

ΧΡΟΝΟΕΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΟΞΕΙΑ ΑΕΡΟΒΙΑ ΑΣΚΗΣΗ

του
Μιχαηλίδη Ιωάννη

Μεταπτυχιακή Διατριβή που υποβάλλεται στο καθηγητικό σώμα για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων απόκτησης του μεταπτυχιακού τίτλου του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Άσκηση και Ποιότητα Ζωής» των Τμημάτων Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Δημοκρίτειου Παν/μίου Θράκης και του Παν/μίου Θεσσαλίας στην κατεύθυνση «Μεγιστοποίηση Αθλητικής Επίδοσης ή Απόδοσης».

Κομοτηνή
2007

Εγκεκριμένο από το Καθηγητικό σώμα:

1^{ος} Επιβλέπων: Τζιαμούρτας Αθανάσιος, Επικ. Καθηγητής

2^{ος} Επιβλέπων: Φατούρος Ιωάννης, Επικ. Καθηγητής

3^{ος} Επιβλέπων: Κουρέτας Δημήτριος, Επικ. Καθηγητής



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

Αρ.θ. Εισ.: 5389/1

Ημερ. Εισ.: 20-06-2007

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: Δ

612.044

MIX

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000086534

©2007

Μιχαηλίδη Ιωάννη

ALL RIGHTS RESERVED

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ιωάννης Μιχαηλίδης: Χρονοεξαρτώμενες μεταβολές δεικτών οξειδωτικού στρες μετά από οξεία αερόβια άσκηση.

(Υπό την επίβλεψη του Επίκ. Καθηγητή κ. Τζιαμούρτα Αθανάσιου)

Σκοπός: Ήταν να ερευνηθούν οι χρονοεξαρτώμενες μεταβολές δεικτών του οξειδωτικού στρες κάνοντας επαναλαμβανόμενες δειγματοληψίες στη διάρκεια του 24ώρου μετά από οξεία αερόβια άσκηση. Μέθοδος: Έντεκα απροπόνητοι άντρες συμμετείχαν σε δυο συνθήκες. Κατά τη συνθήκη άσκησης, οι εθελοντές έτρεξαν για 45 λεπτά σε διάδρομο στο 70-75% της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου ($VO_2 \max$) και στη συνέχεια αυξήθηκε η ένταση στο 90% της $VO_2 \max$ μέχρι να εξαντληθούν. Κατά τη συνθήκη ελέγχου οι εθελοντές αναπαύονταν. Δείγματα αίματος λήφθηκαν πριν, αμέσως μετά, και στις 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 και 24 ώρες μετά την άσκηση. Δείκτες που μετρήθηκαν: Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), GSH/GSSG, ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC), δραστικότητα καταλάσης και ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Αποτελέσματα: Η GSH και ο λόγος μειώθηκαν για 5-h μετά την άσκηση κορυφώνοντας στις 2-h (-63% και -73%, αντίστοιχα). Η GSSG αυξήθηκε από τις 0,5-h έως τις 4-h ώρες μετά την άσκηση και κορυφώσε στις 2-h (39%). Τα TBARS αυξήθηκαν για 3-h μετά την άσκηση κορυφώνοντας στη 1-h (123%). Τα PC αυξήθηκαν από τις 0,5-h μετά την άσκηση μέχρι τις 8-h, εμφανίζοντας τη μέγιστη συγκέντρωση τους στις 4-h (96%). Η δραστικότητα της καταλάσης αυξήθηκε αμέσως μετά την άσκηση (50%) και για 1-h. Η TAC αυξήθηκε για 3-h μετά την άσκηση κορυφώνοντας στις 2-h (21%). Συμπέρασμα: Το ευνοϊκότερο χρονικό σημείο μετά την άσκηση για δειγματοληψία σε απροπόνητα άτομα είναι: αμέσως μετά την άσκηση για την καταλάση, 1-h για τα TBARS, 2-h για τις TAC, GSH και GSSG καθώς και 4-h μετά για τα PC.

Λέξεις - Κλειδιά: άσκηση, ελεύθερες ρίζες, δραστικά είδη οξυγόνου, αιμοληψίες.

ABSTRACT

Yiannis Michailidis: Time course changes of oxidative stress markers after acute aerobic exercise.

(Under the supervision of Assistant Professor Jamurtas Athanasios)

Purpose: To thoroughly investigate the time course changes of several commonly used markers of oxidative stress by performing serial measurements during a 24-hour period following an acute bout of strenuous cardiovascular exercise. **Methods:** Eleven untrained men performed two trials. In the experimental trial the subjects exercised for 45 min at 70-75% of VO_2 max followed by 90% of VO_2 max to exhaustion on a treadmill while in the control trial they remained at rest. Blood samples were drawn before, immediately post as well as 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 and 24-h post-exercise. Reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), GSH/GSSG, thiobarbituric-acid reactive substances (TBARS), protein carbonyls (PC), catalase activity and total antioxidant capacity (TAC) were determined. **Results:** GSH as GSH/GSSG declined until 5-h post-exercise and peaked at 2-h post-exercise (-63% and -73%, respectively). GSSG increased 0,5-h post-exercise (23%), peaked 2-h post-exercise (39%), remained elevated for 4-h (16%). TBARS increased immediately post-exercise (46%), peaked 1-h post-exercise (123%), and remained elevated for 3-h (31%). PC increased 0,5-h (32%) post-exercise, remained elevated for 8-h (31%), and declined thereafter, peaking 4-h post-exercise (96%). Catalase activity peaked immediately post-exercise (50%) and remained elevated for 1-h post-exercise (20%). TAC increased immediately post-exercise (6%), remained elevated for 3-h (11%) and peaked 2-h post-exercise (21%). **Conclusion:** The optimum post-exercise time-points for blood collection in untrained individuals are: immediately post-exercise for catalase, 1-h for TBARS, 2-h for TAC, GSH and GSSG as well as 4-h post-exercise for PC.

Key - Words: oxidative stress, free radicals, reactive oxygen species, blood sample.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το οξειδωτικό στρες που εμφανίζεται στον οργανισμό είτε από την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε από τα μειωμένα επίπεδα των αντιοξειδωτικών αποτελεί αιτία εμφάνισης πολλών ασθενειών καθώς και της γήρανσης. Το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε στις πολυδιάστατες επιρροές του, δημιουργώντας σύντομα μια ογκώδη βιβλιογραφία. Ωστόσο η έλλειψη μελετών που να αναφέρονται στη χρονική κορύφωση των δεικτών του οξειδωτικού στρες με οδήγησε στην παρούσα μελέτη.

Ευχαριστώ τον κ. Τζιαμούρτα Αθανάσιο, Επίκουρο Καθηγητή του Τ.Ε.Φ.Α.Α. του Π.Θ., για την επιστημονική υποστήριξη που μου παρείχε κατά τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της παρούσας διατριβής.

Ευχαριστώ το μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Φατούρο Ιωάννη, Επίκουρο Καθηγητή του Τ.Ε.Φ.Α.Α. του Δ.Π.Θ., για τις εύστοχες παρατηρήσεις του και τους γόνιμους προβληματισμούς του στην διάρκεια εκπόνησης της διατριβής.

Ευχαριστώ το μέλος της τριμελούς επιτροπής κ. Κουρέτα Δημήτριο, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας του Π.Θ., για το ενδιαφέρον και την συμβολή του στην εκπόνηση και συγγραφή της εργασίας.

Προσωπικά θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Νικολαΐδη Μιχάλη, Ερευνητή Δ του Ινστιτούτου Σωματικής Απόδοσης και Αποκατάστασης του Κέντρου Έρευνας Τεχνολογίας και Ανάπτυξης Θεσσαλίας για ό,τι τόσο πρόθυμα μου έχει προσφέρει σε γνώσεις καθώς και για την προσωπική εργασία που κατέβαλλε για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Οφείλω να ευχαριστήσω τους 12 εθελοντές που πήραν μέρος στο πείραμα και ιδιαίτερα το στενό φίλο κ. Θεοδωράκη Σεραφείμ.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Ελένη καθώς εκτός από τη συμπαράσταση που μου προσέφερε ήταν αυτή που με ενθάρρυνε να αρχίσω αυτό το μεταπτυχιακό. Τέλος ένα ευχαριστώ στην οικογένειά μου για την ηθική και υλική συμπαράσταση που μου προσέφερε στη διάρκεια αυτής της μελέτης.

Απρίλιος, 2007

Μιχαηλίδης Ιωάννης

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ABSTRACT	iv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	x
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
Μηδενικές Υποθέσεις.....	5
Λειτουργικοί Ορισμοί	5
Οριοθετήσεις της Έρευνας.....	7
Περιορισμοί της Έρευνας	7
II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	8
Εμφάνιση του Οξυγόνου στη Γη	8
Ελεύθερες Ρίζες	9
Αντιοξειδωτικός Μηχανισμός	11
Οξειδωτικό Στρες και Άσκηση.....	14
III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	29
Δείγμα	29
Διαδικασία.....	29

Σωματομετρία.....	30
Μέτρηση Μέγιστης Πρόσληψης Οξυγόνου (VO ₂ max)	30
Άσκηση Υπομέγιστης Έντασης	30
Διαίτολόγιο	31
Αιμοληψία	31
Διαδικασίες Μέτρησης Δεικτών Οξειδωτικού Στρες.....	32
Στατιστική Ανάλυση	35
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	52
Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα.....	52
VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Ταξινόμηση ελευθέρων ριζών.....	9
Πίνακας 2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	14
Πίνακας 3. Ευρήματα και χαρακτηριστικά ερευνών που αναφέρονται στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. Συμβολισμός: ~ Μη αξιολογες μεταβολές, +++ Σημαντική αύξηση, ++ Αύξηση, + Μικρή αύξηση, = Καμία μεταβολή, Μικρή μείωση, - - Μείωση, - - - Σημαντική μείωση, Α: Άνδρας, Γ: Γυναίκα, Π: Ποντίκι, ΑΑ: Αρσενικό Άλογο, ΘΑ: Θηλυκό Άλογο.....	23
Πίνακας 4. Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά (Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση).....	29
Πίνακας 5. Ημερήσια ανάλυση ενεργειακής πρόσληψης των συμμετεχόντων σε συνθήκες ελέγχου και άσκησης (Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση).....	37

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1. Αύξηση του οξυγόνου στη γήινη ατμόσφαιρα. Προσαρμογή στα ελληνικά από το Κέντρο Περιβαλλοντικής Εκπαίδευσης Καστοριάς.....8
- Σχήμα 2. Μεταβολή της συγκέντρωσης των ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) 24 ώρες μετά την άσκηση.
* Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας.
Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.....38
- Σχήμα 3. Μεταβολή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) 24 ώρες μετά την άσκηση. * Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας. # Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.....39
- Σχήμα 4. Μεταβολή της συγκέντρωσης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) 24 ώρες μετά την άσκηση. * Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας. # Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.....40
- Σχήμα 5. Μεταβολή της δραστηριότητας της καταλάσης (CAT) 24 ώρες μετά την άσκηση. * Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας. # Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.....41
- Σχήμα 6. Μεταβολή της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) 24 ώρες μετά την άσκηση. * Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας. # Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.....42
- Σχήμα 7. Μεταβολή της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) 24 ώρες μετά την άσκηση. * Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας. # Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.....43
- Σχήμα 8. Μεταβολή των τιμών του λόγου ανηγμένης προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH/GSSG) 24 ώρες μετά την άσκηση. * Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας. # Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.....44

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

CAT	[Κατάλαση]
DNPB	[2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη]
DPPH	[2,2-διφαινόλο-1 πικρυλδραζίλιο]
DTNB	[5,5-διθειο-δισ-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ)]
EDTA	[Αιθυλενοδινιτριλοτετραοξικό οξύ]
GSH	[Ανηγμένη γλουταθειόνη]
GSH/GSSG	[Λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένη γλουταθειόνη]
GSSG	[Οξειδωμένη γλουταθειόνη]
MDA	[Μαλονδιαλδεύδη]
PC	[Πρωτεϊνικά καρβονύλια]
TAC	[Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα οξύ]
TBARS	[Ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό]
TCA	[Τριχλωροακετικό οξύ]
VO ₂ max	[Μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου]



ΧΡΟΝΟΞΑΡΤΩΜΕΝΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΟΞΕΙΑ ΑΕΡΟΒΙΑ ΑΣΚΗΣΗ

Είναι γνωστό από τη φυσική ότι το άτομο κάθε στοιχείου αποτελείται από τον πυρήνα και τα αρνητικά φορτισμένα ηλεκτρόνια που περιστρέφονται σε συγκεκριμένες τροχιές γύρω από αυτόν. Ο πυρήνας δομείται από τα πρωτόνια που έχουν θετικό φορτίο και τα νετρόνια που είναι ηλεκτρικά ουδέτερα. Η ένωση διαφόρων ειδών ατόμων δημιουργεί τα μόρια. Όταν στην εξωτερική στιβάδα κάποιου ατόμου ενός μορίου υπάρχει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, τότε το μόριο αυτό χαρακτηρίζεται ως ελεύθερη ρίζα. Η ύπαρξη του μονήρους ηλεκτρονίου καθιστά τις ρίζες πολύ δραστικές χημικά, καθώς αναζητούν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια ώστε να αποκτήσουν δομή ευγενούς αερίου και να σταθεροποιηθούν (Prior, Cao, 1999; Sen, 2001). Τα δραστικά είδη οξυγόνου ανήκουν στις ελεύθερες ρίζες και όπως φαίνεται και από το όνομά τους παράγονται από το οξυγόνο (Finaud, Lac, Filaire, 2006).

Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται στον οργανισμό με ποικίλους τρόπους. Κατ' αρχήν παράγονται κατά τον μεταβολισμό του οξυγόνου ο οποίος λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια (Di Meo, Venditti, 2001). Ένας δεύτερος μηχανισμός με τον οποίο παράγονται είναι η μεταβολή της αιματικής ροής των μυών (ισχαιμία-επαναιμάτωση), η οποία εμφανίζεται έπειτα από εγχειρήσεις, σοκ ή κατά τη διάρκεια φυσικής δραστηριότητας (Fehrenbach, Northoff, 2001; Frederiks, Bosch, 1995; Thompson-Gorman, Zweier, 1990). Ακόμη ένα σημαντικό ποσό ελευθέρων ριζών παράγεται από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα λευκά αιμοσφαίρια κατά την καταστροφή βλαβερών "ουσιών" στον οργανισμό (Fehrenbach et al. 2001; Hampton, Kettle & Winterbourn, 1998). Επίσης, η οξειδωση της αιμοσφαιρίνης και της μυοσφαιρίνης μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό δραστικών ειδών οξυγόνου (Ames, Catchcart, Schwiers, Hochstein, 1981; Thomas, 2000). Τέλος κάποιες άλλες καταστάσεις που μπορούν να προκαλέσουν τη δημιουργία ριζών (μετασχηματισμός του $O_2^{\bullet-}$ σε OH^{\bullet}), είναι η αυξημένη κεντρική θερμοκρασία του σώματος, οι κατεχολαμίνες και το γαλακτικό οξύ (Clarkson, Thompson, 2000; Cooper, Vollaard, Choueiri, Wilson, 2002).

