

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΜΕΤΡΗΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ
ΠΟΔΟΣΦΑΙΡΙΣΤΕΣ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΟ ΤΕΛΟΣ ΕΝΟΣ
ΑΓΩΝΑ**

ΠΑΝΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

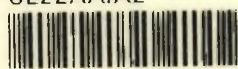
ΛΑΡΙΣΑ 2006



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

Αριθ. Εισ.: 4990/1
Ημερ. Εισ.: 13-11-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΠΑΝ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087755

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετάσχω στην εργαστηριακή του ομάδα, και τον κ. Αντώνιο Κυπάρο, για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε για την συγγραφή της παρούσας εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μιχάλη Νικολαΐδη για τις πληροφορίες που μου έδωσε σχετικά με τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία. Τέλος, ευχαριστώ τη Χρύσα, τον Λεωνίδα, την Μαρίνα και τη Νεράϊδα για το ευχάριστο κλίμα που υπήρξε μέσα στο εργαστήριο.

Τριμελής Επιτροπή

Δημήτριος Κουρέτας
Αναπληρωτής Καθηγητής

Αντώνιος Κυπάρος
Διδάσκων ΠΔ.407/80

Μιχάλης Νικολαΐδης
Διδάσκων ΠΔ.407/80

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη	i
Κατάλογος Σχημάτων	iv
Κατάλογος Εικόνων	vi
Κατάλογος Συντομεύσεων	vii
1. Εισαγωγή	2
1.1. Ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη οξυγόνου (ROS)	2
1.1.1. Ρίζα του σουπεροξειδίου (O_2^-)	2
1.1.2. Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)	3
1.1.3. Ρίζα υδροξυλίου (OH)	3
1.1.4. Singlet oxygen (1O_2)	4
1.1.5. Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)	4
1.2. Παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου	5
1.2.1. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση	5
1.2.2. Οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις	7
1.2.3. Το σύστημα του κυτοχρώματος P450	8
1.2.4. Υπεροξειδιοσώματα	8
1.2.5. Διάφορα βιομόρια	9
1.3. Βιολογική δράση των δραστικών ειδών οξυγόνου	9
1.3.1. Θετικές επιδράσεις	9
1.3.2. Αρνητικές επιδράσεις	11
1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας	13
1.4.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά	14
1.4.1.1. Δεσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)	14
1.4.1.2. Καταλάση	16
1.4.1.3. Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (GSH-Px)	17
1.4.1.4. Αναγωγάση της Γλουταθειόνης (GR)	18

1.4.2. Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά	19
1.4.2.1. Βιταμίνη E (τοκοφερόλη)	19
1.4.2.2. Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)	20
1.4.2.3. Βιταμίνη A (ρετινόλη) και β-καροτένιο	20
1.4.2.4. Γλουταθειόνη (GSH)	20
1.4.2.5. Συνένζυμο Q10	21
1.4.2.6. Ουρικό οξύ	21
1.4.2.7. Μελατονίνη	21
1.4.2.8. Στοιχεία μετάπτωσης	22
1.5. Οξειδωτικό στρες	22
1.5.1. Μέθοδοι προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες στα βιολογικά συστήματα	23
1.5.1.α. Άμεσος προσδιορισμός του οξειδωτικού στρες	23
1.5.1.β. Έμμεσος προσδιορισμός του οξειδωτικού στρες	23
1.5.2. Παράγοντες που επάγουν το οξειδωτικό στρες	23
1.5.3. Οξειδωτικό στρες και άσκηση	24
1.5.4 Οξειδωτικό στρες και ποδόσφαιρο	25
1.5.5. Πιθανοί μηχανισμοί παραγωγής οξειδωτικού στρες κατά την άσκηση	26
2. Σκοπός της Εργασίας	29
3. Υλικά και Μέθοδοι	30
3.1. Συμμετέχοντες	30
3.2. Αμοληψία	30
3.3. Αναλύσεις	31
3.4. Υλικά	31
3.5. Στατιστική ανάλυση	31
4. Αποτελέσματα	33
4.1. Γλουταθειόνες (GSH, GSSG)	33
4.2. TBARS και πρωτεϊνικά καρβονύλια	34

4.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα	34
5. Συζήτηση	35
6. Παράρτημα	38
6.1.1 Πίνακας 1. Οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες και ο χρόνος ημιζωής τους	38
6.1.2. Μέθοδος μέτρησης	39
6.1.2.α. Ποσοτικός προσδιορισμός της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH) του αιμολύματος	40
6.1.2.β. Ποσοτικός προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSSG) του αιμολύματος	40
6.1.2.γ. Ποσοτικός προσδιορισμός των αντιδρώντων ουσιών με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) του ορού	41
6.1.2.δ. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων του ορού	42
6.1.2.ε. Ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού	43
7. Βιβλιογραφία	44

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση παραγωγής ROS στα μιτοχόνδρια

Σχήμα 2. Μονοπάτια αντιδράσεων ελεύθερων ριζών. Ο σχηματισμός του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και του μονοξειδίου του αζώτου οδηγεί στην παραγωγή της ρίζας υδροξυλίου (Boveris et al, 1997)

Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων του κυτόχρωματος P450. Το κυτόχρωμα P450 αντιδρά πρώτα με το οργανικό υπόστρωμα (RH). Το σύμπλοκο ανάγεται από την φλαβοπρωτεΐνη σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο το οποίο αντιδρά με οξυγόνο. Το οξυγονομένο σύμπλοκο είτε ανάγεται από το κυτόχρωμα b είτε αποσυντίθεται απελευθερώνοντας σουπεροξειδίο (Winston and Cederbaum, 1983)

Σχήμα 4. Στάδια της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (Alessio, 2000)

Σχήμα 5. Αντίδραση GSH-Px (Deaton et al., 2003)

Σχήμα 6. Μονοπάτι αναγωγής του H_2O_2 σε νερό (προσαρμοσμένο από Mylonas & Kouretas, 1999).

Σχήμα 7. Το αντιοξειδωτικό σύστημα του κυττάρου (προσαρμοσμένο από Mylonas & Kouretas, 1999).

Σχήμα 8. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή των ROS και την «εξουδετέρωσή τους» από το σύστημα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Deaton et al., 2003).

Σχήμα 9. Παρά την επαρκή αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, η αύξηση στην παραγωγή των ROS επιδρά στο αντιοξειδωτικό σύστημα με αποτέλεσμα την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες (Deaton et al., 2003).

Σχήμα 10. Παραγωγή ελευθέρων ριζών από το σύστημα οξειδάση της ξανθίνης (Crossnan and Moldave, 1967)

Σχήμα 11. Παραγωγή ανιόντων σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) κατά τη διάρκεια της οξειδωσής της οξυαιμογλοβίνης από τη μεθεμογλοβίνη (Deaton et al., 2003).

Σχήμα 12. Συγκέντρωση της γλουταθειόνης στο αίμα πριν (λευκές στήλες) και μετά (σκύρες στήλες) το τέλος ποδοσφαιρικού αγώνα διάρκειας 90 λεπτών. Οι τιμές εκφράζουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα μέσου. N = 8 ποδοσφαιριστές. GSH = ανηγμένη γλουταθειόνη (α), GSSG = οξειδωμένη γλουταθειόνη (β), GSH/GSSG = λόγος

ανηγμένη/οξειδωμένης (γ). *Σημαντικά διαφορετική σε σύγκριση με την τιμή πριν τον αγώνα ($P < 0.05$).

Σχήμα 13. Συγκέντρωση των TBARS (α) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (β) στο αίμα πριν (λευκές στήλες) και μετά (σκύρες στήλες) το τέλος ποδοσφαιρικού αγώνα διάρκειας 90 λεπτών. Οι τιμές εκφράζουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα μέσου. $N = 8$ ποδοσφαιριστές. TBARS = αντιδρώσες ουσίες με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. *Σημαντικά διαφορετική σε σύγκριση με την τιμή πριν τον αγώνα ($P < 0.05$).

Σχήμα 14. Ολικής αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αίματος πριν (λευκές στήλες) και μετά (σκύρες στήλες) το τέλος ποδοσφαιρικού αγώνα διάρκειας 90 λεπτών. Οι τιμές εκφράζουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα μέσου. $N = 8$ ποδοσφαιριστές.

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Τρισδιάστατη δομή κυτταροπλασματικής Cu-Zn SOD

(www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.html)

Εικόνα 2. Τρισδιάστατη δομή μιτοχονδριακής Mn-SOD

(www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.html)

Εικόνα 3. Τρισδιάστατη δομή καταλάσης

(www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.html)

Εικόνα 4. Τρισδιάστατη δομή αναγωγάσης της γλουταθειόνης που αλληλεπιδρά με peroxynitrite (www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.html)

Εικόνα 5. Τρισδιάστατη δομή βιταμίνης (www.3dchem.com/molecules.asp?ID=69)

Εικόνα 6. Τρισδιάστατη δομή της βιταμίν (www.3dchem.com/molecules.asp?ID=69)

Κατάλογος Συντομεύσεων

- ADP: Διφωσφορική αδενοσίνη
AMP: Μονοφωσφορική αδενοσίνη
AP-1: Activator protein
ATP: Τριφωσφορική αδενοσίνη
DHA: Δεϋδροασκορβικό οξύ
DNP: 2,4-dinitrophenyl hydrazon
DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DTNB: 5,5-DiThio-bis(2-NitroBenzoic acid)
EDTA: Αιθυλενοδιάμινο τετραοξικό οξύ
FAD: Φλαβινο-αδενο-δινουκλεοτίδιο
GR: Αναγωγή της γλουταθειόνης
GSH: Reduced glutathione
GSH-Px/GPx: Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GSSG: Oxidized glutathione
MAPK: Mitogen activated protein kinase
MDA: Μαλονδουαλδεΐδη
NAD: Νικοτιναμίδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο (οξειδωμένη μορφή)
NADH: Νικοτιναμίδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο(ανηγμένη μορφή)
NADPH: Φωσφορικό Νικοτιναμίδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο
NF-kB:Nuclear factor-kB
Oxo8-dA: 8-οξύ-2-δεοξυαδενοσίνη
PMN: Πολυμορφοσδετερόφιλα
PUFAs:Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
RNS: Reactive Nitrogen Species (Δραστικά είδη αζώτου)
ROS: Reactive Oxygen Species (Δραστικά είδη οξυγόνου)
SOD: Δισμουτάση του υπεροξειδίου
TAC:Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα
TBA: Θειοβαρβιτουρικό οξύ
TBARS: Thiobarbituric-acid reactive substances
TCA: Τριχλωροξικό οξύ

UQH : Ημικινόνη

UQH₂ : Ουβικινόλη

Περίληψη

Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη επιλεγμένων δεικτών οξειδωτικού στρες σε οκτώ επαγγελματίες ποδοσφαιριστές ομάδας της Α' εθνικής κατηγορίας. Μισή ώρα πριν και αμέσως μετά το τέλος ποδοσφαιρικού αγώνα διάρκειας 90 λεπτών έγινε αιμοληψία ποσότητας αίματος από τη δεξιά ωλένια φλέβα. Οι δείκτες οξειδωτικού στρες που προσδιορίστηκαν ήταν η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) και η αναλογία GSH/GSSG στο αιμόλυμα, καθώς επίσης και οι αντιδρώσες ουσίες με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), πρωτεϊνικά καρβονύλια, και ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) του πλάσματος. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων έδειξαν ότι μόνο τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και η GSSG αυξήθηκαν σημαντικά μετά το τέλος του αγώνα, ενώ οι υπόλοιποι δείκτες δεν διέφεραν σημαντικά πριν και μετά το τέλος του αγώνα. Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι το αντιοξειδωτικό σύστημα των ποδοσφαιριστών πιθανόν έχει υποστεί προσαρμογές λόγω της συνεχούς έκθεσής τους στο οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια της επαγγελματικής τους σταδιοδρομίας.

1. Εισαγωγή

1.1. Ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη οξυγόνου

Ελεύθερη Ρίζα (free radical, FR) είναι ένα χημικό μόριο ή ένωση που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους. Η διαμόρφωση αυτή, η οποία είναι εξαιρετικά ασταθής, προκύπτει είτε από την απώλεια είτε από την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στην εξωτερική στιβάδα σθένους (Mylonas & Kouretas, 1999). Εξαιτίας της αυξημένης χημικής τους δραστηριότητας οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν ταχύτατα με άλλα γειτονικά μόρια ή άλλες ελεύθερες ρίζες προκειμένου να αποκτήσουν 4 ζεύγη ηλεκτρονίων στην εξωτερική τους στιβάδα.

Σήμερα ο όρος «ελεύθερες ρίζες» τείνει να αντικατασταθεί από τον όρο δραστικά είδη οξυγόνου (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 αποκαλούνται μη ρίζες (Deaton et al., 2003). Η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου δίνει μία μεγάλη ποικιλία ROS, τα οποία είναι γενικά βραχύβια και ιδιαίτερα δραστικά (πίνακας 1). Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν:

1.1.1. Ανιόν (ρίζα) του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$)

Η αναγωγή του οξυγόνου από ένα e^- σχηματίζει την ρίζα υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) (εξίσωση 1).



