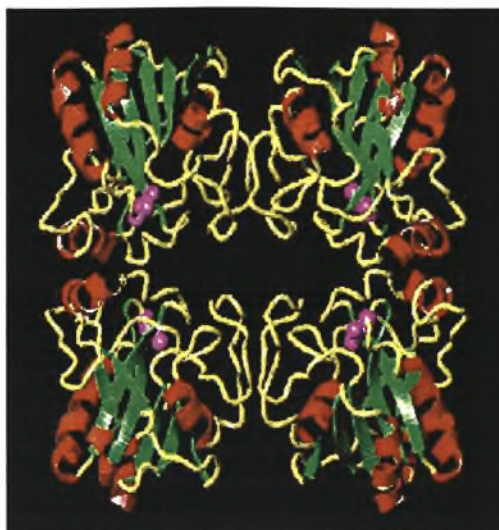
Στα ζώα η καταλάση εντοπίζεται κυρίως στο ήπαρ και τα ερυθροκύτταρα κι εκτός από την παραπάνω αντίδραση μπορεί να καταλύει και: 1.την μετατροπή της μεθανόλης και αιθανόλης στις αντίστοιχες αλδεύδες, 2.την οξείδωση του φορμικού οξέος σε διοξείδιο του άνθρακα, 3.την οξείδωση του υδραργύρου, που απορροφάται από το ανθρώπινο σώμα, σε Hg²⁺. Η δραστηριότητα της καταλάσης στα ζώα και τα φυτά εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα, ενώ τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες και το ενδοπλασματικό δίκτυο παρουσιάζουν ελάχιστη δραστηριότητα.



Εικόνα 10. Τριδιάστατη δομή καταλάσης

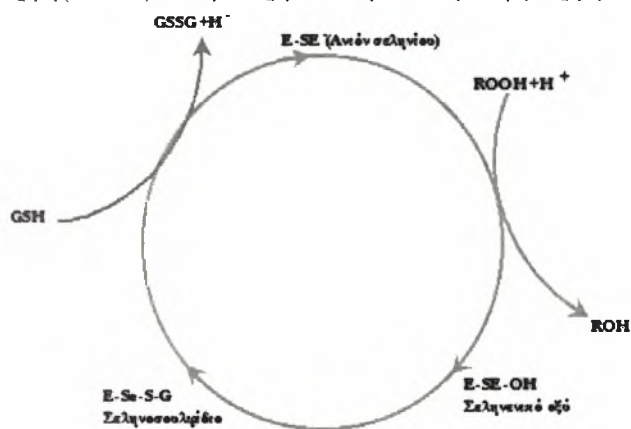
Συνεπώς το H₂O₂ που σχηματίζεται σε αυτά τα οργανίδια δεν απομακρύνεται μέσω της καταλάσης[53].

3. Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (GSH-Px): Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (εικόνα 11) ανήκει στην οικογένεια των σεληνιοπρωτεϊνών και αποτελεί ένα πολύ σημαντικό ενζυμικό αντιοξειδωτικό καθώς καταλύει την αναγωγή μίας ποικιλίας υπεροξειδίων. Πρόκειται για ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα καθώς και στο εξωτερικό του κυττάρου και είναι άφθονο στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τέσσερις ισομορφές GSH-Px στα θηλαστικά: 1) το κλασσικό κυτταρικό ένζυμο, 2) η ισομορφή που μεταβολίζει τα λιπιδιακά υπεροξειδία 3) αυτή που εντοπίζεται στην γαστρεντερική οδό και 4) στο πλάσμα. Η GSH-Px αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες περιέχει ένα άτομο σεληνίου και το σταθερό υπόστρωμα της είναι η γλουταθειόνη (GSH) [53-54].



Εικόνα 11. Τριδιάστατη δομή GSH-Px

Η GSH-Px καταλύει την μετατροπή των υπεροξειδίων σε νερό οξειδώνοντας την GSH στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Συγκεκριμένα, η ιοντισμένη μορφή του σεληνίου (E-Se⁻) ανάγει το υπόστρωμα υπεροξειδίου



Εικόνα 12. Αντίδραση GSH-Px

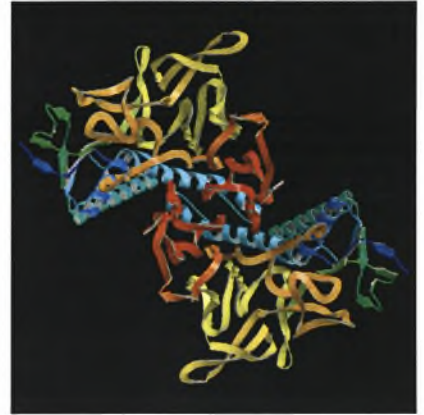
προς μία αλκοόλη και έτσι οξειδώνεται προς σεληνικό οξύ (E-SeOH). Στη συνέχεια εισέρχεται στην αντίδραση η γλουταθειόνη με το σχηματισμό ενός σεληνοσουλφιδίου (E-Se-S-G). Τέλος, ένα δεύτερο μόριο γλουταθειόνης αναγεννά την ενεργό μορφή του ενζύμου με προσβολή του (E-Se-S-G) προς σχηματισμό οξειδωμένης γλουταθειόνης (εικόνα 12) [55].

Συνεργασία Καταλάσης- GSH-Px για την Απομάκρυνση του H₂O₂ *in vivo*

Εφόσον τόσο η καταλάση όσο και η GSH-Px καταλύουν τη διάσπαση του H₂O₂, τίθεται το ερώτημα ποιο ένζυμο είναι πιο σημαντικό σε *in vivo* συνθήκες. Έχει διαπιστωθεί ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις H₂O₂ την διάσπασή του αναλαμβάνει η GSH-Px, ενώ όταν τα επίπεδα του H₂O₂ αυξάνονται στους ιστούς τότε η αποικοδόμησή του καταλύεται κυρίως από την καταλάση [6]. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται λόγω της μεγαλύτερης συγγένειας της GSH-Px προς το H₂O₂ [56]. Ωστόσο, κατά τον E. Beutler (1994) το ερώτημα αυτό είναι ανούσιο καθώς και τα δύο ένζυμα μπορεί να παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο και η δράση του ενός να συμπληρώνει τη δράση του άλλου. Η δραστηριότητα του κάθε ενζύμου σε κάθε στιγμή μπορεί να εξαρτάται από

τις συνθήκες κάτω από τις οποίες γίνεται η μέτρηση καθώς επίσης και από το υπόστρωμα το οποίο καταβολίζεται[57].

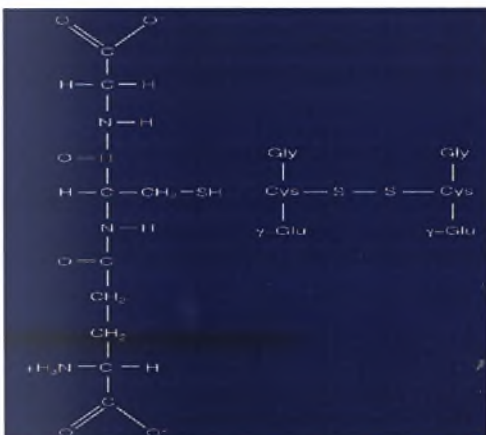
4. Αναγωγή της Γλουταθειόνης (GR): Η αναγωγή της γλουταθειόνης (εικόνα 13) είναι υπεύθυνη για την αναγωγή της GSSG σε GSH και συνεπώς για τη διατήρηση της φυσιολογικής αναλογίας GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η επανασύνθεση GSH από την οξειδωμένη της μορφή και η επακόλουθη διατήρηση των επιπέδων της GSH απαιτεί αναγωγική δύναμη υπό μορφή NADPH. Το NADPH παρέχεται από το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών όπου το πρώτο ένζυμο είναι η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Η GR αποτελείται από δύο υπομονάδες καθεμία από τις οποίες περιέχει στην ενεργό περιοχή της ένα φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο στη συνέχεια μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα. Οι δύο σουλφυδρυλομάδες που σχηματίζονται αλληλεπιδρούν με την GSSG και την ανάγουν σε 2 μόρια GSH [53].



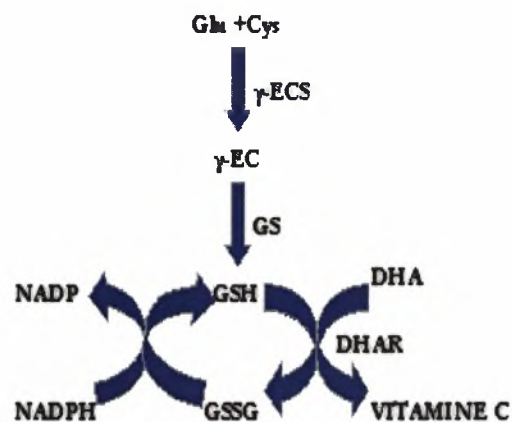
Εικόνα 13. Τρισδιάστατη δομή GR

Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

1. Γλουταθειόνη (GSH): Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο (γ-Glu-Cys-Gly) που περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα και αποτελεί ένα σημαντικό διαλυτό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της συνεχούς και κυκλικής μετάπτωσης του από μία ανηγμένη (GSH) σε μία οξειδωμένη μορφή (GSSG), και το αντίθετο (εικόνα 14) [53].



Εικόνα 14. Το τριπεπτίδιο & η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης



Εικόνα 15. Σύνθεση GSH, ανακύκλωση GSH –GSSG & συμμετοχή GSH στην αναγωγή της βιταμίνης C

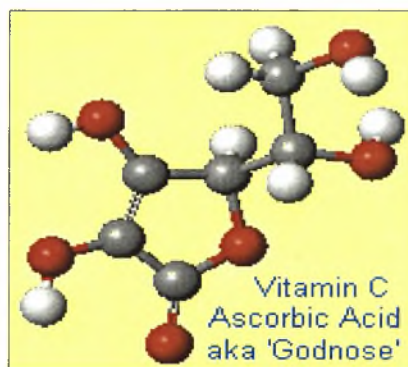
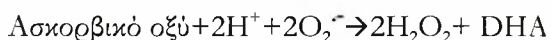
2. Ουρικό οξύ: Αποτελεί παραπροϊόν του μεταβολισμού των πουρινών με σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συγκεκριμένα, εξουδετερώνει τις ρίζες RO_2^{\cdot} , OH^{\cdot} , το όζον, και το υποχλωριώδες οξύ. Ωστόσο κατά τις αντιδράσεις αυτές παράγονται νέες ελεύθερες ρίζες οι οποίες δεν είναι εντελώς ακίνδυνες και συνεπώς το ουρικό οξύ δεν είναι πάντα ένα "ιδανικό" αντιοξειδωτικό[53].

3. Συνένζυμο Q10 (ουβικινόλη): Αποτελεί συστατικό της αναπνευστικής αλυσίδας ιδιαίτερα διαδεδομένο στο ζωικό βασίλειο. Πέρα από τον πολύ σημαντικό του ρόλο σαν μεταφορέας ηλεκτρονίων στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, αποτελεί κι ένα από τα σημαντικότερα λιπόφιλα αντιοξειδωτικά. Εμποδίζει την παραγωγή ελεύθερων ριζών καθώς επίσης και την οξειδωτική καταστροφή του DNA, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Επίσης είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση ενός άλλου πολύ ισχυρού λιπόφιλου αντιοξειδωτικού, της α-τοκοφερόλης [58]

4. Μελατονίνη: Αποτελεί ένα αντιοξειδωτικό με πολλαπλές δράσεις. Συγκεκριμένα, προστατεύει τα μακρομόρια σε όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα γεγονός που επιτυγχάνεται με πολλούς τρόπους. Καταρχήν, εξουδετερώνει μία μεγάλη ποικιλία ROS όπως, H_2O_2 , NO^{\cdot} , $ONOO^{\cdot}$, και $ONOOH$. Επιπλέον, ενεργοποιεί πολλά αντιοξειδωτικά ένζυμα μεταξύ των οποίων τη SOD, τη GR, τη GSH-Px και την καταλάση και έχει βρεθεί ότι αυξάνει *in vitro* τα επίπεδα της γλουταθειόνης. Ακόμη, αναστέλλει τη δράση των ενζύμων συνθάση του NO και λιποξυγενάση και σταθεροποιεί τις κυτταρικές μεμβράνες εμποδίζοντας την οξειδωτική καταστροφή τους. Τέλος, πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι αυξάνει την αποτελεσματικότητα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα τη μείωση της διαρροής ηλεκτρονίων και της παραγωγής ελεύθερων ριζών [59].

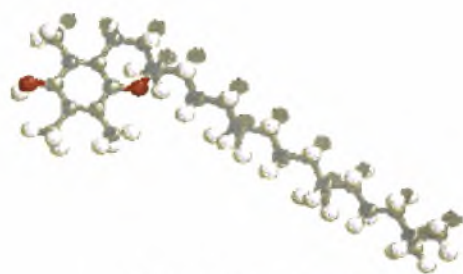
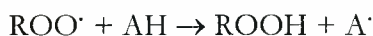
5.Στοιχεία μετάπτωσης: Στοιχεία, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, αποτελούν σημαντικά συστατικά πρωτεϊνών, μερικές από τις οποίες συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού [SOD(Cu/Fe), κυτοχρωμική οξειδάση (Cu), κυτοχρώματα (Se), φερριτίνη (Fe), λακτοφερρίνη (Fe)] [47].

6.Ασκορβικό οξύ: Είναι περισσότερο γνωστό σαν βιταμίνη C και είναι ιδιαίτερα διαλυτό στο νερό. Το ασκορβικό οξύ εντοπίζεται σε πολλά φυτά και ζώα αλλά ο άνθρωπος κι ορισμένα άλλα πρωτεύοντα έχουν χάσει την ικανότητα σύνθεσής του, οπότε το προμηθεύονται αποκλειστικά από τις διάφορες τροφές. Το ασκορβικό οξύ είναι ένας ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας, ο οποίος αντιδρά με πολλές ελεύθερες ρίζες, παράγοντας το μεταβολίτη δευδροασκορβικό οξύ (DHA) [47]:



Εικόνα 16. Ασκορβικό οξύ

7.Βιταμίνη E: Αποτελεί ένα επιπλέον διαιτητικό αντιοξειδωτικό που λόγω της λιπόφιλης φύσης του, μπορεί να ενσωματώνεται στη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα της κυτταρικής μεμβράνης και να αναστέλλει την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (ROOH)



Εικόνα 17.Βιταμίνη E

Η παραγώμενη ρίζα A^\cdot είναι πολύ ασθενής σε σχέση με την ROO^\cdot [47].

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι εκτός από τα διάφορα αντιοξειδωτικά (ενζυμικά και μη) έχουν αναπτυχθεί διάφορα συστήματα επιδιόρθωσης της οξειδωτικής βλάβης. Έτσι το σύστημα επιδιόρθωσης του DNA μπορεί να αναγνωρίσει βάσεις που έχουν οξειδωθεί, να τις απομακρύνει και να τις αντικαταστήσει με φυσιολογικές. Επιπλέον η οξειδωτική βλάβη επάγει την έκφραση ειδικών πρωτεϊνών, όπως είναι οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ[60], οι οποίες συμβάλλουν στην αποκατάσταση της τεταρτοταγούς δομής των μετουσιωμένων πρωτεϊνών [61].

Οξειδωτικό Στρες

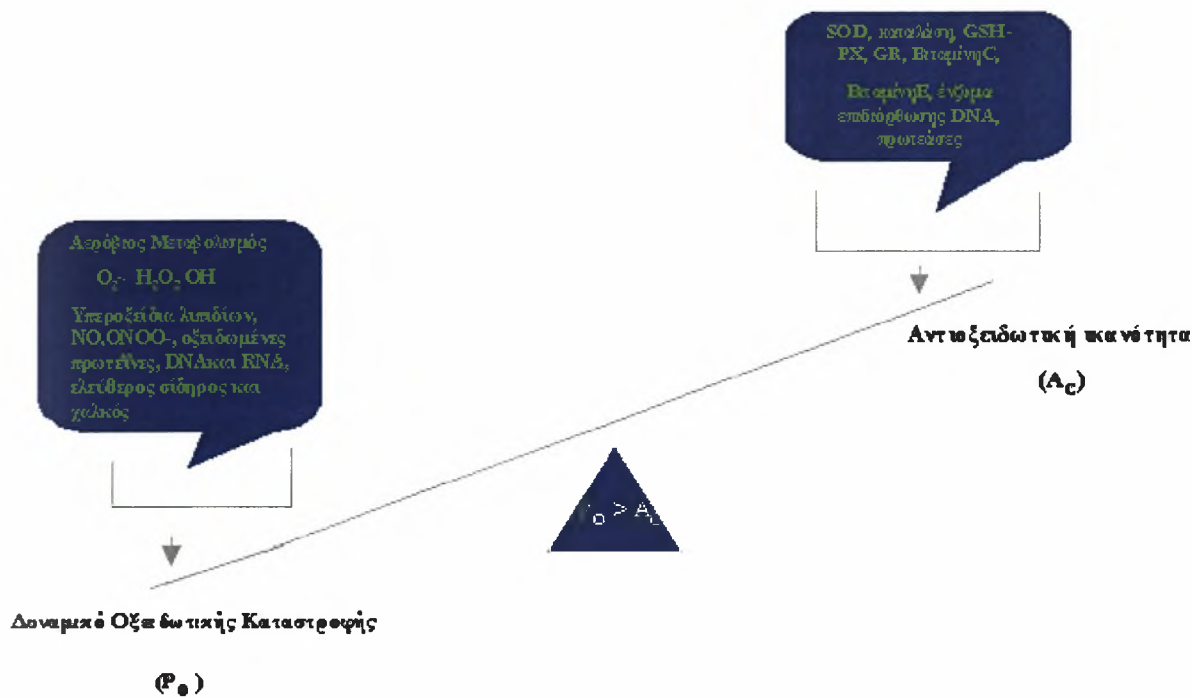
Η παραγωγή των ελεύθερων ριζών αποτελεί μια φυσιολογική και συνεχή διαδικασία και είναι αποτέλεσμα του κυτταρικού μεταβολισμού. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι ανώτεροι οργανισμοί έχουν αναπτύξει ένα ιδιαίτερα αποτελεσματικό σύστημα αντιοξειδωτικής άμυνας κατά την εξέλιξή τους [62] το οποίο τις περισσότερες φορές επαρκεί για να αναστείλει τις αρνητικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών. Εντούτοις, το δυναμικό της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού δεν είναι απεριόριστο και σε ορισμένες περιπτώσεις δημιουργείται μία κατάσταση που είναι γνωστή σαν οξειδωτικό στρες. Συγκεκριμένα, ο όρος "οξειδωτικό στρες" αναφέρεται στην κατάσταση όπου η κυτταρική παραγωγή προ-οξειδωτικών υπερέρχει της φυσιολογικής ικανότητας του συστήματος να τα εξουδετερώνει(εικόνα 18).