Κατά την άσκηση ο σχηματισμός των ριζών πραγματοποιείται μέσω των ίδιων μηχανισμών που γίνεται και κατά την ηρεμία, όμως κάποιιοι από αυτούς κυριαρχούν. Έτσι η αποβολή των ηλεκτρονίων κατά την λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας, η μεταβολή της αιματικής ροής των μυών (Cooper et al. 2002) και η δράση των λευκών αιμοσφαιρίων στις φλεγμονές που προκαλούνται κατά την άσκηση ενοχοποιούνται για τη μαζική παραγωγή των ριζών. Όπως είναι γνωστό η άσκηση αναγκάζει τον οργανισμό να αυξήσει τις ποσότητες του οξυγόνου που φτάνουν στους εργαζόμενους μύες περίπου 100 φορές σε σχέση με τα επίπεδα ηρεμίας. Το οξυγόνο αυτό συμμετέχει στην αερόβια παραγωγή ενέργειας μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια. Ένα ποσοστό του οξυγόνου αυτού (1-3 %) διαφεύγει και σχηματίζει δραστικά είδη οξυγόνου (Boveris, Chance, 1973). Κατά το δεύτερο μηχανισμό σε ορισμένους ιστούς στη διάρκεια έντονης άσκησης υπάρχει μειωμένη παροχή αίματος (under perfusion), ενώ κατά την αποκατάσταση επανέρχεται η ροή του αίματος στον ιστό (reperfusion). Η αυξημένη οξυγόνωση του ιστού που ακολουθεί, έχει ως επακόλουθο την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Radak, 2000). Τέλος κατά την άσκηση προκαλούνται στον οργανισμό ορισμένες φλεγμονές οι οποίες καταπολεμούνται από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα λευκά αιμοσφαίρια. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας παράγονται ελεύθερες ρίζες (Fehrenbach et al. 2001).

Οι ανώτεροι οργανισμοί ωστόσο, για την αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών, έχουν αναπτύξει τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό. Το σύστημα αυτό άμυνας αποτελείται από δυο τμήματα το ενζυμικό και το μη ενζυμικό. Στο πρώτο ανήκουν αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Τα ένζυμα αυτά παράγονται ενδογενώς και μπορούν να επηρεαστούν από διάφορους παράγοντες όπως για παράδειγμα η συστηματική άσκηση (Leeuwenburgh, Hansen, Holloszy, Heinecke, 1999; Ji, 1995; Powers, Lennon, 1999). Το δεύτερο τμήμα περιλαμβάνει ουσίες όπως οι βιταμίνες E, C, η βιταμίνη A ή το β-καροτένιο, τα φλαβονοειδή, οι θειόλες, το συνένζυμο Q10, το ουρικό οξύ, οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ, η φεριτίνη, η αλβουμίνη, η χολερυθρίνη και η σερουλοπλασμίνη (Finaud et al. 2006). Από τις ουσίες αυτές κάποιες παράγονται από τον οργανισμό, ενώ κάποιες άλλες λαμβάνονται μέσω της τροφής και επηρεάζονται από αυτήν.

Η κατάσταση κατά την οποία διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της εξουδετέρωσής τους από τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό ονομάζεται οξειδωτικό στρες (Leeuwenburgh et al. 1999; Nikolaidis et al. 2006; Servais et al. 2003). Αυτό είναι δυνατόν να συμβεί είτε λόγω αυξημένου σχηματισμού ριζών (π.χ.

μετά από έντονη άσκηση (Finaud et al. 2006) και/είτε μειωμένων επιπέδων αντιοξειδωτικών (Nikolaidis et al. 2006). Έτσι οι ελεύθερες ρίζες που δεν αδρανοποιούνται προσβάλλουν μόρια λιπιδίων, πρωτεϊνών, ενζύμων και νουκλεϊκών οξέων αλλοιώνοντας τη χημική δομή τους και κατ' επέκταση τις φυσικές τους ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα, τα λιπίδια σχηματίζουν υπεροξειδία, οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται, τα ένζυμα αδρανοποιούνται και τα νουκλεϊκά οξέα διαφοροποιούνται προκαλώντας διάφορες ασθένειες (αθηροσκλήρωση, καρκίνο), δηλητηριάσεις και γήρανση (Barja, 2004; Kaur, Halliwell, 1994; Radak, 2000).

Είναι γνωστό ότι η αερόβια άσκηση έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ριζών οξυγόνου σε διάφορους ιστούς του οργανισμού όπως είναι οι σκελετικοί μύες, το ήπαρ και η καρδιά (Davies, Quintanilha, Brooks, Packer, 1982; Jackson, Edwards, Symons, 1985; Kumar, Reddy, Prasad, Thyagaraju, Reddanna, 1992).

Για την επίδραση της οξείας αερόβιας άσκησης στους δείκτες του οξειδωτικού στρες υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία (Finaud et al. 2006). Ωστόσο οι περισσότερες μελέτες χρησιμοποιούν μερικούς από τους δείκτες του οξειδωτικού στρες (Ilhan, Kamanli, Ozmerdivenli, Ilhan, 2004; Jammes, Steinberg, Bregeon, Delliaux, 2004), ενώ δεν υπάρχουν μελέτες που να ασχολούνται με τη μεταβολή των δεικτών του οξειδωτικού στρες στη διάρκεια των 24 ωρών της αποκατάστασης μετά από αερόβια άσκηση. Στόχος της παρούσας έρευνας ήταν να καλύψει αυτό το κενό λαμβάνοντας έντεκα δείγματα αίματος μετά την άσκηση και χρησιμοποιώντας παράλληλα επτά δείκτες του οξειδωτικού στρες.

Ξεκινώντας με μελέτες που μέτρησαν την υπεροξειδωση των λιπιδίων αναφέρουμε αρχικά αυτή των Sumida, Tanaka, Kitao, Nakadomo, (1989), όπου διαπιστώθηκε αύξηση της μαλονδιαλδεϋδης (MDA) αμέσως μετά την άσκηση, ενώ μία ώρα αργότερα οι συγκεντρώσεις της στο πλάσμα είχαν επιστρέψει στα πριν την άσκηση επίπεδα. Επίσης αύξηση στη συγκέντρωση των ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) βρέθηκε για τεσσεράμισι (Borsheim, Knardahl, Hostmark, 1999) και 24 ώρες (Senturk et al. 2005) μετά την προσπάθεια. Αντίθετα, οι Schneider et al. (2003) βρήκαν ελαφρώς μειωμένη τη συγκέντρωση των TBARS αμέσως μετά την άσκηση μέχρι και 48 ώρες αργότερα.

Οι Duthie, Robertson, Maughan, Morrice, (1990) αναφέρουν σημαντική μείωση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) για τις πρώτες 24 ώρες μετά την άσκηση, ενώ στη συνέχεια (48 και 72 ώρες μετά) ήταν ελαφρώς μειωμένα και στις 120 ώρες ελαφρώς αυξημένα. Η GSSG ήταν αυξημένη στις 24 ώρες αλλά στη συνέχεια

μειώθηκε και διατηρήθηκε λίγο πάνω από τα επίπεδα ηρεμίας. Σε μελέτη των Weiss et al. (2002) βρέθηκε πτώση των επιπέδων της GSH στο πλάσμα για τις πρώτες έξι ώρες μετά την προσπάθεια, ενώ στις 24 ώρες παρέμειναν ελαφρώς μειωμένα. Η GSSG παρουσίασε αύξηση στα δείγματα αμέσως μετά, στις τρεις και έξι ώρες και μείωση στο δείγμα των 24 ωρών. Επίσης μείωση στα επίπεδα της GSH μετά την άσκηση βρήκαν και οι Ihan et al. (2004) για τις πρώτες τέσσερις ώρες, όμως για τα δείγματα των 24 και 48 ωρών αναφέρουν αύξηση. Όσο αφορά τον λόγο ανηγμένης προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH/GSSG) οι Watson et al. (2005) βρήκαν μείωση που διατηρείται μέχρι και μία ώρα μετά την άσκηση σε αντίθεση με τους Bloomer, Goldfarb, Wideman, McKenzie, Consitt, (2005) όπου ο λόγος επανήλθε στις τιμές πριν την άσκηση μία ώρα μετά.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) βρέθηκε αυξημένη για μισή (Vider et al. 2001) και μία ώρα (Alessio et al. 2000) μετά την άσκηση. Σε αντίθεση με αυτούς οι Watson et al. (2005) παρατήρησαν μείωση αμέσως μετά την άσκηση και αύξηση στη μία ώρα μετά.

Για την επίδραση του οξειδωτικού στρες στις πρωτεΐνες συνήθως αξιολογείται η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) στο αίμα. Οι Alessio et al. (2000) αναφέρουν αύξηση αμέσως μετά την άσκηση των επιπέδων των PC, η οποία μειώνεται αλλά διατηρείται αυξημένη μία ώρα αργότερα. Σε μια άλλη μελέτη που έγινε σε ποντίκια οι Sumida, Nakamura, Yodoi, (2004) παρατήρησαν αύξηση της συγκέντρωσης των PC που κορυφώθηκε στις 12 ώρες μετά την δοκιμασία και προσέγγισε τα επίπεδα ηρεμίας στις 24 ώρες. Τέλος οι Bloomer et al. (2005) βρήκαν αύξηση αμέσως μετά την άσκηση η οποία στη συνέχεια περιορίστηκε χωρίς όμως να εξαλειφθεί στις 24 ώρες.

Όσον αφορά το ένζυμο της καταλάσης (CAT) οι Duthie et al. (1990) αναφέρουν αρχικά μείωση αμέσως μετά την άσκηση (5 min), στη συνέχεια μικρή αύξηση της δραστηριότητας στα δείγματα των 24, 48 και 72 ωρών και τέλος ελαφριά μείωση στο δείγμα των 120 ωρών. Οι Vider et al. (2001) βρήκαν αύξηση αμέσως μετά την προσπάθεια και μικρή πτώση μισή ώρα μετά, ενώ παρόμοια ευρήματα αναφέρθηκαν και από τους Tauler et al. (2003), δηλαδή αύξηση μετά την άσκηση και πτώση 1 ώρα αργότερα.

Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι παρόλο που υπάρχει πλέον η γνώση ότι αυξάνεται το οξειδωτικό στρες αμέσως μετά την άσκηση δεν είναι γνωστή η μεταβολή του για τις επόμενες 24 ώρες της ανάληψης. Οι μελέτες που υπάρχουν σήμερα σχετικά με το θέμα αυτό είτε πραγματοποίησαν αρκετές δειγματοληψίες για λίγες ώρες μετά την προσπάθεια (Hellsten et al. 2001; Jammes et al. 2004), είτε έχουν λάβει λίγα δείγματα για πολύ μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (Duthie et al. 1990; Khassaf et al. 2001). Έτσι, δεν

γνωρίζουμε πότε κορυφώνονται τα επίπεδα των δεικτών αυτών στο αίμα κάτι που μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα συμπεράσματα. Η σημασία της παρούσας μελέτης έγκειται στο γεγονός ότι καλύπτει όσο το δυνατόν πληρέστερα το πρώτο 24ωρο μετά την προσπάθεια λαμβάνοντας συνολικά (μαζί με το δείγμα πριν την άσκηση) δώδεκα δείγματα και μετρώντας σε αυτά, επτά δείκτες (ανηγμένη γλουταθειόνη, οξειδωμένη γλουταθειόνη, λόγο ανηγμένης προς οξειδωμένη γλουταθειόνη, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, ουσίες που αντιδρούν μεθειοβαρβιτουρικό οξύ, καταλάση και πρωτεϊνικά καρβονύλια) του οξειδωτικού στρες.

Πιο συγκεκριμένα ο σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν να βοηθήσει στην κατανόηση του χρονικού πλαισίου κορύφωσης των επιπέδων των παραπάνω δεικτών στο αίμα μετά την άσκηση.

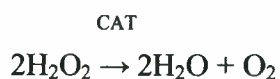
Μηδενικές Υποθέσεις

- Δεν θα υπάρχει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μεταξύ των δειγμάτων της συνθήκης ελέγχου.
- Δεν θα υπάρχει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.
- Δεν θα υπάρχει μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού διαχρονικά στα δείγματα της συνθήκης άσκησης.

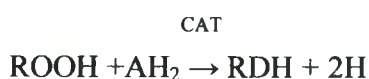
Λειτουργικοί Ορισμοί

- Ελεύθερη ρίζα: Όταν σε ένα άτομο ή σε κάποιο ή κάποια από τα άτομα που αποτελούν ένα μόριο υπάρχει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στιβάδα του, τότε το μόριο ή το άτομο χαρακτηρίζεται ως ελεύθερη ρίζα.
- Αντιοξειδωτικός μηχανισμός: Ένα σύνολο μηχανισμών του οργανισμού για την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών.
- Οξειδωτικό στρες: Κατάσταση του οργανισμού κατά την οποία οι μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών υπερτερούν έναντι του αντιοξειδωτικού μηχανισμού και εμφανίζονται αλλοιώσεις σε διάφορα μόρια που προσβάλλονται από τις ρίζες. Τέτοια μόρια είναι τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, τα ένζυμα και τα νουκλεϊκά οξέα.

- Ουσίες που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS): Αλδεϋδες που ανιχνεύονται στο αίμα και σχηματίζονται από την υπεροξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Αποτελούν δείκτη της υπεροξείδωσης των λιπιδίων.
- Μαλονδιαλδεϋδη (MDA): Αποτελεί μια μορφή των TBARS και είναι δείκτης της υπεροξείδωσης των λιπιδίων.
- Πρωτεϊνικά καρβονύλια (PC): Ενώσεις που σχηματίζονται από την υπεροξείδωση των λιπιδίων (δραστικές αλδεϋδες), από την οξείδωση σακχάρων ή την οξείδωση των προϊόντων τους με υπολείμματα λυσίνης. Μια άλλη πηγή είναι η οξείδωση μορίων που στην πλαϊνή αλυσίδα τους έχουν αμινομάδα. Αποτελούν δείκτη της οξείδωσης των πρωτεϊνών.
- Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH): Ένα τριπεπτιδίο το οποίο βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε όλα τα ζώα και τα φυτά. Η πιο σημαντική αντιοξειδωτική λειτουργία της είναι η ουδετεροποίηση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂).
- Οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG): Η οξειδωμένη μορφή της ανηγμένης γλουταθειόνης που σχηματίζεται παίρνοντας ένα ζεύγος υδρογονοϊόντων από την τελευταία κατά την αντίδραση αναγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂).
- Λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH/GSSG): Είναι ένα κλινικό εργαλείο για τη μελέτη του οξειδωτικού στρες.
- Καταλάση (CAT): Αντιοξειδωτικό ένζυμο που καταλύει αντιδράσεις της παρακάτω μορφής:



Αντίδραση 1.



Αντίδραση 2.

- Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC): Βιοχημικός δείκτης αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού.
- Λιπιδική υπεροξείδωση: Η φθορά των ακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από τις ελεύθερες ρίζες.
- Αερόβια άσκηση: Η άσκηση που πραγματοποιείται από μεγάλες μυϊκές ομάδες και επιβαρύνει το σύστημα μεταφοράς και κατανάλωσης οξυγόνου.
- Ένταση άσκησης: Ο βαθμός της προσπάθειας που καταβάλλεται για να εκτελεστεί μια άσκηση. Καθορίζεται από τους χρόνους, τις ταχύτητες, τα βάρη ή τις φυσιολογικές παραμέτρους (π.χ. συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, καρδιακή συχνότητα).

- Διάρκεια άσκησης: Η χρονική διάρκεια ενός μοναδικού ερεθίσματος ή μιας σειράς ασκήσεων. Καθορίζεται από το χρόνο (δευτερόλεπτα, λεπτά, ώρες) ή από τον αριθμό των επαναλήψεων.