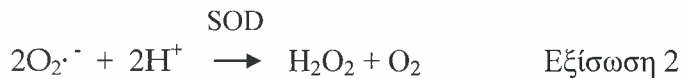
Ύστερα από αυτή ακολουθεί η παραπέρα αναγωγή σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, ρίζα υδροξυλίου και νερό. Η ρίζα του υπεροξειδίου μπορεί να σχηματιστεί με αυτοοξειδωση διάφορων συστατικών της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια (για παράδειγμα της ουβικινόνης) και στους χλωροπλάστες. Ο σχηματισμός της ρίζας υπεροξειδίου μπορεί επίσης να καταλυθεί από μεμβράνες των μικροσωμάτων και έχει πιστοποιηθεί στα υπεροξυσώματα και γλυοξυσώματα (Scandalio et al., 1988).

Η ρίζα του υπεροξειδίου μεταξύ άλλων παράγεται από την ξανθίνη, αλδεύδες και διαμινοοξειδάσες. Διάφορα οξειδοαναγωγικά-κυκλικά ξενοβιοτικά όπως το

ζιζανιοκτόνο paraquat (methyl viologen) μπορούν να καταλύσουν μεγάλα ποσοστά από τον σχηματισμό της ρίζας του υπεροξειδίου, ενεργώντας ως δέκτες ηλεκτρονίων (π.χ. από ανηγμένη φερρεδοξίνη σε χλωροπλάστες) και μεταφέροντάς τα στο οξυγόνο. Η ρίζα υπεροξειδίου μπορεί να ενεργήσει ως οξειδωτικό μέσο (και μερικές φορές ως αναγωγικό μέσο), πιθανώς όμως να είναι περισσότερο επιβλαβής λόγω του σχηματισμού υπεροξειδίου του υδρογόνου και ριζών υδροξυλίου που ακολουθεί.

1.1.2. Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂)

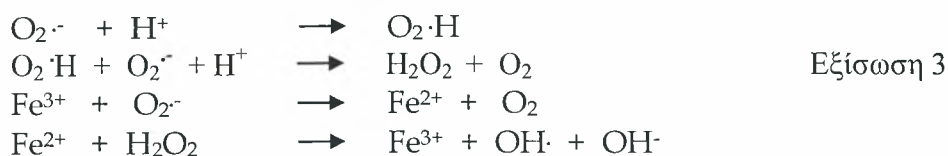
Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζεται από οξειδάσες οι οποίες καταλύουν την μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο, όπως οι οξειδάσες των αμινοξέων, η οξειδάση της γλυκόζης και η οξειδάση του γλυκολικού. Σχηματίζεται επίσης με αυτο-οξειδοαναγωγή της ρίζας υπεροξειδίου (εξίσωση 2).



Αυτή η αντίδραση πραγματοποιείται αργά σε ουδέτερο pH, εφ'όσον η πρωτονιωμένη μορφή της ρίζας υπεροξειδίου είναι περισσότερο δραστική (η υδροϋπεροξειδική ρίζα έχει $\text{pK}_a = 4$). Παρόλα αυτά, σε φυσιολογικά pH (ιδιαίτερα στο αλκαλικό στρώμα των χλωροπλάστων) αυτή η αντίδραση επιταχύνεται τουλάχιστον κατά 10⁴ φορές από το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), του οποίου διάφορα ισόμορφα υπάρχουν σ' όλα τα κυτταρικά διαμερίσματα. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι σχετικά σταθερό και αποτελεί οξειδωτικό μέσο.

1.1.3. Ρίζα υδροξυλίου (OH[·])

Η ρίζα υδροξυλίου προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου (O₂^{·-}) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση (εξίσωση 3). Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι ο σίδηρος (Mylonas & Kouretas, 1999).



Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα θα μπορούσαν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Σημαντικό χαρακτηριστικό του σχηματισμού της ρίζας του υδροξυλίου, είναι η διαθεσιμότητα του σιδήρου ή άλλων μεταλλικών ιόντων με την κατάλληλη μορφή τους.

1.1.4. Singlet oxygen ($^1\text{O}_2$)

Το $^1\text{O}_2$ (singlet oxygen) σχηματίζεται μέσω μιας αλλαγής στην κατάσταση του spin, από παράλληλη σε αντιπαράλληλη. Αυτό αυξάνει πάρα πολύ την δραστηριότητα του επειδή αναιρείται ο περιορισμός του spin. Μπορεί να αντιδράσει εύκολα με αμινοξέα (όπως η κυστεΐνη, μεθειονίνη, τρυπτοφάνη και ιστιδίνη) και αποτελεί τον μεγαλύτερο καταλύτη για την έναρξη της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, η οποία οδηγεί σε καταστροφή της μεμβράνης.

Το $^1\text{O}_2$ σχηματίζεται κατά την άμεση μεταφορά ενέργειας από φωτοευαίσθητα μόρια. Αυτά είναι χρωστικές ενώσεις οι οποίες απορροφούν φωτεινή ακτινοβολία και κατόπιν μεταφέρουν την ενέργεια της διέγερσης σε οξυγόνο θεμελιώδους κατάστασης, καταλήγοντας έτσι στο σχηματισμό του singlet oxygen. Στα φυτά, ο πιο σημαντικός δέκτης του ερεθίσματος του φωτός είναι η χλωροφύλλη. Έτσι, ο σχηματισμός του singlet oxygen αποτελεί κίνδυνο κάτω από συνθήκες εισόδου περίσσειας ενέργειας διέγερσης.

1.1.5. Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

Προκύπτει από την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) με το χλώριο (Cl), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (εξίσωση 4) και είναι 100-1000 φορές πιο τοξικό από το H_2O_2 και το O_2^- (Deaton et al., 2003).



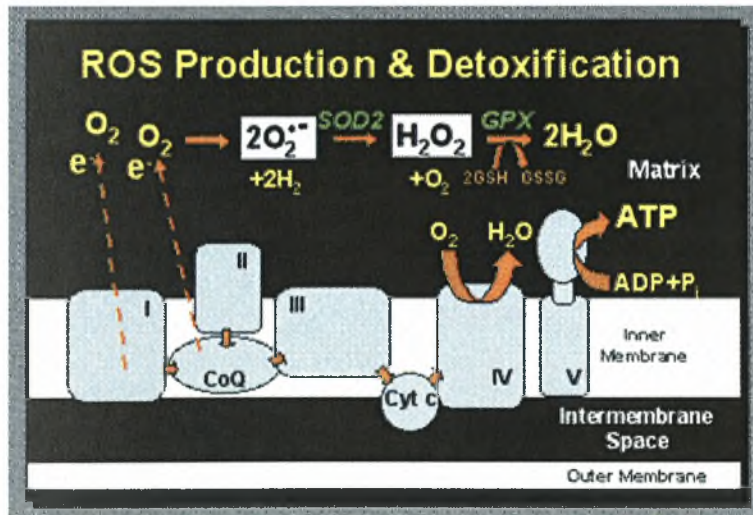
Εκτός από τα ROS υπάρχει και μια επιπλέον σημαντική κατηγορία ελεύθερων ριζών, αυτών που δημιουργούνται από το άζωτο και τα οποία ονομάζονται δραστικά είδη αζώτου (reactive nitrogen species, RNS). Τα τελευταία είναι δραστικά μόρια που περιέχουν άζωτο και μπορούν να παίρνουν μέρος σε πολλές αντιδράσεις. Οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες και ο χρόνος ημιζωής τους παραθέτονται στον πίνακα 1 του παραρτήματος.

1.2. Παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς είναι συνεχής κι αναπόφευκτη. Υπάρχουν πολλές πηγές παραγωγής ριζών οι οποίες είναι τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς. Στις πρώτες περιλαμβάνονται:

1.2.1. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση

Είναι μία διαδικασία η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδογενής πηγή ROS (Σχήμα 1). Υπολογίζεται ότι 2-5% περίπου του οξυγόνου που χρησιμοποιείται για τον αερόβιο μεταβολισμό μετατρέπεται σε ROS (Boveris and Cadenas, 1997) 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 ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντα.

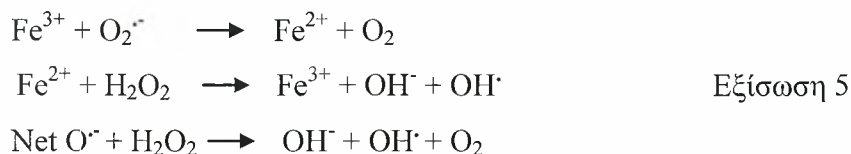


Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση παραγωγής ROS στα μιτοχόνδρια.

(www.altonweb.com/cs/downsyndrome/index.htm?page=mitochondrial.html)

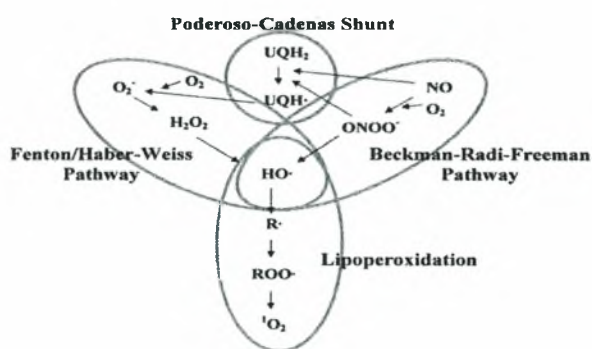
Συγκεκριμένα, ένα ποσοστό των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται για την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε σουπεροξειδίο ($O_2^{\cdot-}$) από την ημικινόνη (UQH \cdot) της NADH-αναγωγής του συνενζύμου Q (το πρώτο ένζυμο

της αναπνευστικής αλυσίδας) (Boveris and Cadenas, 1997). Ένα μέρος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) ανάγεται και δίνει υπεροξείδιο 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^{\cdot}) 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 σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και παράγει υπεροξυνιτρικό ($ONOO^{\cdot}$), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ($ONOOH$) (Korpenol, 1998).

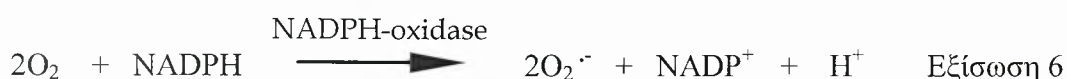
Από το τελευταίο τελικά σχηματίζονται οι ρίζες OH^{\cdot} και NO_2^{\cdot} (Radi et al, 1999). Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη (UQH_2) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH^{\cdot}) η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), όπως προαναφέρθηκε (Σχήμα 2) (Boveris and Cadenas, 1997).



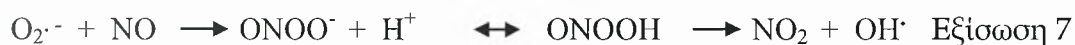
Σχήμα 2. Μονοπάτια αντιδράσεων ελεύθερων ριζών. Ο σχηματισμός του υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και του μονοξειδίου του αζώτου οδηγεί στην παραγωγή της ρίζας υδροξυλίου (Boveris and Cadenas, 1997).

1.2.2. Οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις

Κατά την διάρκεια φλεγμονών, μία ποικιλία από φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα, μονοκύτταρα και μακροφάγα) είναι ικανά να παράγουν ελεύθερες ρίζες ως απάντηση στην φλεγμονή. Συγκεκριμένα, τα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα διαθέτουν μια μεμβρανική NADPH οξειδάση η οποία καταλύει την παρακάτω αντίδραση (εξίσωση 6) με αποτέλεσμα την παραγωγή και απελευθέρωση μεγάλων ποσοτήτων ανιόντος του σουπεροξειδίου.



Το ανιόν του σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\cdot-}$) μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) με μια αντίδραση που καταλύεται από την δεσμουτάση του σουπεροξειδίου. Επιπρόσθετα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) μπορεί να αντιδράσει με σίδηρο προς σχηματισμό ρίζας υδροξυλίου (OH^{\cdot}) και με μονοξείδιο του αζώτου (NO), το οποίο εκκρίνεται από τα μακροφάγα, προς σχηματισμό υπεροξυνιτρικού (ONOOH) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα εκκρίνουν μυελοϋπεροξειδάση. Αυτή η αιμοπρωτεΐνη καταλύει την οξείδωση του χλωρίου από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) προς σχηματισμό υποχλωριώδους οξέος (HOCl) σύμφωνα με την αντίδραση:

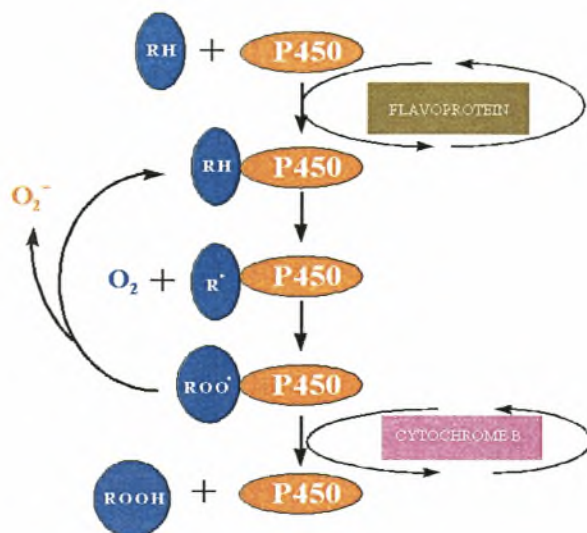


1.2.3. Το σύστημα του κυτοχρώματος P450

Το κυτόχρωμα P450 αποτελεί μία εξίσου σημαντική πηγή παραγωγής ROS. Σε αυτό εντοπίζεται το ενζυμικό σύστημα των μονοοξυγενασών, το οποίο εκτός από την αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών παραγόντων (πχ φάρμακα, εντομοκτόνα κ.α.), είναι υπεύθυνο και για τον σχηματισμό των ROS. Ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα (π.χ. φάρμακο) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Αποτέλεσμα αυτής της αντίδρασης είναι η παραγωγή ROS ως παραπροϊόντα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.



Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων του κυτοχρώματος P450. Το κυτόχρωμα P450 αντιδρά πρώτα με το οργανικό υπόστρωμα (RH). Το σύμπλοκο ανάγεται από την φλαβοπρωτεΐνη σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο το οποίο αντιδρά με οξυγόνο. Το οξυγονομένο σύμπλοκο είτε ανάγεται από το κυτόχρωμα b είτε αποσυντίθεται απελευθερώνοντας σουπεροξειδίου (Winston and Cederbaum, 1983).

1.2.4. Υπεροξειδιοσώματα

Αποτελούν μία ακόμη ενδογενή πηγή των ROS, κυρίως υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Πρόκειται για μικρά μεμβρανικά κυστίδια που περιέχουν εξειδικευμένα ένζυμα τα οποία μεσολαβούν σε ποικίλες αντιδράσεις οξείδωσης (Alberts, 2000).

1.2.5. Διάφορα βιομόρια

Σε αυτά ανήκουν οι φλαβίνες, οι κατεχολαμίνες, οι θειόλες, και η αιμογλοβίνη που μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) (Cutler, 1994).

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 (Inoue et al, 1993; Poulsen et al, 1993), κάπνισμα (Suzuki et al, 1995), έκθεση σε καπνό (Howard et al, 1998) και κατανάλωση αλκοόλ (Nakajima et al, 1998). 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.

1.3. Βιολογική δράση των δραστικών ειδών οξυγόνου

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσα στον οργανισμό είναι συνεχής, γεγονός που έχει άλλοτε ευεργετικές και άλλοτε επιβλαβείς επιδράσεις.

1.3.1. Θετικές επιδράσεις

1) Ο συνεχής σχηματισμός των ROS μέσα στους ιστούς αναγνωρίζεται ως ο κεντρικός μηχανισμός σηματοδότησης για μία μεγάλη ποικιλία μεταβολικών μονοπατιών. Οι ελεύθερες ρίζες χρησιμεύουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι και έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν το επίπεδο οξειδοαναγωγής (Sen et al, 1996; Rimbach et al, 1999; Reid, 2001; Sen, 2001; Linnane et al, 2002). Επίσης συμμετέχουν στη ρύθμιση των υποδοχέων ινσουλίνης με δράση κινάσης τυροσίνης (Schmid et al, 1999). Επίσης ενεργοποιούν τις κυτταροπλασματικές πρωτεϊνικές κινάσες, τον καταρράκτη κινασών MAPK καθώς και τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-1 (Nose et al, 1991; Schieven et al, 1994) και NF-kB (Devary et al, 1991). 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 (Hensley et al, 2002).

2) Οι ελεύθερες ρίζες συνεισφέρουν και στο ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού, καθώς παράγονται από τα φαγοκύτταρα και δρουν ενάντια στα αντιγόνα

κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Finaud et al, 2006). Αυτός ο ρόλος των ROS ενισχύεται κατά την ύπαρξη φλεγμονής.

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 φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών (Halliwell, 2001).

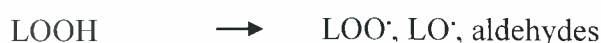
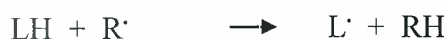
4) Το NO παίζει διαφορετικούς ρόλους στις φυσιολογικές λειτουργίες δρώντας σαν διακυτταρικό σήμα σε πολλά κυτταρικά μονοπάτια (Moncada et al, 2001). Το NO έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την κυτταρική αναπνοή (Boveris et al, 1999) και την παραγωγή ενέργειας καθώς και να μεταβάλλει το μονοπάτι του κυτταρικού 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 (Cleeter et al, 1994). Επίσης, το NO βοηθά στη ρύθμιση της πίεσης του αίματος και συμμετέχει στην εξουδετέρωση των παράσιτων από τα μακροφάγα.

5) Τα ROS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στη μυϊκή συστολή (Reid, 2001; Linnane et al, 2002). Αυτή η διαπίστωση προέρχεται από το γεγονός ότι η παρεμπόδιση παραγωγής των ROS οδηγεί σε απώλεια της ικανότητας συστολής των μυϊκών ινών. Ωστόσο, αυξημένη ποσότητα ROS στους μυϊκούς ιστούς έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

1.3.2. Αρνητικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες, παρά το γεγονός ότι εμπλέκονται σε ορισμένες χρήσιμες για τον οργανισμό διεργασίες έχουν και αρκετές επιβλαβείς επιδράσεις, οι οποίες μπορούν να συνοψιστούν στις εξής:

1) Υπεροξειδωση λιπιδίων. Όλα τα βιομόρια προσβάλλονται από τις ελεύθερες ρίζες αλλά τα λιπίδια είναι τα πιο ευάλωτα σε αυτές. Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids-PUFAs), τα οποία προσβάλλονται από ελεύθερες ρίζες οδηγώντας έτσι σε μία



Εξίσωση 10

οποία αρχίζει με την οξείδωση ενός PUFA από μία ελεύθερη ρίζα οδηγώντας στο σχηματισμό μιας λιπιδιακής ρίζας. Η τελευταία αντιδρά με το οξυγόνο παράγοντας μία ρίζα υπεροξυλίου. Η ρίζα αυτή προκαλεί την διατήρηση της αντίδρασης και την υπεροξείδωση 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 (εξίσωση 10). Η καταστροφή των μεμβρανικών λιπιδίων και τα προϊόντα της υπεροξειδωσής τους είναι επικίνδυνα για την επιβίωση των κυττάρων και τελικά των ιστών που απαρτίζουν (Mylonas and Kouretas, 1999).

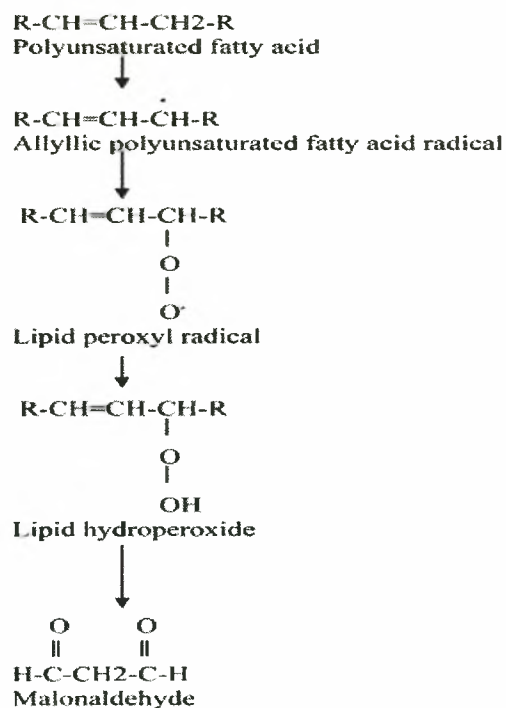


Fig. 1. Steps of lipid peroxidation (Alessio, 2000).

Σχήμα 4. Στάδια της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (Alessio, 2000).

2) Οξείδωση πρωτεϊνών. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν δομικές πρωτεΐνες αλλά και πρωτεΐνες του αίματος (Szweda et al, 2002). Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης, οι πρωτεΐνες είναι δυνατόν να χάσουν αμινοξέα ή να τεμαχιστούν σε μικρότερα τμήματα, οπότε και μεταβάλλεται η δομή τους και η λειτουργικότητά τους. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η καταστροφή των πρωτεϊνών αυξάνεται με την ηλικία (Standman et al., 2001) και ότι η υπεροξειδωση των λιπιδίων

διαταράσσει τη λειτουργία των πρωτεϊνών που βρίσκονται προσδεσμένες στη μεμβράνη (Beckman et al, 1998). Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες είναι πιθανόν να ενεργοποιήσουν την παραγωγή αντισωμάτων κι αυτοάνοσες διαδικασίες.

3) Οξείδωση DNA. 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 (Rodney et al, 2000). 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 (Cheng et al, 1992). Επίπλέον, τόσο η αδενίνη όσο και οι πυριμιδίνες μπορούν να τροποποιηθούν μετά από αλληλεπίδραση με τη ρίζα OH[•] (Mylonas & Kouretas, 1999). 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-διωδρο-5,6-διωδροξυ-2-δεοξουριδίνη, η οποία επάγει C→T μεταλλάξεις. Τέλος, η οξείδωση της θυμίνης δίνει thymidine glycol η οποία επάγει T→C μεταλλάξεις.

4) Γήρανση. Η άποψη ότι η γήρανση είναι αποτέλεσμα της δράσης των ελεύθερων ριζών προτάθηκε για πρώτη φορά το 1956 από τον Harman κι έκτοτε έχουν γίνει πολλές μελέτες τα αποτελέσματα των οποίων υποστηρίζουν αυτήν τη θεωρία. 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) και απενεργοποίησης κάποιων ειδικών πρωτεϊνών, όπως η μετατοπάση ATP-ADP (Hamilton et al, 2001). 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.

5) Πρόκληση ασθενειών. Οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται υπεύθυνες για την εμφάνιση ασθενειών που προσβάλλουν τον άνθρωπο. Οι κακοήθεις ασθένειες, ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριοσκλήρυνση, η χρόνια φλεγμονή, το σύνδρομο Down, η νόσος Parkinson αποτελούν μόνο μερικά παραδείγματα αυτών των ασθενειών.

1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας

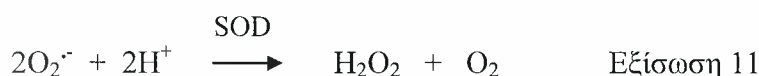
Τα συστατικά των ζωντανών κυττάρων είναι ευπαθή από προσβολές ελεύθερων ριζών, και για το λόγο αυτό εξελικτικά έχει δημιουργηθεί ένας αριθμός ενδοκυτταρικών μηχανισμών που εξισορροπούν ή ελέγχουν τη δραστηριότητα των ROS. Υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία αντιοξειδωτικών μηχανισμών (ενζυμικών και μη) στα ανθρώπινα 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 προσβάλλουν τα 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 του οργανισμού ανάλογα με τη χημική τους φύση μπορούν να καταταχθούν σε ενζυμικά και μη ενζυμικά.

1.4.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά περιλαμβάνουν ένζυμα τα οποία βρίσκονται σε ειδικά οργανίδια και υποκυτταρικά διαμερίσματα με στόχο να ελέγχουν την παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Σε αυτήν την κατηγορία των αντιοξειδωτικών ανήκουν:

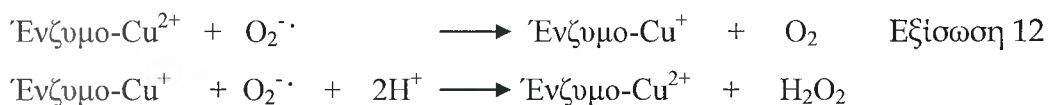
1.4.1.a. Δεσμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)

Η SOD είναι το πιο σημαντικό ένζυμο του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού και αποτελεί την κύρια άμυνα ενάντια στα ανιόντα του σουπεροξειδίου (Mylonas & Kouretas, 1999), καθώς καταλύει την αντίδραση μετατροπής τους σε υπεροξείδιο του υδρογόνου σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

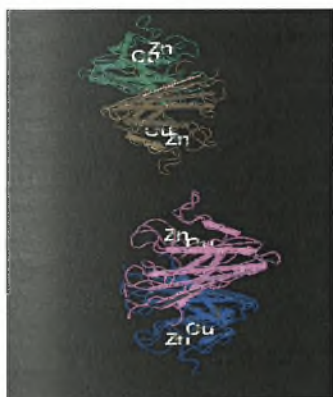


SOD διακρίνεται σε τρεις τύπους: i) η κυτταροπλασματική Cu-Zn SOD, ii) η μιτοχονδριακή Mn-SOD και iii) η εξωκυτταρική SOD (Deaton et al, 2004).

i) Κυτταροπλασματική Cu-Zn SOD. Οι Cu-Zn SOD που έχουν απομονωθεί από ευκαρυωτικούς οργανισμούς έχουν μοριακό βάρος περίπου ίσο με 32000 daltons και αποτελούνται από δύο υπομονάδες από τις οποίες η μία φέρει ένα άτομο Zn και η άλλη ένα άτομο Cu. Συγκεκριμένα το ιόν χαλκού φαίνεται πως συμμετέχει στην αντίδραση της δεσμουτάσης και υφίσταται διαδοχικά οξείδωση και αναγωγή, δηλαδή

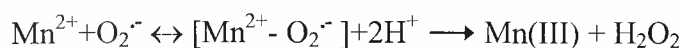
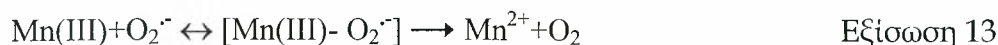


Το ιόν Zn^{2+} δεν συμμετέχει στο καταλυτικό κύκλο αλλά συμβάλλει στη σταθερότητα του ενζύμου (Halliwell & Gutteridge, 1998).



Εικόνα 1. Τρισδιάστατη δομή κυτταροπλασματικής Cu-Zn SOD (www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.html).

ii) Μιτοχονδριακή Mn-SOD. Η Mn-SOD απαντάται στα βακτήρια, φυτά και ζώα, σχεδόν αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια. Έχει μοριακό βάρος περίπου ίσο με 40000 daltons και περιέχει στο ενεργό της κέντρο ένα ιόν μαγγανίου. Η αντίδραση που καταλύει είναι:



Σε αντίθεση με την Cu-Zn SOD η δραστηκότητά 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 δραστηκότητα του ένζυμο καθώς η απομάκρυνσή του έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της δραστηκότητας της Mn-SOD (Halliwell & Gutteridge 1998).