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προέλθει από:

1. Μείωση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών, λόγω μεταλλάξεων που επηρεάζουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τοξικών παραγόντων που μειώνουν την αντιοξειδωτική άμυνα καθώς και διατροφικών ελλείψεων.
2. Αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών που μπορεί να προέρχεται από αύξηση είτε των επιπέδων των τοξινών είτε της ενεργοποίησης των φυσικών συστημάτων παραγωγής ROS/RNS.

Από την άλλη το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε:

- 1.Τραυματισμό των ιστών, προκαλώντας καταστροφή στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια.
- 2.Κυτταρικό θάνατο, διεγείροντας τους δύο μηχανισμούς που οδηγούν στο θάνατο, δηλαδή τη νέκρωση και την απόπτωση
- 3.Προσαρμογή, για παράδειγμα μέσω αύξησης της έκφρασης της αντιοξειδωτικής άμυνας [7].



Εικόνα 18. Η ιδέα του οξειδωτικού στρες

Τέλος, οι παράγοντες που μπορούν να επάγουν το οξειδωτικό στρες διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς. Στους ενδογενείς περιλαμβάνονται η φυσική άσκηση/καθιστική ζωή, το ψυχολογικό στρες, η φλεγμονή (παροδική μόλυνση/χρόνια πάθηση), ο καρκίνος, η ισχαιμία/επανοξυγόνωση και ο κυτταρικός θάνατος. Στους εξωγενείς παράγοντες περιλαμβάνονται η διατροφή, οι ρύποι, τα φάρμακα, η ακτινοβολία και διάφορες ενώσεις που απορροφώνται από το δέρμα. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες δρουν συχνά πολύ γρήγορα και πολλές φορές η δράση τους είναι αθροιστική ή τουλάχιστον συνεργιστική[63].

Άσκηση

Για τα περισσότερα ζώα η κίνηση είναι ουσιώδης για την επιβίωσή τους. Για τον άνθρωπο συγκεκριμένα, η άσκηση εκτός από μέσο επιβίωσης αποτελεί πλέον τρόπο ζωής, αναζωογόνησης και πολλές φορές συστήνεται για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών. Είναι πλέον καλά διαπιστωμένο ότι η τακτική φυσική άσκηση συμβάλλει στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιακών νόσων, καρκίνου, οστεοπόρωσης και διαβήτη[64-66]. Οι πολύπλοκοι μηχανισμοί που συμβάλλουν σε αυτά τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν προσαρμογές πρωτεϊνών-υποδοχέων και πρωτεϊνών-μεταφορέων, αλλαγή των λιπιδικών και ορμονικών προφίλ, μεταβολές της αντιοξειδωτικής άμυνας κ.α. Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι η άσκηση αυξάνει το μέσο όρο ζωής στους αρουραίους κατά 10% και ταυτόχρονα μειώνει τα σημάδια γήρανσης. Επίσης, συγκεκριμένες μορφές άσκησης βελτιώνουν τη λειτουργία των σκελετικών μυών και συμβάλλουν στη διατήρηση της μυϊκής μάζας [67]. Ακόμη, η εντατική άσκηση αυξάνει τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, μεταξύ των οποίων της SOD, της καταλάσης και της GSH-Px στον σκελετικό μύ, την καρδιά και το ήπαρ [68-71]. Επιπλέον η χρόνια άσκηση διεγείρει την έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων στους μύες, κυρίως της Mn-SOD και της μιτοχονδριακής GSH-Px [71] και συνεπώς συμβάλλει στην καλύτερη αντιμετώπιση των ελεύθερων ριζών. Η επίδραση της

άσκησης στην παραγωγή ελεύθερων ριζών φαίνεται να αποτελεί ένα σημαντικό φαινόμενο στη διαδικασία προσαρμογής που προκαλείται από την άσκηση [72]. Η αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων σαν απόκριση στην άσκηση οφείλεται προφανώς στην ανάγκη του συστήματος να αυξήσει το αντιοξειδωτικό δυναμικό προκειμένου να προστατευθεί από τη δράση των ελεύθερων ριζών. Επιπλέον, τα μειωμένα επίπεδα ελεύθερων ριζών μπορεί να οφείλονται στην επαναλαμβανόμενη και παρατεταμένη έκθεση σε αυτές, η οποία οδηγεί σε μεταβολές στην παραγωγή τους [73]. Η άσκηση μικρής έντασης δεν επάγει τέτοιου είδους προσαρμογές καθώς οι παραγόμενες ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται πλήρως από την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού [72]. Προφανώς αυτές οι προσαρμογές προκύπτουν από τα συσσωρευτικά αποτελέσματα επαναλαμβανόμενης άσκησης κατάλληλης διάρκειας και έντασης [73].

Ωστόσο, ενώ η άσκηση συνδέεται με πολλά οφέλη όσον αφορά την υγεία, μπορεί από την άλλη να θεωρηθεί σαν μία φυσική πηγή στρες που μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτική καταστροφή των κυττάρων, πιθανόν λόγω της αυξημένης παραγωγής ROS [74-75]. Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι η έντονη άσκηση σε απροπόνητα άτομα, στα οποία δεν έχουν αναπτυχθεί οι παραπάνω προσαρμογές, αυξάνει την παραγωγή ελεύθερων ριζών, οι οποίες όπως έχει αναφερθεί είναι ιδιαίτερα καταστροφικές [67]. Τέλος, ενώ η άσκηση μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης κάποιων ασθενειών και προτείνεται σαν τρόπος αποφυγής τους και αντιμετώπισής τους, ταυτόχρονα, η παραγωγή ελεύθερων ριζών που συνοδεύει την άσκηση αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα πολλών από αυτών των ασθενειών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα καρδιοαγγειακά νοσήματα, όπου η άσκηση μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης τους, αλλά ταυτόχρονα η παραγωγή ελεύθερων ριζών αποτελεί μια βασική αιτία τους. Αυτές οι αντιφατικές επιδράσεις της άσκησης είναι γνωστές σαν "παράδοξο της άσκησης" [76].

Άσκηση & Οξειδωτικό Στρες

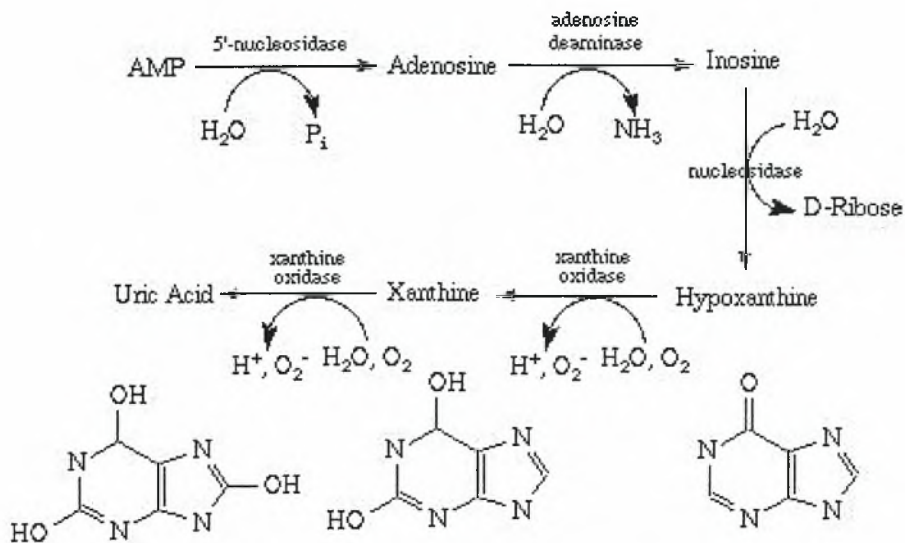
Οι πρώτες μελέτες για την εμπλοκή των ROS στην καταστροφή των ιστών που προκαλείται από την άσκηση γίνονται στα τέλη της δεκαετίας του '70. Συγκεκριμένα, το 1978 οι *Dillard et al.* [77] είναι οι πρώτοι που αποδεικνύουν ότι η φυσική άσκηση μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Ειδικότερα, παρατήρησαν μία αύξηση των επιπέδων του ειπνεόμενου πεντανίου (πιθανόν παραπροϊόν της οξειδωτικής καταστροφής των λιπιδίων) κατά 1,8 φορές, μετά από 60min ποδηλασίας στο 25-75% του $\dot{V}O_{2max}$. Έκτοτε, ένας μεγάλος αριθμός μελετών υποστηρίζουν ότι υπάρχει μία συσχέτιση της φυσικής άσκησης με την αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου και της παραγωγής ελεύθερων ριζών και συνεπώς με την εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Υπολογίζεται ότι για κάθε 25 μόρια O_2 που ανάγονται κατά τη φυσιολογική αναπνοή, παράγεται μία ελεύθερη ρίζα [78] και ότι κατά την άσκηση ο ρυθμός κατανάλωσης O_2 σε ολόκληρο το σώμα αυξάνεται κατά 10-15 φορές. Τέλος, η ροή O_2 σε έναν ενεργό μύ μπορεί να αυξηθεί περίπου 100 φορές [79].

Πιστεύεται ότι η παραγωγή ROS αποτελεί το σημαντικότερο μηχανισμό για μία σειρά βιοχημικών και φυσιολογικών αλλαγών που παρατηρούνται κατά την άσκηση και είναι ενδεικτικές του οξειδωτικού στρες [80]. Κατά την άσκηση τα ROS μπορούν να προέρχονται από πολλές κυτταρικές πηγές, μερικές από τις οποίες

πιθανόν να είναι πιο σημαντικές από κάποιες άλλες σε συγκεκριμένα όργανα, σε συγκεκριμένο χρόνο ή σε συγκεκριμένο τύπο άσκησης. Ωστόσο, οι πηγές αυτές δεν είναι μεμονωμένες και μπορεί να ενεργοποιούνται ταυτόχρονα.

1. Η σημαντικότερη πηγή ελεύθερων ριζών κατά την άσκηση θεωρείται η διαρροή ηλεκτρονίων από τη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα (Ο μηχανισμός περιγράφεται στην ενότητα "Παραγωγή Ελεύθερων Ριζών"). Ωστόσο, παρά τη θεωρητική ορθότητα αυτής της άποψης, υπάρχουν ελάχιστα άμεσα στοιχεία που να αποδεικνύουν ότι υπάρχει αυξημένη μιτοχονδριακή παραγωγή O_2^- και η υπόθεση αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι η κατανάλωση οξυγόνου αυξάνεται δραματικά κατά την άσκηση. Παρόλα αυτά υπάρχουν έμμεσα στοιχεία που υποστηρίζουν αυτήν την άποψη και κυρίως η οξειδωτική καταστροφή των μιτοχονδρίων. Έτσι, έχει βρεθεί ότι μετά την άσκηση αυξάνεται η υπεροξειδωση λιπιδίων, μειώνονται τα επίπεδα των θειολών και απενεργοποιούνται τα οξειδωτικά ένζυμα στα μιτοχόνδρια [81]. Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί προσαρμογές, λόγω της άσκησης, των μιτοχονδριακών αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως των Mn-SOD και GSH-Px.

2. Ένας εναλλακτικός μηχανισμός με τον οποίο η άσκηση μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες είναι η ισχαιμία-επανοξυγόνωση. Η τελευταία μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών μέσω της μετατροπής της αφυδρογονάσης της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP αποικοδομείται σε AMP και ADP λόγω των αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων. Αν η παροχή οξυγόνου είναι ανεπαρκής τα επίπεδα του AMP αυξάνονται συνεχώς με αποτέλεσμα τη μετατροπή της αφυδρογονάσης της ξανθίνης στην οξειδωμένη της μορφή-οξειδάση της ξανθίνης- και την αποικοδόμηση του AMP σε υποξανθίνη. Η μετατροπή αυτή πραγματοποιείται από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που πιθανόν ενεργοποιείται από ιόντα Ca^{2+} . Η υποξανθίνη αποτελεί το υπόστρωμα τόσο της αφυδρογονάσης όσο και της οξειδάσης της ξανθίνης και μέσω της δράσης αυτών των ενζύμων μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η αντίδραση που καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης, μία φλαβοπρωτεΐνη που περιέχει μολυβδένιο και σίδηρο, συνοδεύεται από την απελευθέρωση O_2^- (εικόνα 19). Για την ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού απαιτούνται επαρκή επίπεδα υποξανθίνης, ξανθίνης και O_2 και ακόμη πιστεύεται ότι η άσκηση υψηλής έντασης παράγει ένα κυτταρικό περιβάλλον που ευνοεί αυτήν την ενεργοποίηση. Τέλος, υπάρχουν στοιχεία που δείχνουν ότι η οξειδάση της ξανθίνης αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό παραγωγής ROS κατά την αναερόβια άσκηση. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα οξειδάσης της ξανθίνης και υποξανθίνης τόσο στο πλάσμα όσο και στους ιστούς μετά από αναερόβια άσκηση [82-85] και επιπλέον παρατηρήθηκε αναστολή της οξειδωσης της γλουταθειόνης (λόγω άσκησης) μετά από χορήγηση αλλοπουρινόλης, που αποτελεί αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης [85].



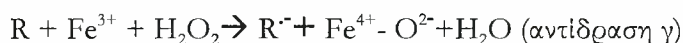
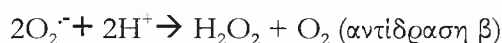
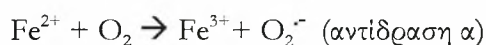
Εικόνα 19. Παραγωγή ελευθέρων ριζών από το σύστημα της οξειδάσης της ξανθίνης

3. Μία ποικιλία ασκήσεων ενεργοποιεί τη φλεγμονώδη αντίδραση οδηγώντας σε εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη. Τα πολυμορφοουδετερόφιλα (**PolyMorphoNeutrophils-PMN**) αποτελούν μια ομάδα κυττάρων με σημαντικό ρόλο στην άμυνα των ιστών σε μολύνσεις από ιούς ή βακτήρια. Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά ξεκινά με την καταστροφή κάποιου μυός ή ενός μαλακού ιστού και η καταστροφή αυτή προκαλείται είτε από οξειδωτικές διαδικασίες που διεγείρονται από τα ROS, είτε από τέντωμα ή κάποια άλλη μηχανική δύναμη. Έτσι, τα PMN προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που απελευθερώνουν τα κατεστραμμένα κύτταρα και μεταναστεύουν στην πληγείσα περιοχή, όπου εκκρίνουν λυσοζύμη και O₂⁻. Η λυσοζύμη προωθεί τη διάσπαση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και κυτταρικών υπολειμμάτων [76], ενώ το O₂⁻, που παράγεται από τη μυελοπεροξειδάση και τη NADPH οξειδάση προλαμβάνει την επέκταση της βακτηριακής μόλυνσης[67]. Σήμερα υπάρχουν αρκετές μελέτες που υποστηρίζουν την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης κατά την άσκηση. Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί αυξημένη μετανάστευση ουδετερόφιλων στο σκελετικό μύ μετά από μία ποικιλία ασκήσεων [86-89] και επομένως, οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τα φαγοκύτταρα στον κατεστραμμένο μυ μπορεί να είναι υπεύθυνες για την οξειδωτική βλάβη που παρατηρείται μετά την άσκηση[67]. Επίσης, βρέθηκε ότι τα επίπεδα της IL-6 και της μυελοπεροξειδάσης - δύο δείκτες της φλεγμονής- είναι αυξημένα μετά την άσκηση [89] κι ότι η δράση της τελευταίας αυξάνεται σημαντικά στους μύες αρσενικών ποντικών μετά από 24 ώρες άσκησης στον τροχό [90]. Επιπλέον, οι *Hack et al.*[91] έδειξαν ότι μία έντονη άσκηση μέχρι εξάντλησης αυξάνει σημαντικά τον αριθμό των λευκοκυττάρων, λεμφοκυττάρων και των ουδετερόφιλων, στον άνθρωπο. Επίσης, βρήκαν ότι η ικανότητα φαγοκυττάρωσης αυξάνεται αμέσως μετά την άσκηση και για τις επόμενες 24 ώρες ενώ η παραγωγή O₂⁻ αυξάνεται μετά από 24 ώρες. Οι *Meydani et al.*, παρατήρησαν αύξηση των επιπέδων των κυτοκίνης μετά από έντονη άσκηση σε άντρες με καθιστικό τρόπο ζωής [92] και τέλος οι *Smith et al.*[93] ανέφεραν ότι μετά από μία ώρα μέτριας άσκησης αυξάνεται *in vitro* η παραγωγή H₂O₂ από τα ουδετερόφιλα.

4. Μία ακόμη πιθανή πηγή ROS αποτελούν οι κατεχολαμίνες τα επίπεδα των οποίων έχει βρεθεί ότι αυξάνονται σε περίπτωση παρατεταμένης άσκησης. Οι κατεχολαμίνες αυξάνουν τον οξειδωτικό μεταβολισμό των μυών και του μυοκαρδίου μέσω ενεργοποίησης των β-αδρενεργικών υποδοχέων κι ως εκ τούτου αυξάνεται η παραγωγή των ROS στα μιτοχόνδρια [76]. Επιπλέον, η αυτοοξείδωση της επινεφρίνης σε αδενοχρώμιο συνοδεύεται από την ταυτόχρονη παραγωγή $O_2^{\cdot-}$. Ωστόσο, η σημασία των κατεχολαμινών σαν πηγή παραγωγής ROS κατά τη διάρκεια της άσκησης δεν έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό και συνεπώς παραμένει αδιευκρίνιστη.

5. Μία άλλη πιθανή πηγή ROS είναι τα υπεροξειδιοσώματα, κυτταρικά οργάνια που εμπλέκονται στην μη μιτοχονδριακή οξείδωση των λιπαρών οξέων και των D-αμινοξέων. Έχει αποδειχθεί ότι η παρατεταμένη ησυχία αυξάνει την παραγωγή H_2O_2 κυρίως λόγω της αυξημένης οξείδωσης των λιπαρών οξέων στα υπεροξειδιοσώματα [95]. Εφόσον τα λιπαρά οξέα αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για το μυοκάρδιο και τους σκελετικούς μύες κατά την άσκηση, τα υπεροξειδιοσώματα μπορεί να είναι πιθανή θέση παραγωγής ROS [94].