Οριοθετήσεις της Έρευνας

Παρακάτω αναφέρονται οι οριοθετήσεις της παρούσας έρευνας σε σχέση με την επιλογή του δείγματος και τον πειραματικό σχεδιασμό:

- Οριοθέτηση ως προς το προπονητικό επίπεδο του δείγματος: Οι εθελοντές ήταν απροπόνητα άτομα (δεν ασκούσαν συστηματικά).
- Οριοθέτηση ως προς τη χρονολογική ηλικία του δείγματος: Συμμετείχαν νεαρά άτομα ηλικίας 18-30 ετών.
- Οριοθέτηση ως προς το φύλο του δείγματος: Συμμετείχαν μόνο άντρες.
- Οριοθέτηση ως προς το είδος της άσκησης: Πραγματοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο αερόβιας άσκησης.
- Οριοθέτηση ως προς τους δείκτες του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού που μετρήθηκαν: Μετρήθηκαν: α) Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, β) πρωτεϊνικά καρβονύλια, γ) ανηγμένη γλουταθειόνη, δ) οξειδωμένη γλουταθειόνη, ε) καταλάση, στ) ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και υπολογίστηκε ζ) ο λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένη γλουταθειόνη.

Περιορισμοί της Έρευνας

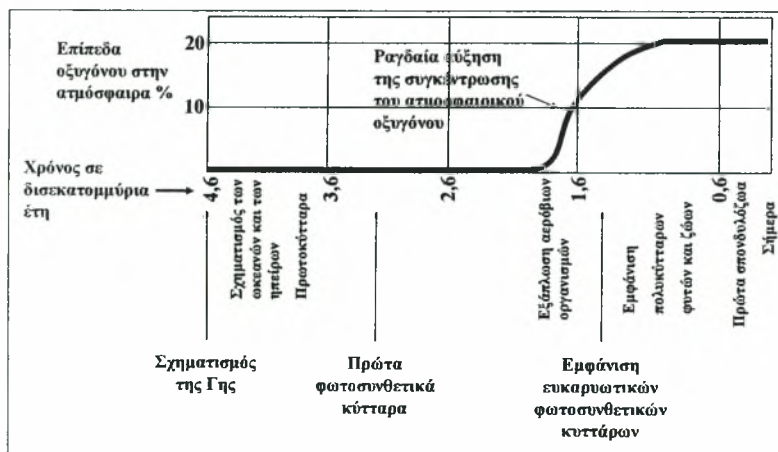
- Η μελέτη στηρίχθηκε στην ειλικρίνεια των συμμετεχόντων όσο αφορά την διατροφή τους και την αποχή τους από την άσκηση, την καφεΐνη και το αλκοόλ.
- Οι συμμετέχοντες ήταν εθελοντές.

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Εμφάνιση του Οξυγόνου στη Γη

Η αρχική σύσταση της γήινης ατμόσφαιρας δεν είναι γνωστή με ακρίβεια, ωστόσο οι χημικοί συμφωνούν ότι το αέριο οξυγόνο πρέπει να ήταν ελάχιστο καθώς είναι πολύ δραστικό στοιχείο και θα είχε αντιδράσει με άλλα στοιχεία. Λόγω της έλλειψης του οξυγόνου η γη ήταν εκτεθειμένη στην υπεριώδη ακτινοβολία και στις κοσμικές ακτίνες του ήλιου. Πιστεύεται ότι μετά την εμφάνιση των προκαρυωτικών κυττάρων πριν από 3,6 με 3,8 δισεκατομμύρια έτη, στην εξελικτική πορεία της ζωής πάνω στον πλανήτη σημαντικό ρόλο έπαιξε η εμφάνιση φωτοσυνθετικών βακτηρίων (Gould, 1993).

Τα κύτταρα αυτά δέσμευαν το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας, ηλιακή ενέργεια, νερό και συνέθεταν υδρογονάνθρακες για την επιβίωσή τους, ενώ παράλληλα απελευθέρωναν οξυγόνο στην ατμόσφαιρα. Η αύξηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου στο περιβάλλον ήταν βασική προϋπόθεση για την ανάπτυξη αερόβιων βακτηρίων. Ταυτόχρονα με τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης το οξυγόνο άρχισε να υπερτερεί έναντι του διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα και ένα μέρος του αφού μετατράπηκε σχημάτισε προοδευτικά το στρώμα του όζοντος (O_3), το οποίο προστατεύει κάθε μορφή ζωής από τη θανατηφόρα ηλιακή ακτινοβολία (Gould, 1993).



Σχήμα 1: Αύξηση του οξυγόνου στη γήινη ατμόσφαιρα. Προσαρμογή στα ελληνικά από το Κέντρο Περιβαλλοντικής Εκπαίδευσης Καστοριάς.

Ελεύθερες Ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια ή τμήματα μορίων με ένα ή περισσότερα μονήρη ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα (Cheeseman, Slater, 1993; Jenkins, 1988; Rimbach, et al. 1999). Το γεγονός αυτό τις καθιστά ιδιαίτερα ασταθείς και δραστικές χημικά εμφανίζοντας την τάση να δεσμεύουν τα ηλεκτρόνια που τους υπολείπονται, για να αποκτήσουν δομή ευγενούς αερίου (αν η στιβάδα K είναι η εξωτερική πρέπει να είναι συμπληρωμένη με 2 e⁻, ενώ οποιαδήποτε άλλη πρέπει να είναι συμπληρωμένη με 8 e⁻), από άλλα μόρια οξειδώνοντάς τα (Guiland, et al. 1989; Petibois, Cazorla, Poortmans, Deleris, 2002; Sen, 2001). Επιπλέον είναι δυνατόν να σχηματίσουν νέες ρίζες αν αντιδράσουν μεταξύ τους ή με άλλα μόρια. (Sen, 2001).

Μεταξύ των ελεύθερων ριζών διακρίνονται τρεις ομάδες, α) τα δραστικά είδη οξυγόνου που παράγονται όπως φαίνεται και από την ονομασία τους από το οξυγόνο και τα δραστικά είδη β) αζώτου και γ) θείου. Η ταξινόμηση των ειδών αυτών παρουσιάζεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Ταξινόμηση ελευθέρων ριζών.

Ελεύθερες Ρίζες	Μοριακός Τύπος
<i>Δραστικά είδη Οξυγόνου</i>	<i>ROS</i>
Ιόν υπεροξειδίου του οξυγόνου	O ₂ ^{•-}
Όζον	O ₃
Μονήρης κατάσταση μοριακού Οξυγόνου	O ₂
Ρίζα υδροξυλίου	OH [•]
Υπεροξειδίο του Υδρογόνου	H ₂ O ₂
Υποχλωρικό οξύ	HOCl
Ρίζα αλκοξυλίου	RO [•]
Ρίζα περοξυλίου	ROO [•]
Υδροπεροξύλιο	ROOH [•]
<i>Δραστικά είδη Αζώτου</i>	<i>RNS</i>
Οξειδίο του Αζώτου	NO [•]
Διοξειδίο του Αζώτου	NO ₂ [•]
Περοξείνιτρίτιο ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου	ONOO ^{•-}
<i>Δραστικά είδη Θείου</i>	<i>RSS</i>
Ρίζα Θείου	RS [•]

Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών είναι μια φυσιολογική βιολογική διαδικασία απαραίτητη στην αναβολική λειτουργία των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού του DNA και του RNA καθώς και βασικών πρωτεϊνών (Karlsson, 1997). Οι

σημαντικότεροι μηχανισμοί παραγωγής τους μπορούν να διακριθούν σε “προγραμματισμένους και μη”. Στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου τα ουδετερόφιλα και τα φαγοκύτταρα έχουν ως στόχο την καταστροφή “ξένων” προς τον οργανισμό ιών-βακτηρίων και την αντιμετώπιση των φλεγμονών που εμφανίζονται. Αυτά τα λευκά αιμοσφαίρια παράγουν το υπεροξειδίο του οξυγόνου ($O_2^{\bullet -}$) οξειδώνοντας ταυτόχρονα υδρογονωμένα μόρια νικοτινάμιδου αδένινου δινουκλεοτίδιου (NADPH) σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση (Fehrenbach et al. 2001).



Αντίδραση 3.

Το υπεροξειδίο αυτό μπορεί να μεταλλαχτεί σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2), συμμετέχοντας στην αντίδραση Fenton και αυτό με τη σειρά του να δώσει υποχλωρικό οξύ (HOCL) που είναι ιδιαίτερα δραστικό στον εκφυλισμό των αντιγόνων (Aguoma, 1999). Κατά τη λειτουργία του αμυντικού συστήματος του ανθρώπου μπορεί να σχηματιστεί ένας σημαντικός αριθμός δραστικών ειδών οξυγόνου που παίζουν βασικό ρόλο στον έλεγχο της ομοιόστασης (Fehrenbach et al. 2001; Hampton, Kettle, Winterbourn, 1998).

Ωστόσο οι ρίζες παράγονται και “απρογραμματίστα” όπως για παράδειγμα στη διάρκεια του μεταβολισμού του οξυγόνου. Πιο συγκεκριμένα ένα ζεύγος ηλεκτρονίων μεταφέρεται από το υδρογονωμένο νικοτινάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο (NADH) στην αφυδρογονάση του NADH και έτσι μετατρέπεται σε νικοτινάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο (NAD^+) και υδρογονοκατιόντα H^+ . Η αφυδρογονάση του NADH μεταβιβάζει τα ηλεκτρόνια στην ουβικινόνη (ή συνένζυμο Q) που με τη σειρά της τα μεταφέρει στην αναγωγή του κυτοχρώματος. Έπειτα τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο κυτόχρωμα c το οποίο ανάγεται. Τέλος, τα ηλεκτρόνια διαβιβάζονται στην οξειδάση του κυτοχρώματος που αποτελεί τον τελευταίο σταθμό της αναπνευστικής αλυσίδας. Εκεί 4 ηλεκτρόνια προερχόμενα από 2 NADH και 4 πρωτόνια από το υδατικό περιβάλλον προσθέτονται σε ένα μόριο οξυγόνου (O_2) και παράγουν 2 μόρια νερού.



Αντίδραση 4.

Η οξείδωση του υδρογονωμένου φλάβινου αδένινου δινουκλεοτίδιου (FADH) είναι συντομότερη καθώς τα ηλεκτρόνια του, τα δίνει κατευθείαν στην ουβικινόνη. Από εκεί και πέρα αυτά ακολουθούν ίδια διαδρομή με τα ηλεκτρόνια του NADH (Μούγιος, 1995). Πιθανότατα η παραγωγή των δραστικών ειδών οξυγόνου γίνεται στο επίπεδο των κυτοχρωμάτων (Radak, 2000). Στις παραπάνω διαδικασίες ένα ποσοστό του οξυγόνου 1-5

% (κατ' άλλους 1-3 %, Boveris et al. 1973) σχηματίζει το υπεροξειδίο του (Clarkson, 1995; Jenkins, Goldfarb, 1993; Lenaz, 1998), όπως προαναφέρθηκε πιθανότατα στα κυτοχρώματα.

Μια άλλη πηγή δραστικών ειδών οξυγόνου αποτελεί το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης ιστών που εμφανίζεται συνήθως μετά από χειρουργικές επεμβάσεις, σοκ και στη διάρκεια της φυσικής δραστηριότητας (Fehrenbach et al. 2001; Jackson, O'Farrell, 1993; Thompson-Gorman et al. 1990). Κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης ο οργανισμός προμηθεύει με αίμα τους ιστούς που το έχουν άμεση ανάγκη (π.χ. εργαζόμενοι μύες, πνεύμονες), ενώ περιορίζει την αιμάτωση κάποιων άλλων ιστών (π.χ. στομάχι, μη εργαζόμενοι μύες) (Cooper et al. 2002; Di Meo et al. 2001). Μετά την άσκηση η αιμάτωση στους ιστούς αυτούς επανέρχεται λαμβάνοντας μεγαλύτερες ποσότητες οξυγόνου. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται " φαινόμενο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης" στη διάρκεια του οποίου μπορεί να σχηματιστεί το υπεροξειδίο του οξυγόνου. Αυτό συμβαίνει με αντιδράσεις μεταξύ του οξυγόνου, της ξανθίνης και της υποξανθίνης που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης (Cooper et al. 2002; Goldfarb, 1999; Heunks et al. 1999). Επίσης αναφέρεται ότι στη διάρκεια αυτού του φαινομένου αυξάνεται η μιτοχονδριακή παραγωγή των ελευθέρων ριζών (Di Meo et al. 2001).

Ακόμη, η οξειδωση της αιμοσφαιρίνης μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό δραστικών ειδών οξυγόνου (Ames et al. 1981; Fehrenbach et al. 2001; Thomas, 2000). Από την αιμοσφαιρίνη του σώματος ένα ποσοστό 3 % αυτοοξειδώνεται παράγοντας μεταξύ των άλλων και υπεροξειδίο του οξυγόνου (Cooper et al. 2002; Gohil, Viguie, Stanley, Brooks, Packer, 1988; Mirsa, Fridovich, 1972). Η μυοσφαιρίνη επίσης μπορεί να οξειδωθεί σχηματίζοντας υπεροξειδίο του υδρογόνου (Brantley, Smerdon, Wilkinson, Singleton, Olson, 1993; Gunther, Sampath, Caughey, 1999; Wallace, Houtchens, Maxwell, Caughey, 1982) με το οποίο στη συνέχεια μπορεί να αντιδράσει παράγοντας άλλες ρίζες (Giulivi, Cadenas, 1998; Harel, Kanner, 1988; Kelman, DeGray, Mason, 1994).

Αντιοξειδωτικός Μηχανισμός

Οι ανώτεροι οργανισμοί στην προσπάθειά τους να προστατευθούν από τις επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στα διάφορα βιολογικά μόρια, ανέπτυξαν τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό. Πρόκειται για ένα σύστημα ενζυμικών και μη ουσιών οι οποίες στόχο έχουν να ουδετεροποιήσουν τις ρίζες ή να περιορίσουν όσο γίνεται τη ζημία που προκαλούν στα διάφορα μόρια (Dekkers, Van Doornen, Kemper, 1996).

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) αποτελεί ένα από τα τρία ενζυμικά αντιοξειδωτικά και είναι η κύρια άμυνα στα υπεροξειδία. Αντιπροσωπεύει ένα σύνολο ενζύμων που καταλύουν την αντίδραση μετατροπής της ρίζας του υπεροξειδίου του οξυγόνου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου.



Αντίδραση 5.

Η CAT αποτελεί το δεύτερο ένζυμο ενάντια στις ρίζες. Πιο συγκεκριμένα βρίσκεται σε κάθε κύτταρο και μετασχηματίζει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο (Αντίδραση 6). Επίσης μπορεί να ‘‘χρησιμοποιήσει’’ το υπεροξείδιο του υδρογόνου για να εξουδετερώσει άλλα τοξικά μόρια, όπως συμβαίνει σε αντιδράσεις υπεροξειδωσης που υπάρχει ταυτόχρονα το κατάλληλο υπόστρωμα π.χ. αιθανόλη. (Αντίδραση 7).



Αντίδραση 6.



Αντίδραση 7.

Τελειώνοντας με τον ενζυμικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) βρίσκεται στα μιτοχόνδρια των κυττάρων και έχει την ικανότητα να καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό (Αντίδραση 8).



Αντίδραση 8.

Κατά την αντίδραση αυτή η GSH μετατρέπεται σε GSSG.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η CAT και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης έχουν την ίδια λειτουργία απέναντι στο υπεροξείδιο του υδρογόνου, όμως η πρώτη είναι πιο αποτελεσματική σε υψηλές συγκεντρώσεις δραστικών ειδών οξυγόνου, ενώ η δεύτερη έχει σημαντική δράση σε μικρές συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Antunes, Derick, Cadenas, 2002; Jenkins et al. 1993).