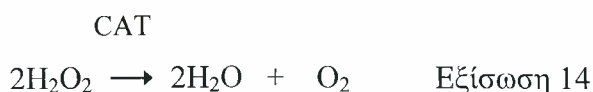


Εικόνα 2. Τρισδιάστατη δομή μιτοχονδριακής Mn-SOD (www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.html).

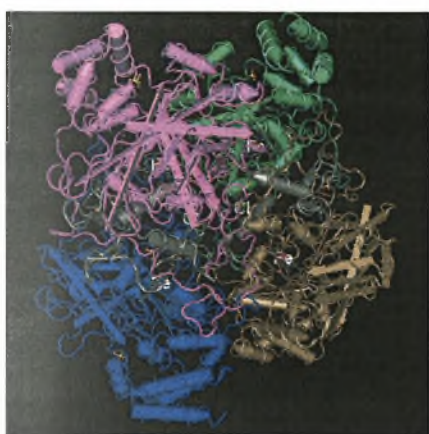
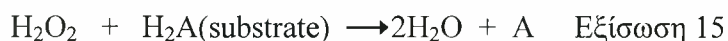
iii) Εξωκυτταρική SOD. Έχει σχετικά υψηλό μοριακό βάρος σε σύγκριση με τους άλλους δύο (περίπου 135000) και είναι μια τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη στην οποία κάθε υπομονάδα περιέχει ένα άτομο χαλκού και ένα άτομο ψευδαργύρου. Υπάρχουν αρκετές μορφές εξωκυτταρικής SOD (A, B και C) και έχει παρατηρηθεί ότι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

1.4.1.β. Καταλάση

Αποτελεί ένα σημαντικό ενζυμικό αντιοξειδωτικό το οποίο εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα. Απαρτίζεται 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 (Finaud et al., 2006). Καταλύει την μετατροπή του υπεροξειδίου σε νερό και μοριακό οξυγόνο σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η καταλάση στα ζώα βρίσκεται σε αφθονία κυρίως στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα. Επίσης, έχει την δυνατότητα χρησιμοποιώντας το υπεροξείδιο να αποτοξινώσει ορισμένες τοξικές ουσίες χρησιμοποιώντας ως υποστρώματα π.χ. φαινόλες, αλκοόλες, φορμικό οξύ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (Finaud et al., 2006).

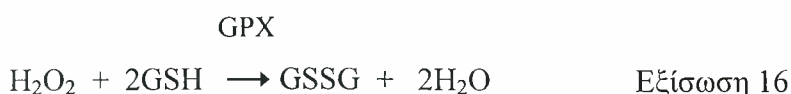


Εικόνα 3. Τρισδιάστατη δομή καταλάσης(www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.html).

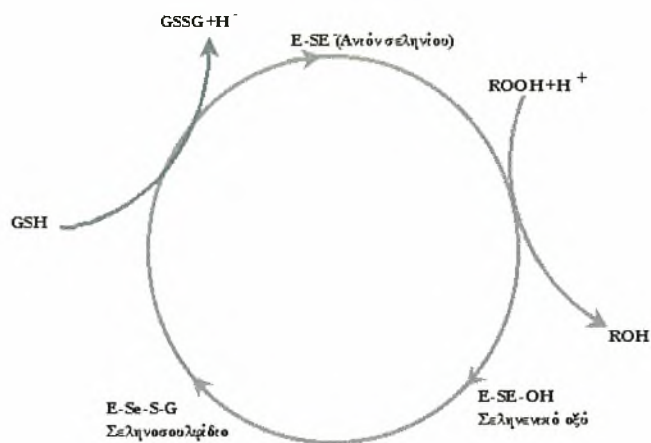
1.4.1.γ. Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (GSH-Px)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 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 υπεροξείδια 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) (Halliwell and Gutteridge 1998).

Η GSH-Px καταλύει την μετατροπή των υπεροξειδίων σε νερό οξειδώνοντας την GSH στην οξειδωμένη της μορφή(GSSG) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

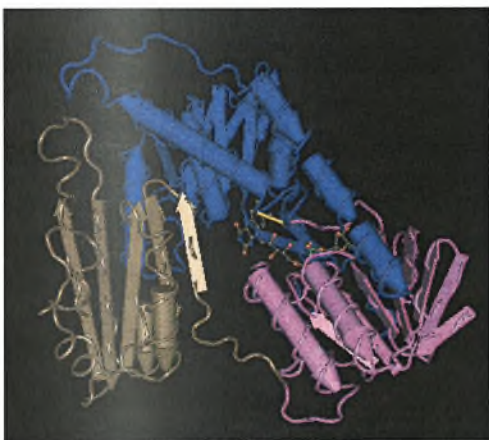


Συγκεκριμένα, η ιοντισμένη μορφή του σεληνίου ($E-Se^-$) ανάγει το υπόστρωμα υπεροξειδίου προς μία αλκοόλη και έτσι οξειδώνεται προς σεληνενικό οξύ ($E-SeOH$). Στη συνέχεια εισέρχεται στην αντίδραση η γλουταθειόνη με το σχηματισμό ενός σεληνοσουλφιδίου ($E-Se-S-G$). Τέλος, ένα δεύτερο μόριο γλουταθειόνης αναγεννά την ενεργό μορφή του ενζύμου με προσβολή του ($E-Se-S-G$) προς σχηματισμό οξειδωμένης γλουταθειόνης (Σχήμα 6).



Σχήμα 5. Αντίδραση GSH-Px (Deaton et al., 2003).

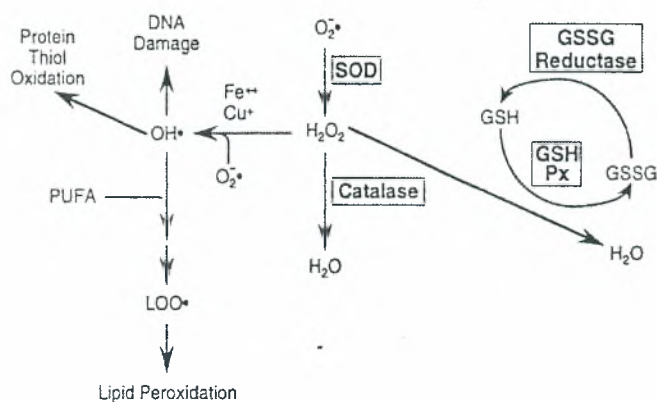
Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση έχουν την ίδια δράση ενάντια στο υπεροξείδιο. Αλλά η πρώτη είναι περισσότερο αποτελεσματική σε υψηλές συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών, ενώ η δεύτερη δρα περισσότερο αποτελεσματικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου (Antunes et al, 2002).



Εικόνα 4. Τρισδιάστατη δομή αναγωγής της γλουταθειόνης που αλληλεπιδρά με peroxyinitrite (www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.html).

1.4.1.δ. 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 (Halliwell and Gutteridge 1998).



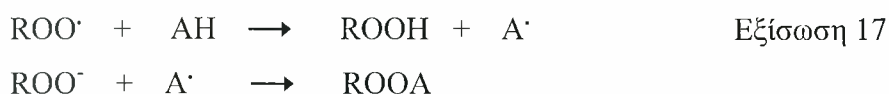
Σχήμα 6. Μονοπάτι αναγωγής του H₂O₂ σε νερό (Mylonas & Kouretas, 1999).

1.4.2. Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά

1.4.2.α. Βιταμίνη E (τοκοφερόλη)

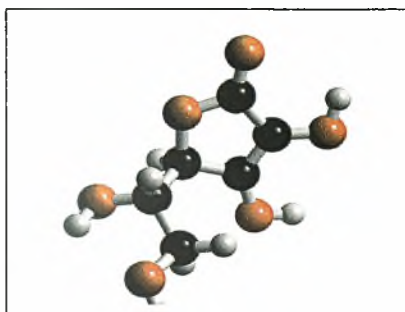
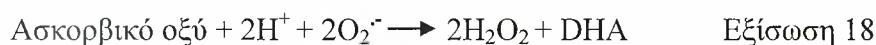
Είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη που αποτελείται από διάφορες ισομορφές γνωστές ως τοκοφερόλες με την α-τοκοφερόλη να είναι η πιο δραστική και άφθονη μορφή. Η βιταμίνη E θεωρείται από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά εξαιτίας της αφθονίας της στις μεμβράνες των κυττάρων και των μιτοχονδρίων, αλλά και της ικανότητάς της να δρα απευθείας έναντι των ελευθέρων ριζών. Επιπλέον έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται στη λιπιδιακή διπλοστοιβάδα της κυτταρικής

μεμβράνης και να αναστέλλει την αλυσιδωτή αντίδραση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων (ROOH) (Mylonas & Kouretas, 1999; Finaud et al, 2006).



1.4.2.β. Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη και ένας ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας, ο οποίος αντιδρά με πολλές ελεύθερες ρίζες, παράγοντας το μεταβολίτη δευδροασκορβικό οξύ (DHA) (Mylonas & Kouretas, 1999).



Εικόνα 5. Τρισδιάστατη δομή βιταμίνης C (www.3dchem.com/molecules.asp?ID=69).

1.4.2.γ. Βιταμίνη A (ρετινόλη) και β-καροτένιο

Η βιταμίνη Α είναι λιποδιαλυτή και βρίσκεται σε αρκετές λιπαρές ουσίες, ενώ το β-καροτένιο εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μετατρέπεται σε βιταμίνη Α όταν απαιτείται από τις ανάγκες του οργανισμού. Το β-καροτένιο πιστεύεται ότι αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες και περιορίζει την υπεροξειδωση των λιπιδίων.



Εικόνα 6. Τρισδιάστατη δομή της βιταμίνης Α (www.3dchem.com/molecules.asp?ID=69).

1.4.2.δ. Γλουταθειόνη (GSH)

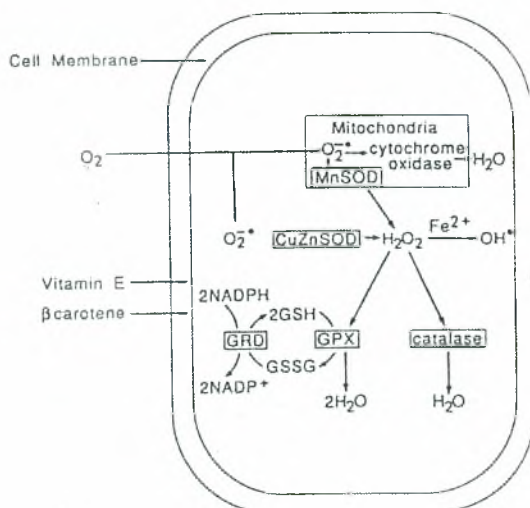
Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπίδιο (γ -Glu-Cys-Gly) που περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα και αποτελεί ένα σημαντικό διαλυτό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της συνεχούς και κυκλικής μετάπτωσης του από μία ανηγμένη (GSH) σε μία οξειδωμένη μορφή (GSSG), και το αντίθετο (Halliwell and Gutteridge, 1998).

1.4.2.ε. Συνένζυμο Q10

Είναι ένα ενδογενές μόριο το οποίο βρίσκεται στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων και είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του ATP. Είναι γνωστό ότι δρά απευθείας ως αντιοξειδωτικό ενάντια στις ρίζες υπεροξειδίου, ενώ παράλληλα είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση ενός άλλου πολύ ισχυρού λιπόφιλου αντιοξειδωτικού, της α -τοκοφερόλης (Siemieniuk et al, 2005).

1.4.2.στ. Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο. Έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς 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 (Halliwell and Gutteridge 1998).



Σχήμα 7. Το αντιοξειδωτικό σύστημα του κυττάρου (Mylonas & Kouretas, 1999).

1.4.2.ζ. Μελαντονίνη

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 , $NO\cdot$, $ONOO^-$, 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 (Russel et al, 2001).

1.4.2.η. Στοιχεία μετάπτωσης

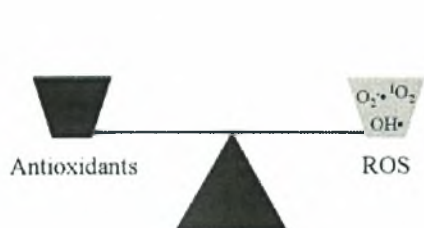
Στοιχεία, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός, αποτελούν σημαντικά συστατικά πρωτεϊνών, μερικές από τις οποίες συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού [SOD(Cu/Fe), κυτοχρωμική οξειδάση (Cu), κυτοχρώματα (Se), φερριτίνη (Fe), λακτοφερρίνη (Fe) (Mylonas & Kouretas, 1999).

1.5. Οξειδωτικό στρες

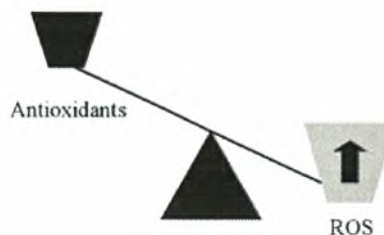
Ο όρος «οξειδωτικό στρες» χρησιμοποιείται για να περιγράψει την κατάσταση κατά την οποία η κυτταρική παραγωγή προ-οξειδωτικών υπερέρχει της φυσιολογικής ικανότητας του συστήματος να τα εξουδετερώνει. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προέλθει από:

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.



Σχήμα 8. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή των ROS και την «εξουδετέρωσή τους» από το σύστημα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Deaton et al., 2003).