6. Πιθανές πηγές ROS είναι επίσης, η αιμοσφαιρίνη και η μυοσφαιρίνη. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες έχουν την ικανότητα να παράγουν ROS και να αυξήσουν τη δραστηριότητά τους μέσω συγκεκριμένων μονοπατιών:

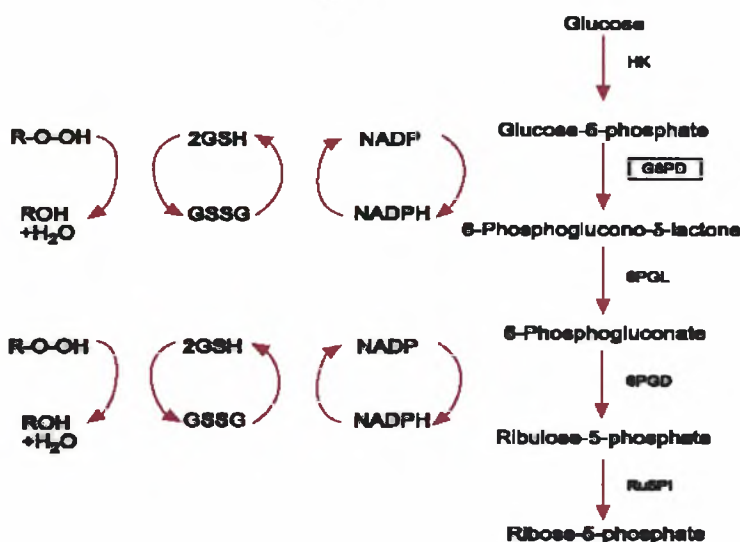
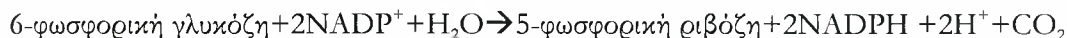


Η αυτό-οξείδωση της αιμοσφαιρίνης και μυοσφαιρίνης (αντίδραση α) οδηγεί στο σχηματισμό ρίζας σουπεροξειδίου το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (αντίδραση β). Το H_2O_2 μπορεί να αντιδράσει με αιμοπρωτεΐνες με τρισθενή σίδηρο σχηματίζοντας δύο ισχυρά οξειδωτικά, πρωτεϊνική ρίζα (R^{\cdot}) και $Fe^{4+} - O^{2-}$ (αντίδραση γ). Η γραφική παράσταση που απεικονίζει την αυτό-οξείδωση της αιμοσφαιρίνης σε σχέση με την πίεση του οξυγόνου είναι κωδωνοειδής και συνεπώς η παραγωγή ROS από την αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυξηθεί με τη μείωση της πίεσης του οξυγόνου στα τριχοειδή και τα αγγεία του αίματος που συνοδεύει την άσκηση. Ωστόσο η υπόθεση ότι αυτό το μονοπάτι αποτελεί μια σημαντική πηγή ROS κατά την έντονη άσκηση είναι υπό εξέταση [96].

Αφυδρογονάση της 6-Φωσφορικής Γλυκόζης (G6PD)

Μεταβολικός ρόλος της Αφυδρογονάσης της 6-Φωσφορικής Γλυκόζης

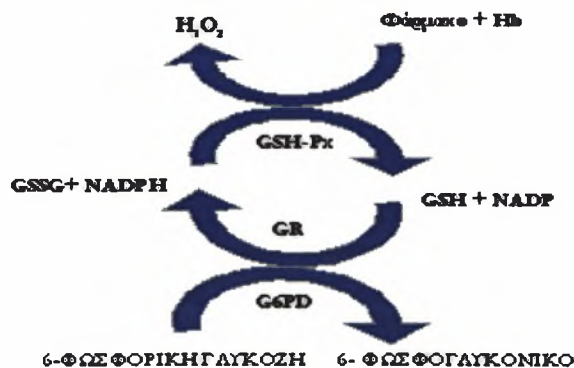
Η πορεία των φωσφορικών πεντοζών (Pentose Phosphate Pathway-PPP) ξεκινάει με την αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης. Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει την οξείδωση της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε 5-φωσφορική ριβόζη με ταυτόχρονη παραγωγή αναγωγικής δύναμης υπό μορφή NADPH (εικόνα 20). Στο πρώτο βήμα του PPP η G6PD δρα στην 6-φωσφορική γλυκόζη οπότε παράγεται 6-φωσφογλυκονο-δ-λακτόνη, η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε 5-φωσφορική ριβόζη, μέσω του 6-φωσφογλυκονικού και της 5-φωσφορικής ριβουλόζης.[55]. Συνολικά η αντίδραση είναι:



Εικόνα 20. Δράση του G6PD στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Το NADPH που παράγεται χρησιμοποιείται για την εξουδετέρωση οξειδωτικών μέσω της γλουταθειόνης (GSH-GSSG)

Η 5-φωσφορική ριβόζη που παράγεται αποτελεί πρόδρομο πολύ σημαντικών μορίων όπως τα ATP, CoA, NAD, FAD, RNA και DNA. Από την άλλη ο κύριος ρόλος του παραγόμενου NADPH είναι να διατηρεί το λόγο GSH:GSSG σε τιμή περίπου 500:1. Επίσης, χρησιμεύει σαν δότης ηλεκτρονίων στις αναγωγικές βιοσυνθέσεις, κυρίως της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων, καθώς επίσης και στην σύνθεση του NO.

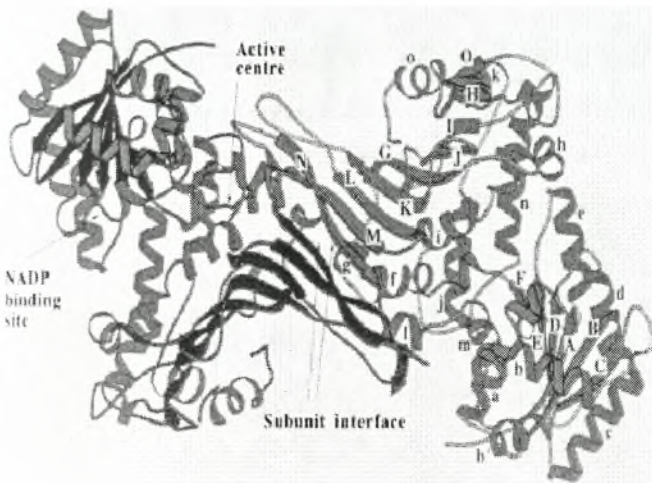
Επιπλέον, όπως είναι γνωστό το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών αποτελεί τη μοναδική πηγή NADPH για τα ερυθροκύτταρα, καθώς αυτά στερούνται μιτοχονδρίων. Συνεπώς, η παραγωγή NADPH από το μονοπάτι PPP παίζει σημαντικότερο ρόλο στην προστασία των ερυθροκυττάρων από το οξειδωτικό στρες (εικόνα 21), τη διατήρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης και των ανηγμένων σουλφιδρυλομάδων[97]



Εικόνα 21. Ρόλος G6PD στην προστασία από οξειδωτικό στρες

Ειδικότερα, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω η αναγέννηση της ανηγμένης γλουταθειόνης από την οξειδωμένη της μορφή καταλύεται από την GR και για την αντίδραση αυτή απαιτείται NADPH. Επιπλέον, τα ερυθροκύτταρα αποτελούν μία ιδιαίτερα πλούσια πηγή καταλάσης, η οποία έχει την ικανότητα να δεσμεύει ισχυρά το NADPH. Επομένως, η λειτουργία του PPP έχει σαν αποτέλεσμα την απομάκρυνση των υπεροξειδίων μέσω ενεργοποίησης όχι μόνο της GSH-Px αλλά και της καταλάσης[98].

Χαρακτηριστικά του Ενζύμου



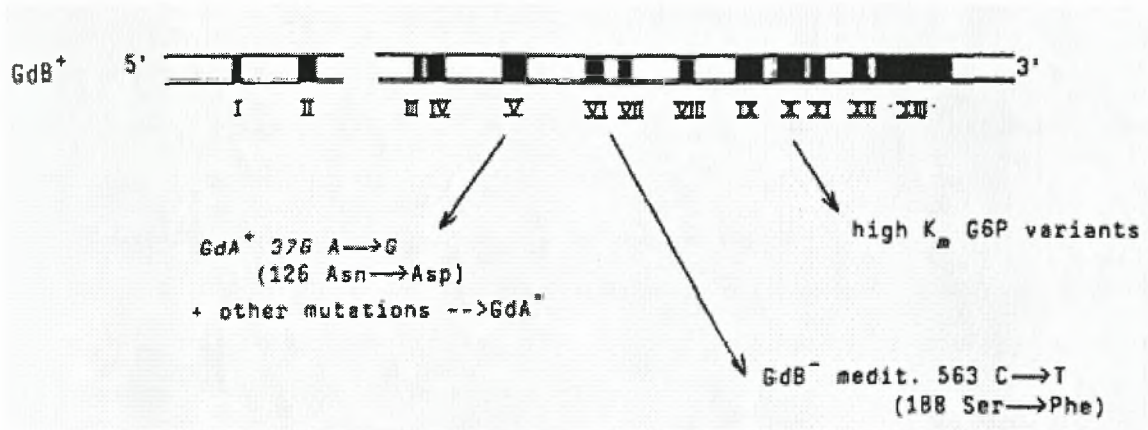
Εικόνα 22. Τρισδιάστατη δομή G6PD

Η δραστική μορφή του ενζύμου είναι διμερής και είναι στενά συνδεδεμένο με NADP [99-100]. Το μονομερές αποτελείται από 515 αμινοξέα με συνολικό μοριακό βάρος 59.256 Da [101-102]. Η συναρμολόγηση των ανενεργών μονομερών σε καταλυτικά δραστικά διμερή απαιτεί την παρουσία NADP [87], συνεπώς το NADP είναι απαραίτητο στο ένζυμο τόσο σαν δομικό συστατικό όσο και σαν υπόστρωμα της αντίδρασης. Τέλος, τα αμινοξέα 386,

387, που αντιστοιχούν στα βασικά αμινοξέα λυσίνη και αργινίνη αντίστοιχα, φαίνεται ότι συνδέονται με μία από τις φωσφορικές ομάδες του NADP [103] και το αμινοξύ 205 αποτελεί τη θέση πρόσδεσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης [104-107].

Το γονίδιο που κωδικοποιεί το G6PD κλωνοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1986 από τους *Persico et al.* [108-111] κι αργότερα σε μία ανεξάρτητη προσπάθεια από τους *Takizawa & Yoshida* [112]. Έτσι διαπιστώθηκε ότι εντοπίζεται στο τελομερές του μεγάλου βραχίονα του X χρωμοσώματος στη θέση Xq28. Αποτελείται από 13 εξώνια και 12 ιντρόνια, έχει μήκος πάνω από 20 kb [109-111] και κωδικοποιεί μία αλληλουχία 515 αμινοξέων καθώς και έναν υποκινητή πλούσιο σε GC [97]. Το πρώτο εξώνιο δεν περιέχει κωδική αλληλουχία, το ιντρόνιο ανάμεσα στα εξώνια 2 και 3 είναι ασυνήθιστα μεγάλο (9,857bp) [113] και στο 5' άκρο του γονιδίου υπάρχει μία GrC περιοχή [108]. Τέλος, τα γονίδια που βρίσκονται στην Xq28 περιοχή είναι σφιχτά πακεταρισμένα και πρόσφατα βρέθηκε ότι το γονίδιο του G6PD διαχωρίζεται από ένα άλλο (NF-kappaB modulator) μέσω μίας περιοχής μήκους λιγότερο από 800 bp [97].

Τέλος, η K_m του G6PD για το NADP είναι πολύ χαμηλή (περίπου 2-4 $\mu\text{mol/L}$) και το ένζυμο αναστέλλεται ανταγωνιστικά από το NADPH. Συνεπώς, η αναλογία NADPH/NADP στα ερυθροκύτταρα ελέγχει το ρυθμό της αντίδρασης με έναν αυτορυθμιστικό τρόπο. Σε κατάσταση ηρεμίας η παραπάνω αναλογία είναι πολύ υψηλή[114-115] και η δράση του ενζύμου αναστέλλεται σχεδόν πλήρως. Όταν το NADPH οξειδώνεται μετατρέπεται σε NADP και το G6PD ενεργοποιείται ανάγοντας έτσι το NADP σε NADPH.



Εικόνα 23. Γονίδιο του G6PD. Το GdB⁺ αντιστοιχεί στον άγριο τύπο. Αντικατάσταση του νουκλεοτιδίου 376 A→G οδηγεί στον πολυμορφικό τύπο GdA⁺. Οι GdB⁻ προέρχονται από μεταλλάξεις στην αλληλουχία του GdB⁺ ενώ οι GdA⁻ φέρουν μία επιπλέον μετάλλαξη στο νουκλεοτιδίο 376.

Ανεπάρκεια του Ενζύμου G6PD

Η ανεπάρκεια σε G6PD αποτελεί ένα φυλοσύνδετο χαρακτηριστικό και μία πάρα πολύ συχνή ασθένεια. Η πρώτη απόδειξη ότι η έλλειψη του G6PD χαρακτηρίζεται από φυλοσύνδετη κληρονομικότητα ήταν η γενετική σύνδεση του χαρακτηριστικού αυτού με το φαινότυπο Protan-Deutan ο οποίος σχετίζεται με απώλεια της έγχρωμης όρασης [116] και αποτελούσε εκείνη την εποχή το μόνο γνωστό φυλοσύνδετο πολυμορφισμό. Την ίδια περίπου εποχή, στα τέλη της δεκαετίας του '50, διεξήχθησαν μελέτες σε οικογένειες οι οποίες επιβεβαίωναν την υπόθεση αυτή, δείχνοντας ότι η έλλειψη του ενζύμου μεταφερόταν από τη μητέρα στο γιο, το κλασικό πρότυπο της φυλοσύνδετης κληρονομικότητας.

Σε διάφορες μελέτες που έγιναν αργότερα παρατηρήθηκε ότι η γεωγραφική κατανομή της ελονοσίας είναι αξιοσημείωτα ίδια με αυτήν της ανεπάρκειας σε G6PD και συγκεκριμένα βρίσκεται σε μεγάλη συχνότητα σε Αφρικανικούς, Μεσογειακούς και Ασιατικούς πληθυσμούς, στους οποίους η ελονοσία ήταν ενδημική. Το φαινόμενο αυτό οδήγησε, πριν 35 χρόνια, στην πρόταση ότι αυτές οι υψηλές συχνότητες είναι αποτέλεσμα εξελικτικού πλεονεκτήματος που προσέφερε η έλλειψη G6PD κατά τη διάρκεια μόλυνσης από το πλασμώδιο της ελονοσίας, *P. falciparum* [117-120]. Τέλος, η ανεπάρκεια σε G6PD περιγράφηκε για πρώτη φορά σαν αποτέλεσμα μίας σειράς μελετών με σκοπό να γίνει κατανοητό γιατί όταν δόθηκε, κατά τη διάρκεια του πολέμου στην Κορέα, το φάρμακο πριμακίνη, για αντί-ελονοσιακή προστασία, περίπου 10% των μαύρων εφέδρων κι ένα μικρότερο ποσοστό λευκών στρατιωτών (κυρίως Μεσογειακής προέλευσης) ανέπτυξαν οξεία αλλά ελεγχόμενη αιμολυτική αναιμία. Σύντομα, έγινε φανερό ότι η συντριπτική πλειονότητα των πασχόντων από έλλειψη G6PD ήταν ασυμπτωματική αν και, τα άτομα με έλλειψη του ενζύμου βρίσκονται σε κίνδυνο εμφάνισης νεογνικού ίκτερου και σοβαρής αιμολυτικής αναιμίας μετά από χορήγηση συγκεκριμένων φαρμάκων κατά τη διάρκεια κάποιων μολύνσεων, και κυρίως μετά την κατανάλωση κουκιών [97].

Μεταλλάξεις & Τάξεις της Ανεπάρκειας σε G6PD

Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευτεί περίπου 70 μεταλλάξεις ή συνδυασμοί μεταλλάξεων στα 12 εξώνια που φέρουν κωδική αλληλουχία και στην περιοχή του υποκινητή [121]. Οι περισσότερες μεταλλάξεις είναι μικρές, παρερμηνεύσιμες σημειακές μεταλλάξεις και απαλοιφές και συμβαίνουν σε τρία ή σε περισσότερα (πολλαπλάσιο του τρία) νουκλεοτίδια έτσι ώστε να μην παρατηρείται αλλαγή στο πλαίσιο ανάγνωσης. Μόνο μία μετάλλαξη που οφείλεται σε λανθασμένο μάτισμα έχει ανιχνευτεί, ενώ δεν είναι γνωστή μια τέτοια μετάλλαξη στην περιοχή του υποκινητή. Το γεγονός ότι δεν υπάρχουν εκτεταμένες μεταλλάξεις ή μεταλλάξεις που αλλάζουν το πλαίσιο ανάγνωσης υποδηλώνει ότι η πλήρης απουσία του ενζύμου δεν είναι συμβατή με τη ζωή και χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι η μεγαλύτερη απαλοιφή που έχει παρατηρηθεί είναι 24 νουκλεοτιδίων στο εξώνιο 9 η οποία εντοπίζεται ανάμεσα στις επαναλήψεις του τετρανουκλεοτιδίου CCAC [122].

Τύποι Μεταλλάξεων που Οδηγούν σε Έλλειψη του Ενζύμου G6PD

Τύπος	Αριθμός
Single missense	111
Double or triple missense	8
Small in frame deletions	8
Nonsense (female)	1
Splice site	1
Total	129

Πίνακας 4. Τύποι Μεταλλάξεων που Οδηγούν σε Έλλειψη του Ενζύμου G6PD

Επειδή η έλλειψη G6PD χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια, τα άτομα με έλλειψη διακρίνονται με βάση την ευαισθησία τους στο οξειδωτικό στρες. Έτσι το 1967 ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας (World Health Organization- WHO) κατέταξε τα άτομα αυτά σε τέσσερις τάξεις ανάλογα με τα κλινικά συμπτώματα που συνοδεύουν την έλλειψη:

Τάξη I: Πολύ χαμηλή δραστηριότητα του ενζύμου G6PD που προκαλεί χρόνια μη-σφαιροκυτταρική αιμολυτική αναιμία.

Τάξη II: Η ενζυμική δραστηριότητα κυμαίνεται από 1-10% του φυσιολογικού. Άτομα που ανήκουν σε αυτήν την τάξη εκδηλώνουν αιμολυτικές κρίσεις κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες.

Τάξη III: Μέτρια έλλειψη G6PD με ενζυμική δραστηριότητα από 10-60% του φυσιολογικού.

Τάξη IV: Καμία μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου και πλήρης απουσία συμπτωμάτων [121].

Έχει αποδειχτεί ότι οι μεταλλάξεις που σχετίζονται με σοβαρά κλινικά συμπτώματα (τάξη I) εντοπίζονται στα εξώνια 10,11 και 7, γεγονός αναμενόμενο αφού η περιοχή του εξωνίου 10 αντιστοιχεί στις περιοχές σύνδεσης του NADP και G6PD. Όσον αφορά τις μεταλλάξεις των τάξεων II & III τα στοιχεία δεν είναι τόσο συγκεκριμένα. Έτσι μέχρι τώρα έχουν αναγνωριστεί πέντε μεταλλάξεις της τάξης II στο εξώνιο 6, τέσσερις στο 12 και οι υπόλοιπες στα εξώνια 3,5,9 και 11. Τέλος η πλειοψηφία των μεταλλάξεων της τάξης III εντοπίζεται πιο συχνά στο εξώνιο 4 ακολούθως στα εξώνια 5, 6 & 9 και λιγότερο συχνά στα εξώνια 7, 8 & 2 [121].