Στη συνέχεια παρουσιάζεται ο μη ενζυμικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός. Η βιταμίνη E έχει την ικανότητα να δρα απευθείας στα δραστικά είδη οξυγόνου και να τα ουδετεροποιεί (Evans, 2000). Η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C εξωκυτταρικά ουδετεροποιεί τα δραστικά είδη οξυγόνου (Bigard, 2001), ενώ ενδοκυτταρικά ενισχύει τη δράση της βιταμίνης E και της GSH με το να αναγεννά την δραστική μορφή τους (Ashton et al. 1999; Evans, 2000; Ma, Stone, Leclair, 1994). Τέλος για τη λιποδιαλυτή βιταμίνη A πιστεύεται ότι αδρανοποιεί τα δραστικά είδη οξυγόνου και περιορίζει την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Ozdogina, Kasaikina, 1995; Powers et al. 1999), ενώ τα φλαβονοειδή φαίνεται να βοηθούν στην εξοικονόμηση των βιταμινών E και A (Morand et al. 1998; Pietta, 2000).

Οι θειόλες περιλαμβάνουν τη σουλφιλομάδα στο μόριό τους (Sen, Packer, 2000) και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως αντιοξειδωτικά. Πιο συγκεκριμένα η GSH αποτελεί την κύρια θειόλη στον οργανισμό. Οι αντιδράσεις σχηματισμού της GSH από γλουταμίνη, κυστεΐνη και γλυκίνη καταλύονται από δυο κυτοζολικά ένζυμα την συνθετάση της γ-γλουταμυλκυστίνης (GCS) και τη συνθετάση της GSH. Αυτό συμβαίνει σχεδόν σε όλα τα ανθρώπινα κύτταρα με το ήπαρ να αποτελεί τον κύριο παραγωγό και προμηθευτή της GSH (Wu, Fang, Yang, Lupton, Turner, 2004), ενώ ένα μέρος της προέρχεται από την τροφή (Lu, 2000). Δρα ως υπόστρωμα στις αντιδράσεις αναστολής των δραστικών ειδών οξυγόνου με το ένζυμο της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX). Επίσης ουδετεροποιεί τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα των βιταμινών C και E (Groussard et al. 2003; May, Qu, Whitesell, Cobb, 1996).

Το συνένζυμο Q10 λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό άμεσα στις ρίζες υπεροξειδίου ή με έμμεσο τρόπο αναγεννώντας τις βιταμίνες C και E (Crane, 2001; Witt, Reznick, Viguie, Starke-Reed, Packer, 1992). Το ουρικό οξύ εκτός από τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών (Grootveld, Halliwell, 1987; Hellsten, Tullson, Richter, Bangsbo, 1997; Svensson et al. 2002) αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά με άμεση δράση σε συγκεκριμένα δραστικά είδη οξυγόνου (π.χ. ατομικό οξυγόνο, υποχλωρικό οξύ, όζον) (Grootveld et al. 1987; Hooper et al. 2000; Hooper et al. 1998; Kean, Spitsin, Mikheeva, Scott, Hooper, 2000) και επιπλέον βοηθά στην προστασία των ερυθροκυττάρων, των κυτταρικών μεμβρανών και του DNA από την οξείδωση των ελευθέρων ριζών. Ακόμη σχηματίζει σταθερά συμπλέγματα με τα ιόντα του σιδήρου και με αυτόν τον τρόπο αναστέλλει την οξείδωση της βιταμίνης C και την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Davies, Sevanian, Muakkasah-Kelly, Hochstein, 1986; Sevanian, Davies, Hochstein, 1991). Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ είναι μια μορφή πρωτεϊνών που προστατεύουν τα κύτταρα και τις ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες από τις ελεύθερες ρίζες (Fehrenbach et al. 2001; Hamilton et al. 2003; Nishizawa et al. 1999). Η φεριτίνη αποτελεί την αποθηκευτική πρωτεΐνη του σιδήρου στον οργανισμό. Ο προστατευτικός ρόλος της φεριτίνης έγκειται στο γεγονός ότι ελαχιστοποιεί το σχηματισμό ριζών απομονώνοντας το σίδηρο στο αίμα ή στα κύτταρα (Arosio, Levi, 2002; Meneghini, 1997; Orino et al. 2001). Τέλος η αλβουμίνη, η σερουλοπλασμίνη και η χολερυθρίνη δρουν δίνοντας ηλεκτρόνια στις ελεύθερες ρίζες (Prior et al. 1999). Η αλβουμίνη και η σερουλοπλασμίνη συμμετέχουν επίσης στην μεταφορά του χαλκού και έτσι περιορίζουν την παραγωγή των ριζών μέσω της αντίδρασης του Fenton (Atanasiu et al. 1998; Rimbach et al. 1999). Η δράση των τριών αυτών

πρωτεϊνών είναι περιορισμένη γιατί δρουν έμμεσα και σε υγρά του σώματος όπως το αίμα, δηλαδή μακριά από τον τόπο παραγωγής των ελευθέρων ριζών. Παρακάτω στον πίνακα 2 παρουσιάζονται τα κύρια μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.

Πίνακας 2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.

Μη Ενζυμικά Αντιοξειδωτικά
Βιταμίνη E
Βιταμίνη C
Βιταμίνη A ή ρετινόλη
Συνένζυμο Q10
Πρωτεΐνες θερμικού σοκ
Φεριτίνη
Αλβουμίνη
Χολερυθρίνη
Σερουλοπλασμίνη
Φλαβινοειδή
Ουρικό οξύ
Θειόλες (γλουταθειόνη)

Οξειδωτικό Στρες και Άσκηση

Όταν στον οργανισμό αυξηθεί η συγκέντρωση ελευθέρων ριζών λόγω διαταραχής της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής τους και της εξουδετέρωσής τους από τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό, τότε η κατάσταση στην οποία επέρχεται ο οργανισμός ονομάζεται οξειδωτικό στρες (Cooper et al. 2002). Όπως γίνεται αντιληπτό αυτό μπορεί να συμβεί σε περίπτωση αυξημένου σχηματισμού ριζών (Finaud et al. 2006) ή/και μειωμένης ικανότητας του μηχανισμού άμυνας (Nikolaidis et al. 2006).

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να αυξήσει την απόπτωση (προγραμματισμένη καταστροφή κυττάρων) σε υγιή κύτταρα, να δημιουργήσει φλεγμονές και να προκαλέσει κυτταρικές δυσλειτουργίες. Στις επιδράσεις αυτές αποδίδονται παθολογικές καταστάσεις και ασθένειες όπως ο καταρράκτης, ο καρκίνος, η γήρανση και οι νόσοι του Alzheimer και του Parkinson (Golden, Hinerfeld, Melon, 2002). Ακόμη η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών που προκαλούν οι ρίζες αποτελεί παθογόνο παράγοντα της αθηροσκλήρωσης (Vasankari J., Kujala, Vasankari M. 1997; Young, McEneany, 2001). Επιπλέον η υπεροξείδωση των λιπιδίων αλλάζει τις φυσικές ιδιότητες των κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα την απώλεια ενδοκυτταρικών υγρών, την υποβάθμιση της μεταφοράς ασβεστίου και μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες (Jackson et al. 1993; Jenkins, 1988).

Η επίδραση των ROS στις πρωτεΐνες έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια αμινοξέων και την κατάτμησή τους. Αυτές οι αντιδράσεις οδηγούν σε μεταλλάξεις δομικών πρωτεϊνών και στη δυσλειτουργία των ενζύμων (Radak et al. 1999). Ακόμη τα ROS μπορούν να δημιουργήσουν πρόβλημα στις πρωτεολυτικές διαδικασίες είτε μεσολαβώντας στον σχηματισμό ανασταλτικών ενδογενών ενζύμων είτε διαφοροποιώντας εξειδικευμένα πρωτεολυτικά ένζυμα (Szweda PA., Friguet, Szweda LI., 2002). Η οξειδωτική βλάβη του DNA μπορεί να οδηγήσει σε μετάλλαξη και αποτελεί τον κύριο συντελεστή της γήρανσης και της εμφάνισης του καρκίνου (Fehrenbach et al. 2001; Kasai, 2002; Radak et al. 1999; Wallace, 2002). Τέλος το οξειδωτικό στρες μπορεί να συμβάλλει στην κόπωση των ασκούμενων μυών και στο μυϊκό πόνο μετά από άσκηση που προκαλεί μυϊκή καταστροφή (Childs, Jacobs, Kaminski, Halliwell, Leeuwenbrgh 2001; Evans, 2000; Radak, Pucso, Mecseki, Csont, Ferdinandy, 1999).

Αν και στη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες που δεν βρήκαν αύξηση του οξειδωτικού στρες μετά από οξεία άσκηση (Inoue, Mu, Sumikawa, Adachi, Okochi, 1993; Nielsen et al. 1995; Witt et al. 1992) σήμερα είναι γενικά αποδεκτό ότι άσκηση με υψηλή ένταση ή μεγάλη διάρκεια επαρκεί για να αυξήσει τις ελεύθερες ρίζες στον οργανισμό σε τέτοιο βαθμό που να υπερσκελίσουν τη δράση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού (Niess, Hartmann, Grunert-Fuchs, Poch, Speit, 1996; Poulsen, Loft, Vistisen, 1996; Quindry, Stone, King, Broeder 2003).

Όπως προαναφέραμε η άσκηση αυξάνει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, ωστόσο δεν είναι ξεκάθαρο τι προκαλεί αυτή την αύξηση. Αρκετοί από τους μηχανισμούς παραγωγής ριζών δρουν συνεργιστικά και είναι πιθανό διαφορετικά είδη άσκησης να ενεργοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς παραγωγής τους (Vollaard, Shearman, Cooper, 2005).

Όπως προαναφέραμε ο αντιοξειδωτικός μηχανισμός παίζει ζωτικό ρόλο στην προστασία των ιστών από εκτεταμένες οξειδωτικές καταστροφές (Clarkson et al. 2000; Dekkers et al. 1996) και ιδιαίτερα κατά την άσκηση στη διάρκεια της οποίας αυξάνεται η παραγωγή των ελευθέρων ριζών (Ji, 1995). Η προπόνηση αποτελεί βασικό παράγοντα αύξησης της ικανότητας δράσης του ενζυμικού αντιοξειδωτικού μηχανισμού (Clarkson, 1995; Leeuwenburgh et al. 1999; Powers et al. 2000). Η μεταβολή αυτή πιθανότατα συμβαίνει άμεσα μετά την παραγωγή των ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα στις οξειδωτικές μυϊκές ίνες οι οποίες αποτελούν την κύρια τοποθεσία παραγωγής των ριζών (Ji, 1995; Ji, 1993; Powers et al. 2000). Η αερόβια άσκηση επιδρά και στα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Πιο συγκεκριμένα αναφέρεται αύξηση των βιταμινών E, C, του ουρικού

οξέως καθώς και της TAC μετά από αερόβια άσκηση (Davies et al. 1982; Liu et al. 1999; Mastaloudis, Leonard, Traber, 2001). Όσο αφορά την GSH αρκετές μελέτες αναφέρουν μείωση των επιπέδων της (Liu et al. 1999; Powers et al. 2000; Tessier, Margaritis, Richard, Moynot, Marconnet, 1995).

Η εκτίμηση του οξειδωτικού στρες μπορεί να γίνει είτε μετρώντας απευθείας τις παραγόμενες ελεύθερες ρίζες, είτε μετρώντας τα προϊόντα των αντιδράσεων των ριζών με βιολογικά μόρια, είτε τέλος μετρώντας την δραστικότητα των ενζύμων και τις συγκεντρώσεις του αντιοξειδωτικού μηχανισμού (Clarkson et al. 2000; Duthie, 1999; Jenkins, 2000). Η απευθείας μέτρηση των ελευθέρων ριζών στηρίζεται στις παραμαγνητικές τους ιδιότητες (Ashton et al. 1998; Ashton et al. 1999; Rimbach et al. 1999). Οι μετρήσεις μπορούν να γίνουν σε ζωντανό οργανισμό (in vivo) ή εκτός αυτού (ex vivo). Η εφαρμογή της μεθόδου στον ανθρώπινο οργανισμό δεν είναι ιδιαίτερα πρακτική λόγω της τοξικότητας των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται (Clarkson et al. 2000; Rimbach et al. 1999). Τα δείγματα αίματος συλλέγονται σε συσκευασίες που περιέχουν διάλυμα με σταθεροποιητές των ριζών. Μετά τη φυγοκέντριση ο ορός αναλύεται με μια φασματοσκοπική μέθοδο. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα θα πρέπει να αντιμετωπιστούν με επιφύλαξη καθώς τα δραστικά είδη οξυγόνου έχουν μικρό χρόνο ημιζωής, αντιδρούν πολύ εύκολα και έχουν πολύ μικρές συγκεντρώσεις (Ashton et al. 1999; Cooper et al. 2002; Jenkins, 2000).

Ένας άλλος τρόπος εκτίμησης του οξειδωτικού στρες είναι η μέτρηση της υπεροξειδωσης των μεμβρανών των λιπιδίων ή των λιπαρών οξέων μέσω των ουσιών που παράγονται. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων οδηγεί στο σχηματισμό πολλών κύριων προϊόντων οξειδωσης όπως τα συζευγμένα διένια ή τα υδροπεροξειδία των λιπιδίων (Aguoma, 1999; Ashton et al. 1999; Clarkson et al. 2000) και δευτερευόντων προϊόντων όπως η μαλονδιαλδεΐδη, τα F2-ισοπροστάνια, το πεντάνιο, το αιθάνιο και το εξάνιο (Finaud et al. 2006). Η μαλονδιαλδεΐδη αποτελεί ένα από τα δευτερεύοντα προϊόντα της οξειδωσης των λιπιδίων και παράγεται από την αυτοοξειδωση των λιπαρών οξέων. Εκτιμάται μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με την οποία παράγονται ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ. Αν και η μέθοδος αυτή δεν θεωρείται αξιόπιστη χρησιμοποιείται με επιφύλαξη ως γενικός δείκτης της υπεροξειδωσης των λιπιδίων (Clarkson et al. 2000; Groussard et al. 2003; Rimbach et al. 1999). Ωστόσο μερικές έρευνες δείχνουν ότι η MDA δεν αποτελεί εξειδικευμένη μέθοδο για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες μετά από άσκηση (Groussard et al. 2003). Μια άλλη τεχνική με περιορισμένη όμως χρηστική αξία είναι η μέτρηση στα εκπνεόμενα αέρια πτητικών

υδρογονανθράκων όπως το πεντάνιο, το εξάνιο και το αιθάνιο, καθώς τα αέρια αυτά μπορούν να σχηματιστούν και με άλλους τρόπους εκτός από την οξειδωση που προκαλούν οι ρίζες (Rimbach et al. 1999). Τα τελευταία χρόνια βρέθηκε ότι τα F2-ισοπροστάνια παράγονται από την υπεροξειδωση που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες στο αραχιδονικό οξύ (Aruoma, 1999). Αρκετές μελέτες δείχνουν την αξιοπιστία αυτού του δείκτη καθώς και άλλων περισσότερο πρόσφατων όπως η οξειδωμένη LDL στο αίμα ή τα αντισώματα κατά της οξειδωμένης LDL (Frank, Pompella, Biesalski, 2000; Pincemail et al. 2000; Willcox, Catignani, Roberts, 2002).

Για την εκτίμηση της επίδρασης του οξειδωτικού στρες στις πρωτεΐνες η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι η μέτρηση των καρβονυλίων που σχηματίζονται (Levine, 2002; Stadtman, Levine, 2000). Ένας πιο πολύτιμος δείκτης είναι η αναλογία των καρβονυλίων προς τη συνολική πρωτεΐνη η οποία μετριέται για το σκοπό αυτό (Chen, Chang, Wei, 2001). Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη καθώς τα καρβονύλια έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής και μπορούν να δείξουν συσσωρευμένες επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό (π.χ. μετά από ένα μπλοκ προπονήσεων). Επίσης η μέτρηση των οξειδωμένων αμινοξέων αποτελεί έναν άλλο δείκτη της οξειδωσης των πρωτεϊνών (Leeuwenburgh et al. 1999) χωρίς να υπάρχει όμως αυτή τη στιγμή επαρκής γνώση για την κινητική των αμινοξέων περιορίζοντας έτσι την ερμηνεία των ευρημάτων (Leeuwenburgh et al. 1999; Rimbach et al. 1999).