Σχήμα 9. Παρά την επαρκή αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, η αύξηση στην παραγωγή των ROS επιδρά στο αντιοξειδωτικό σύστημα με αποτέλεσμα την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες (Deaton et al., 2003).

1.5.1. Μέθοδοι προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες στα βιολογικά συστήματα

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προσδιοριστεί με τη μέτρηση α) της ποσότητας των ελευθέρων ριζών που παράγονται β) της βλάβης που προκαλείται σε λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA από τις ελεύθερες ρίζες.

1.5.1.α. Άμεσος προσδιορισμός του οξειδωτικού στρες

Η τεχνική της παγίδευσης του spin ακολουθούμενη από την τεχνική παραμαγνητικού συντονισμού ηλεκτρονίων (electron spin resonance technique) χρησιμοποιούνται για την απευθείας μέτρηση των ROS με βάση τις παραμαγνητικές τους ιδιότητες. Οι μετρήσεις είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν *in vivo*, *ex vivo* και *in vitro*. Τα δείγματα αίματος συλλέγονται σε σωληνάρια που περιέχουν ειδικό διάλυμα με παγιδευμένα spin, τα οποία αποτελούν σταθεροποιητές των ROS. Έπειτα από φυγοκέντρηση ο ορός αναλύεται με την φασματοφωτομετρική μέθοδο. Ωστόσο τα αποτελέσματα από την παραπάνω μέθοδο δεν θεωρούνται σε μεγάλο βαθμό αξιόπιστα εξαιτίας του μικρού χρόνου ημιζωής των ROS και της χαμηλής τους συγκέντρωσης (Urso et al., 2003).

1.5.1.β. Έμμεσος προσδιορισμός του οξειδωτικού στρες

Πραγματοποιείται με την χρήση ειδικών δεικτών (δείκτες οξειδωτικού στρες) με τους οποίους προσδιορίζεται το μέγεθος της βλάβης που έχουν υποστεί μακρομόρια όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA, εξαιτίας της δράσης των ελευθέρων ριζών. Εκτενής αναφορά στους παραπάνω δείκτες πραγματοποιείται στην ενότητα «υλικά και μέθοδοι».

1.5.2. Παράγοντες που επάγουν το οξειδωτικό στρες

Οι παράγοντες που μπορούν να επάγουν το οξειδωτικό στρες διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς. Στους ενδογενείς περιλαμβάνονται η φυσική δραστηριότητα, το ψυχολογικό στρες, η φλεγμονή (παροδική μόλυνση/χρόνια πάθηση), ο καρκίνος, η ισχαιμία/επαναιμάτωση (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 (Moller et al., 1996). Στη συγκεκριμένη εργασία έγινε μελέτη σχετικά με τον πρώτο παράγοντα, τη φυσική άσκηση.

1.5.3. Οξειδωτικό στρες και άσκηση

Η άσκηση είναι γνωστό ότι βελτιώνει την ποιότητα ζωής του ανθρώπου, καθώς τον αναζωογονεί και μειώνει αισθητά τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών όπως καρδιακών νόσων, καρκίνου, οστεοπόρωσης και διαβήτη. Επίσης, συγκεκριμένες μορφές άσκησης βελτιώνουν τη λειτουργία των σκελετικών μυών και συμβάλλουν στη διατήρηση της μυϊκής μάζας (Leeuwenburgh et al., 2001).

Ωστόσο, τα αποτελέσματα από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η άσκηση συνδέεται με την αύξηση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών και άρα επάγει την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες. Η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών αντισταθμίζεται από το αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού, το οποίο προσαρμόζεται ανάλογα με τον τύπο της άσκησης. Συγκεκριμένα, κατά την διάρκεια επαναλαμβανόμενης άσκησης κατάλληλης διάρκειας και έντασης, οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται εξουδετερώνονται πλήρως από το κατάλληλα προσαρμοσμένο αντιοξειδωτικό σύστημα (Bloomer et al., 2004). Αντίθετα, κατά την διάρκεια έντονης άσκησης σε

απροπόνητα άτομα, των οποίων το αντιοξειδωτικό σύστημα δεν είναι κατάλληλα προσαρμοσμένο, η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι ιδιαίτερα επιβλαβής (Leeuwenburgh et al., 2001).

Έχει βρεθεί ότι η μικρής διάρκειας και μέτριας έντασης άσκηση επάγει την υπεροξείδωση των λιπιδίων σε αρκετά είδη οργανισμών (Marlin et al, 2002). Στους ανθρώπους η υπομέγιστη άσκηση αυξάνει την συγκέντρωση του εκπνεόμενου πεντανίου, το οποίο προέρχεται από την υπεροξείδωση του λινολεϊκού οξέος (Dillard et al., 1977). Στους μαραθωνοδρόμους μετά από αγώνα παρατηρείται αύξηση των προϊόντων της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, ενώ έχουν και αυξημένη δεκτικότητα στην οξείδωση της LDL (Liu et al, 1999). Έχει επίσης βρεθεί ότι τα επίπεδα της GSSG είναι αυξημένα στο αίμα ποδηλατοδρόμων μετά από μέγιστης έντασης άσκηση διάρκειας 14 min (Sen et al., 1994).

Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι η άσκηση αυξάνει τα επίπεδα της SOD σε κολυμβητές, ποδηλάτες και παίκτες του βόλεϊ (Powers et al., 2000), όπως επίσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GSH-Px) (Leeuwenburgh et al., 1994). Επιπλέον, η δραστητικότητα της καταλάσης φαίνεται να αυξάνεται στα ερυθροκύτταρα επαγγελματιών ποδηλατοδρόμων σε κατάσταση ηρεμίας σε σύγκριση με τους ερασιτέχνες (Mena et al., 1991).

Σήμερα είναι πλέον τεκμηριωμένο πως η άσκηση αυξάνει το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες μελέτες που δεν συμφωνούν πλήρως με την παραπάνω παραδοχή. Οι κύριοι λόγοι είναι οι διαφορές μεταξύ των ομάδων που επιλέγονται προς μελέτη ως προς την ηλικία, τη φυσική κατάσταση, τη γενετική προδιάθεση, τις διατροφικές συνήθειες όπως επίσης και τα διαφορετικά πρωτόκολλα άσκησης. Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα φαίνεται ότι κυρίως η έντονη άσκηση μακράς διάρκειας ξεπερνά την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού και οδηγεί σε οξειδωτικές βλάβες (Finaud et al., 2006).

1.5.4. Οξειδωτικό στρες και ποδόσφαιρο

Σχετικά μικρός είναι ο αριθμός των εργασιών που εξετάζουν το οξειδωτικό στρες στο ποδόσφαιρο. Το ποδόσφαιρο είναι ένα άθλημα που απαιτεί υψηλής έντασης, αλλά ασυνεχή δραστηριότητα για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα. Η αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και οι γρήγορες αλλαγές στη ροή του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια, γεγονότα που σχετίζονται με την παρατεταμένη και διακεκομμένη άσκηση, ίσως ευθύνονται για την παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Το παρατεταμένο

και ασυνεχές τρέξιμο, όπως συμβαίνει στη περίπτωση του ποδοσφαίρου, φαίνεται να αυξάνει τους δείκτες της μυϊκής καταστροφής και της υπεροξειδωσής των λιπιδίων στο αίμα (Thompson et al., 2001; Kingsley et al., 2005).

Πιο συγκεκριμένα, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ποδοσφαιριστών φαίνεται να είναι αυξημένη κατά 25% σε σύγκριση με απροπόνητα άτομα (Brites et al., 1999). Επίσης, η συγκέντρωση του ασκορβικού και του ουρικού οξέος είναι υψηλότερη στους ποδοσφαιριστές σε σχέση με τα απροπόνητα άτομα (Brites et al., 1999). Αυξημένα είναι επίσης και τα επίπεδα της HDL-C στους ποδοσφαιριστές, γεγονός που μειώνει σημαντικά την οξειδωσής της LDL από τις ελεύθερες ρίζες (Brites et al., 1999).

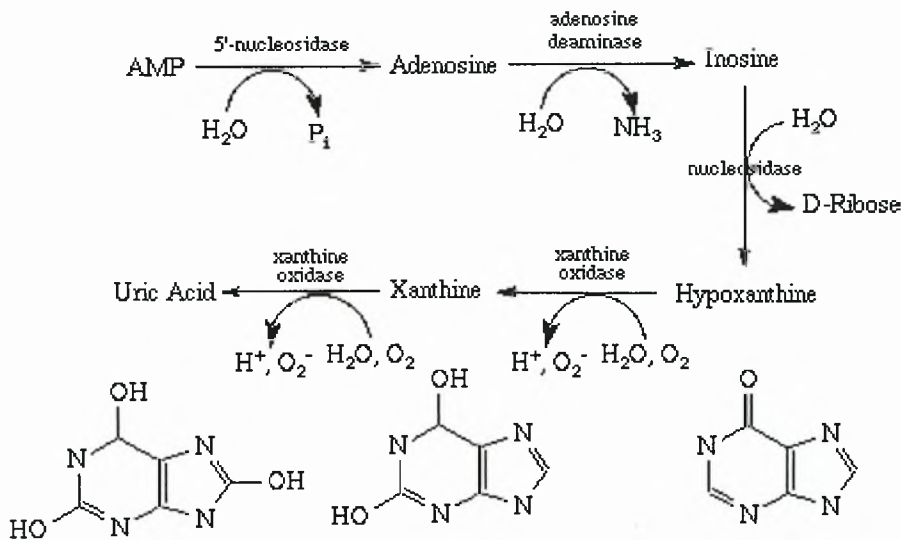
Όσον αφορά τα υδατοδιαλυτά αντιοξειδωτικά, όπως οι ολικές πρωτεΐνες και η αλβουμίνη βρέθηκε να κυμαίνονται περίπου στα ίδια επίπεδα στους ποδοσφαιριστές και στα απροπόνητα άτομα. Αντίθετα, τα επίπεδα της βιταμίνης C βρέθηκαν αυξημένα στους ποδοσφαιριστές. Από τα ενζυμικά αντιοξειδωτικά, η δεσμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης εμφάνισαν μεγαλύτερη δραστηριότητα στους ποδοσφαιριστές σε σύγκριση με τα απροπόνητα άτομα (Cazzola et al., 2003; Dekany et al., 2006). Τα επίπεδα της MDA βρέθηκαν μειωμένα στους ποδοσφαιριστές σε σύγκριση με τα άτομα controls (Metin et al., 2003). Αντίθετα, οι συγκεντρώσεις της ρεδοκτάσης της γλουταθειόνης και του NO στο πλάσμα βρέθηκαν αυξημένες σε ποδοσφαιριστές που έπερναν συμπλήρωμα βιταμίνης C σε σύγκριση με τα απροπόνητα άτομα (Banfi et al., 2005). Τέλος τα επίπεδα της GSH παρουσιάστηκαν αυξημένα σε νεαρούς ποδοσφαιριστές σε σύγκριση με τα απροπόνητα άτομα (Metin et al., 2003).

1.5.5. Πιθανοί μηχανισμοί παραγωγής οξειδωτικού στρες κατά την άσκηση

Υπάρχουν αρκετές εναλλακτικές εξηγήσεις για τους τρόπους με τους οποίους η άσκηση αυξάνει τα επίπεδα των ROS (Moller et al., 1996).

Μια ευρέως διαδεδομένη θεωρία για την παραγωγή ελεύθερων ριζών κατά την άσκηση θεωρείται η διαρροή ηλεκτρονίων από τη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα Η αερόβια αναπνοή συνίσταται στην αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. Η όλη διαδικασία που λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, περιλαμβάνει μια ροή ηλεκτρονίων από τους μεταβολίτες του κύκλου του Krebs στο μοριακό οξυγόνο. Μικρά ποσοστά $O_2^{\cdot -}$ και H_2O_2 διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα και μάλιστα προτάθηκε πως το σημείο διαρροής είναι η

ουβικινόνη. Τελικά έγινε κοινώς αποδεκτό πως δεν υπάρχει συγκεκριμένη θέση και πως τα μιτοχόνδρια είναι ταυτόχρονα η πηγή και ο κύριος στόχος των ROS. Θεωρείται πως ένα ηλεκτρόνιο που προέρχεται από την αναγωγή της ουβικινόνης, επάγει το σχηματισμό μιας δραστικής ενδιάμεσης ένωσης, της ουβισεμικινόνης, αντί λοιπόν η ουβισεμικινόνη να δεχθεί ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο και να σχηματίσει την ουβικινόλη, προσφέρει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο οξυγόνο, οπότε παράγεται $O_2^{\cdot-}$. Η καταλυτική συμβολή της άσκησης είναι εμφανής αν αναλογιστεί κανείς πως κατά τη μέγιστη άσκηση η συνολική πρόσληψη οξυγόνου αυξάνεται 20 φορές (Li et al, 1988). Ωστόσο, νεώτερες μελέτες (Vina et al, 2006) υποστηρίζουν ότι τα μιτοχόνδρια παράγουν ROS, σε αναλογία περίπου 2% της συνολικής κατανάλωσης οξυγόνου, όταν βρίσκονται στο στάδιο ηρεμίας 4. Αντίθετα, όταν τα μιτοχόνδρια παράγουν ATP από ADP με μεγάλη ροή ηλεκτρονίων προς το οξυγόνο (στάδιο 3), όπως συμβαίνει στη περίπτωση της άσκησης, η ποσότητα του οξυγόνου που μετατρέπεται σε ROS μειώνεται κατά δέκα περίπου φορές σε σχέση με το στάδιο 4. Σύμφωνα με τα παραπάνω οι Vina et al. (2006) πρότειναν ότι ο ακριβής ρόλος των μιτοχονδρίων στην παραγωγή των ROS θα πρέπει να αποτιμηθεί ξανά και να επανεξετασθούν εναλλακτικοί μηχανισμοί.