Ποικιλίες της Ανεπάρκειας σε G6PD

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ανεπάρκειας G6PD είναι η έκταση της γενετικής ποικιλότητας. Οι ποικιλίες της έλλειψης του G6PD περιγράφηκαν αρχικά με βάση τις διαφορές τους στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πηκτή αμύλου. Η μελέτη αυτού του χαρακτηριστικού σε άτομα με έλλειψη από διαφορετικούς πληθυσμούς έκανε προφανές ότι η ανεπάρκεια σε G6PD διαφέρει ανάμεσα στις διαφορετικές περιοχές του πλανήτη. Χρησιμοποιώντας αυτά τα βιοχημικά στοιχεία βρέθηκε ότι υπάρχουν περίπου 442 ποικιλίες της έλλειψης [95]. Η ποικιλία G6PD B αποτελεί το φυσιολογικό τύπο του ενζύμου που βρίσκεται στους περισσότερους πληθυσμούς.

Αφρικάνικη Ποικιλία

Η ανεπάρκεια σε G6PD στους Αφρικάνικους πληθυσμούς είναι σχετικά ήπια. Χαρακτηρίζεται G6PD A⁻ και η συχνότητα του αντίστοιχου γονιδίου στους Αφρο-Αμερικάνους είναι περίπου 11% [123]. Μία επίσης συχνή ποικιλία στον πληθυσμό των μαύρων είναι η G6PD A (τάξη IV) η οποία ονομάζεται έτσι λόγω της πιο γρήγορης ηλεκτροφορητικής κινητικότητάς της και έχει πλήρη ενζυμική δραστηριότητα. Πρόσφατες μελέτες έχουν καθορίσει τη μοριακή βλάβη σε αυτή και σε άλλες ποικιλίες G6PD. Έτσι μία αλλαγή A σε G στο νουκλεοτίδιο 376 στο εξώνιο 5 έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση της ασπαραγίνης από ασπαρτικό οξύ, στην αμινοξική θέση 126 (η αντικατάσταση αυτή πιθανόν εξηγεί την ταχύτερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα των δύο ποικιλιών A και A⁻). Μία δεύτερη μετάλλαξη στην G6PD A⁻, η αλλαγή G σε A στο νουκλεοτίδιο 202 στο εξώνιο 4 έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση της βαλίνης από τη μεθειονίνη στο αμινοξύ 68 και υποθετικά είναι υπεύθυνη για τη μειωμένη σταθερότητα της ποικιλίας αυτής [124] (Η δεύτερη μετάλλαξη μπορεί επίσης να είναι G→T στο νουκλεοτίδιο 680 ή T→C στο νουκλεοτίδιο 968[125]).

Μεσογειακή Ποικιλία

Στη Μεσογειακή ποικιλία της G6PD, η δραστηριότητα του ενζύμου είναι μόλις ανιχνεύσιμη και υπάρχει μεγαλύτερος κίνδυνος αιμολυτικής αναιμίας. Μία μετάπτωση C προς T στο νουκλεοτίδιο 563 στο εξώνιο 6, έχει σαν αποτέλεσμα την αντικατάσταση της σερίνης από φαινυλαλανίνη στο αμινοξύ 188 και πιθανώς ευθύνεται για τη μειωμένη δραστηριότητα και σταθερότητα της ποικιλίας αυτής.[124].

Ανατολικές Ποικιλίες

Σε πολλές Ασιατικές χώρες έχει αναφερθεί μία μεγάλη ετερογένεια σχετικά με την ανεπάρκεια σε G6PD. Έτσι μεταξύ άλλων έχουν αναφερθεί η Ube^{241T} και Konan^{241T} στην Ιαπωνία, η G6PDViangchan^{871A} σε πληθυσμούς της Ινδίας, του Λάος και των Φιλιππίνων και η Kaiping^{1388G} στην Κίνα και το Λάος [125].

Συχνότητες & Κατανομή των Διάφορων Ποικιλιών G6PD

Η ανεπάρκεια G6PD είναι συνήθης και προσβάλλει περίπου 400 εκατομμύρια ανθρώπους σε όλον τον κόσμο. Η συχνότητα της ανεπάρκειας διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στους διαφορετικούς πληθυσμούς. Έτσι η συχνότητα του αντίστοιχου μεταλλαγμένου γονιδίου στους μαύρους Αμερικάνους κυμαίνεται μεταξύ 10-11% [126-127] και αυτή της Μεσογειακής ποικιλίας είναι πάνω από 60% σε μερικές ομάδες Κούρδων-Εβραίων και πάνω από 30% σε κάποια περιοχή της Σαρδηνίας. Επίσης σε μία έρευνα στην Ελλάδα σε περισσότερα από 1.200.000 νεογνά η συχνότητα του υπεύθυνου γονιδίου ήταν περίπου 4,5% [128]. Τέλος, ιδιαίτερα υψηλές συχνότητες συναντάμε και στην Ασία.

Όσον αφορά την κατανομή των διαφορών ποικιλιών, γενικά μπορούμε να πούμε ότι οι μεταλλάξεις περιορίζονται σε γειτονικές γεωγραφικά περιοχές ή σε περιοχές όπου έχουν παρατηρηθεί έντονες πληθυσμιακές μεταναστεύσεις κατά το παρελθόν. Έτσι η ποικιλία G6PD A⁺ παρουσιάζει μία ευρεία κατανομή που περιλαμβάνει όλη την Αφρική, τη Νότια Ευρώπη και γενικά τις περιοχές όπου το εμπόριο σκλάβων έφερε Αφρικανούς στον Νέο Κόσμο ενώ η μεσογειακή ποικιλία εντοπίζεται στην Νότια Ευρώπη, στη Μέση Ανατολή και στην Ινδία [108].

Ερυθροκύτταρα & Ανεπάρκεια του Ενζύμου G6PD

Αν και το G6PD εκφράζεται σε όλους τους ιστούς τα κλινικά συμπτώματα εμφανίζονται σχεδόν αποκλειστικά στα ερυθροκύτταρα. Τα ερυθροκύτταρα μπορούν να ολοκληρώσουν τις λειτουργίες τους στη διάρκεια της ζωής τους (120 μέρες περίπου) μόνο αν αντέξουν σε ποικίλα εσωτερικά και εξωτερικά φορτία. Για το λόγο αυτό απαιτούνται ATP και αναγωγικά ισοδύναμα (π.χ. NADPH) τα οποία θα πρέπει να αναγεννώνται συνεχώς και να παραμένουν σε σταθερά επίπεδα. Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών αποτελεί τη μοναδική πηγή NADPH για τα ερυθροκύτταρα, καθώς αυτά στερούνται μιτοχονδρίων και η παραγωγή NADPH παίζει σημαντικότερο ρόλο στην προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες, τη διατήρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης και των ανηγμένων σουλφυδρυλομάδων [97]. Έτσι, ενώ στα φυσιολογικά ερυθροκύτταρα κάθε οξειδωτική ουσία που ελαττώνει τα επίπεδα του NADPH αυξάνει ταυτόχρονα το PPP 30 περίπου φορές (μάλιστα πρόσφατα βρέθηκε ότι η επιτάχυνση του μονοπατιού προκαλείται κυρίως μέσω αύξησης της έκφρασης της G6PD), στα ερυθροκύτταρα με έλλειψη σε G6PD δεν μπορεί να αυξηθεί η ροή της γλυκόζης σε αυτά με αποτέλεσμα την μη ικανοποιητική αύξηση του PPP σε συνθήκες οξειδωτικού στρες. Αυτό έχει σαν συνέπεια τα ερυθροκύτταρα με έλλειψη σε G6PD να μην μπορούν να ανάγουν το NADP σε NADPH με τον κανονικό ρυθμό με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων GSH και NADPH και αύξηση της ευαισθησίας τους στο οξειδωτικό στρες [97,121].

Οξειδωτικό Στρες σε Άτομα με Ανεπάρκεια του Ενζύμου G6PD

Γενικά η πλειοψηφία των ατόμων με ανεπάρκεια σε G6PD είναι τελείως ασυμπτωτικοί και εμφανίζουν κάποια συμπτώματα μόνο κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες. Έχει αναφερθεί ότι άτομα με έλλειψη G6PD παρουσιάζουν αυξημένη γλυκοσυλίωση πρωτεϊνών, κυρίως όσων σχετίζονται με τον κερατοειδή χιτώνα του ματιού γεγονός που μπορεί να προκαλέσει καταρράκτη. Υπάρχουν επίσης αραιές αναφορές που υποδεικνύουν πως όταν η δραστηριότητα της G6PD είναι πολύ χαμηλή και το οξειδωτικό στρες αυξημένο, τότε μπορεί να προκληθεί αυξημένη καταστροφή ερυθρών αιμοσφαιρίων, και κατά συνέπεια να εμφανιστεί αιμολυτική αναιμία [129].

Ένας από τους λόγους που τα άτομα με έλλειψη G6PD παρουσιάζουν μεγαλύτερη προδιάθεση για τη δημιουργία οξειδωτικού στρες μπορεί να είναι τα χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών των ατόμων αυτών. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι άτομα με έλλειψη G6PD έχουν χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης E, βιταμίνης C, καροτενοειδών και γλουταθειόνης [129].

Οξειδωτικό Στρες Κατά την Άσκηση σε Άτομα με Ανεπάρκεια του Ενζύμου G6PD

Όπως προαναφέρθηκε, η άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες. Βέβαια, τα άτομα τα οποία πάσχουν από έλλειψη G6PD, θεωρητικά τουλάχιστον, βρίσκονται σε μειονεκτικότερη θέση επειδή τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης είναι χαμηλότερα, και επομένως υπολείπονται σε έναν από τους μηχανισμούς αντιμετώπισης του οξειδωτικού στρες κατά την άσκηση. Τα ερυθροκύτταρα φαίνεται να βρίσκονται σε ακόμα μειονεκτικότερη κατάσταση, αφού σε αυτά ο μόνος τρόπος για να αναχθεί η γλουταθειόνη είναι μέσω του NADPH, που με τη σειρά του παράγεται από τη δράση του G6PD. Ωστόσο, παρόλη την ύπαρξη θεμελιωμένης θεωρητικής βάσης για μειωμένη αντοχή των ατόμων που πάσχουν από έλλειψη G6PD στο οξειδωτικό στρες της άσκησης, δεν υπάρχει καμία σχετική έρευνα που να έχει μελετήσει την ανταπόκριση των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου στην άσκηση.

Σκοπός της Εργασίας

Από την βιβλιογραφική ανασκόπηση φαίνεται ότι δεν υπάρχει καμία σχετική έρευνα που να έχει μελετήσει την ανταπόκριση του οργανισμού ατόμων που πάσχουν από έλλειψη του ενζύμου G6PD στην άσκηση. Συνεπώς, σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να μελετήσει την προσαρμογή διαφόρων αντιοξειδωτικών μηχανισμών και το προκαλούμενο οξειδωτικό στρες αμέσως μετά το τέλος έντονης άσκησης σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD. Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκε η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού, τα επίπεδα των, GSH, GSSG, όπως επίσης και του λόγου GSH/GSSG και η δραστηριότητα της καταλάσης του ορού, όσον αφορά τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Επίσης, μετρήθηκαν και τα επίπεδα της MDA, που αποτελεί σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, δείκτη του οξειδωτικού στρες.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

Για τους φωτομετρικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιήθηκε φωτόμετρο *Hitachi U-1500*. Τα υλικά TBA, DTNB, DPPH, NADPH, ρεδουκινάση της γλουταθειόνης και οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης προμηθεύτηκαν από την εταιρεία SIGMA. Από την εταιρεία MERCK προμηθεύτηκαν τα NaH_2PO_4 , NaHPO_4 και Tris (hydroxymethyl) aminomethane. Τέλος, τα TCA και Na_2SO_4 αγοράστηκαν από τις εταιρείες Pancreac και Fluca αντίστοιχα.

Συμμετέχοντες

Στη συγκεκριμένη άσκηση έλαβαν μέρος 6 άτομα αγύμναστα με έλλειψη σε G6PD ηλικίας 18-40 χρονών. Οι συμμετέχοντες ήταν μη καπνιστές και δεν είχαν λάβει συμπληρώματα διατροφής ή αντιφλεγμονώδη το τελευταίο μήνα καθώς και κατά τη διάρκεια της μελέτης. Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων βρέθηκαν 6 υγιή άτομα (control) τα οποία ταίριαζαν με τα άτομα με έλλειψη στο φύλο, ηλικία, μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου και ποσοστό λίπους.

Σωματομετρικά χαρακτηριστικά και προσδιορισμός μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου

Οι συμμετέχοντες προσέρχονταν στο εργαστήριο το πρωί (8-10πμ), μετά από ολονύχτια νηστεία και αποφυγή καφεϊνούχων και αλκοολούχων ποτών το προηγούμενο βράδυ και άσκησης για τρεις ημέρες πριν από τη δοκιμασία. Οι συμμετέχοντες υποβάλλονταν σε μετρήσεις για την αξιολόγηση των σωματομετρικών τους χαρακτηριστικών (βάρους, ύψους και ποσοστό λίπους). Στη συνέχεια αφού ξεκουράζονταν σε καθιστή θέση για μισή ώρα γινόταν η πρώτη αιμοληψία.

Άσκηση μικρής διάρκειας και μέγιστης έντασης μέχρι εξάντλησης

Ο προσδιορισμός της φυσικής κατάστασης των συμμετεχόντων και της ανταπόκρισής τους στην άσκηση έγινε με βάση τον υπολογισμό της VO_2max σε δαπεδοεργόμετρο χρησιμοποιώντας ανοιχτή σπειρομετρία (Sensormedics Vmax29). Μετά το τέλος της δοκιμασίας λάβαινε χώρα η δεύτερη αιμοληψία.

Ορός αίματος και αιμόλυμα

Ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, της μαλονδυαλδεύδης και της καταλάσης γινόταν στον ορό του αίματος. Το αίμα τοποθετείτο στον ειδικό σωλήνα με το τζελ (vacutainer tube) και παρήμενε σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά μέχρι να πήξει. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 3500 rpm (1370 g) για 10 λεπτά και στους 5°C. Έπειτα συλλεγόταν το υπερκείμενο, μοιραζόταν σε σωλήνες eppendorf (περίπου 200μl/σωλήνα) και τέλος καταψύχεται στους -20°C.

Για τον προσδιορισμό της ανηγμένης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης χρησιμοποιείται αιμόλυμα ολικού αίματος. Το αίμα τοποθετείται σε vacutainer με EDTA ως αντιπηκτικό και στη συνέχεια προστίθεται 1ml 5% TCA. Μετά από ισχυρή ανάδευση ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 6000 rpm(4000 g) για 20 λεπτά και στους 5°C. Έπειτα το υπερκείμενο μοιραζόταν σε σωλήνες erpendorf (περίπου 200μl/σωλήνα) και μετά την προσθήκη 60μl 5% TCA, ακολουθούσε ισχυρή ανάδευση. Έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 16000 rpm (28620g) για 5 λεπτά στους 5°C και το υπερκείμενο συλλεγόταν σε νέο σωλήνα erpendorf και καταψυχόταν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ορού (Total Antioxidant Capacity)

Αρχή της μεθόδου: Ο συγκεκριμένος προσδιορισμός βασίζεται στην εξουδετέρωση του 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) από τα αντιοξειδωτικά του ορού και πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας το πρωτόκολλο των *A. Janaszewska & G. Bartosz (2002)* [130]. Το DPPH είναι μια χρωμοφόρος ρίζα της οποίας το χρώμα μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης με τα αντιοξειδωτικά του ορού από ιώδες σε καφέ. Συνεπώς μετρώντας την απορρόφηση του ορού 30 λεπτά μετά την προσθήκη διαλύματος DPPH μπορούμε να προσδιορίσουμε την αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού.

Ο ορός (20 μl) αναμειγνύεται με 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (480 μl) και 0,1 mM DPPH (500 μl) και μετά από ανάδευση και 30 λεπτά επώαση ακολουθούσε φωτομέτρηση στα 520nm. Η κυψελίδα του control περιείχε μόνο 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (500 μl) και 0,1 mM DPPH (500 μl). Σαν θετικό control χρησιμοποιούταν διάλυμα που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM pH=7,4 (495 μl), 0,1 mM DPPH (500 μl) και 10 mM ασκορβικό οξύ(5 μl). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν η εκατοστιαία μείωση της απορρόφησης του control

$$\% \text{ μείωση} = [\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{δείγματος}} / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$$

και όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν εις τριπλούν.

Μαλονδυαλδεύδη- TBARS (ThioBarbituric Acid-Reactive Substances)

Αρχή της μεθόδου: Είναι γνωστό ότι ένας από τους στόχους των ελεύθερων ριζών είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών οδηγώντας σε μία αλυσιδωτή αντίδραση γνωστή σαν υπεροξειδωση των λιπών. Τα παραγόμενα υπεροξειδία των λιπών διασπώνται παράγοντας αέριους υδρογονάνθρακες και αλδεύδες. Οι τελευταίες και κυρίως η MDA χρησιμοποιούνται σαν δείκτες του οξειδωτικού στρες λόγω άσκησης και μπορούν να προσδιοριστούν ποσοτικά μέσω HPLC, με φωτομετρικές τεχνικές και φασματομετρίας φθορισμού. Στην παρούσα άσκηση η ολική μαλονδυαλδεύδη (MDA) μετρήθηκε με τη μέθοδο TBARS (ThioBarbituric Acid-Reactive Substances) του *Keles et al.(2001)*, [131] που ανήκει στις φωτομετρικές τεχνικές.

Ο ορός (100 μl) αναμιγνυόταν με 35% τριχλωροξικό οξύ (TCA) (500 μl) και μετά από ανάδευση ακολουθούσε προσθήκη 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl pH 7,4 (500 μl). Τα δείγματα αναδεύονταν και επωάζονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

Στη συνέχεια προστίθετο στα δείγματα 0,75% θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) (1ml) σε 2M Na₂SO₄ (1ml) και μεταφέρονταν σε υδατόλουτρο στους 100^oC για 45 λεπτά. Ακολούθως τα δείγματα μεταφέρονταν σε πάγο για 5 λεπτά και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 10000 rpm(950g) για 10 λεπτά. Τέλος το υπερκείμενο συλλεγόταν και φωτομετρείτο στα 530nm.