Η εκτίμηση της καταστροφής που προκαλεί το οξειδωτικό στρες στο DNA συνήθως γίνεται με τη μέτρηση του νουκλεοτιδίου 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνης (8-OHdG). Η ουσία αυτή παράγεται κατά την οξειδωση της γουανίνης από τις ελεύθερες ρίζες. Ωστόσο υπάρχουν κάποιες αμφιβολίες για την ακρίβεια της μεθόδου καθώς η ουσία αυτή ενδέχεται να σχηματίζεται μέσα στις αρτηρίες με αυτοοξειδωση στη διάρκεια ή ακόμη και μετά τη δειγματοληψία (Dizdaroglu, Jaruga, Brincioglu, Rodriguez, 2002; Hofer, Moller, 2002).

Σε πολλές μελέτες χρησιμοποιείται η μέτρηση της δραστηρότητας των τριών ενζύμων του αντιοξειδωτικού μηχανισμού των οποίων η εξέλιξη παρουσιάζει μια προσαρμογή στην παραγωγή των ελευθέρων ριζών μετά την άσκηση (Marzatico, Pansarasa, Bertorelli, Somenzini, Della Valle, 1997; Miyazaki et al. 2001). Μπορεί να εμφανιστεί αύξηση της δραστηρότητας ή και μείωση στην περίπτωση που το οξειδωτικό στρες είναι σημαντικό ή έχει μεγάλη διάρκεια.

Η μέτρηση στο πλάσμα των αντιοξειδωτικών βιταμινών (A, C και E) μπορεί να χρησιμοποιηθεί εκτός από την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού

και ως έμμεσος δείκτης του οξειδωτικού στρες (Rimbach et al. 1999). Επίσης ένα άλλο αντιοξειδωτικό που μπορούμε να μετρήσουμε είναι οι θειόλες. Έλλειψη των πρωτεϊνών αυτών μπορεί να εμφανιστεί στη διάρκεια μιας μεγάλης περιόδου οξειδωτικού στρες. Η GSH αποτελεί την πιο σημαντική θειόλη στον ανθρώπινο οργανισμό και μαζί με την οξειδωμένη της μορφή αποτελούν βασικούς δείκτες για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες. Η αναλογία τους αποτελεί έναν επιπλέον κλινικό δείκτη καθώς οι ελεύθερες ρίζες οξειδώνουν την GSH σε GSSG (Svensson et al. 2002; Tessier et al. 1995). Αν και το ουρικό οξύ είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό του οργανισμού (Marklund, Ostman, Nalmo, Persson, Hillered, 2000; Wayner, Burton, Ingold, Barclay, Locke, 1987), μόνο του δεν αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του οξειδωτικού στρες. Ωστόσο η αλλαντοΐνη που είναι παράγωγο οξείδωσης του ουρικού οξέος και απουσιάζει σε φυσιολογικές συνθήκες από τα ανθρώπινα υγρά είναι ένας χρήσιμος ενδογενής δείκτης του οξειδωτικού στρες. Από την άλλη πλευρά μελέτες αναφέρουν περιορισμένη λειτουργική αξία του δείκτη αυτού γιατί μπορεί να οξειδωθεί από τις ελεύθερες ρίζες στα δείγματα αίματος και έτσι να υπερεκτιμηθεί το οξειδωτικό στρες (Marklund et al. 2000).

Τέλος ένα άλλος δείκτης που χρησιμοποιείται είναι η TAC που οφείλει την ονομασία της και την εμφάνισή της στην ύπαρξη πολλών αντιοξειδωτικών ουσιών στα ανθρώπινα υγρά και στη δύσκολη μέτρηση κάθε μιας από αυτές ξεχωριστά. Η συνηθέστερη τεχνική περιλαμβάνει τη χρήση προ – οξειδωτικών με στόχο να μετρηθεί η ικανότητα απορρόφησης (σε φωτόμετρο) των ριζών του οξυγόνου (Cao, Prior, 2000; Prior et al. 1999). Η μέθοδος αυτή έχει μειονεκτήματα καθώς ο δείκτης επηρεάζεται από διατροφικές συνήθειες. Επιπλέον είναι δυνατόν να αλλάξουν οι συγκεντρώσεις κάποιων αντιοξειδωτικών παραγόντων χωρίς να μεταβληθεί η TAC (Kohen, Vellaichamy, Hrbac, Gati, Tirosh, 2000).

Συμπερασματικά για τη μέτρηση του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού μπορούμε να αναφέρουμε ότι κάθε μέθοδος έχει τα θετικά της στοιχεία και τους περιορισμούς της. Καμία από αυτές δεν μπορεί να λειτουργήσει αυτόνομα, αλλά μια ομάδα με δείκτες οξειδωτικής καταστροφής λιπιδίων, πρωτεϊνών και DNA καθώς και η TAC μαζί με κάποια αντιοξειδωτικά φαίνεται να είναι η πιο αξιόπιστη μέθοδος για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες (Prior et al. 1999).

Στην παρούσα μελέτη από τους προαναφερθέντες δείκτες μετρήθηκε η δραστικότητα της καταλάσης και οι συγκεντρώσεις ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης. Επίσης υπολογίστηκε ο λόγος τους. Έτσι εκτιμήθηκε η επίδραση του οξειδωτικού στρες στην ενζυμική και μη αντιοξειδωτική ικανότητα. Μετρήθηκαν ακόμη οι

συγκεντρώσεις των ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων για την εκτίμηση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και των πρωτεϊνών αντίστοιχα. Τέλος χρησιμοποιήθηκε ο δείκτης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας για μια περισσότερο ολοκληρωμένη εκτίμηση των επιδράσεων του οξειδωτικού στρες.

Η μεταβολή αυτών των δεικτών μετά από αερόβια άσκηση αποτέλεσε αντικείμενο πολλών ερευνών. Ελάχιστες όμως από αυτές ασχολήθηκαν με την κινητική των παραπάνω δεικτών κατά τη διάρκεια της αποκατάστασης. Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι η αερόβια άσκηση έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS και της MDA αμέσως μετά την άσκηση (Vider et al. 2001; Sumida et al. 1989) και για 30 λεπτά αργότερα (Jammes et al. 2004). Οι Vider et al. πραγματοποίησαν σε διάδρομο ένα αυξανόμενο τεστ μέχρι την εξάντληση, οι Sumida et al. παρόμοιο τεστ σε κυκλοεργόμετρο, ενώ οι Jammes et al. εφάρμοσαν σε κυκλοεργόμετρο αρχικά ένα στάδιο άσκησης με αερόβιες απαιτήσεις και στη συνέχεια, μετά από ανάπαυση 30 λεπτών, ένα τεστ μέχρι εξαντλήσεως. Επίσης αυξήσεις των επιπέδων των TBARS αναφέρθηκαν για τεσσεράμισι (Borsheim et al. 1999) και για 24 ώρες (Senturk et al. 2005) μετά την άσκηση. Στη μελέτη των Borsheim et al. η προσπάθεια περιλάμβανε 90 λεπτά ποδηλασίας στο 58 % της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου, ενώ αυτή των Senturk et al. αποτελούνταν από μια δοκιμασία εξάντλησης στο κυκλοεργόμετρο. Σε μελέτη των Ilhan et al. (2004) αναφέρεται αύξηση της συγκέντρωσης αμέσως μετά την άσκηση που ακολουθείται από πτώση στις τέσσερις ώρες αργότερα. Στις 24 ώρες εμφανίζεται αύξηση όπως και στις 48 ώρες. Το πρωτόκολλο άσκησης περιλάμβανε 12 λεπτά τρέξιμο σε διάδρομο με ταχύτητα 8,5 km/h και κλίση 4 %. Τέλος ο Duthie με τους συνεργάτες του το 1990 βρήκαν αύξηση στα επίπεδα των TBARS μετά από μια κούρσα ημιμαραθώνιου για τις πρώτες 48 ώρες, ενώ στα δείγματα των 72 και 120 ωρών μετά την άσκηση παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων.

Σε αντίθεση υπάρχουν μελέτες που βρήκαν ελαφρώς μειωμένα τα επίπεδα των TBARS για 48 ώρες μετά την άσκηση (Close, Ashton, Cable, Doran, MacLaren, 2004; Schneider et al. 2003). Μη σημαντικές διαφορές βρέθηκαν και από άλλους μελετητές κατά τη μέτρηση των TBARS (Sato, Nanri, Ohta, Kasai, Ikeda, 2003), αλλά και κατά τη μέτρηση της MDA (Alessio et al. 2000; Bloomer et al. 2005).

Από τη βιβλιογραφία γίνεται φανερό ότι η επίδραση της αερόβιας άσκησης αυξάνει την συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Έτσι αναφέρονται αυξήσεις για μία (Alessio et al. 2000) και 24 ώρες μετά την άσκηση (Bloomer et al. 2005). Η άσκηση στην

μελέτη των Alessio et al. περιλάμβανε ένα μέγιστο αερόβιο τεστ σε διάδρομο, ενώ αυτή των Bloomer et al., 30 λεπτά ποδηλασία στο 70 % της VO_2 max.

Ακόμη έρευνες σε ζώα έδειξαν αυξήσεις στις έξι, 12 ώρες (Sumida et al. 2004) καθώς και στις 24 ώρες (Kinnunen et al. 2005) μετά τη δοκιμασία. Η μελέτη των Sumida et al. έγινε σε ποντίκια που κολύπησαν για 30 λεπτά, ενώ αυτή των Kinnunen et al. έγινε σε άλογα που πραγματοποίησαν 45 λεπτά μέτριας έντασης άσκησης.

Για την επίδραση της αερόβιας άσκησης στην TAC υπάρχει περιορισμένη βιβλιογραφία. Ωστόσο οι περισσότερες μελέτες δείχνουν αύξηση στα επίπεδά της. Σε μελέτες μετά από ένα αερόβιο τεστ ως την εξάντληση σε διάδρομο βρέθηκε αύξηση των επιπέδων της TAC αμέσως μετά την άσκηση και για 30 λεπτά αργότερα (Vider et al. 2001). Αυξήσεις επίσης έχουν παρατηρηθεί έπειτα από μέγιστο τεστ σε εργοποδήλατο (Ashton et al. 1998). Τέλος οι Watson et al. (2005) παρατήρησαν σημαντική μείωση των επιπέδων της TAC αμέσως μετά την άσκηση και αύξηση μία ώρα αργότερα. Η δοκιμασία που εφάρμοσαν περιλάμβανε 30 λεπτά τρέξιμο στο 60 % της VO_2 max που ακολουθήθηκε από περπάτημα και στη συνέχεια ένα μέγιστο τεστ σε διάδρομο ως την εξάντληση.

Η αερόβια άσκηση έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου καταλάση. Ειδικότερα οι Vider et al. (2001) αναφέρουν αύξηση αμέσως μετά από μέγιστο τεστ στο διάδρομο, ενώ 30 λεπτά αργότερα μειώθηκε η δραστηριότητα ελαφρώς σε σχέση με τα πριν την άσκηση επίπεδα. Αύξηση μετά την άσκηση βρέθηκε και από τους Tauler et al. (2003) που ακολουθήθηκε από πτώση μία ώρα αργότερα. Σε άλλη μελέτη των Tauler et al. (2003) βρέθηκε σημαντική αύξηση του ενζύμου στα λεμφοκύτταρα για μία ώρα μετά τη δοκιμασία, ενώ στα ουδετερόφιλα η σημαντική μείωση που παρατηρήθηκε αμέσως μετά τον αγώνα δεν διατηρήθηκε στο δείγμα της μίας ώρας αργότερα. Και στις δυο μελέτες των Tauler et al. (2003) η δοκιμασία περιλάμβανε έναν αγώνα διάθλου. Σε μελέτη τους οι Duthie et al. (1990) παρατήρησαν μείωση, αμέσως μετά τον ημιμαραθώνιο και στο δείγμα των 120 ωρών αργότερα. Αντίθετα στα δείγματα των 24, 48 και 72 ωρών παρατηρήθηκε μικρή αύξηση. Οι Khassaf et al. (2001) λαμβάνοντας μυϊκές βιοψίες από το πόδι που ποδηλατούσε για 45 λεπτά στο 70 % της VO_2 max βρήκαν αύξηση, μη σημαντική, στα δείγματα των 24, 48, 72 και 144 ωρών αργότερα.

Το μεγαλύτερο μέρος της βιβλιογραφίας αναφέρει πτώση της GSH μετά από αερόβια άσκηση. Έτσι οι Jammes et al. (2004) αναφέρουν σημαντική πτώση της GSH πέντε λεπτά μετά την άσκηση, στη συνέχεια αύξηση στα δείγματα των 10 και 20 λεπτών και τέλος πτώση στο 30λεπτο. Οι Watson et al. (2005) βρήκαν αρχικά μικρή πτώση της

ολικής ανηγμένης γλουταθειόνης (TGSΗ) που μετατράπηκε σε μικρή αύξηση μία ώρα μετά.

Οι Bloomer et al. (2005) αναφέρουν στη μελέτη τους μείωση των επιπέδων της GSH αμέσως μετά την άσκηση, ενώ στα υπόλοιπα δείγματα (μία, έξι και 24 ώρες) δεν υπήρχαν σημαντικές μεταβολές. Οι Pihan et al. (2004) βρήκαν μικρή πτώση για τέσσερις ώρες μετά την άσκηση που ακολουθήθηκε από μικρή αύξηση στα δείγματα των 24 και 48 ωρών. Οι Weiss et al. (2002) παρατήρησαν πτώση στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης για 24 ώρες και στο δείγμα αμέσως μετά την άσκηση η πτώση ήταν σημαντική. Επίσης σημαντική μείωση για τις πρώτες 24 ώρες παρατηρήθηκε από τους Duthie et al. (1990), ενώ στα υπόλοιπα δείγματα (48, 72, 120 ώρες) η GSH πλησίασε τα πριν την άσκηση επίπεδα. Σε κάποιες άλλες μελέτες βρέθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης της ολικής ανηγμένης γλουταθειόνης (TGSΗ) για 30 λεπτά μετά από μέγιστο τεστ (Vider et al. 2001). Μικρές αυξομειώσεις της TGSΗ στο διάστημα της πρώτης ώρας μετά την άσκηση βρέθηκαν και από τους Hellsten, et al. (2001). Τέλος στη μελέτη των Mills et al. (1996) σε άλογα βρέθηκε μικρή αύξηση για τις πρώτες δύο ώρες μετά την άσκηση (αερόβιας μορφής), ενώ στις 24 ώρες εμφανίστηκε μικρή πτώση.

Για την GSSG παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της αμέσως μετά την άσκηση (Bloomer et al. 2005) και για μία (Watson et al. 2005), έξι (Weiss et al. 2002) και 120 (Duthie et al. 1990) ώρες αργότερα. Τέλος στην μελέτη των Mills et al. (1996) στα άλογα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της οξειδωμένης γλουταθειόνης αμέσως μετά την άσκηση, ενώ και στα επόμενα δείγματα (30 λεπτών, δύο ωρών) παρέμειναν υψηλές οι τιμές της, ενώ τέλος στο δείγμα των 24 ωρών εξαλείφθηκαν οι μεταβολές.