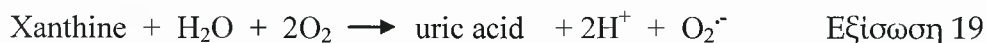


Σχήμα 10. Παραγωγή ελευθέρων ριζών από το σύστημα οξειδάση της ξανθίνης (Crossnan and Moldave, 1967).

Ένας εναλλακτικός μηχανισμός με τον οποίο η άσκηση μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες είναι η ισχαιμία- επαναιμάτωση (επανοξυγόνωση). Η εξάντληση

των αποθεμάτων ATP οδηγεί σε αυξημένα ενδοκυτταρικά επίπεδα ADP. Το γεγονός αυτό πυροδοτεί τον καταβολισμό του ADP από το σύστημα της οξειδάσης της ξανθίνης η οποία καταλύει μια αντίδραση που έχει χαρακτηριστεί ως μια από τις κυριότερες πηγές παραγωγής των ROS. Η υψηλής έντασης άσκηση και τα ισχαιμικά επεισόδια φαίνεται πως δημιουργούν όλες τις ευνοϊκές προϋποθέσεις για την ενεργοποίηση του μονοπατιού της οξειδάσης της ξανθίνης.

Η πρόσληψη του οξυγόνου χαρακτηρίζεται ανεπαρκής κυρίως κατά την ισομετρική άσκηση. Υπό αυτές τις συνθήκες το AMP (το οποίο έχει προκύψει από τη διάσπαση του ATP σε ADP, και του τελευταίου σε AMP), διασπάται και παράγεται ένα μόριο υποξανθίνης η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ξανθίνη και ουρικό οξύ από την οξειδάση της ξανθίνης. Η τελευταία αντίδραση είναι συζευγμένη με την παραγωγή $O_2^{\cdot-}$.



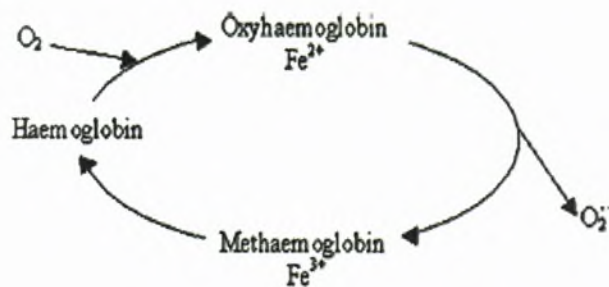
Έχει βρεθεί πως η υποξανθίνη συσσωρεύεται μετά από έντονη μυϊκή σύσπαση και το ουρικό οξύ βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα τόσο στον ασκούμενο μυ όσο και στο πλάσμα. Υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές που πιστοποιούν την αύξηση της δραστηριότητας της οξειδάσης της ξανθίνης μετά την άσκηση. Κάτω από αναερόβιες συνθήκες το ATP αναπληρώνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η υποξανθίνη και η ξανθίνη μετατρέπονται σε ουρικό οξύ από τη δεϋδρογενάση της ξανθίνης και όχι από την οξειδάση, οπότε δεν παράγονται ROS (Hellsten et al, 1988; Radak et al, 1996; Hellsten et al, 1997).

Τα πολυμορφοουδετερόφιλα (PMN) είναι μία κατηγορία κυττάρων που κατέχουν σημαντική θέση στην άμυνα των ιστών σε μολύνσεις από ιούς ή βακτήρια. Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την ήπια καταστροφή των ιστών κατά τη συστολή, είτε από το οξειδωτικό στρες, είτε από κάποιο τραυματισμό. Σε αυτήν την περίπτωση τα PMN μεταναστεύουν στην πληγείσα περιοχή και εκκρίνουν λυσοζύμη και $O_2^{\cdot-}$. Η λυσοζύμη προωθεί τη διάσπαση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και κυτταρικών υπολειμμάτων, ενώ το $O_2^{\cdot-}$, που παράγεται από την μυελοπεροξειδάση και τη NADPH οξειδάση σύμφωνα με την αντίδραση:



Κατά τον αναερόβιο μεταβολισμό η τοπική πτώση του pH, λόγω συσσώρευσης γαλακτικού οξέος, παράγει την απελευθέρωση οξυγόνου από την

αιμογλοβίνη και αυξάνει την μερική πίεση του οξυγόνου στους ιστούς και μειώνεται στις αρτηρίες. Κάτω από συνθήκες έντονης άσκησης η αιμογλοβίνη παράγει ROS. Η πτώση του pH έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση σιδήρου από τις πρωτεΐνες που περιέχουν αίμη. Αμφότερες η αιμογλοβίνη και η μυογλοβίνη έχουν την ιδιότητα να επάγουν την παραγωγή των ROS μέσω των ατόμων σιδήρου που διαθέτουν (Deaton et al., 2003).



Σχήμα 11. Παραγωγή ανιόντων σουπεροξειδίου (O_2^-) κατά τη διάρκεια της οξείδωσης της οξυαιμογλοβίνης από τη μεθεμογλοβίνη (Deaton et al., 2003).

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 (Elosua et al, 2003). Επιπλέον, η αυτοοξείδωση της επινεφρίνης σε αδrenoχρώμιο συνοδεύεται από την ταυτόχρονη παραγωγή O_2^- . Ωστόσο, η σημασία των κατεχολαμινών σαν πηγή παραγωγής ROS κατά τη διάρκεια της άσκησης δεν έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό και συνεπώς παραμένει αδιευκρίνιστη (Elosua et al, 2003).

2. Σκοπός της εργασίας

Υπάρχει μεγάλος αριθμός εργασιών που εξετάζουν το οξειδωτικό στρες και την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού κατά την άσκηση. Ωστόσο, ελάχιστες είναι οι μελέτες που ασχολούνται με την απόκριση επαγγελματιών ποδοσφαιριστών στο οξειδωτικό στρες. Για αυτό το λόγο η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την μελέτη δεικτών οξειδωτικού στρες σε επαγγελματίες ποδοσφαιριστές πριν και μετά το τέλος ενός ποδοσφαιρικού αγώνα διάρκειας 90 λεπτών. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της GSH της GSSG και του λόγου GSH/GSSG του αιμολύματος, καθώς επίσης και τα επίπεδα των TBARS, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού (TAC).

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Συμμετέχοντες

Στην παρούσα εργασία έλαβαν μέρος 8 επαγγελματίες ποδοσφαιριστές ομάδας της Α' εθνικής κατηγορίας. Οι αθλητές αφού ενημερώθηκαν για τους πιθανούς κινδύνους, την ταλαιπωρία και τα οφέλη της συμμετοχής στην έρευνα, συναίνεσαν γραπτά για την εθελοντική συμμετοχή τους. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες που θεσπίστηκαν για έρευνα σε ανθρώπους από την Αμερικάνικη Αθλητιατρική Εταιρεία.

3.2. Αιμοληψία

Μισή ώρα πριν και αμέσως μετά το τέλος ποδοσφαιρικού αγώνα διάρκειας 90 λεπτών έγινε αιμοληψία περίπου 8-10 mL αίματος από τη δεξιά ωλένια φλέβα. Για τη λήψη του ορού, μια ποσότητα αίματος τοποθετήθηκε σε απλούς δοκιμαστικούς σωλήνες (vacutainer tubes) και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 10-20 λεπτά μέχρι να πήξει. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν στις 3500 rpm (1370 g) για 10 λεπτά στους 5°C, συλλέχθηκε ο ορός του αίματος, μοιράστηκε σε σωλήνες erpendorf (περίπου 200μl/σωλήνα) και κατόπιν καταψύχθηκε στους -20°C έως ότου τα δείγματα αναλυθούν για αντιδρώσες ουσίες με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), πρωτεϊνικά καρβονύλια και ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).

Για τη λήψη του αιμολύματος, 1 mL αίματος τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν EDTA ως αντιπηκτικό (EDTA vacutainer tubes) στους οποίους προστέθηκε από 1 mL TCA 5% και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση σε vortex (2500 rpm). Κατόπιν οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν στις 6000 rpm (4020g) στους 5°C για 20 min. Στη συνέχεια το υπερκείμενο μοιράστηκε σε σωλήνες erpendorf (200μl/σωλήνα), σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 60μl TCA 5% και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση. Έπειτα, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 16000 rpm (28620g) για 5 λεπτά στους 5°C και το υπερκείμενο συλλέχθηκε σε νέο σωλήνα erpendorf. Η προσθήκη 5% TCA και η μετέπειτα φυγοκέντρωση πραγματοποιήθηκαν 2 φορές, ώστε να πάρουμε όσο το δυνατόν πιο καθαρό υπερκείμενο. Τέλος, τα υπερκείμενα που προέκυψαν από τη δεύτερη φυγοκέντρωση συλλέχθηκαν σε νέα erpendorf και

καταψύχθηκαν στους -20°C έως ότου αναλυθούν για οξειδωμένη (GSSG) και ανηγμένη (GSH) γλουταθειόνη.

3.3. Αναλύσεις

Η συγκέντρωση της GSSG προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Reddy et al. (2004), ενώ η GSH σύμφωνα με τη μέθοδο του Tietze (1969). Η μέτρηση των TBARS έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο των Keles et al. (2001) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια σύμφωνα με τους Patsoukis et al. (2004). Η TAC του ορού προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Janaszewska & Bartosz (2002). Ο συντελεστής διακύμανσης της κάθε ανάλυσης ήταν για GSH 4.1%, GSSG 6.1%, TBARS 4.7%, πρωτεϊνικά καρβονύλια 5.4%, καταλάση 7.0% και TAC 3.4%. Η συνολική πρωτεΐνη του ορού μετρήθηκε με τη χρήση αντιδραστηρίου Bradford της εταιρείας Sigma. Κάθε ανάλυση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Οι μετρήσεις ολοκληρώθηκαν μέσα σε δύο εβδομάδες από τη συλλογή του αίματος.

3.4. Υλικά

Για τους φωτομετρικούς προσδιορισμούς χρησιμοποιήθηκε φωτόμετρο *Hitachi U-1500*. Τα υλικά TBA, DTNB, DPPH, NADPH, ρεδουκτάση της γλουταθειόνης και οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης προμηθεύτηκαν από την εταιρεία SIGMA, ενώ το DNPΗ από την εταιρία Aldrich. 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.

3.5. Στατιστική ανάλυση

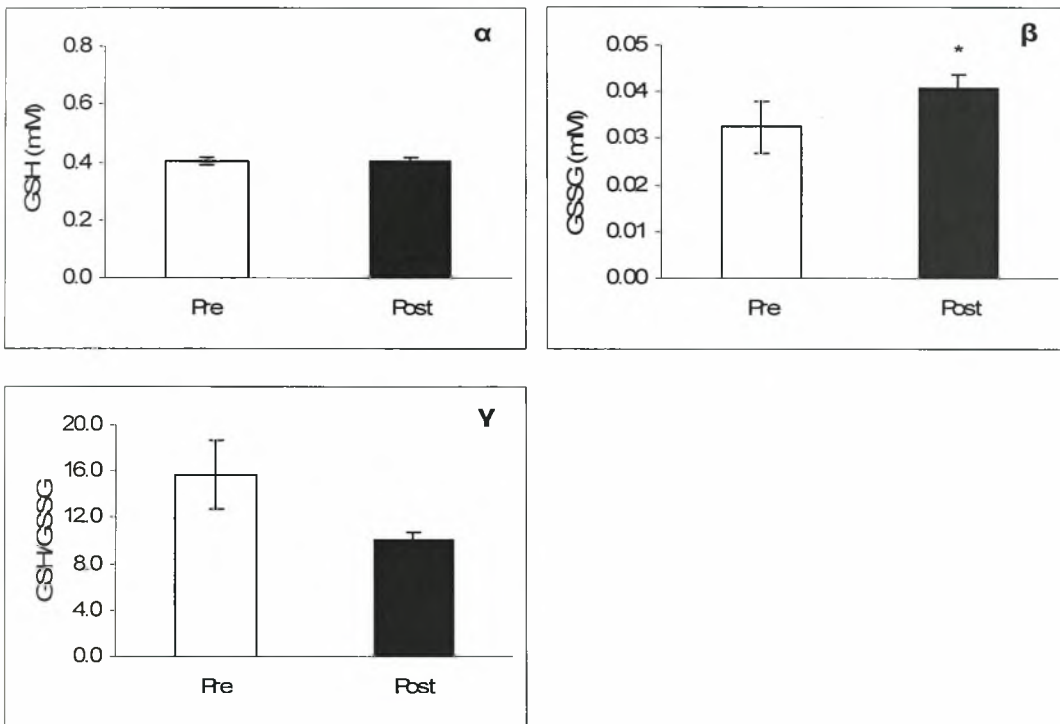
Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση του στατιστικού πακέτου για τις κοινωνικές επιστήμες (SPSS Inc, USA). Η κατανομή των εξαρτημένων μεταβλητών εξετάστηκε με το τεστ Shapiro-Wilk και δε βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά από την κανονική κατανομή. Για την εκτίμηση των διαφορών στους δείκτες οξειδωτικού στρες μεταξύ των μετρήσεων πριν και μετά τον αγώνα χρησιμοποιήθηκε το τεστ

paired Student's t test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας καθορίστηκε στο $\alpha = 0.05$.