Στο τυφλό ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι ο ορός αντικαταστήθηκε από 100μl απεσταγμένο H₂O. Η ποσότητα της MDA εκφραζόταν σαν nmoles MDA/ml ορού και προσδιοριζόταν από τον τύπο:

$$\text{TBARS} = [\text{Abs}_{\text{δείγματος}} / 1,56 \times 10^5] \times [\text{συνολικός όγκος στην κυψελίδα (ml)} / 1000 \text{ml}] \times [1000 \mu\text{l} / \text{[όρος στην κυψελίδα (}\mu\text{l)}]$$

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν εις τριπλούν.

Καταλάση

Αρχή της μεθόδου: Ο προσδιορισμός αυτός βασίζεται στην απορρόφηση που δίνει το H₂O₂ αμέσως μετά την προσθήκη του στον ορό και πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του *Aebi (1984)* [132]. Συγκεκριμένα, μετά την προσθήκη αρχίζει η αντίδραση που καταλύεται από την καταλάση με αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης του H₂O₂ και συνεπώς της απορρόφησής του. Η φωτομέτρηση συνεχίζεται για 1 λεπτό μετά την προσθήκη του H₂O₂ και όσο μεγαλύτερη η μείωση της απορρόφησης τόσο μεγαλύτερη η δραστηριότητα της καταλάσης του ορού.

Ο ορός (20 μl) αναμιγνυόταν με 67 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (2,975 ml) και ακολουθούσε επώαση στους 37^oC για 10 λεπτά. Στη συνέχεια προτίθετο 8,82M H₂O₂ (5 μl), οπότε η αντίδραση παρακολουθείτο στα 240nm (UV) για 1 λεπτό. Τα αποτελέσματα συγκρίνονταν με αυτά του τυφλού, που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα στη θέση του ορού. Η δραστηριότητα της καταλάσης εκφραζόταν σε μmol/min/ml ορού και προσδιοριζόταν από τον τύπο:

$$\text{Δραστηριότητα (U/ml} = \mu\text{mol/min/ml ορού)} = [\Delta\text{O.D.} / 62,4] \times [\text{συνολικός όγκος στην κυψελίδα (ml)} / 1000 \text{ ml}] \times [1000 \mu\text{l} / \text{ορός στην κυψελίδα (}\mu\text{l)}]$$

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν εις τριπλούν.

Ανηγγμένη Γλουταθειόνη(GSH)

Αρχή της μεθόδου: Ο συγκεκριμένος προσδιορισμός βασίζεται στην απορρόφηση που δίνει το κίτρινο προϊόν που προκύπτει μετά την στοιχειομετρική αντίδραση του 5,5-DiThio-bis(2-NitroBenzoic acid) (DTNB) με τη σουλφυρυδολομάδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (Khyntium & Prasad) (2003) [133] και το οποίο απορροφά στα 412nm.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Reddy *et al.*(2004) [134], το αιμόλυμα (20 μl) αναμειγνύεται με 67 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH7,95 (660 μl) και με 330 μl DTNB* και μετά από ανάδευση επωάζονται για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και στο σκοτάδι. Στη συνέχεια ακολουθούσε φωτομέτρηση στα 412nm. Το τυφλό περιείχε νερό (20 μl), στη θέση του αιμόλυματος. Η ποσότητα της GSH εκφραζόταν σαν mmoles/ml αίματος και προσδιοριζόταν από τον τύπο:

$$\text{Ποσότητα GSH} = [\text{Abs}_{\text{δείγματος}} / 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}] \times [\text{συνολικός όγκος στην κυψελίδα (ml)} / 1000 \text{ml}] \\ \times [1000 \mu\text{l} / \text{αιμόλυμα στην κυψελίδα (}\mu\text{l)}] \times \text{παράγοντας αραιώσης}$$

Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιούνταν εις τριπλούν.

*Το διάλυμα DTNB παρασκευάζεται με την προσθήκη 39,6 mg σε 100ml 1%Na-citrate.

Οξειδωμένη Γλουταθειόνη(GSSG)

Αρχή της μεθόδου: Ο συγκεκριμένος προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Tietze F., *et al.* (2004) [135] και βασίζεται στην μετατροπή της οξειδωμένης γλουταθειόνης σε ανηγμένη με τη βοήθεια της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase) (GR), η οποία χρησιμοποιεί το NADPH σαν αναγωγική δύναμη. Η ανηγμένη γλουταθειόνη που παράγεται αντιδρά στη συνέχεια με το DTNB και προσδιορίζεται η συγκέντρωση του έγχρωμου προϊόντος (κίτρινο) της αντίδρασης με φωτομέτρηση. Για αυτόν τον προσδιορισμό απαιτείται η κατασκευή πρότυπης καμπύλης.

Για τον προσδιορισμό της οξειδωμένης γλουταθειόνης αρχικά ρυθμίστηκε το pH του αιμόλυματος (260ml) στο 7-7,5 με προσθήκη 1M NaOH. Στη συνέχεια προστέθηκε 2-VinylPyridine monomer (4μl) και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Το 2-VP δεσμεύει την ανηγμένη γλουταθειόνη του ορού με αποτέλεσμα η μόνη ανηγμένη γλουταθειόνη που είναι διαθέσιμη για σύνδεση με το DTNB είναι αυτή που προκύπτει από την μετατροπή της οξειδωμένης. Στη συνέχεια, σε 5μl δείγματος προστέθηκαν 3 mM NADPH (100μl), 10 mM DTNB (100μl), stock buffer (143 mM Na⁻P, 6,3 mM Na₂-EDTA) pH=7, 5 (600 μl), H₂O (189μl), και μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 λεπτά το ένζυμο GR (1μl). Μετά από γρήγορη ανάδευση ακολούθησε φωτομέτρηση στα 412nm εις διπλούν για το κάθε δείγμα οπότε υπολογίστηκε ο ρυθμός σχηματισμού έγχρωμου προϊόντος ανά λεπτό. Ο προσδιορισμός της GSSG έγινε σύμφωνα με την εξίσωση που προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη και έπειτα η τιμή της συγκέντρωσης πολλαπλασιάστηκε επί 400 για να υπολογισθούν τα nmoles της GSSG σύμφωνα με το βαθμό αραιώσης. Η

πρότυπη καμπύλη προέκυψε από την απορρόφηση διαλυμάτων με γνωστές συγκεντρώσεις GSSG σύμφωνα με τον πίνακα 5.

*Τα NADPH & DTNB είναι διαλυμένα σε stock buffer.

<i>μL</i>	<i>Τυφλό</i>	<i>0,12 nmoles</i>	<i>0,25 nmoles</i>	<i>0,75 nmoles</i>	<i>1,5 nmoles</i>
GSSG(αραιωμένη)	-	12	25	75	150
NADPH	100	100	100	100	100
DTNB	100	100	100	100	100
Stock buffer	600	600	600	600	600
dH ₂ O	199	187	174	124	49
GR	1	1	1	1	1

Πίνακας 5. Διαλύματα Πρότυπης Καμπύλης

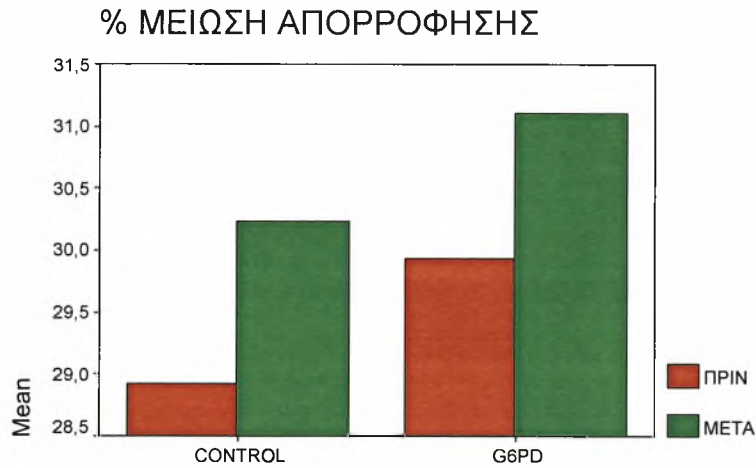
Στατιστική Ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης 2 παραγόντων για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Αν υπάρχει κύρια επίδραση της ομάδας ή της άσκησης τότε γίνεται ανάλυση απλών κύριων επιδράσεων. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $p < 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ορού (Total Antioxidant Capacity -TAC)

Όπως γίνεται φανερό η άσκηση δεν μετέβαλε την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού σε καμία από τις δύο ομάδες ατόμων (φυσιολογικοί & με έλλειψη). Επιπλέον, συγκρίνοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού των φυσιολογικών με αυτήν των ατόμων με έλλειψη πριν και μετά την άσκηση επίσης δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά.

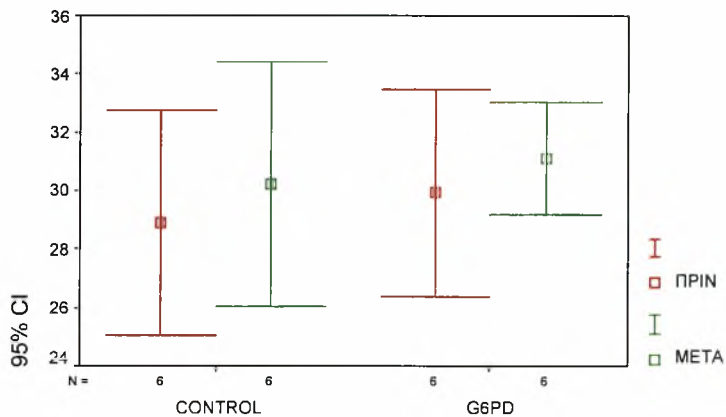


ΟΜΑΔΑ

ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑ 1.

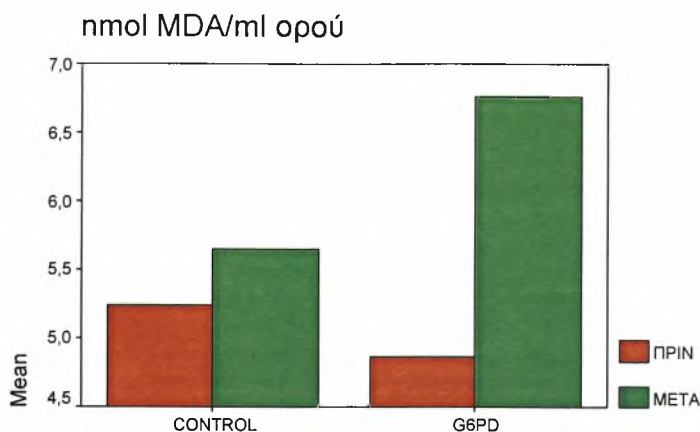
ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΟΡΟΥ

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΕΛΛΕΙΨΗ



ΟΜΑΔΑ

Μαλονδυαλδεΐδη (TBARS- ThioBarbituric Acid-Reactive Substances)

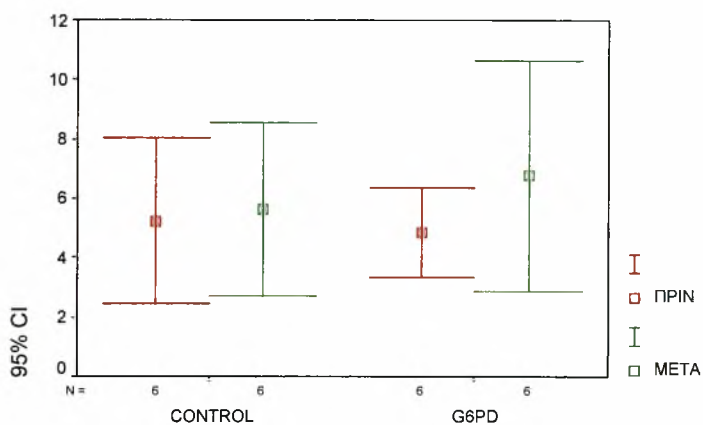


ΟΜΑΔΑ

ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑ 2.

ΜΑΛΟΝΔΥΑΛΔΕΥΔΗ-TBARS

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΜΑΛΟΝΔΥΑΛΔΕΥΔΗΣ



ΟΜΑΔΑ

ERROR BAR 2.

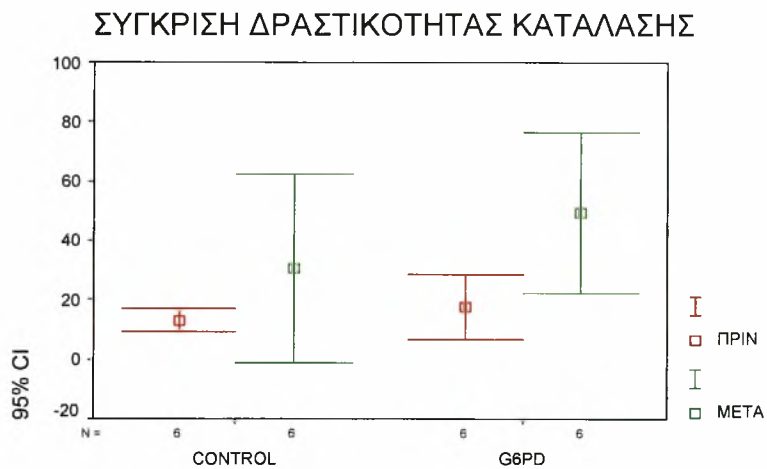
Όπως προέκυψε από τη στατιστική ανάλυση δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της μαλονδυαλδεΐδης πριν και μετά την άσκηση τόσο στα φυσιολογικά άτομα όσο και σε αυτά με έλλειψη του ενζύμου. Ακόμη, συγκρίνοντας τα επίπεδα της μαλονδυαλδεΐδης στον ορό των φυσιολογικών με αυτά των ατόμων με έλλειψη πριν την άσκηση δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά. Τέλος δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στα επίπεδα της μαλονδυαλδεΐδης μεταξύ των ατόμων με έλλειψη και των φυσιολογικών μετά την άσκηση.

Καταλάση



ΟΜΑΔΑ

ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑ 3.

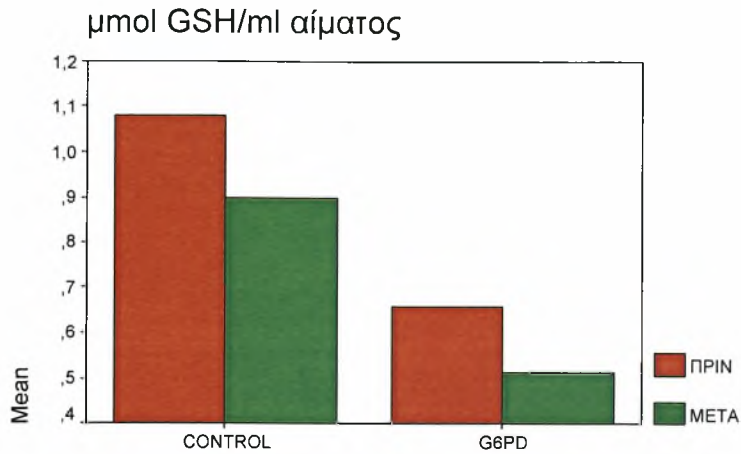


ΟΜΑΔΑ

ERROR BAR 3.

Όπως φαίνεται, η δραστηριότητα της καταλάσης αυξήθηκε σημαντικά έπειτα από την επίδραση της άσκησης μόνο στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου. Αντίθετα δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στη δραστηριότητα του ενζύμου των φυσιολογικών ατόμων πριν και μετά την άσκηση. Τέλος, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη δραστηριότητα του ενζύμου μεταξύ φυσιολογικών και ατόμων με έλλειψη τόσο πριν όσο και μετά την άσκηση.

Ανηγμένη Γλουταθειόνη (GSH)

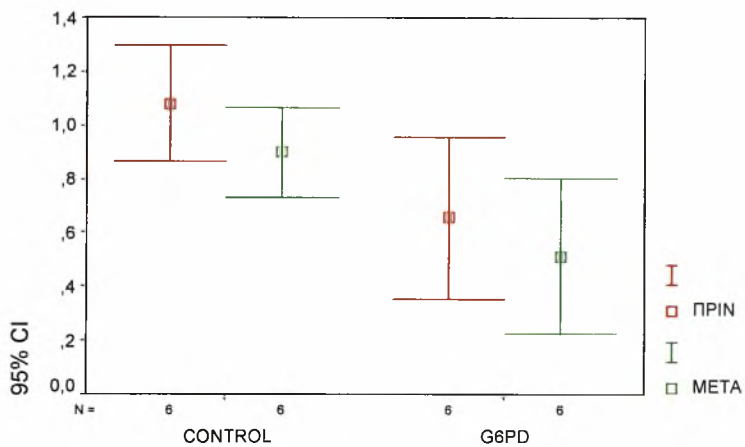


ΟΜΑΔΑ

ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑ 4.

ΑΝΗΓΜΕΝΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ(GSH)

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ GSH

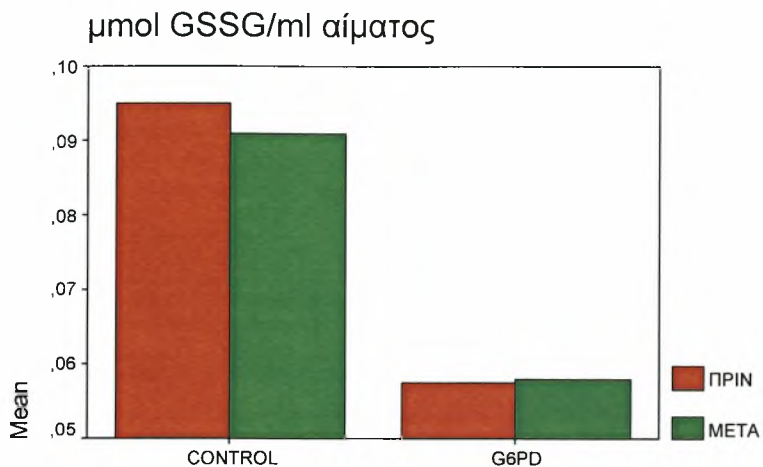


ΟΜΑΔΑ

ERROR BAR 4.

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η άσκηση προκάλεσε μείωση της GSH και στις δύο εξεταζόμενες ομάδες. Συγκρίνοντας τα επίπεδα της GSH μεταξύ των δύο ομάδων παρατηρήθηκε ότι τα άτομα με έλλειψη του ενζύμου έχουν περίπου τη μισή συγκέντρωση GSH σε σχέση με τα φυσιολογικά τόσο πριν όσο και μετά την άσκηση.

Οξειδωμένη Γλουταθειόνη (GSSG)

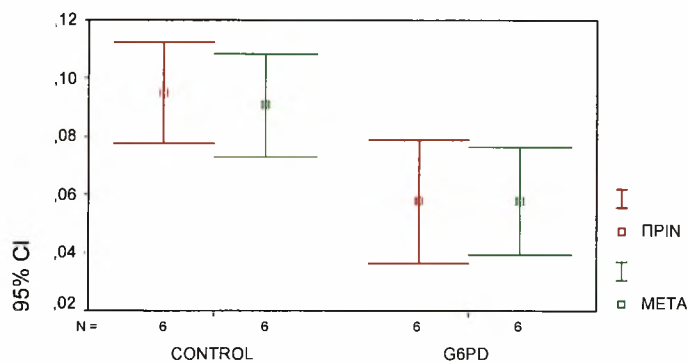


ΟΜΑΔΑ

ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑ 5.

ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ(GSSG)

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ(GSSG)

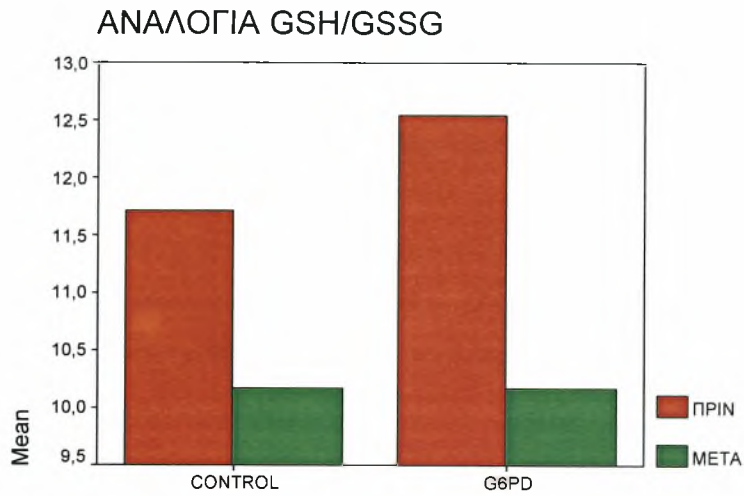


ΟΜΑΔΑ

ERROR BAR 5.

Όπως προκύπτει από τα παραπάνω γραφήματα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της οξειδωμένης γλουταθειόνης μεταξύ των φυσιολογικών και αυτών με έλλειψη πριν, αλλά και μετά την άσκηση($P=0,012$). Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της γλουταθειόνης στους φυσιολογικούς πριν και μετά την άσκηση. Το ίδιο ισχύει και για τα άτομα με έλλειψη G6PD.

Αναλογία GSH:GSSG

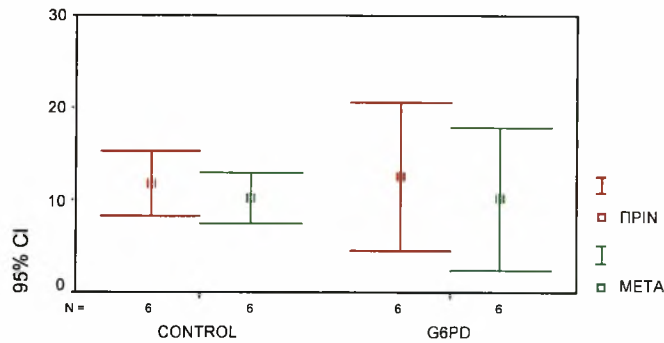


ΟΜΑΔΑ

ΡΑΒΔΟΓΡΑΜΜΑ 6.

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΑΛΟΓΙΩΝ GSH/GSSG

ΦΥΣ/ΚΩΝ ΚΑΙ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΕΛΛΕΙΨΗ



ΟΜΑΔΑ

ERROR BAR 6.

Όπως προκύπτει από τα γραφήματα υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση της αναλογίας GSH:GSSG μετά την άσκηση τόσο στους φυσιολογικούς όσο και στους G6PDD. Επιπλέον μεταξύ των φυσιολογικών και των G6PDD παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά της αναλογίας GSH:GSSG πριν την άσκηση. Το ίδιο ισχύει και για μετά την άσκηση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η μελέτη των αλλαγών που συμβαίνουν στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD αμέσως μετά το τέλος έντονης άσκησης. Από την βιβλιογραφική ανασκόπηση φαίνεται ότι η εργασία αυτή αποτελεί την πρώτη συστηματική προσπάθεια μελέτης της ανταπόκρισης του οργανισμού των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD στην άσκηση καθώς στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν πέντε παράμετροι και επιπλέον υπήρχε ικανοποιητικό δείγμα ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD (6 άτομα) σε αντίθεση με τις προηγούμενες που χρησιμοποιούσαν ένα άτομο.

Η παραγωγή ελεύθερων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς είναι συνεχής κι αναπόφευκτη. Είναι αποτέλεσμα πολλών φυσιολογικών διεργασιών κι αναμφισβήτητα έχουν σημαντική βιολογική δράση μέσα στο σώμα. Ωστόσο, η παρουσία τους σε υψηλά επίπεδα μέσα στο σώμα είναι ανεπιθύμητη καθώς δημιουργεί αρκετά προβλήματα που μπορούν συνοψιστούν στα εξής:

1. Επίθεση σε μακρομόρια
2. Γήρανση
3. Πρόκληση ασθeneιών

Για τον λόγο αυτό έχει αναπτυχθεί μία μεγάλη ποικιλία ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών (ενζυμικών και μη), οι οποίοι σε συνδυασμό με άλλα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται από την τροφή βοηθούν στην προστασία των κυττάρων από τις αρνητικές συνέπειες των ριζών εξουδετερώνοντάς αυτές. Ωστόσο, το δυναμικό της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού δεν είναι απεριόριστο και έτσι σε περιπτώσεις που η παραγωγή των ελεύθερων ριζών υπερβαίνει αυτό το δυναμικό δημιουργείται διαταραχή της ισορροπίας ανάμεσα στις διάφορες οξειδωτικές ουσίες και στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Έτσι δημιουργείται μία κατάσταση που είναι γνωστή σαν οξειδωτικό στρες. Υπάρχουν πολλές καταστάσεις που οδηγούν στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες και μία από αυτές είναι η άσκηση. Πράγματι υπάρχουν πολλά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η άσκηση προκαλεί σημαντική αύξηση της παραγωγής ελεύθερων ριζών σε πολλούς ιστούς(μυς, καρδιά και ήπαρ) [136], αυξάνει τους βιολογικούς δείκτες του οξειδωτικού στρες (πρωτεϊνικά καρβονύλια και MDA)[137] και αλλάζει τα επίπεδα των διαφόρων αντιοξειδωτικών, ενζυμικών και μη[137-139]

Στη συγκεκριμένη εργασία για τη μελέτη της ανταπόκρισης του οργανισμού των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από έντονη άσκηση μικρής διάρκειας προσδιορίστηκαν οι μεταβολές: 1.στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού (TAC), 2.στην δραστηριότητα της καταλάσης του ορού, 3.στα επίπεδα της μαλονδυαλδεύδης και 4.στη συγκέντρωση της GSH και της GSSG.

Όσον αφορά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του ορού παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της TAC μετά την άσκηση και στις δύο εξεταζόμενες ομάδες (φυσιολογικοί, G6PDD) ωστόσο οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Επιπλέον, η αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού των φυσιολογικών δεν διέφερε σημαντικά από αυτή των G6PDD πριν αλλά και μετά την άσκηση. Η μικρή, έστω, αύξηση που παρατηρήθηκε

μετά την άσκηση υποδεικνύει ότι η άσκηση στην οποία υποβλήθηκαν οι συμμετέχοντες πιθανώς προκάλεσε οξειδωτικό στρες κάποιου βαθμού και ο οργανισμός ανταποκρίθηκε αυξάνοντας τη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό ήταν αναμενόμενο για τους φυσιολογικούς αφού αύξηση της TAC μετά από έντονη άσκηση έχει διαπιστωθεί και σε άλλες μελέτες. Όσον αφορά τους G6PDD η παρατηρούμενη αύξηση υποδεικνύει ότι η έλλειψη του συγκεκριμένου ενζύμου δεν επηρεάζει την ικανότητα του οργανισμού να αυξήσει τους αντίστοιχους μηχανισμούς για να αντιμετωπίσει την αυξημένη παραγωγή ριζών που προκαλείται από την άσκηση. Η τελευταία υπόθεση ενισχύεται και από το γεγονός ότι η TAC των φυσιολογικών κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με αυτήν των G6PDD πριν την άσκηση. Το ίδιο ισχύει και για μετά την άσκηση. Μία πιθανή εξήγηση αυτού του φαινομένου είναι η συνεργασία που παρατηρείται ανάμεσα στα διάφορα αντιοξειδωτικά που συμβάλλουν στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Με άλλα λόγια η απουσία ενός αντιοξειδωτικού μπορεί να καλυφθεί από την αντικατάστασή του από κάποιο άλλο αντιοξειδωτικό [140]. Στην περίπτωση μας η έλλειψη του ενζύμου G6PD οδηγεί σε μείωση των επιπέδων της GSH, ενός σημαντικού μη ενζυμικού αντιοξειδωτικού.

Από την άλλη, οι *Palazchetti et. al.* [143] παρατήρησαν μία σημαντική μείωση της TAC μετά την άσκηση αποδίδοντας αυτήν τη μείωση στην κατανάλωση των μη-ενζυμικών αντιοξειδωτικών κατά τη διάρκεια της άσκησης. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι ο προσδιορισμός της TAC παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα, όπως μικρή εξειδίκευση, τα οποία μπορεί να μειώνουν την ικανότητα προσδιορισμού μιας ακριβούς εικόνας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του σώματος [144].

Μια από τις αρνητικές συνέπειες της παραγωγής ελεύθερων ριζών είναι η επίθεση στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των κυτταρικών μεμβρανών προκαλώντας υπεροξείδωση των λιπιδίων. Αυξημένα επίπεδα της τελευταίας χρησιμοποιούνται συχνά σαν απόδειξη ανάπτυξης οξειδωτικού στρες στους διάφορους ιστούς [146-147]. Οι *Davis et.al.* [148] έδειξαν ότι η άσκηση μέχρι εξάντλησης προκαλεί δύο-τρεις φορές αύξηση στη συγκέντρωση των ελεύθερων ριζών στους μύες και το ήπαρ που συνοδεύεται από σημαντική αύξηση των TBARS.

Στη συγκεκριμένη άσκηση η υπεροξείδωση των λιπιδίων, η οποία βασιζόταν στη μέτρηση της MDA, παρουσίαζε τάση αύξησης μετά την άσκηση τόσο στους φυσιολογικούς όσο και στους G6PDD. Ωστόσο, η αύξηση αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική σε καμία από τις δύο εξεταζόμενες ομάδες. Το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται σε δύο λόγους: 1. στον προστατευτικό ρόλο των αντιοξειδωτικών (TAC) στην υπεροξείδωση των λιπιδίων που προκαλείται από την άσκηση, τα οποία επίσης παρουσιάζουν αύξηση μετά την άσκηση [141], 2. η ένταση και/ή διάρκεια της άσκησης στην οποία υποβλήθηκαν οι συμμετέχοντές μας δεν ήταν αρκετή για να προκαλέσει σημαντική αύξηση των επιπέδων MDA [152].

Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με αυτά πολλών εργασιών που δείχνουν αύξηση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων σαν αποτέλεσμα της άσκησης. Έτσι, οι *Kretzschmar et.al.* [149] και *Laaksonen et.al.* [150] ανέφεραν αύξηση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων μετά από έντονη άσκηση σε αγύμναστα άτομα. Επιπλέον, οι *Marzatico et.al* [151] βρήκαν αύξηση των επιπέδων TBARS του πλάσματος σε δρομείς και μαραθωνοδρόμους μετά από έντονη άσκηση και έδειξαν ότι όσο πιο έντονη είναι η άσκηση τόσο πιο μεγάλη είναι αύξηση της προκαλούμενης από

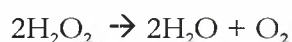
την άσκηση υπεροξειδωσης λιπιδίων. Ομοίως, οι *Bloomer et.al.* έδειξαν ότι τόσο η αναερόβια όσο και η αερόβια άσκηση προκάλεσαν αύξηση των επιπέδων της MDA [152].

Ωστόσο, υπάρχουν και μελέτες που δεν αναφέρουν αύξηση των επιπέδων TBARS σαν απόκριση στην άσκηση. Έτσι δεν παρατηρήθηκε καμία αύξηση στα επίπεδα TBARS του πλάσματος σε μετρίως γυμνασμένα άτομα μετά από τρέξιμο για 2,5 ώρες [153-154] και μετά από επαναλαμβανόμενες ισομετρικές συσπάσεις [155]. Επιπλέον, σε πολλές μελέτες όπου οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε αναερόβια ισότονη ή έκκεντρη άσκηση δεν παρουσίασαν καμία αλλαγή στα επίπεδα της MDA ή των TBARS.

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αποκλίσεις στα αποτελέσματα που παρατηρούνται ανάμεσα στις διάφορες μελέτες ίσως οφείλονται στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Σε πολλές μελέτες χρησιμοποιείται η μέθοδος TBARS που από πολλούς μελετητές δεν θεωρείται ιδιαίτερα ακριβής για μελέτες οξειδωτικού στρες στον άνθρωπο γιατί στερείται εξειδίκευσης καθώς μπορεί να αντιδρά όχι μόνο με τη MDA αλλά και με κορεσμένες και ακόρεστες μη λειτουργικές αλδεύδες, υδρογονάνθρακες και προσταγλανδίνες [155]. Επιπλέον όπως έχει δηλωθεί από τον *Sen* (1995) “ο προσδιορισμός του οξειδωτικού στρες με βάση την υπεροξειδωση λιπιδίων είναι μία έμμεση προσέγγιση που μπορεί να είναι αξιόπιστη μόνο όταν μελετώνται ταυτόχρονα κι άλλοι δείκτες του οξειδωτικού στρες”.

Τέλος, τα ποσά της MDA στους φυσιολογικούς πριν την άσκηση δεν έχουν αξιοσημείωτη διαφορά από αυτά των G6PDD. Το ίδιο παρατηρείται και μετά την άσκηση. Αυτό προφανώς σημαίνει ότι ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός των G6PDD αντιμετωπίζει την υπεροξειδωση λιπιδίων τόσο αποτελεσματικά όσο και ο μηχανισμός των φυσιολογικών.

Η καταλάση, η οποία εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξειδισώματα, είναι ένα σημαντικό ενζυμικό αντιοξειδωτικό, που μέσω των ομάδων αίμης, που περιέχει, καταλύει την μετατροπή του H₂O₂ σε νερό και μοριακό οξυγόνο σύμφωνα με την αντίδραση:



Τα αποτελέσματα της εργασίας μας σχετικά με τη δρασιτικότητα της καταλάσης έδειξαν ότι υπάρχει αύξηση στα φυσιολογικά άτομα μετά την άσκηση η οποία όμως δεν μπορεί να θεωρηθεί στατιστικά σημαντική λόγω μεγάλης τυπικής απόκλισης στα δείγματα. Αντίθετα, στα άτομα με ανεπάρκεια σε G6PD παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της δρασιτικότητας της καταλάσης μετά την άσκηση. Η αύξηση (στατιστικά σημαντική ή μη) που παρατηρείται και στις δύο ομάδες που εξετάστηκαν είναι δικαιολογήσιμη καθώς όπως είναι γνωστό η έντονη άσκηση προκαλεί εντονότερη παραγωγή ROS [156-157] στα οποία περιλαμβάνεται και το υπόστρωμα της καταλάσης, το H₂O₂, γεγονός που συνεπάγεται, με τη σειρά του, αύξηση της δρασιτικότητας της καταλάσης καθώς και άλλων αντιοξειδωτικών. Ωστόσο, τα αποτελέσματα από τη βιβλιογραφία είναι αντικρουόμενα. Έτσι, υπάρχουν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές στις οποίες βρέθηκε αύξηση της δρασιτικότητας της καταλάσης [158-160] αλλά, από την άλλη υπάρχουν και κάποιες που αναφέρουν ότι η δρασιτικότητα του συγκεκριμένου

ενζυμικού αντιοξειδωτικού παραμένει σταθερή μετά την άσκηση[162-164]. Αυτές οι διαφορές που παρατηρούνται στα αποτελέσματα των διαφόρων εργασιών ίσως οφείλονται στην δυσκολία ελέγχου των διαφόρων παραμέτρων που επηρεάζουν το τελικό αποτέλεσμα όπως η ένταση, η διάρκεια και ο τύπος άσκησης, η ηλικία και η φυσική κατάσταση των συμμετεχόντων καθώς και η πιθανότητα ότι το πρωτόκολλο που ακολουθείται για τον προσδιορισμό του οξειδωτικού στρες μπορεί να διέφερε μεταξύ των μελετών.

Η αντιοξειδωτική δράση της γλουταθειόνης (GSH) είναι καλά τεκμηριωμένη τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις [165-166]. Όπως έχει αναφερθεί αποτελεί ένα σημαντικό διαλυτό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη μέσω της συνεχούς και κυκλικής μετάπτωσης του από μία ανηγμένη (GSH) σε μία οξειδωμένη μορφή (GSSG), και το αντίθετο. Η αναγωγική δύναμη που απαιτείται για τη δεύτερη αντίδραση παρέχεται από το NADPH το οποίο παράγεται από το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Το τελευταίο ξεκινά με μία αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο G6PD και επιπλέον αποτελεί τη μοναδική πηγή NADPH για τα ερυθροκύτταρα παίζοντας έτσι σημαντικότατο ρόλο στην προστασία τους από το οξειδωτικό στρες. Τέλος, υπάρχουν πολλά στοιχεία που δείχνουν ότι η έντονη άσκηση μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην ομοιοσταση της GSH όπως, μείωση της συγκέντρωσης της σε διάφορους ιστούς, διαταραχή του κυτταρικού αναγωγικού δυναμικού, της σύνθεσης και μεταφοράς της GSH [167-168].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης άσκησης υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της GSH μετά την άσκηση τόσο στους φυσιολογικούς όσο και στους G6PD. Η μείωση αυτή στους τελευταίους δείχνει ότι η GSH διατηρεί την αντιοξειδωτική της δράση και δεν επηρεάζεται από την έλλειψη του ενζύμου. Επίσης, παρατηρείται πολύ μικρή μείωση (όχι στατιστικά σημαντική) των επιπέδων της GSSG μετά την άσκηση στους φυσιολογικούς, ενώ στους G6PD τα επίπεδα της GSSG αυξάνονται σε πολύ μικρό βαθμό.