Η επίδραση της αερόβιας άσκησης στο λόγο της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη φαίνεται από τη βιβλιογραφία να είναι αρνητική. Συγκεκριμένα μείωση του λόγου αναφέρεται αμέσως μετά (Weiss et al. 2002), για μία (Watson et al. 2005) και στις έξι (Weiss et al. 2002) ώρες μετά την δοκιμασία. Οι Bloomer et al. (2005) σχημάτισαν το λόγο οξειδωμένης προς ολική γλουταθειόνη τον οποίο βρήκαν αυξημένο σημαντικά αμέσως μετά την άσκηση. Τα ευρήματα και τα χαρακτηριστικά όλων των προαναφερθέντων μελετών παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Στις παραπάνω μελέτες είδαμε πως επηρεάζονται οι δείκτες του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού από την αερόβια άσκηση. Ωστόσο διαπιστώνουμε την ύπαρξη διαφορετικών αποτελεσμάτων από την επίδραση της άσκησης στον ίδιο δείκτη και αυτό πιθανότατα συμβαίνει λόγω των διαφορετικών ειδών άσκησης και γενικότερα των διαφορετικών πρωτοκόλλων που εφαρμόζονται στις έρευνες.

Ακόμη στις περισσότερες μελέτες, σε αντίθεση με την παρούσα, χρησιμοποιείται ένας μικρός αριθμός δεικτών του οξειδωτικού στρες. Το γεγονός αυτό αποτελεί περιορισμό των ερευνών καθώς όπως έχουμε προαναφέρει απαιτείται ένα σύνολο δεικτών για να διαπιστωθεί και να εκτιμηθεί η κατάσταση του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό.

Τέλος φαίνεται ότι δεν είναι γνωστή η διακύμανση των δεικτών του οξειδωτικού στρες σε διάστημα 24 h μετά την άσκηση. Σε κάποιες μελέτες που έγινε προσπάθεια να εκτιμηθούν οι μεταβολές αυτές στη διάρκεια της ανάληψης είτε πραγματοποιήσαν πολλές δειγματοληψίες αλλά για λίγες ώρες μετά την προσπάθεια (Hellsten et al. 2001; Jammes et al. 2004) είτε πήραν λίγα δείγματα για αρκετές ώρες μετά (Bloomer et al. 2005; Duthie et al. 1990; Elosua et al. 2003; Ihan et al. 2004; Sato et al. 2003). Στην πρώτη περίπτωση δεν υπάρχει πλήρης εικόνα των μεταβολών και της χρονικής επαναφοράς τους στα πριν την άσκηση επίπεδα, ενώ στη δεύτερη είναι πιθανό να χαθούν μεταβολές καθώς υπάρχουν μεγάλα διαστήματα από δείγμα σε δείγμα.

Στην παρούσα μελέτη τα προβλήματα αυτά έχουν περιοριστεί καθώς έχουν ληφθεί έντεκα δείγματα αίματος στο πρώτο 24ωρο μετά την προσπάθεια. Η μελέτη αυτή θα βοηθήσει στο να γνωρίσουμε το χρονοδιάγραμμα κορύφωσης και πτώσης των συγκεντρώσεων και της δραστικότητας επτά δεικτών του οξειδωτικού στρες (TBARS, CAT, PC, TAC, GSH, GSSG, λόγος GSH/GSSG). Έτσι γνωρίζοντας το χρονικό σημείο κορύφωσης των παραπάνω δεικτών και κάνοντας δειγματοληψίες στα σημεία αυτά θα μπορούν να είναι συγκρίσιμα τα ευρήματα των μελετών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες.

Πίνακας 3. Ευρήματα και χαρακτηριστικά ερευνών που αναφέρονται στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας. Συμβολισμός: ~ Μη αξιόλογες μεταβολές, +++ Σημαντική αύξηση, ++ Αύξηση, + Μικρή αύξηση, = Καμία μεταβολή, - Μικρή μείωση, -- Μείωση, --- Σημαντική μείωση, A: Άνδρας, Γ: Γυναίκα, Π: Ποντίκι, AA: Αρσενικό Άλλογο, ΘA: Θηλυκό Άλλογο.

Συγγραφέας/ Έτος	Δείγμα	Είδος Άσκησης	Ιστός	Δείκτης	Post	5 min	10 min	15 min	20 min	30 min	1 h	2 h	3 h	4 h	4,5 h	6 h	8 h	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	144 h
Alessio et al. 2000	12 A	Μέγιστο αερόβιο τεστ μέχρι την εξάντληση σε διάδρομο	αίμα	MDA PC	+						=	+											
Ashton et al. 1998	12 9A+3Γ	Τεστ σε κυκλοεργόμετρο μέχρι την εξάντληση	αίμα	TAC	+																		
Bloomer et al. 2005	10 A	30 λεπτά ποδηλασία στο 70% της VO ₂ max	αίμα	MDA PC GSH GSSG GSSG/ TGSH	+						·	+	·	+	·	·	·	·	·	·	·	·	·
Borsheim et al. 1999	8 A	90 λεπτά ποδηλασία στο 58% της VO ₂ max	αίμα	TBARS	+							+											

Χρονικές στιγμές δειγματοληψίας	144 h										
	120 h				·	·	+	+			
	72 h		+		∴	+	·	+			
	48 h		·		‡	+	·	+			+
	24 h		∴		‡	+	∴	‡			+
	12 h										
	8 h										
	6 h										
	4,5 h										
	4 h										·
	3 h										·
	2 h										
	1 h										+
	30 min										+
	20 min										·
	15 min										
	10 min										
5 min					‡	·	- - -	=			
Post			·							+	·
Δείκτης		MDA		TBARS	CAT	GSH	GSSG		TGSH	TBARS	GSH
Ιστός		αίμα				αίμα			αίμα		αίμα
Είδος Άσκησης		30 λεπτά τρέξιμο στο 65 % της VO_2 max				Ημιμαραθώνιος			2 μπλοκ ποδηλασίας μέχρι την εξάντληση στο 90 % της VO_2 max, μεταξύ των οποίων μια ώρα ανάπαυση		Τρέξιμο σε διάδρομο για 12 λεπτά: Κλίση 4%, ταχυντ. 8,5 km/h
Δείγμα		8 A				7 A			7 A		Μια ομάδα 20 10A+10Γ
Συγγραφέας/ Έτος		Close et al. 2003				Duthie et al. 1990			Hellsten et al. 2001		Ilhan et al. 2004

Χρονικές στιγμές δειγματοληψίας								
	144 h							+
	120 h							
	72 h							‡
	48 h							+
	24 h							‡
	12 h							
	8 h							
	6 h							
	4,5 h							
	4 h							‡
	3 h							
	2 h							
	1 h							
	30 min		‡					·
	20 min		‡					+
	15 min							
	10 min		‡					+
	5 min		‡					·
	Post							‡
Δείκτης			TBARS		GSH		CAT	PC
Ιστός					αίμα		βιοψία	αίμα
Είδος Άσκησης			A: 2 λεπτά ανάπαυση για δειγματοληψία, B: 2 λεπτά με 0 watt αντίσταση για να φτάσουν συχνότητα 1 Hz, Γ: Στάδιο στο τέλος του οποίου ασκούνται στο 80% της VO ₂ max, Δ: 30 λεπτά ανάπαυση. Στο Γ ξεκινάει με 20 watt και αυξάνεται 20 watt/min μέχρι την εξάντληση				Ποδηλασία με το 1 πόδι για 45 λεπτά στο 70% της VO ₂ max	45 λεπτά άσκηση μέσης έντασης σε διάδρομο με κλίση 3°
Δείγμα				19 5A+14Γ			7 A	8 3AA+ 5ΘA
Συγγραφέας/ Έτος				Jammes et al. 2004			Khassaf et al. 2001	Kinnunen et al. 2005

Χρονικές στιγμές δειγματοληψίας							
	144 h						
	120 h						
	72 h						
	48 h				λ		'
	24 h	'	+		λ		'
	12 h						
	8 h						
	6 h						
	4,5 h						
	4 h						
	3 h						'
	2 h	+	‡				
	1 h				λ		'
	30 min	+	‡				
	20 min						
	15 min						'
	10 min						
	5 min	+	‡‡		λ		
	Post						'
Δείκτης		GSH	GSSG		TBARS		TBARS
Ιστός		αίμα			αίμα		αίμα
Είδος Άσκησης		Περπάτημα 10 λεπτά, χαλαρός καλπασμός 10 λεπτά, καλπασμός 2 λεπτά, χαλαρός καλπασμός 20 λεπτά, περπάτημα 10 λεπτά, μέγιστος καλπασμός 8 λεπτά			30 λεπτά ποδηλασία στο 50 % της VO ₂ max		Τρέξιμο μέχρι την εξάντληση (αρχική ταχ. 6 km/h αύξηση 2 km/h κάθε 3 λεπτά, κλίση 1%), ακολουθεί διάλειμμα 15 λεπτά και τρέξιμο στο 110% του ατομικού ανασερόβιου κατωφλιού μέχρι την εξάντληση, σύνολο περίπου 28 λεπτά
Δείγμα		6 4AA +	20A		15 A		13 A
Συγγραφέας/ Έτος		Mills et al. 1996			Sato et al. 2003		Schneider et al. 2003

Χρονικές στιγμές δειγματοληψίας	144 h																		
	120 h																		
	72 h																		
	48 h																		
	24 h		++		+														
	12 h		+++		+++														
	8 h		++																
	6 h				+++														
	4,5 h																		
	4 h		+																
	3 h				+														
	2 h		++																
	1 h		++						-				+++		-				
	30 min				+														
	20 min																		
	15 min																		
	10 min																		
	5 min																		
Post		+				+++		+				+++		---					
Δείκτης		TBARS		PC		MDA		CAT		CAT		Λεμφοκύτταρα		Ουδετερόφιλα					
Ιστός		αίμα		αίμα		αίμα		αίμα		αίμα		Λεμφοκύτταρα		Ουδετερόφιλα					
Είδος Άσκησης		Άσκηση σε κυκλοεργόμετρο, ξεκινά στα 50w και αυξάνεται 50w/2min μέχρι την εξάντληση		30 λεπτά κολύμβηση		Αυξανόμενο τεστ μέχρι την εξάντληση στο κυκλοεργόμετρο		Διαθλο		Διαθλο									
Δείγμα		18 A		Π		21 A		16 A				16 A							
Συγγραφέας/ Έτος		Senturk et al. 2005		Sumida et al. 2004		Sumida et al. 1989		Tauler et al. 2003				Tauler et al. 2003							

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Δείγμα

Στη μελέτη έλαβαν μέρος εθελοντικά 11 υγιείς άντρες οι οποίοι δε γυμνάζονταν συστηματικά (όχι πάνω από δύο φορές την εβδομάδα). Η ηλικία τους ήταν μεταξύ 18 και 30 έτη. Οι εθελοντές ενημερώθηκαν προφορικά για το σχεδιασμό της έρευνας και υπέγραψαν έντυπο συναίνεσης όπου τους εξηγούνταν η πειραματική διαδικασία, τα πλεονεκτήματα από τη συμμετοχή τους, οι προσδοκώμενες ωφέλειες και οι υποχρεώσεις τους. Για την έρευνα τηρήθηκαν οι κατευθυντήριες γραμμές του Κώδικα Δεοντολογίας Ερευνών του Δημοκρίτειου Πανεπιστημίου Θράκης και του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά (Μέση Τιμή ± Τυπική Απόκλιση).

Μεταβλητή	Μέση τιμή ± Τυπική Απόκλιση
Ηλικία (έτη)	23,4 ± 6,2
Ύψος (cm)	175 ± 3,5
Μάζα (Kg)	74,8 ± 5,3
Ποσοστό σωματικού λίπους %	14,3 ± 3,4
Μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου σε διάδρομο (ml / Kg / min)	47,2 ± 6,4

Διαδικασία

Οι εθελοντές ήλθαν στο Κέντρο Έρευνας και Αξιολόγησης της Φυσικής Απόδοσης (Κ.Ε.Α.Φ.Α.) του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τρεις φορές. Και τις τρεις φορές απείχαν από άσκηση τουλάχιστον για 3 ημέρες καθώς και από την πρόσληψη καφεΐνης και αλκοόλ για 24 ώρες. Στην πρώτη επίσκεψη τους στο Κ.Ε.Α.Φ.Α. πραγματοποιήθηκαν σωματομετρικές μετρήσεις και μέτρηση της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου ($VO_2 \max$). Δόθηκαν σε κάθε συμμετέχοντα φυλλάδια καταγραφής της διατροφής του για τρεις ημέρες καθώς επίσης προφορικές και γραπτές οδηγίες για τη σωστή καταγραφή αυτής. Στη δεύτερη επίσκεψη, με τυχαίο τρόπο, οι εθελοντές είτε έκαναν το πρωτόκολλο της άσκησης (συνθήκη άσκησης), είτε αυτό της ηρεμίας (συνθήκη ελέγχου). Το πρωτόκολλο ηρεμίας χρησίμευσε

ως συνθήκη ελέγχου για να διαπιστωθούν τυχόν ημερήσιες μεταβολές των δεικτών του οξειδωτικού στρες. Τέλος στην τρίτη επίσκεψη πραγματοποίησαν τη συνθήκη που υπολείπονταν (άσκηση ή ηρεμία).

Σωματομετρία

Στις σωματομετρικές μετρήσεις μετρήθηκε το σωματικό βάρος και ύψος των συμμετεχόντων καθώς και το σωματικό τους λίπος με τη μέθοδο των δερματοπτυχών (7th Ed. ACSM Guidelines for Exercise Testing and Prescription, 2006). Το σωματικό βάρος μετρήθηκε με ακρίβεια μισού κιλού (0,5 Kg) χρησιμοποιώντας το ζυγό Beam Balance 710, Seca, UK. Το σωματικό ύψος μετρήθηκε στο πλησιέστερο μισό εκατοστό (0,5 cm) με χρήση του Stadiometer 208, Seca, UK. Οι συμμετέχοντες μετρήθηκαν χωρίς υποδήματα και με ελαφρύ ντύσιμο. Τέλος για το ποσοστό σωματικού λίπους χρησιμοποιήθηκε το δερματοπτυχόμετρο Harpenden calliper, (John Bull, UK). Η μέτρηση έγινε εις διπλούν σε επτά σημεία και ο μέσος όρος κάθε μέτρησης χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση της πυκνότητας του σώματος και κατ' επέκταση του σωματικού λίπους.

Μέτρηση Μέγιστης Πρόσληψης Οξυγόνου ($VO_2 max$)

Η μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου πραγματοποιήθηκε σε εργοδιάδρομο του τύπου GXC200 (Powerjog, UK). Η ταχύτητα της άσκησης ξεκινούσε από τα 9 km/h και κάθε δύο λεπτά αυξανόταν κατά 1 km/h, μέχρι που ο συμμετέχων δεν θα μπορούσε να συνεχίσει πλέον την προσπάθεια (Paschalis et al. 2005). Η καρδιακή συχνότητα, η πρόσληψη του οξυγόνου και η παραγωγή του διοξειδίου του άνθρακα καταγραφόταν συνεχόμενα μέσω ενός ψηφιακού αναλυτή αερίων (SensorMedics 2900c, SensorMedics Corporation, USA). Χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια τα οποία έχει θέσει η Αμερικανική Αθλητιατρική Εταιρεία για την απόδειξη της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (7th Ed. ACSM Guidelines for Exercise Testing and Prescription, 2006).