4. Αποτελέσματα

4.1. Γλουταθειόνες

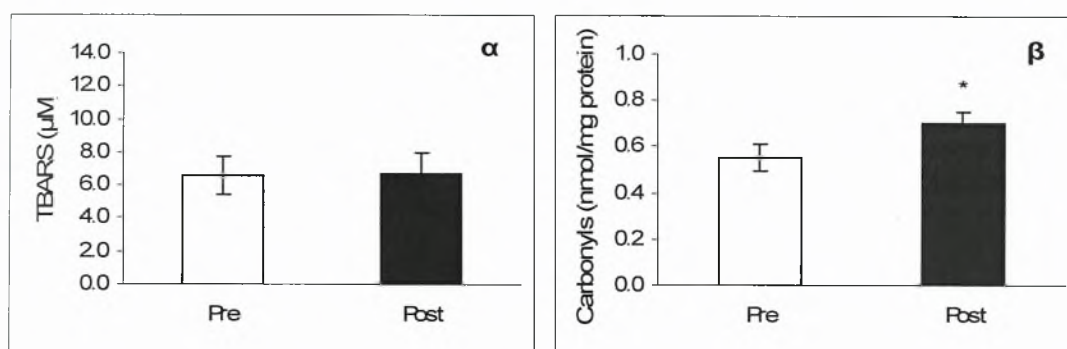
Από τη στατιστική ανάλυση δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά ($P > 0.05$) στα επίπεδα της GSH στο αίμα των ποδοσφαιριστών πριν και μετά το τέλος του αγώνα (Σχήμα 1α). Αντίθετα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ($P = 0.048$) της συγκέντρωσης της GSSG μετά το τέλος του αγώνα (Σχήμα 1β). Η αναλογία GSH/GSSG μειώθηκε μετά το τέλος του αγώνα, ωστόσο η μείωση ήταν οριακά ($P = 0.064$) μη σημαντική (Σχήμα 1γ).



Σχήμα 12. Συγκέντρωση της γλουταθειόνης στο αίμα πριν (λευκές στήλες) και μετά (σκούρες στήλες) το τέλος ποδοσφαιρικού αγώνα διάρκειας 90 λεπτών. Οι τιμές εκφράζουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα μέσου. $N = 8$ ποδοσφαιριστές. GSH = ανηγμένη γλουταθειόνη (α), GSSG = οξειδωμένη γλουταθειόνη (β), GSH/GSSG = λόγος ανηγμένης/οξειδωμένης (γ). *Σημαντικά διαφορετική σε σύγκριση με την τιμή πριν τον αγώνα ($P < 0.05$).

4.2. TBARS και πρωτεϊνικά καρβονύλια

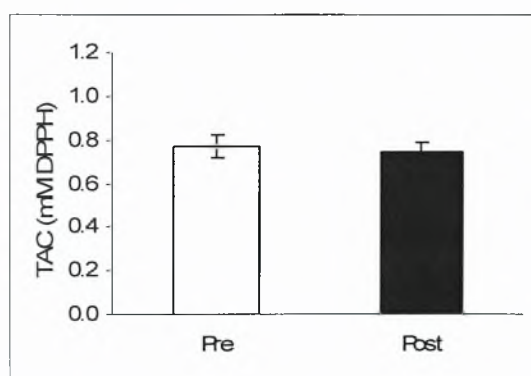
Όπως προέκυψε από τη στατιστική ανάλυση δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P > 0.05$) στη συγκέντρωση των TBARS των ποδοσφαιριστών πριν και μετά το τέλος του αγώνα (Σχήμα 2α). Αντίθετα, βρέθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ($P = 0.008$) της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά το τέλος του αγώνα (Σχήμα 2β).



Σχήμα 13. Συγκέντρωση των TBARS (α) και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (β) στο αίμα πριν (λευκές στήλες) και μετά (σκούρες στήλες) το τέλος ποδοσφαιρικού αγώνα διάρκειας 90 λεπτών. Οι τιμές εκφράζουν μέσο όρο ± τυπικό σφάλμα μέσου. N = 8 ποδοσφαιριστές. TBARS = αντιδρώσες ουσίες με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. *Σημαντικά διαφορετική σε σύγκριση με την τιμή πριν τον αγώνα ($P < 0.05$).

4.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ορού (Total Antioxidant Capacity - TAC)

Συγκρίνοντας την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού των ποδοσφαιριστών, πριν και μετά το τέλος του αγώνα (Σχήμα 3), δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά ($P > 0.05$).



Σχήμα 14. Ολικής αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αίματος πριν (λευκές στήλες) και μετά (σκούρες στήλες) το τέλος ποδοσφαιρικού αγώνα διάρκειας 90 λεπτών. Οι τιμές εκφράζουν μέσο όρο ± τυπικό σφάλμα μέσου. N = 8 ποδοσφαιριστές.

5. Συζήτηση

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η επαναλαμβανόμενη άσκηση μέτριας έντασης και διάρκειας έχει ως αποτέλεσμα την σταδιακή προσαρμογή του αντιοξειδωτικού συστήματος του οργανισμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών που παράγονται κατά την διάρκεια της άσκησης. Αντίθετα, η έντονη άσκηση μικρής διάρκειας (ειδικά σε απροπόνητα άτομα) οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, οι οποίες δεν εξουδετερώνονται πλήρως από το αντιοξειδωτικό σύστημα εξαιτίας της μειωμένης προσαρμογής του (Leewenburgh et al 2001).

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήσαμε την απόκριση επαγγελματιών ποδοσφαιριστών στο οξειδωτικό στρες πριν και μετά το τέλος ενός αγώνα. Το ποδόσφαιρο ως άθλημα περιλαμβάνει περιόδους, όπου οι αθλητές υπόκεινται σε υψηλής έντασης άσκηση που όμως διακόπτεται από περιόδους στις οποίες η άσκηση χαρακτηρίζεται ως χαμηλής έντασης (Svensson et al., 2004).

Στις μέχρι τώρα έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί και αφορούν τον τρόπο που το ποδόσφαιρο επάγει το οξειδωτικό στρες, οι επαγγελματίες ποδοσφαιριστές συγκρίνονται ως προς το αντιοξειδωτικό τους προφίλ με μη ασκούμενα άτομα (Brites et al, 1999; Cazzola et al, 2003; Banfi et al, 2005). Σε κάποιες μελέτες μάλιστα, η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ποδοσφαιριστών πραγματοποιήθηκε μετά τη χορηγήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής (Banfi et al, 2005). Αντίθετα, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήσαμε ως ομάδα ελέγχου τους ίδιους ποδοσφαιριστές πριν την έναρξη του αγώνα.

Στην παρούσα εργασία τα επίπεδα της GSH παρέμειναν σταθερά πριν και μετά το τέλος του αγώνα. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα της GSH εμφανίζονται αυξημένα σε νεαρούς ποδοσφαιριστές σε σχέση με μη ασκούμενα άτομα (Metin et al, 2003). Τα επίπεδα της GSH εμφανίζονται ελαφρώς αυξημένα στους ποδοσφαιριστές σε σύγκριση με τους παίκτες του μπάσκετ (Pincemail et al., 1999). Σε αντίθεση με τα επίπεδα της GSH, αυτά της GSSG βρέθηκαν αυξημένα στους ποδοσφαιριστές της εργασίας μας μετά το τέλος του αγώνα ενώ η αναλογία των δύο βρέθηκε μειωμένη.

Ο δείκτης υπεροξειδωσης λιπιδίων TBARS δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική μεταβολή πριν και μετά το τέλος του αγώνα. Αντίθετα, σύμφωνα με άλλες μελέτες τα επίπεδα της MDA εμφανίστηκαν μειωμένα στους ποδοσφαιριστές σε

σχέση με τα μη ασκούμενα άτομα (Metin et al., 2003). Επίσης τα επίπεδα της MDA παρουσιάστηκαν μειωμένα και σε αθλητές του rugby (Chang et al., 2002).

Ενδιαφέρον παρουσίασε επίσης η παρατήρηση των αυξημένων επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους ποδοσφαιριστές μετά το τέλος του αγώνα. Ο συγκεκριμένος δείκτης οξειδωσης των πρωτεϊνών δεν βρέθηκε να έχει χρησιμοποιηθεί σε εργασίες ποδοσφαίρου, οπότε δεν υπάρχει η δυνατότητα σύγκρισης των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας με τα αποτελέσματα άλλων εργασιών.

Στην παρούσα έρευνα, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά πριν και μετά το τέλος του αγώνα. Σύμφωνα με τον Brite (Brite et al, 1999) η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα των ποδοσφαιριστών βρέθηκε σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τα απροπόνητα άτομα. Αντίθετα, μελέτη που έγινε σε παίκτες του μπάσκετ πριν και μετά από το τέλος αγώνα έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας μετά το τέλος του αγώνα. (Tsakiris et al, 2006). Στην έρευνά μας θα περιμέναμε αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας μετά το τέλος του αγώνα, καθώς η άσκηση επάγει την παραγωγή των ελευθέρων ριζών. Το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα μετά το τέλος του αγώνα συγκριτικά με τις τιμές ηρεμίας ίσως να οφείλεται σε μια πιθανή προσαρμογή του αντιοξειδωτικού συστήματος των ποδοσφαιριστών λόγω της συνεχούς έκθεσής τους στο οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια της επαγγελματικής τους σταδιοδρομίας.

Από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας φαίνεται ότι μετά από αγώνα ποδοσφαίρου δεν παρατήθηκαν σημαντικές αλλαγές σε όλους τους δείκτες οξειδωτικού στρες με εξαίρεση την αύξηση στα επίπεδα της GSSG και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Από τα παραπάνω δεδομένα προκύπτει ότι το αντιοξειδωτικό σύστημα των ποδοσφαιριστών πιθανόν έχει υποστεί προσαρμογές λόγω της συνεχούς έκθεσης των αθλητών στο οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια της επαγγελματικής τους σταδιοδρομίας.

6. Παράρτημα

Πίνακας 1. Οι κυριότερες ελεύθερες ρίζες, ο χρόνος ημιζωής τους και οι κύριες επιδράσεις στα κυτταρικά συστατικά (Finaud et al., 2006).

Δραστικά είδη οξυγόνου(ROS)	Μοριακός τύπος	Χρόνος ημιζωής	Επιδράσεις σε κυτταρικά συστατικά
Ανιόν (ρίζα) του υπεροξειδίου	$O_2^{\cdot-}$	10^{-5} sec	Υπεροξειδωση λιπιδίων, οξείδωση πρωτεϊνών, καταστροφή DNA
Όζον	O_3	Σταθερός	
Singlet oxygen	1O_2	1 μsec	
Ρίζα υδροξυλίου	OH^{\cdot}	10^{-9} sec	
Υπεροξειδίο του υδρογόνου	H_2O_2	Σταθερός	
Υποχλωριώδες οξύ	$HOCl$	Σταθερός	
Ρίζα αλκοξυλίου	RO^{\cdot}	10^{-6} sec	
Ρίζα υπεροξυλίου	ROO^{\cdot}	7 sec	
Ρίζα υδροπεροξυλίου	$ROOH^{\cdot}$		
Ρίζα υδροπεροξυλίου	$ROOH^{\cdot}$		
Δραστικά είδη αζώτου (RNS)	Μοριακός τύπος	Χρόνος ημιζωής	Επιδράσεις σε κυτταρικά συστατικά
Μονοξειδίο του αζώτου	NO^{\cdot}		Υπεροξειδωση λιπιδίων, οξείδωση πρωτεϊνών, καταστροφή DNA
Διοξειδίο του αζώτου	NO_2^{\cdot}	1-10 sec	
Υπεροξυνιτρικό	$ONOO^{\cdot-}$	0.05^{-1} sec	

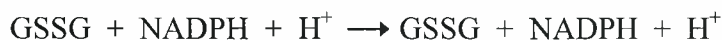
Μέθοδος μέτρησης

Ποσοτικός προσδιορισμός της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH) σε αιμόλυμα

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 σουλφυρυδλομάδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (Khyngium & Prasad 2003) και το οποίο απορροφά στα 412nm. Πιο συγκεκριμένα, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης απομακρύνει το H₂O₂ προς σχηματισμό H₂O με την οξείδωση της ανηγμένης GSH:



Στη συνέχεια η οξειδωμένη GSSG επανέρχεται στην ανηγμένη μορφή της χρησιμοποιώντας την αναγωγική ισχύ του NADPH και το ένζυμο ρεδοκτάση της γλουταθειόνης:



Η ελεύθερη ομάδα -SH μπορεί να αντιδράσει με το DTNB.

Σε 20μl από το αιμόλυμα προστέθηκαν 660 μl 67mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών νατρίου και καλίου pH 7,95 και 330μl διαλύματος DTNB (39,6mg DTNB σε 100ml 1% κιτρικού νατρίου). Κατόπιν ανάδευσης τα διαλύματα επώασθηκαν στο σκοτάδι για 15min και ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης στα 412nm. Στο τυφλό προστέθηκαν 20μl dH₂O αντί για αιμόλυμα. Η μέτρηση της απορρόφησης έγινε εις διπλούν για κάθε δείγμα. Η σύνδεση GSH- DTNB δίνει έγχρωμο προϊόν με συντελεστή απορρόφησης 13,6mM⁻¹cm⁻¹ (στοιχειομετρική αντίδραση). Στην περίπτωση μας ισχύει:

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

Ποσοτικός προσδιορισμός της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSSG) σε αιμόλυμα

Ο συγκεκριμένος προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Tietze et al. (2004) 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 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 προστέθηκε 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.