Η μείωση των επιπέδων GSH μετά την άσκηση είναι αναμενόμενη. Όπως έχει αναφερθεί η άσκηση οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ROS προκαλώντας έτσι αύξηση της δραστηριότητας ή μείωση των επιπέδων των διαφόρων αντιοξειδωτικών μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνεται και η γλουταθειόνη. Οι *Elosua et al.* (2003) [76] βρήκαν ότι η παραγωγή ελεύθερων ριζών που συνοδεύει την αυξημένη πρόσληψη οξυγόνου προάγει την ενεργοποίηση του ενζύμου GPx (το οποίο εξουδετερώνει H₂O₂ οξειδώνοντας την GSH σε GSSG) εξηγώντας έτσι τη μείωση της GSH που παρατηρείται μετά την άσκηση. Οι ίδιοι πρόσθεσαν ότι η ενεργοποίηση του συγκεκριμένου ενζύμου συνοδεύεται από την απενεργοποίησή του σαν αποτέλεσμα της κατανάλωσης του ενζύμου από τη δράση του στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών. Πράγματι οι *Aguilo et.al.* (2005) [160] βρήκαν ότι μετά την άσκηση (ποδηλασία) η δραστηριότητα της GPx ελαττώνεται και απέδωσαν την ελάττωση αυτή στην μετουσίωση του ενζύμου που προκαλείται από τα παραγόμενα ROS. Από την άλλη όμως υπάρχουν και εργασίες που αναφέρουν αύξηση της δραστηριότητας της GPx και την αποδίδουν στην ενεργοποίηση του ενζύμου από του υπόστρωμά του, H₂O₂ [159,162].

Από την άλλη όμως υπάρχουν εργασίες που αναφέρουν σημαντική αύξηση της γλουταθειόνης μετά από διάφορα είδη άσκησης και σε διάφορους ιστούς (ποδηλασία-ήπαρ και νεφροί[169], συνδυασμό αερόβιας-αναερόβιας-αίμα[170], κολύμβηση-αίμα[171]) καθώς και μετά από χορήγηση αντιοξειδωτικών[172]. Στην τελευταία περίπτωση μάλιστα βρέθηκε ότι το πρότυπο της γλουταθειόνης στο αίμα δεν μεταβαλλόταν μετά τη λήψη των αντιοξειδωτικών.

Κάτι που προκάλεσε έκπληξη ήταν μείωση των επιπέδων της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) μετά από την άσκηση στους φυσιολογικούς αφού το αναμενόμενο είναι να αυξάνονται καθώς, λόγω οξειδωτικού στρες, ενισχύεται η οξείδωση της γλουταθειόνης.. Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε αντίθεση με αυτά άλλων εργασιών που αναφέρουν αύξηση της GSSG μετά την άσκηση[160, 170, 171] και συνεπώς το ζήτημα αυτό χρειάζεται περαιτέρω έρευνα. Όσον αφορά τους G6PDD παρατηρείται μικρή ανοδική τάση των επιπέδων της GSSG.

Σχετικά με την αναλογία GSH :GSSG παρατηρείται στατιστικά σημαντική μείωση μετά την άσκηση τόσο στους φυσιολογικούς όσο και στους G6PDD, γεγονός που οφείλεται στη αξιοσημείωτη μείωση της GSH μετά την άσκηση καθώς η GSSG δεν μεταβλήθηκε σημαντικά στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με εκείνα άλλων εργασιών που αναφέρουν ελάττωση της αναλογίας GSH :GSSG μετά την άσκηση στο ήπαρ και τους νεφρούς [171] και στο αίμα [173-175].

Όσον αφορά τη σύγκριση των G6PDD με τους φυσιολογικούς βρέθηκε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της GSH πριν την άσκηση μεταξύ των δύο ομάδων και το ίδιο ισχύει και για μετά την άσκηση. Μάλιστα τόσο πριν όσο και μετά την άσκηση τα επίπεδα της γλουταθειόνης στους φυσιολογικούς είναι περίπου τα διπλάσια από αυτά των G6PDD. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο αφού τα άτομα με έλλειψη σε G6PD έχουν χαμηλότερα επίπεδα NADPH και συνεπώς λιγότερη αναγωγική δύναμη για τη μετατροπή της GSSG σε GSH. Η χαμηλότερη περιεκτικότητα των G6PDD σε GSH ίσως σημαίνει ότι η GSH δεν παίζει τόσο σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών που παράγονται κάτω από συνθήκες υψηλού οξειδωτικού στρες (π.χ. άσκηση) κι επομένως οι G6PDD πρέπει να έχουν εναλλακτικούς μηχανισμούς.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των επιπέδων της GSSG ανάμεσα στους φυσιολογικούς και τους G6PDD τόσο πριν όσο και μετά την άσκηση. Όπως και στην περίπτωση της GSH έτσι και σε αυτήν τα επίπεδα της GSSG στους φυσιολογικούς είναι περίπου διπλάσια από αυτά των G6PDD. Το φαινόμενο αυτό είναι αναμενόμενο αφού η GSH, από την οποία προκύπτει η GSSG μέσω της δράσης της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, είναι περίπου η διπλάσια στους φυσιολογικούς. Τέλος, η αναλογία GSH:GSSG διαφέρει επίσης στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στους φυσιολογικούς και τους G6PDD πριν αλλά και μετά την άσκηση. Αυτό προφανώς οφείλεται στις σημαντικές διαφορές που υπάρχουν στους δύο όρους της αναλογίας (GSH:GSSG). Από όλα τα παραπάνω προκύπτει ότι η συνολική γλουταθειόνη είναι μειωμένη στους G6PDD, λόγω της έλλειψης του ενζύμου G6PD. Αυτό ίσως έχει σαν αποτέλεσμα αυτά τα άτομα να είναι πιο ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες και να αυξάνουν τη δραστηριότητα άλλων αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Τέλος,

Ίσως τα άτομα με έλλειψη σε G6PD που ασχολούνται με τον αθλητισμό χρειάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό χορήγηση διαφόρων αντιοξειδωτικών προκειμένου να ενισχύσουν την αντιοξειδωτική τους άμυνα. Τα τελευταία καθώς και πολλά άλλα σχετικά με την αντιοξειδωτική κατάσταση των G6PDD είναι ζητήματα που απαιτούν περαιτέρω έρευνα στο μέλλον.

Συμπερασματικά, η έντονη άσκηση φαίνεται ότι δεν επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των G6PDD αφού η πλειοψηφία αυτών συμπεριφέρονται όπως οι αντίστοιχοι των φυσιολογικών. Πιο συγκεκριμένα, η TAC των φυσιολογικών κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα με αυτήν των G6PDD πριν και μετά την άσκηση, γεγονός που σημαίνει ότι η έλλειψη του συγκεκριμένου ενζύμου δεν επηρεάζει την ικανότητα του οργανισμού να αυξήσει τους αντίστοιχους μηχανισμούς για να αντιμετωπίσει την αυξημένη παραγωγή ριζών που προκαλείται από την άσκηση. Επιπλέον, τα ποσά της MDA στους φυσιολογικούς πριν την άσκηση δεν έχουν αξιοσημείωτη διαφορά από αυτά των G6PDD. Το ίδιο παρατηρείται και μετά την άσκηση κι αυτό προφανώς σημαίνει ότι ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός των G6PDD αντιμετωπίζει την υπεροξείδωση λιπιδίων τόσο αποτελεσματικά όσο και ο μηχανισμός των φυσιολογικών. Όσον αφορά την καταλάση παρατηρείται σημαντική διαφορά της δραστηριότητάς της στους G6PDD πριν και μετά την άσκηση, αλλά δεν υπάρχει αξιοσημείωτη διαφορά ανάμεσα στις δύο εξεταζόμενες ομάδες. Αυτό δείχνει ότι η καταλάση είναι ένας αντιοξειδωτικός μηχανισμός που δεν επηρεάζεται από την έλλειψη του ενζύμου αλλά συνεχίζει να δρα όπως και στους φυσιολογικούς. Τέλος οι μεγαλύτερες διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και G6PDD παρατηρούνται στη γλουταθειόνη, γεγονός που είναι αναμενόμενο αφού η παραγωγή της εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη δράση του ενζύμου G6PD. Συγκεκριμένα η συνολική γλουταθειόνη είναι μειωμένη στους G6PDD σε σχέση με τους φυσιολογικούς γεγονός που ίσως σημαίνει ότι αυτά τα άτομα είναι πιο ευάλωτα στο οξειδωτικό στρες και ενδεχομένως αυξάνουν τη δραστηριότητα άλλων αντιοξειδωτικών μηχανισμών για να αντιμετωπίσουν την αυξημένη παραγωγή ROS.

Βιβλιογραφία

1. Oxygen <http://recipelands.com/encyclopedia/index.php/Oxygen>
2. History of planet Earth <http://warrensburg.k12.mo.us/ew/ehissumm.html>
3. Bulkley Gregory, (2002). Free radicals and reactive oxygen species. The evolution of a scientific concept. *Cosmos journals*
4. Nobuo Torli Photosynthesis-The Earth's environment was created by organisms: index Quarterly journal Biohistory: vol 30
5. John McMurry: Οργανική Χημεία (2^η έκδοση), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2000
6. Halliwell Barry and Guteridge John M.C. (1998). Free radicals in biology and chemistry, *Oxford Science Publications*
7. Barry Halliwell. Free radicals and other reactive species in disease, Encyclopedia of life sciences Nature publishing group, 2001
8. Boveris A, Cadenas E (1997) Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: Clerch LB, Massaro DJ (eds) Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function. NY: Marcel Dekker, Inc. pp:1-25
9. Koppenol WH (1998) The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxy nitrite. *Free Rad Biol Med* 25: 385-391
10. Radi R, Denicola A, Freeman BA (1999) Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate. *Meth Enzymol* 301: 353-367
11. Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R. & Davies, M.J. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324, 1-18
12. Alberts, Bray, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter: Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας- Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του κυττάρου, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2000
13. Κουρέτας Δημήτρης Βιοχημική Τοξικολογία
14. Cutler R. (1994) Antioxidants, aging and longevity. In: Pryor W A (ed) *Free Radicals in Biology*, vol 6. Orlando, FL: Academic Press, Inc. pp 381-395
15. Adams, D. O.; Hamilton, T. A. Macrophages as destructive cells in host defense. In: Gallin, J. I.; Goldstein, I. M.; Synderman, R., eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven; 1992:637– 662.
16. Klebanoff, S. J. Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. In: Gallin, J. I.; Goldstein, I. M.; Synderman, R., eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven; 1988:391– 444.
17. Inoue, T.; Mu, Z.; Sumikawa, K.; Adachi, Z.; Okochi, T. Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn. J. Cancer Res.* 84:720 –725; 1993.
18. Poulsen, H. E.; Loft, S.; Vistisen, K. Increased oxidative DNA damage after 30 days of vigorous exercise. *J. Toxicol. Environ. Health* 40:459–462; 1993.
19. Suzuki, J.; Inoue, Y.; Suzuki, S. Changes in urinary level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generating substances. *Free Radic. Biol. Med.* 18:431– 436; 1995.
20. Asami, S.; Hirano, T.; Yamaguchi, R.; Tomioka, Y.; Itoh, H.; Kasai, H. Increase of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxyguanine, and its repair activity in human leukocytes by cigarette smoking. *Cancer Res.* 56:2546 –2549; 1996.
21. Howard, D. J.; Ota, R. B.; Briggs, L. A.; Hampton, M.; Pritsos, C. A. Environmental tobacco smoke in the workplace induces oxidative stress in employees, including increased production of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7:141–146; 1998.
22. Nakajima, M.; Takeuchi, T.; Takeshita, T.; Morimoto, K. 8-Hydroxydeoxyguanosine in human leukocyte DNA and daily health practice factors: effects of individual alcohol sensitivity. *Environ. Health Perspect.* 104:1336 –1338; 1996.
23. Schmid E, Hotz-Wagenblatt, Droegew. Inhibition of the insulin receptor kinase phosphorylation by nitric oxide: functional and structural aspects. *Antioxidants Redox Signal* 1: 45–53, 1999.
24. Schmid E, Hotz-Wagenblatt, Hack V, Droegew Phosphorylation of the insulin receptor kinase by phosphocreatine in combination with hydrogen peroxide. The structural basis of redox priming. *FASEB J* 13: 1491–1500, 1999.

25. Hardwick JS Sefton BM. Activation of the Lck tyrosine protein kinase by hydrogen peroxide requires the phosphorylation of Tyr-
26. Nakamura K, Hori T, Sato N, Sugie K, Kawakami T, Yodoi J. Redox regulation of a Src family protein tyrosine kinase p56lck in T cells. *Oncogene* 8: 3133–3139, 1993.
27. Schieven GL, Kirihara JM, Burg DL, Geahlen RL, Ledbetter JA. p72syk tyrosine kinase is activated by oxidizing conditions that induce lymphocyte tyrosine phosphorylation and Ca21 signals. *J Biol Chem* 268: 16688–16692, 1993.
28. Schieven GL, Kirihara JM, Myers DE, Ledbetter JA, Uckun FM. Reactive oxygen intermediates activate NF-kappa B in a tyrosine kinase-dependent mechanism and in combination with vanadate activate the p56lck and p59fyn tyrosine kinases in human lymphocytes. *Blood* 82: 1212–1220, 1993.
29. Schieven GL, Mittler RS, Nadler SG, Kirihara JM, Bolen JB, Kanner SB, Ledbetter JA. ZAP-70 tyrosine kinase, CD45, and T cell receptor involvement in UV- and H2O2-induced T cell signal transduction. *J Biol Chem* 269: 20718–20726, 1994.
30. Nose K, Shibanuma M, Kikuchi K, Kageyama H, Sakiyama S, Kuroki T. Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line. *Eur J Biochem* 201: 99–106, 1991.
31. Stein B, Rahmsdorf HJ, Steffen A, Liftin M, Herrlich P. UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Mol Cell Biol* 9: 5169–5181, 1989.
32. Meyer M, Schereck R, Baeuerle PA. H2O2 and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kB and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant response factor. *EMBO J* 12: 2005–2015, 1993.
33. Devary Y, Gottlieb RA, Laus LF, Karin M. Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response. *Mol Cell Biol* 11: 2804–2811, 1991. 7915–7922, 1993.
34. Angel P, Karin M. The role of jun, fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072:129–157, 1991.
35. Hensley, K., and Floyd, R.A. (2002). Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: A look back, a look ahead. *Arch. Biochem. Biophys.* 397: 377-383.
36. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142
37. Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ (1999b) Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen and nitric oxide. *Meth Enzymol*, 301: 188-198
38. Cleeter MWJ, Cooper JM, Darley Mar VM, Moncandas, Schapira AHV (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 345: 50-54
- Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boveris A. (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 328: 85-92
39. Moody, C. S.; Hassan, H. M. Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2855–2859; 1982
40. Dettmer, C. M.; Kramer, S.; Gottlieb, S. F.; Aponte, G. E. Carcinogenic properties of increased oxygen tensions. I. Effects on radiation-induced mammary tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 41:751–756; 1968.
41. Bruyninckx, W. J.; Mason, H. S.; Morse, S. A. Are physiological oxygen concentrations mutagenic? *Nature* 274:606–607; 1978.
42. Sturrock, J. E.; Nunn, J. F. Chromosomal damage and mutations after exposure of Chinese hamster cells to high concentrations of oxygen. *Mutat. Res.* 57:27–33; 1978.
43. Moody, C. S.; Hassan, H. M. Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2855–2859; 1982.
44. Newcomb, T. G.; Loeb, L. A. Oxidative DNA damage and

- mutagenesis. In: Nickoloff, J. A.; Hoekstra, M. F., eds. *DNA damage and repair, vol. I: DNA repair in prokaryotes and lower eukaryotes*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 1998:65–84.
45. Rodney E. Shackelford, William K. Kaufmann, Richard S. Paules
Oxidative stress and cell cycle checkpoint function
Free Radical Biology & Medicine, Vol. 28, No. 9 pp. 1387–1404, 2000
46. Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S. & Loeb, L.A. (1992)
8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative damage, causes G-T and A-C substitutions. *J. Biol. Chem.* 267,166-172
47. Mylonas C, Kouretas D (1999)
Lipid Peroxidation and Tissue Damage in vivo 13:295-310
48. Standman E.R. (2001). Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann NY Acad Sci.*, 928:22-38
49. Beckman K.B., Ames B.N., (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.*, 78(2): 547-581.
50. Hamilton, M. L., Z. M. Guo, C. D. Fuller, H. Van Remmen, W. F. Ward, S. N. Austad, D. A. Troyer, I. Thompson, and A. Richardson.
A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA.
Nucleic Acids Res. 29:2117–2126, 2001
51. H. Shar, C. Chart An excerpt from the medical textbook contemporary *Edinburgh: Charchill Livingstone 1998*
52. Noguchi, N., Watanabe, A., Shi H. (2000) *Free Rad. Res.* 33: 809-817
53. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology and Medicine* (2nd edition). Oxford: Clarendon Press, pp136-158, 1989.
54. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11: 298-300
55. Lubert Stryer :Βιοχημεία Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης 1997 (2^η έκδοση)
56. Urso Maria L., Clarkson Priscilla M. (2003). Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189:41-54
57. Ernest Beutler,
G6PD Deficiency.
Blood, Vol 84, No 11 (December 1), 1994 pp 3613-3636
58. Siemieniuk E, Skrzydlewska E.
Coenzyme Q10: its biosynthesis and biological significance in animal organisms and in humans
Postepy Hig Med Dosw (Online). 2005 Apr 18;59:150-9
59. Russel J. Reiter, Dario Acuna –Castroviejo, Dun –Xian Tan Susanne Burkhardt
Free Radical-Mediated Molecular Damage - Mechanisms for the Protective Actions of Melatonin in the Central Nervous System
Annals of the New York Academy of Sciences 939:200-215 (2001)
60. Levine, R. L., Moskovitz, J. and Stadtman, E. R.
Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation.
IUBMB Life 50, 301-307(2000)
61. Grune, T.
Oxidative stress, aging and the proteasomal system.
Biogerontology 1, 31-40(2000)
62. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology and Medicine* (2nd edition). Oxford: Clarendon Press, pp136-158, 1989.
63. Møller Peter, Wallin Hakan, Knudsen Lisbeth. (1996) Oxidative stress associated with exercise, physiological stress and life-style factors. *Chemico-biological interactions*, 102:295-310
64. Lee I.M, Paffenbarger R.S. *Am J Epidemiol.* 2000, 151, 293.
65. Lee I.M, Paffenbarger R.S., Hennekens. *Aging (Milano)* 1997, 9, 2.
66. McCarter R.J.M. In *Studies in Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Eds., Sen C., Packer L., Hanninen O., Amsterdam, 2000, pp 797-830.
67. C. Leeuwenburgh & J. W. Heinecke
Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise
Current Medicinal Chemistry 2001, 8, 829-838
68. Jenkins, R. R.
Free radical chemistry: Relationship to exercise.
Sport Med. 5:156-170; 1988.
69. Ji, L. L.; Fu, R. G.; Mitchell, E.
Glutathione and antioxidant enzyme in skeletal muscle: Effect of fiber type and exercise intensity.
J. Appl. Physiol. 73:1854-1859; 1992.
70. Ji, L. L.; Fu, R. G.

- Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide.
J. Appl. Physiol. 72:549-554; 1992.
71. Ji, L. L.
Antioxidant enzyme response to exercise and aging.
Med. Sci. Sports Exerc. 25:225-231; 1993.
72. Radak, Z., Taylor, A.W., Ohno, H., and Goto, S.
Adaptation to exercise-induced oxidative stress: From muscle to brain.
Exerc. Immun. Rev. 7: 90-107. (2001)
73. Bloomer, R.J.; and Goldfarb, A.H.
Anaerobic exercise and oxidative stress: A review.
Can. J. Appl. Physiol. 29(3): 245-263. © 2004 Canadian Society for Exercise Physiology.
74. Knight, J. A.
Free Radicals, Antioxidants, Aging, and Disease.
Washington: American Association for Clinical Chemistry Press (1999).
75. Sen, C.K., Packer, L., Hanninen, O. (Eds.) (1994). Exercise and Oxygen Toxicity. Amsterdam: Elsevier Science.
76. Elosua, R., Molina, L., Fito, M., Arquer, A., Sanchez-Quesada, J.L., Covas, M.I., Ordonez-Llanos, J., Marrugat, J., 2003.
Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women.
Atherosclerosis 167, 327–334. (1994)
77. Dillard, C. J., Litov, R. E., Savin, W. M., Dumelin, E. E. Tappel, A. L. *J. Appl. Physiol.* 45, 927±932(1978)
78. Chance B, Sies H, Boveris A:
Hydroperoxide metabolism in mammalian organs.
Physiol Rev 59: 527–605, 1979
79. Sen CK
Oxidants and antioxidants in exercise.
J Appl Physiol 79: 675–686, 1995
80. Jenkins RR
Free radical chemistry. Relationship to exercise.
SportsMed: 5: 156–170, 1988
81. Ji LL, Stratman FW, Lardy HA.
Enzymatic downregulation with exercise in rat skeletal muscle.
Arch Biochem Biophys 263: 137-149, 1988
82. Hellsten, Y, Ahlborg, G., Jensen-Urstad, M., and Sjodin, B.
Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise.
Acta Physiol. Scand. 134: 159-160. (1988).
83. Hellsten, Y, Frandsen, U., Orthenblad, N., Sjodin, B., and Richter, E.A. (1997).
Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: A role of inflammation.
J. Physiol. 498: 239-248.
84. Radak, Z., Asano, K., Inoue, M., Kizaki, T, Oh-Ishi, S., Suzuki, K., Taniguchi, N., and Ohno, H. (1996).
Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in Uver and kidney of rats induced by exhaustive exercise.
Eur. J. Appl. Physiol 72: 189-194.
85. Vina, J., Gimeno, A., Sastre, J., Desco, C, Asensi, M., Pallardo, F.V., Cuesta, A., Ferrero, J.A., Terada, L.S., and Repine, J.E. *IUBMB Life* 49: 539-544(2000)
86. Maughan R.J., Donnelly A.E., Gleeson M., Whiting P.H., Walker K.A., Clough P.J.
Muscle Nerve. 1989, 12, 332.
87. MacIntyre D.L., Reid W.D., Lyster D.M., McKenzie D.C.
Eur. J. Appl. Physiol. 2000, 81, 47.
88. Fielding R.A., Violan M.A., Svetkey L., Abad L.W., Manfredi T.J., Cosmas A, Bean. J Eff.
Med. Sci. Sports Exerc. 2000, 32, 359.
89. Childs A., Jacobs C., Kaminski T., Leeuwenburgh C.
Free Rad. Biol. Med. 2000, 29 (suppl. 1), 531.
90. Tiidus P.M., Bombardier E. *Acta Physiol. Scand.* 1999, 166, 85.
91. Hack V, StrobelG, Rau JP, Weicker H.
The effect of maximal exercise on the activity of neutrophil granulocytes im highly trained athletes in a moderate training period.
Eur J Appl Physiol 65:520-524,1992.
92. Meydani M, Enans W, Handelman G, Fielding RA, Meydani SN, Fiatarone MA, Blumberg JB, Cannon JG.
Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 669:363-364,1992
93. Smith JA, GrayAB, Pyne DB, Baker MS, Telford RD, Weidemann MJ.
Moderate exercise triggers both priming and activation of neutrophil subpopulations.
Am J Physiol 39: R838-845, 1996

94. LI LI JI.
Antioxidants and Oxidative stress in exercise *P.S.E.B.M.*1999, Vol 222: 283-292.
95. Godin DV, Wohaiab SA.
Nutritional deficiency, starvation, and tissue antioxidant status.
Free Radic Biol Med 5:165-176,1988.
96. C. E. Cooper¹, N. B. J. Vollaard, T. Choueiri and M. T. Wilson
Exercise, free radicals and oxidative stress
Biochemical Society Transactions (2002) Volume 30, part 2, p 280-285
97. Atul Mehta, Philip J. Mason, Tom J. Vulliamy. Baillie's
Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency
Clinical Haematology Vol. 13, No. 1, pp. 21±38, 2000.
98. Somani SM.
Exercise, drugs and tissue specific antioxidant system.
In: Somani SM, editor. *Pharmacology in exercise and sports*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1996. p. 57-95.
99. De Flora A, Morelli A, Giuliano F
Human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase. Content of bound coenzyme.
Biochem Biophys Res Commun 59:406, 1974
100. Morelli A, Benatti U, Guiliano F, De Flora A:
Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. Evidence for competitive binding of NADP and NADPH.
Biochem Biophys Res Commun 70:600, 1976
101. Wrigley NG, Heather JV, Bonsignore A, De Flora A:
Human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase: Electron microscope studies on structure and interconversion of tetramers, dimers and monomers. *J Mol Biol* 68:483, 1972
102. Rattazzi MC:
Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes: Molecular weight determination by gel filtration.
Biochem Biophys Res Commun 3 1:16, 1968
103. Hirono A, Kuhl W, Gelbart T, Forman L, Fairbanks VF, Beutler E:
Identification of the binding domain for NADP⁺ of human glucose-6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants.
Proc Natl Acad Sci USA 86:10015, 1989
104. Camardella L, Caruso C, Rutigliano B, Romano M, Di Prisco G, Descalzi-Cancedda F
Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase: Identification of a reactive lysyl residue labelled with pyridoxal 5'-phosphate.
Eur J Biochem 17 1 :485, 1988
105. Jeffery J, Wood I, Macleod A, Jeffery R, Jornvall H:
Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Characterization of a reactive lysine residue in the Pichiajadinii enzyme reveals a limited structural variation in a functionally significant segment.
Biochem Biophys Res Commun 160: 1290, 1989
106. Bhadbhade MM, Adams MJ, Flynn TG, Levy HR:
Sequence identity between a lysine-containing peptide from *Leuconostoc mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase and an active site peptide from human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett* 211:243, 1987
108. Persico MC, Viglietto G, Martino G, Toniolo D, Paonessa G, Moscatelli C, Dono R, Vulliamy T, Luzzatto L, D'Urso M:
Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: Primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. *Nucleic Acids Res* 14:251 1. 1986
109. Persico MG, Viglietto G, Martini G, Dono R, D'Urso M, Toniolo D, Vulliamy T, Luzzatto L:
Analysis of the primary structure of human G 6 PD deduced from the cDNA sequence, in Yoshida A, Beutler E (eds): *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase*, Orlando, FL, Academic, 1986, p 503
110. Martini G, Toniolo D, Vulliamy T, Luzzatto L, Dono R, Viglietto G, Paonessa G, D'Urso M, Persico MG:
Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydro-

genase. *EMBO J* 5:1849, 1986

111. Toniolo D, Persico MG, Battistuzzi G, Luzzatto L:
Partial purification and characterization of the messenger RNA for human
glucose-6-phosphate dehydrogenase.
Mol Biol Med 2239, 1984

112. Takizawa T, Huang IY, Ikuta T, Yoshida A:
Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: Primary structure and cDNA cloning.
Proc Natl Acad Sci USA 83:4157, 1986

113. Chen EY, Cheng A, Lee A, Kuang W-J, Hillier L, Green
P, Schlessinger D, Ciccodicola A, D'Urso M:
Sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in plasmids and a yeast
artificial chromosome (YAC). *Genomics* 10:792, 1991

114. Kirkman HN, Gaetani GD, Clemons EH, Maren] C:
Red cell NADP+ and NADPH in glucose-6-phosphate dehydrogenase
deficiency.
J Clin Invest 55:875, 1975

115. Kirkman HN, Gaetani GF:
Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes.
J Biol Chem 261:4032, 1986

116. Adam A. Linkage between deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase and colour-blindness. *Nature* 1961; 189: 686.

117. Motulsky AG: Glucose-6-phosphate dehydrogenase defi-
ciency haemolytic disease of the newborn, and malaria. *Lancet*
168, 1961

118. Siniscalco M, Bemini L, Latte B, Motulsky AG:
Favism and thalassaemia in Sardinia and their relationship to malaria.
Nature 190:1179, 1961

119. Allison AC, Clyde DF: Malaria in African children with
deficient erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *BMJ*
1346, 1961

120. Allison AC: Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency
red blood cells of East Africans. *Nature* 186:531, 1960

121. Gisela Jacobasch and Samuel M. Rapoport Hemolytic Anemias Due to Erythrocyte Enzyme Deficiencies

122. Xu W, Westwood B, Bartsocas CS, Malcorra-Azpiazu JJ,
Indrak K, Beutler E:
G6PD mutations and haplotypes in various ethnic groups. *Blood* 1995 (in press)

123. Heller P, Best WR, Nelson RB, Becktel J
Clinical implications of sickle-cell trait and glucose-6-phosphate dehydrogenase
deficiency in hospitalized black male patients.
N Engl J Med 1979; 300: 1001~1005.

124. Thomas D. Gelehrter, Francis S. Collins, David Ginsburg Αρχές Ιατρικής Γενετικής Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 2^η
έκδοση, 2003.

125. E. Beutler G6PD:
Population genetics and clinical manifestations *Blood Renew*s (1996) 10,45-52
©1996 Pearson Professional Ltd

126. Heller P, Best WR, Nelson RB, Becktel J:
Clinical implications of sickle-cell trait and glucose-6-phosphate dehydrogenase de-
ficiency in hospitalized black male patients.
N Engl J Med 300: 1001, 1979

127. Kraus AP, Neely CL, Carey m, Kraus LM:
Detection of deficient erythrocyte regeneration of reduced triphosphopyridine nu-
cleotide from glucose-6-phosphate. Evaluation of a rapid screening
test. *Ann Intern Med* 56:765, 1962

128. Missiou-Tsagaraki S:
Screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency as a preventive measure: Prevalence among
1,286,000 Greek newborn infants. *J Pediatr* 119:293, 1991

129. C. E. Cooper1, N. B. J. Vollaard, T. Choueiri and M. T. Wilson
Exercise, free radicals and oxidative stress
Biochemical Society Transactions (2002) Volume 30, part 2

130 Janaszewska A., Bartosz G.(2002) Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human
blood plasma. *Scand J Clin Invest.*, 62 :231-236

131. Keles MS., Taysi S., Sen N., Aksoy H., Akcay F. (2001). Effects of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can. J. Neurol. Sci.*, 28:141-143
132. Aebi HE. Catalase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods in enzymatic analysis*. Basel: Verlag Chemie; 1984. p. 273– 86.
133. Kirkman HN, Gaetani GF:
Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes.
J Biol Chem 261 :4032, 1986
- 134 Reddy Y.N., Murthy S.V., Krishna D.R., Prabhakar M.C.
Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Appl Physiol.*, (2004) 73:1805-9
135. Tietze
Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. (1969)
Analyt. Biochem.,27:502-552
136. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, and Packer L.
Free radicals and tissue damage produced by exercise.
Biochem Biophys Res Commun 107: 1198–1205, 1982.
137. GOLDFARB, A. H., M. K. MCINTOSH, B. T. BOYER, and I. G. FATOUROS.
Vitamin E effects on indices of lipid peroxidation in muscle from DHEA-treated and exercised rats.
J. Appl. Physiol. 76:1630 –1635, 1994.
138. EVELO, C. T. A., N. G. PALMEN, Y. ARTUR, and G. M. E. JANSSEN.
Changes in blood glutathione concentrations and in erythrocyte glutathione reductase and glutathione-S-transferase activity after running training and after participation in contests.
Eur. J. Appl. Physiol. 64:354 –358, 1992.
139. JI, L. L. Antioxidant enzyme response to exercise and aging.
Med. Sci. Sports Exerc. 25:225–231, 1993.
140. WAYNER, D. D., G. W. BURTON, K. U. INGOLD, L. R. BARCLAY, and S. J. LOCKE.
The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma.
Biochim. Biophys. Acta 924:408– 419, 1987.
141. Simpson, R.J.; Wilson, M.R.; Black, J.R.; Ross, J.A.; Whyte, G.P.; Guy, K.; and Florida-James, G.D. (2005).
Immune alterations, lipid peroxidation, and muscle damage following a hill race.
Can. J. Appl. Physiol. 30(2): 196-211. © 2005 Canadian Society for Exercise Physiology.
142. Child, R.B., Wilkinson, D.M., Fallowfield, J.L., and Donnelly, A.E. (1998).
Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to simulated half-marathon run. *Med. Sci. Sports Exerc.* 30: 1603-1607.
143. Palazzetti, S.; Richard, M-J.; Favier, A.; and Margadti, I. (2003).
Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage.
Can. J. Appl. Physiol. 28(4): 588-604.
144. Trent A. Watson, Robin Callister, Robert T D. Taylor, David W. Sibbritt, Lesley K. MacDonald-Wicksi, and Manohar L. Gargi.
Antioxidant Restriction and Oxidative Stress in Short-Duration Exhaustive Exercise,
MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE 2005
145. Halliwell B.
Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions.
Acta Neurol Scand 126: 23–33, 1989.
146. Halliwell B.
Reactive oxygen species and the central nervous system.
J Neurochem 59: 1609–1623, 1992.
147. Liu J and Mori A.
Involvement of reactive oxygen species in emotional stress: a hypothesis based on the immobilization stress-induced oxidative damage and antioxidant defense changes in rat brain, and the effect of antioxidant treatment with reduced glutathione.
Int J Stress Manag 1: 249–263, 1994.
148. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, and Packer L.
Free radicals and tissue damage produced by exercise.
Biochem Biophys Res Commun 107: 1198–1205, 1982.

149. Kretzschmar, M., Müller, D., Hubscher, J., Madn, E., and Klinger, W. (1991). Influence of aging, training and acute physical exercise on plasma glutathione and lipid peroxides in man. *Int. J. Sports Med.* 12: 218-222.
150. Laaksonen, D.E., Atalay, M., Niskanen, L., Uusitupa, M., Hanninen, O., and Sen, CK. (1999). Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise-induced oxidative stress in young men. *Redox Report* 4: 53-59.
151. Marzatico F, Pansarasa O, Bertorelli L, Somenzini L, Della Valle G. Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 1997;37:235-239
152. Bloomer J. Richard, Goldfarb H. Allan, Wideman Laurie, McKenzie J. Michael, Consitt A. Leslie. Effects of acute aerobic and aerobic exercise on blood markers of oxidative stress *Journal of strength and conditioning research*, 2005 19(2), 276-285
153. Davies KJA, Quintanilha T, Brooks GA, Parcker L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochim Biophys Res Commun* 1982;197:1198-1205
154. Kanter MM, Lesmes GR, Kaminsky LA, La Ham-Seager J, Nequin ND. Serum Creatine kinase and lactate dehydrogenase changes following an eighty kilometerrace. Relationship to lipid peroxidation. *EU J Appl Physiol Occup Physiol* 1998;57(1):60-63
155. Allesio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32:1576-1581
156. Goldfarb, A. H. Antioxidant role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 25: 232-236, 1993.
157. LILL, J. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 25:225-231, 1993.
158. Robertson, J. D., R. J. Maughan, G. G. Duthie, and P. C. Morrice. Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clin. Sci.* 80:611- 618, 1991.
159. Mine Inal, Fahrettin Akuz, Akin Turgut, Wade Mills Getsfrid. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers, *MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE*, 2000
160. Antoni Aguilo, Pedro Tauler, Emilia Fuentespina, Josep A. Tur, Alfredo Cordova, Antoni Pons: Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise *Physiology & Behavior* 84 (2005) 1 -7
161. Raphaelle Varraso, Nicole Massin, Michel Hery, Martine Fradier-Dusch, Jean-Pierre Michaely, Maryvonne Fournier, Genevieve Hubert, Patrick Biette, Benoit Rieger, Aline Berthelin, Gerard Hecht and Rachel Nadif: Not only training but also exposure to chlorinated compounds generates a response to oxidative stimuli in swimmers, *Toxicology and Industrial Health* 2002; 18: 269-278
162. Buchman, A.L., Keen, C., Commisso, J., Killip, D., Ou, C.N., Rognerud, C.L., Dennis, K., Dunn, J.K. 1988: The effect of a marathon run on plasma and urine mineral and metal concentrations. *Journal of the American College of Nutrition* 17, 124-27.
163. Inal, M., Akyuz, F., Turgut, A. and Getsfrid, W.M. 2001: Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 33, 564-67.
164. Miyazaki, H., Oh-ishi, S., Ookawara, T., Kizaki, T., Toshinai, K., Ha, S., Haga, S., Ji, L.L., Ohno, H. 2001: Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *European Journal of Applied Physiology* 84, 1-6.
165. Deleve L. D. & Kaplowitz, N. (1990) Importance and regulation of hepatic glutathione. *Sim. Liv. Dis.* 10: 251-266.
166. Meister, A. & Anderson, M. E. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711-760.
167. Ji, L. L. & Leeuwenburgh, C. (1995) Glutathione and exercise. In: *Pharmacology in Exercise and Sports.* (Somani, S. ed.) pp. 97-123. CRC Press, Boca Raton, FL
168. Kretzschmar, M. & Müller, D. (1993) Aging, training and exercise: a review of effects of plasma glutathione and lipid peroxidation. *Sports Med.* 15: 196-209.
169. Yves Jammes, Jean Guillaume Steinberg, Fabienne Bregeon, Stephane Delliauxb: The oxidative stress in response to routine incremental cycling exercise in healthy sedentary subjects,

Respiratory Physiology & Neurobiology 144 (2004) 81–90 169.

171. Christiaan Leeuwenburgh, Li Li Ji: Glutathione and Glutathione Ethyl Ester Supplementation of Mice Alter Glutathione Homeostasis during Exercise, 1998 *American Society for Nutritional Sciences*.

172. Allan H. Goldfarb, Richard J. Bloomer, Michael J. McKenzie: Combined Antioxidant Treatment Effects on Blood Oxidative Stress after Eccentric Exercise, 2005 *MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE*

173. Sen CK. Glutathione homeostasis in response to exercise training and nutritional supplements. *Mol Cell Biochem* 1999;196:31-42

174. Laaksonen DE Atalay M, Niskanen L, Uusitupa M, Hanninen O, Sen CK.

Blood glutathione homeostasis as a determinant of resting and exercise- induced oxidative stress in young men. ,

Acta Physiol Scand 1991;142:275-281

175. Dufaux B, Heine O, Kothe A, Prinz U, Rost R. Blood glutathione status following distance running. *Int J Sports Med* 1997;18:89-93