Άσκηση Υπομέγιστης Έντασης

Οι εθελοντές μετά το τεστ εύρεσης της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου, εντός δύο εβδομάδων παρουσιάστηκαν στο εργαστήριο και πραγματοποίησαν το πρωτόκολλο υπομέγιστης έντασης. Οι εθελοντές ασκήθηκαν στον ίδιο εργοδιάδρομο όπου πραγματοποιήθηκε η διαδικασία για την μέτρηση της $VO_2 max$. Η άσκηση περιλάμβανε τρέξιμο για 45 min στο 70-75 % $VO_2 max$ και στη συνέχεια αύξηση της ταχύτητας του διαδρόμου σε ένταση που αντιστοιχούσε στο 90-95 % της $VO_2 max$, όπου συνέχισαν την προσπάθεια έως ότου εγκατέλειψαν λόγω εξάντλησης. Η θερμοκρασία στην οποία

πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμασίες ήταν 25 ± 2 °C, ενώ η σχετική υγρασία 48 ± 3 %. Ο συνολικός χρόνος που χρειαζόταν για την ολοκλήρωση της δοκιμασίας ήταν περίπου 60 λεπτά. Για να αποφευχθούν προβλήματα δυσανεξίας και μεταβολές στον όγκο του πλάσματος, κατά τη διάρκεια των 45 λεπτών της άσκησης, οι συμμετέχοντες μπορούσαν να πίνουν νερό κατά βούληση.

Διαιτολόγιο

Οι εθελοντές πριν τις δυο πειραματικές μέρες (ημέρα άσκησης υπομέγιστης έντασης και ημέρα συνθήκης ελέγχου) ακολούθησαν το ίδιο τριήμερο διαιτολόγιο. Πιο συγκεκριμένα στα φύλλα καταγραφής διαιτολογίου που τους δόθηκαν στην πρώτη επίσκεψή τους στο εργαστήριο κατέγραψαν την διατροφή τους τρεις μέρες πριν την δεύτερη επίσκεψή τους. Έτσι πριν την τρίτη επίσκεψη τους ακολούθησαν την διατροφή που είχαν καταγράψει. Την ημέρα επίσκεψης στο Κ.Ε.Α.Φ.Α. ήρθαν το πρωί στις 8:30 έπειτα από 8ωρη τουλάχιστον νηστεία. Μετά από μισή ώρα εξοικείωσης με το χώρο έγινε η λήψη αίματος για το δείγμα πριν την άσκηση. Στις 11:00 η ώρα τους δόθηκε ένα snack, ενώ μεσημεριανό έφαγαν μεταξύ 4^{ης} και 5^{ης} ώρας μετά την άσκηση. Δείπνο έφαγαν μετά το ενδέκατο δείγμα. Τα διαιτητικά χαρακτηριστικά της διατροφής τους αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας ένα διατροφικό σύστημα ανάλυσης [Science Fit Diet 200A (Sciencefit, Greece)].

Αιμοληψία

Από κάθε εθελοντή λήφθηκαν δώδεκα δείγματα αίματος των 8 ml από τη μεσοβασιλική φλέβα σε καθιστή θέση. Δειγματοληψίες έγιναν πριν την άσκηση (δείγμα ηρεμίας), αμέσως μετά την άσκηση και μισή, μία, δύο, τρεις, τέσσερις, πέντε, έξι, οκτώ, δέκα και 24 ώρες αργότερα.

Από το αίμα αυτό 1 mL διοχετεύτηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με αιθυλενοδιημιτρίλοτετραοξικό οξύ (EDTA) για τη μέτρηση της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη. Επίσης 1 mL αίματος διοχετεύτηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με EDTA και 1 mL TCA (5% TCA, 1:1, v:v). Σε αυτό προστέθηκαν και 40 μL 2-βουνιλ πυριδίνιο. Στη συνέχεια έγινε ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 6.000 στροφές για 10 λεπτά στους 5 °C. Το υπερκείμενο υγρό τοποθετήθηκε σε πολλαπλά σωληνάρια erpendorf σε ποσότητες των 200 μL στις οποίες προστέθηκαν 60 μL 5 % TCA. Ακολούθησε vortex και φυγοκέντρηση στις 16.000 στροφές για 5 λεπτά στους 5 °C. Το καθαρό υπερκείμενο αποτελούσε το αιμόλυμα το οποίο τοποθετήθηκε σε σωληνάρια erpendorf και αποθηκεύτηκε και αυτό

στους -20 °C μέχρι τη μέρα της μέτρησης της GSSG. Για την εξαγωγή του αιμολύματος που θα χρησιμοποιούνταν για την μέτρηση της GSH ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι δεν έγινε προσθήκη του 2-βυνιλ πυριδίνιου. Τέλος για την εξαγωγή του ορού, τα υπόλοιπα 5 mL αίματος διοχετεύτηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες και μετά από 20 λεπτά στον πάγο φυγοκεντρίθηκαν στις 3.500 στροφές για 10 λεπτά στους 5 °C. Το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε σε πολλαπλά σωληνάρια erpendorf και καταψύχθηκε στους -20 °C μέχρι την ημέρα της μέτρησης. Ο υπολογισμός της μεταβολής του όγκου του πλάσματος μετά την άσκηση σε σχέση με πριν έγινε σύμφωνα με την εξίσωση των Dill και Costill, (1974).

Διαδικασίες Μέτρησης Δεικτών Οξειδωτικού Στρες

Η μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης έγινε σύμφωνα με τους Reddy, Murthy, Krishna, Prabhakar, (2004), ενώ της οξειδωμένης σύμφωνα με τον Tietze (1969). Για τα TBARS ακολουθήθηκαν οι οδηγίες των Keles, Taysi, Sen, Aksoy, Akcay, (2001), ενώ για τα PC αυτές των Patsoukis et al. (2004). Τέλος για την CAT ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναφέρεται από τον Aebi (1984) και για την TAC αυτή των Janaszewska και Bartosz (2002).

Για τα TBARS ακολουθήθηκαν οι οδηγίες των Keles et al. (2001) σύμφωνα με τις οποίες σε δοκιμαστικούς σωλήνες Falcon προστέθηκαν 100 μ L ορού για τα δείγματα ή απιοντισμένου νερού για το “τυφλό”. Έπειτα αφού προστέθηκαν 500 μ L TCA 35 % και 500 μ L τρις – υδροχλωρίου έγινε ανάδευση στη συσκευή vortex και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 mL Na_2SO_4 -TBA και ακολούθησε επώαση στους 95 °C για 45 λεπτά. Τοποθετήθηκαν σε πάγο για 5 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκε 1 mL TCA 70 % και ακολούθησε νέα ανάδευση. Από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα Falcon μεταφέρθηκε 1 mL σε erpendorf και έγινε φυγοκέντριση στις 10.000 στροφές για 3 λεπτά. Τέλος μεταφέρθηκαν με πιπέτα 900 μ L του υπερκείμενου υγρού σε μια κιουβέτα και μετρήθηκε η απορρόφηση στο φωτόμετρο στα 530 nm.

Η τελική συγκέντρωση των TBARS υπολογίστηκε με την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{TBARS } (\mu\text{mol/L}) = (\text{Abs}_{\text{δείγμα}} - \text{Abs}_{\text{τυφλό}}) / 0,156 \times 31 \text{ (όπου Abs} \rightarrow \text{απορρόφηση).}$$

Εξίσωση 1.

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες των Patsoukis et al. (2004) όπου σε erpendorf προστέθηκαν 50 μ L ορού και 50 μ L 20 % TCA και έγινε ανάδευση στη συσκευή vortex. Ακολούθησε επώαση σε πάγο για 15 λεπτά και φυγοκέντριση στις 15.000 στροφές για 5 λεπτά στους 4 °C. Απομακρύνθηκε το

υπερκείμενο και προστέθηκαν στο ίζημα 0,5 mL διαλύματος 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη (DNPH) (σε 2,5 N υδροχλώριο) στα erpendorf με τα δείγματα ή 0,5 mL 2,5 N υδροχλώριο για το “τυφλό”. Έγινε ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε 15 λεπτά γινόταν ανάδευση. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντριση στις 15.000 στροφές για 5 λεπτά στους 4 °C. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και έγινε ανάδευση και φυγοκέντριση, όπως παραπάνω, αφού προστέθηκε 1 mL 10 % TCA. Έπειτα απομακρύνθηκε εκ νέου το υπερκείμενο υγρό και έγινε ανάδευση και φυγοκέντριση αφού προστέθηκαν 0,5 mL αιθανόλη και 0,5 mL αιθυλική ακετόνη (1:1, v:v). Επαναλήφθηκαν τα βήματα της αφαίρεσης του υπερκείμενου και της προσθήκης αιθανόλης και αιθυλικής ακετόνης δυο επιπλέον φορές. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1 mL ουρίας (5M, pH 2,3), έγινε ανάδευση και επώαση στους 37 °C για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 15.000 στροφές για 2-3 λεπτά στους 4 °C. Τέλος μετρήθηκε η απορρόφηση στο φωτόμετρο στα 375 nm. Η ολική πρωτεΐνη του ορού μετρήθηκε με τη χρήση αντιδραστηρίων Bradford. Η τελική συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίστηκε σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$PC \text{ (nmol/mL)} = [(Abs_{\text{δείγμα}} - Abs_{\text{τυφλό}}) / 0,022 \times 1000/50]/70.$$

Εξίσωση 2.

Η μέτρηση της TAC έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες των Janaszewska et al. (2002). Πιο συγκεκριμένα στα erpendorf κάθε “τυφλού” προστέθηκαν 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (10 mM, pH 7,4) και 500 μL 2,2-διφαινόλο-1 πικρυλδραζιλίου (DPPH) (0,1 μM), ενώ στα erpendorf του θετικού ελέγχου προστέθηκαν 495 μL και 500 μL, αντίστοιχα καθώς και 5 μL ασκορβικό οξύ (10 mM). Στα erpendorf των δειγμάτων προστέθηκαν 480 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, 500 μL DPPH και 20 μL ορού.

Ακολούθησε ανακίνηση των erpendorf αρκετές φορές και επώαση στο σκοτάδι για 30 λεπτά. Έπειτα έγινε φυγοκέντριση για 3 λεπτά στις 20.000 στροφές στους 25 °C. Στη συνέχεια μεταφέρθηκε το υπερκείμενο με τη χρήση πιπέτας σε καθαρές πλαστικές κιουβέτες και μετρήθηκε η απορρόφηση στο φωτόμετρο σε μήκος κύματος 520 nm.

Η τελική συγκέντρωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας βρέθηκε με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\% \text{ Abs (αναφορικά με το τυφλό)} = (Abs_{\text{τυφλό}} - Abs_{\text{δείγμα}}) / Abs_{\text{τυφλό}} \times 100$$

$$\mu\text{mol DPPH scavenged / ml ορού} = \% \text{ Abs} / 100 \times 50 \times 50 / 1000$$

Εξισώσεις 3,4.

Για την μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου της CAT χρησιμοποιήθηκαν οι οδηγίες του Aebi (1984) σύμφωνα με τις οποίες στις κιουβέτες των “τυφλών” τοποθετήθηκαν 2995 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (67 mM, pH 7,4), ενώ στις κιουβέτες των δειγμάτων 2975 μL του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος και 20 μL ορού. Ακολούθησε ανακίνηση των κιουβετών αρκετές φορές και επώαση στους 37 °C για 10 λεπτά. Έπειτα μεταφέρθηκε το περιεχόμενο σε μια γυάλινη UV κιουβέτα (υπεριώδους ακτινοβολίας) και έγινε ανακίνηση 3 φορές. Τέλος σε κάθε κιουβέτα ξεχωριστά προστέθηκαν 5 μL 30 % υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και μετρήθηκε αμέσως η μεταβολή της απορρόφησης στο φωτόμετρο στα 240 nm UV ακτινοβολίας για 1.5 λεπτά.

Η τελική δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίστηκε με την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Cat } (\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}) = (\Delta\text{Abs}_{\text{δείγμα}} - \Delta\text{Abs}_{\text{τυφλό}}) / 62,4 \times 150000$$

Εξίσωση 5.

Σύμφωνα με τους Reddy et al. (2004) για την GSH προστέθηκε σε κάθε erpendorf που προοριζόταν για “τυφλό” 660 μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,95), 330 μL 5,5-διθειο-δισ-(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (DTNB) (1 mM) και 20 μL απιοντισμένο νερό. Στα erpendorfs των δειγμάτων τοποθετήθηκαν 660 μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 67 mM (pH 7,95), 330 μL DTNB (1 mM) και 20 μL αιμόλυμα. Ακολούθησε ανακίνηση των erpendorfs αρκετές φορές και επώαση στο σκοτάδι για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση στο φωτόμετρο (Miltonroy Spectronic 401) στα 412 nm. Η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης σε mmol/L υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{GSH (mmol/L)} = \text{Abs}_{\text{δείγμα}} - \text{Abs}_{\text{τυφλό}} / 13,6 \times 131,3.$$

Εξίσωση 6.

Το αποτέλεσμα της εξίσωσης πολλαπλασιάστηκε με το δυο για να γίνει διόρθωση στην αραιώση που έγινε αρχικά με 5 % TCA (v:v, 1:1) και στη συνέχεια πολλαπλασιάστηκε με το 1,3 για να γίνει διόρθωση μετά την νέα αραιώση με τα 60 μL 5 % TCA. Η τιμή αυτή αποτελούσε την τελική συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.

Για την GSSG ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του Tietze (1969), σύμφωνα με τις οποίες αρχικά προσαρμόστηκε κάθε δείγμα αιμόλυματος σε pH μεταξύ 7,0 και 7,5. Αυτό έγινε με την προσθήκη σε 260 μL ολικού αίματος με TCA περίπου 20-30 μL καυστικού νατρίου (NaOH 1M). Στη συνέχεια προστέθηκαν 4 μL από το 2-βυνιλ πυριδίνιο και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Σε κάθε erpendorf που αφορούσε “τυφλό” προστέθηκαν 600 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών που περιείχε και EDTA (143 mM Na-P, 6,3 mM EDTA, pH 7,5), 100 μL NADPH, 100 μL

DTNB και 199 μL απιοντισμένου νερού. Στα eppendorfs των δειγμάτων και του "standard" προστέθηκαν οι ίδιες ποσότητες ρυθμιστικού διαλύματος, NADPH και DTNB όπως στο "τυφλό". Στα δείγματα προστέθηκε 194 μL απιοντισμένου νερού και 5 μL αιμολύματος, ενώ στο "standard" προστέθηκαν 124 μL απιοντισμένου νερού και 75 μL διαλύματος GSSG (10 $\mu\text{mol/L}$).

Ακολούθησε ανακίνηση των eppendorfs αρκετές φορές και επώαση για 5-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια σε κάθε eppendorf ξεχωριστά γινόταν προσθήκη 1 μL αναγωγάσης της γλουταθειόνης, ανακινούνταν αρκετές φορές και έπειτα μετριόταν η απορρόφηση στο φωτόμετρο στα 412 nm για 3 λεπτά σε πλαστικές κιουβέτες.

Η τελική συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης υπολογίστηκε σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{GSSG (mM)} = (\Delta\text{Abs}_{\text{δείγμα}} - \Delta\text{Abs}_{\text{τυφλό}}) / \Delta\text{Abs}_{\text{standard}} \times 0,75 \times 1000/5 \times 1,6.$$

Εξίσωση 7.

Ο αιματοκρίτης μετρήθηκε με τη μέθοδο μικροφυγοκέντρισης. Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης μετρήθηκε με τη χρήση αναλωσίμων και οδηγιών της εταιρίας Spinreact (Santa Coloma, Spain).

Εκτός από τις μετρήσεις της CAT και της GSSG οι οποίες πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν οι υπόλοιποι δείκτες αναλύθηκαν εις διπλούν. Οι αναλύσεις έγιναν την ίδια μέρα, εντός ενός μηνός από τη στιγμή που συλλέχθηκαν τα δείγματα και αποψύχονταν μόνο η ποσότητα του δείγματος που θα χρησιμοποιούνταν ώστε να περιοριστεί στο μέγιστο δυνατόν η μεταβλητότητα εξαιτίας της ψύξης-απόψυξης στις διαδικασίες μέτρησης.