Ποσοτικός προσδιορισμός των αντιδρώντων ουσιών με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) στον ορό αίματος

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 αλδεΐδες. 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 (Thio Barbituric Acid-Reactive Substances) του Keles et al. (2001) που ανήκει στις φωτομετρικές τεχνικές.

Μέσα σε σωλήνες Falcon προστέθηκαν κατά σειρά 0,1ml ορού και 0,5ml 35% TCA. Κατόπιν ισχυρής ανάδευσης σε vortex προστέθηκαν 0,5ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris/HCl (50Mm, pH 7.4) και ακολούθησε ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10min. Έπειτα προστέθηκε 1,0ml διαλύματος 0,75% θειοβαρβιτουρικού οξέος σε 2M Na₂SO₄. Το διάλυμα θερμάνθηκε για 45min στους 95°C για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση που θα δώσει το έγχρωμο προϊόν. Στη συνέχεια οι σωλήνες Falcon τοποθετήθηκαν σε πάγο για να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου μετά από 5min. Ακολούθησε προσθήκη 1ml 70% TCA και ισχυρή ανάδευση σε vortex. Έπειτα από κάθε σωλήνα Falcon πάρθηκε 1ml διαλύματος, τοποθετήθηκε σε erpendorf και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10000rpm για 3 min. Τέλος έγινε προσδιορισμός της απορρόφησης του υπερκείμενου στα 530nm εις διπλούν για κάθε δείγμα. Στο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό προστέθηκαν 100μl dH₂O αντί για ορό. Οι συνολικές ενώσεις που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ προσδιορίστηκαν με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης για την MDA $1,56 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον ορό αίματος

Η μέθοδος των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αποτελεί έναν συνήθη δείκτη για την οξείδωση των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες. Οι ομάδες των καρβονυλίων (κυρίως αλδεΐδες και κετόνες) δημιουργούνται στις πρωτεϊνικές αλυσίδες όταν οι τελευταίες οξειδωθούν. Η παραπάνω μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση των ομάδων των καρβονυλίων με 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) που οδηγεί στο σχηματισμό του σταθερού 2,4-dinitrophenyl (DNP) hydrazone ως προϊόντος, το οποίο ανιχνεύεται με φασματοσκοπική μέθοδο. (Dalle Donne et al, 2002)

Για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αρχικά προστέθηκαν 50μl TCA 20% σε 50μl ορού και ακολούθησε επώαση στο πάγο για 15min και έπειτα φυγοκέντρηση στα 15000g για 5 λεπτά στους 4oC. Στην συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και στο ίζημα προστέθηκαν 0,5ml 10mM DNPH (σε 2.5N HCl), ενώ στο τυφλό προστέθηκαν 0,5ml 2.5N HCl. Ακολούθησε vortex και έπειτα επώαση των δειγμάτων για 1 ώρα στο σκοτάδι. Στο διάστημα της μίας ώρας γινόταν vortex κάθε 15min. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στα 15000g για 5 λεπτά στους 4oC. Απομακρύνθηκε για ακόμη μία φορά το υπερκείμενο και στο ίζημα προστέθηκε 1ml 10% TCA, ακολούθησε vortex, φυγοκέντρηση στα 15000g για 5 λεπτά στους 4oC και αφαίρεση του υπερκείμενου. Στη συνέχεια προστέθηκαν στο ίζημα 0,5ml ethanol και 0,5ml ethyl acetate (1:1 v/v), ακολούθησε vortex, φυγοκέντρηση στα 15000g για 5 λεπτά στους 4oC και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Τα τελευταία βήματα επαναλήφθηκαν δύο φορές.. μετά και την τελευταία απομάκρυνση του υπερκείμενου προστέθηκε στο ίζημα 1ml 5M urea (pH 2.3), ακολούθησε vortex και επώαση στους 37oC για 15min. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στις 15000g για 3min στους 4oC. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης στα 375nm. Οι μετρήσεις των δειγμάτων έγιναν εις διπλούν και για κάθε δείγμα υπάρχει και ξεχωριστό τυφλό.

$$\text{Protein carbonyls (nmol/ml)} = A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0,022 * 1000 / 50$$

Ποσοτικός προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) στον ορό αίματος

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). 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 μ l) αναμείχθηκε με 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (480 μ l) και 0,1 mM DPPH (500 μ l) και μετά από ανάδευση και 30 λεπτά επώαση ακολούθησε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13500rpm(20000g) και έπειτα τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 520nm. Η κυψελίδα του δείγματος ελέγχου (control) περιείχε μόνο 10 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7,4 (500 μ l) και 0,1 mM DPPH (500 μ l). Σαν θετικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκε διάλυμα που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 10mM pH=7,4 (495 μ l), 0,1 mM DPPH (500 μ l) και 10 mM ασκορβικό οξύ(5 μ l). Τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν η εκατοστιαία μείωση της απορρόφησης του αρνητικού μάρτυρα και όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

$$\% \text{ μείωση} = \frac{\text{Απορρόφηση δείγμα ελέγχου} - \text{Απορρόφηση δείγμα ορού}}{\text{Απορρόφηση δείγμα ελέγχου}} \cdot 100\%$$

7. Βιβλιογραφία

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας- Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του κυττάρου. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2000.

Alessio HM. Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise. Elsevier, NY 2000:115–128.

Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. Free Radic Biol Med 2002; 33:1260-7.

Banfi G, Malavazos A, Lorio E, Dolci A, Doneda L, Verna R, Corsi M.M. Plasma oxidative stress biomarkers, nitric oxide and heat shock protein 70 in trained elite soccer players. Eur J Appl Physiol 2005; 69:483-486.

Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. Physiol Rev 1998; 78:547-581.

Bloomer RJ, Goldfarb AH. Anaerobic exercise and oxidative stress. Can J Appl Physiol 2004; 29:245-263.

Boveris A, Cadenas E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. Inc 1997:1-25.

Boveris A, Costa LE, Cadenas E, Poderoso JJ. Regulation of mitochondrial respiration by adenosine diphosphate, oxygen and nitric oxide. Meth Enzymol 1999; 301:188-198.

Brites FD, Evelson PA, Christiansen MG, Nicol MF, Basilico MJ, Wikinski RW, Llesuy SF. Soccer players under regular training show oxidative stress but an improved plasma antioxidant status. Clinical Science 1999; 96:381-385.

Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G, Cestaro B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. Eur J Clin Invest 2003; 33:924-930.

Chang CK, Tseng HF, Hsuw YD, Chan WH, Shieh LC. Higher LDL oxidation at rest and after a rugby game in weekend warriors. Ann Nutr Metab 2002; 46:103-107.

Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative damage, causes G-T and A-C substitutions. J Biol Chem 1992; 267:166-172.

Cleeter MWJ, Cooper JM, Darley Mar VM, Moncandas, Schapira AHV. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. FEBS Lett 1994; 345:50-54.

Crossnan and Moldave, *Methods in enzymology*, Vol XII, 1967. Cutler R. Antioxidants, aging and longevity. In: Pryor W A (ed) *Free Radicals in Biology* 1994; 6:381-395.

Dalle Done I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 2003; 329: 23-38.

Deaton C, Marlin D. Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2003; 2:278-291.

Dekany M, Nemeskeri V, Gyore I, Harbula I, Malomsoki J, Pucsok J. Antioxidant status of interval-trained athletes in various sports. *Int J Sports Med* 2006; 27:112-116.

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* 1991;11:2804-2811.

Dillard CJ, Dumelin EE, Teppel AL. Effect of dietary vitamin E on expiration of pentane and ethane by the rat. *Lipide* 1977; 12:109-114.

Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada J.L, Covas M.I, Ordonez-Llanos J, Marrugat J. 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* 2003; 167:327-334.

Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of life sciences* Nature publishing group, 2001.

Halliwell B and Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and chemistry*. Oxford Science Publications 1998.

Hamilton ML, Guo CD, Fuller H, Van Remmen WF, Ward SN, Austad DA, Troyer I, Thompson ZM, Richardson A. 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.* 2001; 29:2117-2126.

Hellsten Y, Ahlborg G, Jensen-Urstad M, Sjodin B. Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise. *Acta Physiol Scand* 1988; 134:159-160.

Hellsten Y, Frandsen U, Orthenblad N, Sjodin B, and Richter E.A. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: A role of inflammation. *J Physiol* 1997; 498:239-248.

Hensley, K., and Floyd, R.A. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: A look back, a look ahead. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002; 397:377-383.

Howard DJ, Ota RB, Briggs LA, Hampton M, Pritsos CA. Environmental tobacco smoke in the workplace induces oxidative stress in employees, including increased

production of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7:141-146.

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* 1993; 84:720-725.

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

Ji LL, Stratman FW, Lardy HA. Enzymatic downregulation with exercise in rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 1988; 263:137-149.

Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 2001; 28:141-143.

Kingsley M, Wadsworth D, Kilduff L, Mceneny J, Benton D. Effects of phosphatidylserine on oxidative stress following intermittent running. *Med Sci Sports Exercise*. 2005:1300-1306.

Koppenol WH. The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Rad Biol Med* 1998; 25:385-391.

Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R. Aging and exercise training in skeletal muscle: Responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol* 1994; 269:439-445.

Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise *Current Medicinal Chemistry* 2001; 8:829-838.

Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N. Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959:396-411.

Liu M.L, Bergholm R, Makimattila S. A marathon run increase the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *Am J Physiol* 1999; 276:1083-1091.

Marlin DJ, Fenn K, Smith N. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *J Nutr* 2002; 132: 16228-16278.

Mena P, Mayner M, Gutierrez JM. Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professionals racers. Adaptation to training. *Int Sports Med* 1991; 12:563-566.

Metin G, Atukeren P, Alturfan AA, Gulyasar T, Kaya M, Gumustas MK. Lipid peroxidation, erythrocyte superoxide-dismutase activity and trace metals in young male footballers. *Yonsei Medical Journal* 2003; 44:979-986,

Møller P, Wallin H, Knudsen L. Oxidative stress associated with exercise, physiological stress and life-style factors. *Chemico-biological interactions* 1996; 102:295-310.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.

Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 1999; 13:295-309.

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* 1996; 104:1336–1338.

Nose K, Shibamura 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* 1991; 201:99–106.

Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett* 2004; 357:83-86.

Pincemail J, Lecomte J, Castiau J, Collard E, Vasankari T, Cheramy-Bien J, Limet R, Defraigne J. Evaluation of autoantibodies against oxidized LDL and antioxidant status in top soccer and basketball players after 4 months of competition. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:559-565.

Poulsen HE, Loft S, Vistisen K. Increased oxidative DNA damage after 30 days of vigorous exercise. *J Toxicol Environ Health* 1993; 40:459–462.

Powers SK, Sen CK. *Physiological antioxidants and exercise training*. Elsevier Science BV. 2000:221-295.

Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H. Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol* 1996; 72:189-194.

Radi R, Denicola A, Freeman BA. Peroxynitrite reactions with carbon dioxide-bicarbonate. *Meth Enzymol* 1999; 301: 353-367.

Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc* 2004; 51:213-218.

Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle. Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001;90:724-31.

Shackelford RE, Kaufmann W K, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical Biology & Medicine* 2000; 28:1387–1404.

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* 2001; 939:200-215.

Scandalio LM, Fernandez VM, Ruperez FL, Del Rio LA. Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiol* 1998;87:1-4.

Schieven GL , Mittler RS, Nadlerg 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* 1994; 269:20718–20726.

Schmid E, Hotz-Wagenblatta, Drogew. Inhibition of the insulin receptor kinase phosphorylation by nitric oxide: functional and structural aspects. *Antioxidants Redox Signal* 1999; 1:45–53.

Sen CK, Renkinen T, Vaisanen S. Oxidative stress after human exercise: Effect of N-acetylcysteine supplementation. *J Appl Physiol* 1994; 76:2570-2577.

Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996; 10:709-20.

Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33:368-370.

Siemieniuk E, Skrzydlewska E. Coenzyme Q10: its biosynthesis and biological significance in animal organisms and in humans. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2005; 59:150-9.

Standman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann NY Acad Sci* 2001; 928:22-38.

Suzuki J, Inoue Y, Suzuki S. Changes in urinary level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generating substances. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:431– 436.

Svensson M, Drust B. Testing soccer players. *Journal of Sports Sciences* 2005; 23:601-618.

Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Poteolysis, free radicas and aging. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:29-36.

Thompson DC, Williams C, Kingsley M. Muscle soreness and damage parameters after prolonged intermitten shuttle-running followinh acute vitamin C supplementation. *Int J Sports Med* 2001; 22:68-75.

Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969; 27:502-522.

Tsakiris S, Parthimos T, Parthimos N, Tsakiris T, Schulpis K.H. The beneficial effect of L-cysteine supplementation on DNA oxidation induced by forced training. *Pharmacological Research* 2006;5-9.

Urso M. L, Clarkson P.M. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology* 2003; 189: 41-54.

Vina, J, Borras, C, Gomez-Cabrera, MC, and Orr, WC. Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signalling and gene expression. Role of reactive oxygen species and (phyto)oestrogens in the modulation of adaptive response to stress. *Free Radical Biology & Medicine* 2006; 40:11-19.

Winston, GW, Cederbaum, AI. Oxyradical production by purified components of the liver microsomal mixed-function oxidase system I: Oxidation of hydroxyl radical scavenging agents. *J Biol Chem* 1983; 258:1508-1513.

www.3dchem.com/molecules.asp?ID=69

www.altonweb.com/cs/downsyndrome/index.htm?page=mitochondrial.html

www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.html