Στατιστική Ανάλυση

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση. Οι συγκρίσεις των μεταβολών των συγκεντρώσεων όλων των παραμέτρων στα 12 χρονικά σημεία αιμοληψίας έγιναν με ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (συνθήκη \times χρόνος δείγματος) με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (two way ANOVA with repeated measures on time). Την εύρεση σημαντικής διαφοράς ακολούθησαν post hoc contrasts για να ανιχνευτούν διαφορές στις μεταβολές κατά συνθήκη ανάμεσα στα διάφορα χρονικά σημεία. Για να εκτιμήσουμε την σημαντικότητα των διαφορών στην ημερήσια πρόσληψη ενέργειας, θρεπτικών και αντιοξειδωτικών συστατικών μεταξύ των προσπαθειών, υπολογίστηκε το μέγεθος επίδρασης ως η διαφορά των μέσων τιμών μεταξύ των προσπαθειών 1 και 2 προς τη μέση τυπική απόκλιση των προσπαθειών 1 και 2. Σύμφωνα με την τροποποιημένη κλίμακα του Cohen (<http://newstats.org>) τα μεγέθη επίδρασης 0,2 -

0,6 – 1,2 – 2,0 και 4,0 θεωρήθηκαν μικρά, μεσαία, μεγάλα, πολύ μεγάλα και σχεδόν τέλεια. Για σύγκριση, οι τιμές της κλίμακας του Cohen είναι 0,2 για τις μικρές, 0,5 για τις μεσαίες και 0,8 για τις μεγάλες επιδράσεις. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $\alpha = 0,05$. Χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS, έκδοση 13,0 (SPSS Inc., USA).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ο όγκος του πλάσματος μετά την άσκηση ήταν το $0,99 \pm 0,03$ (μη σημαντική μεταβολή $p>0,05$) του αρχικού. Για το λόγο αυτό δεν χρειάστηκε να γίνουν διορθώσεις στα αποτελέσματα.

Σε γενικές γραμμές η διατροφή ήταν παρόμοια μεταξύ των δυο προσπαθειών εκτός από την πρόσληψη των υδατανθράκων και των λιπαρών, όπου οι διαφορές μπορούν να χαρακτηριστούν ως μεσαίες (π.χ. μέγεθος επίδρασης μεταξύ 0,6 και 1,2). Στη συνέχεια στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των διατροφικών τους συνηθειών ως μέσες τιμές \pm τυπική απόκλιση (SD).

Πίνακας 5. Ημερήσια ανάλυση ενεργειακής πρόσληψης των συμμετεχόντων σε συνθήκες ελέγχου και άσκησης (Μέση Τιμή \pm Τυπική Απόκλιση).

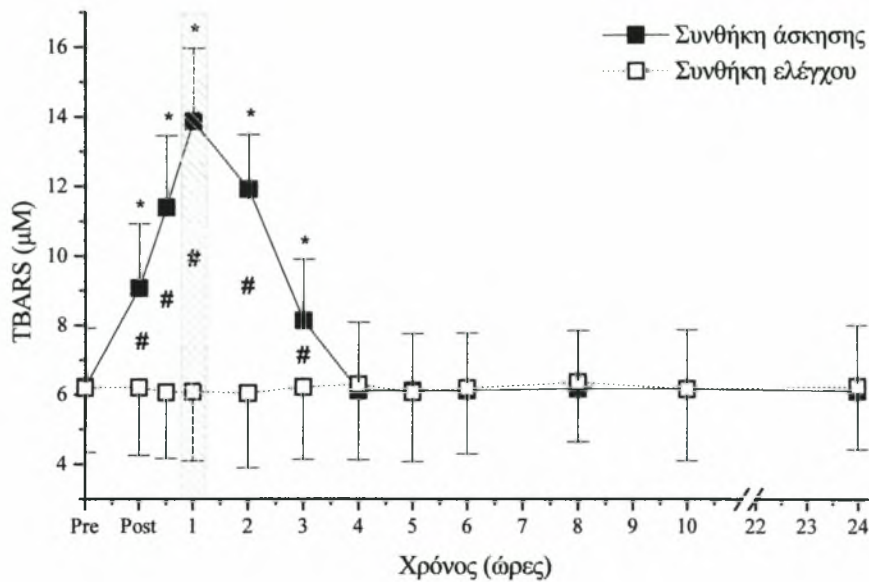
	Συνθήκη ελέγχου	Συνθήκη άσκησης	Μέγεθος επίδρασης
Ενέργεια (kcal)	2748 \pm 325	2802 \pm 391	0,15
Υδατάνθρακες (% ενέργεια)	54,8 \pm 7,0	49,9 \pm 5,3	0,80
Λιπαρά (% ενέργεια)	31,4 \pm 6,3	35,7 \pm 4,3	0,81
Πρωτεΐνες (% ενέργεια)	13,8 \pm 2,7	14,4 \pm 3,3	0,20
Βιταμίνη A (mg, RE) [#]	1,01 \pm 0,17	0,96 \pm 0,13	0,34
Βιταμίνη C (mg)	121 \pm 36	111 \pm 33	0,29
Βιταμίνη E (mg, α -TE) [†]	7,2 \pm 2,0	7,5 \pm 1,3	0,18
Σελήνιο (μ g)	40,3 \pm 7,0	40,9 \pm 6,3	0,09

[#]RE, ισοδύναμα ρετινόλης (1RE = 1 μ g ρετινόλης ή 12 μ g β -καροτένιο)

[†] α -TE, ισοδύναμα α -τοκοφερόλης

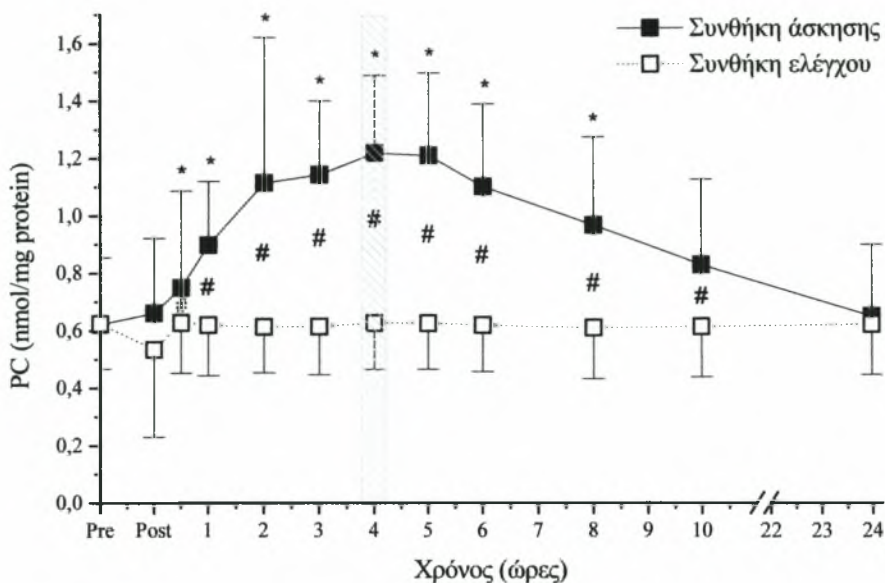
Η άσκηση αύξησε ($p<0,001$) τις συγκεντρώσεις των TBARS στις πρώτες πέντε δειγματοληψίες μετά την προσπάθεια. Οι συγκεντρώσεις τους πλησίασαν τα πριν την άσκηση επίπεδα από τις τέσσερις ώρες και μετά. Η μέγιστη αύξηση των επιπέδων τους σε ποσοστό 122,6 % παρατηρήθηκε μία ώρα μετά την άσκηση. Κατά τη συνθήκη ελέγχου δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές μεταβολές ($p>0,05$). Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης εμφανίστηκαν ($p<0,001$) για τα πέντε

πρώτα δείγματα μετά τη δοκιμασία. Η πλήρης εικόνα των διακυμάνσεων των συγκεντρώσεων των TBARS παρουσιάζεται στο σχήμα 2.



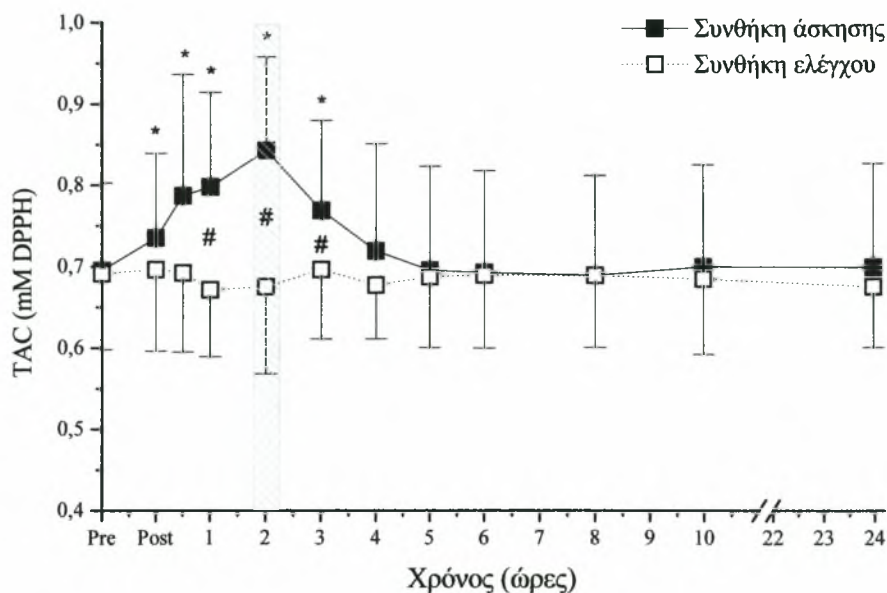
Σχήμα 2. Μεταβολή της συγκέντρωσης των ουσιών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) 24 ώρες μετά την άσκηση. * Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας. # Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.

Τα PC αυξήθηκαν ($p < 0,001$) μετά τη δραστηριότητα αλλά οι σημαντικές μεταβολές εμφανίστηκαν από το δείγμα των 30 λεπτών και μετά μέχρι και αυτό των οκτώ ωρών. Στο δείγμα των 10 ωρών οι συγκεντρώσή τους εξακολουθούσε να είναι αυξημένη και πλησίασε τα πριν την άσκηση επίπεδα στις 24 ώρες. Η μεγαλύτερη αύξηση (95,7 %) των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρατηρήθηκε στις τέσσερις ώρες μετά τη δοκιμασία και παρέμειναν εξίσου υψηλά (94,4 %) και μία ώρα αργότερα. Κατά τη συνθήκη ελέγχου δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές μεταβολές ($p > 0,05$). Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης εμφανίστηκαν ($p < 0,001$) από το δείγμα των 30 λεπτών μέχρι και αυτό των 10 ωρών. Στο σχήμα 3 παρουσιάζονται οι μεταβολές των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.



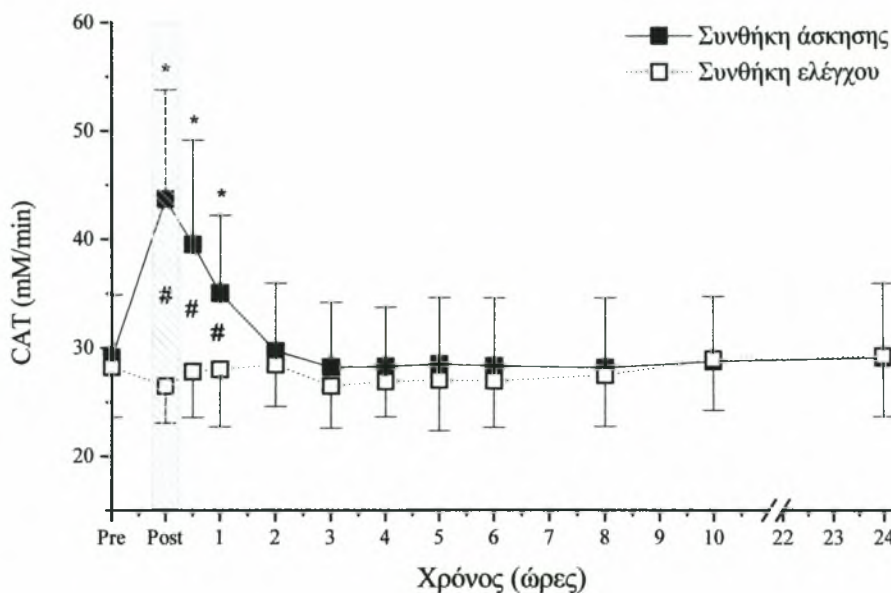
Σχήμα 3. Μεταβολή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) 24 ώρες μετά την άσκηση. * Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας. # Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.

Η συγκέντρωση της TAC αυξήθηκε ($p < 0,001$) μέχρι τις τρεις ώρες μετά την άσκηση, ενώ από τις τέσσερις ώρες και μετά επανήλθε σε τιμές ηρεμίας. Η κορύφωση της αύξησης της TAC παρατηρήθηκε δύο ώρες μετά την άσκηση και ήταν της τάξεως του 21,3 %. Επίσης, στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης εμφανίστηκαν ($p < 0,001$) για τα δείγματα στις μία, δύο και τρεις ώρες μετά τη δοκιμασία. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στις τιμές της TAC κατά τη συνθήκη ελέγχου ($p > 0,05$). Οι μεταβολές των συγκεντρώσεων της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσα στο 24ωρο τόσο για τη συνθήκη άσκησης όσο και για τη συνθήκη ελέγχου παρουσιάζονται στο σχήμα 4.



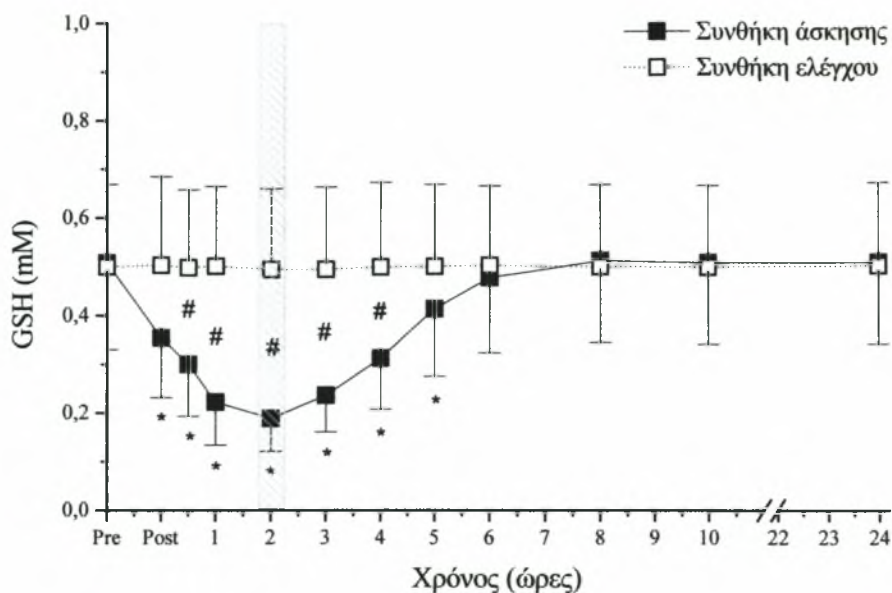
Σχήμα 4. Μεταβολή της συγκέντρωσης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) 24 ώρες μετά την άσκηση. * Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας. # Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.

Η ενζυμική δραστηριότητα της CAT παρουσίασε σημαντική αύξηση αμέσως μετά την άσκηση και διατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη για μία ώρα μετά το τέλος της άσκησης ($p < 0,001$). Από το δείγμα των δύο ωρών και μετά η δραστηριότητά της επανήλθε στα επίπεδα που εμφάνιζε πριν την προσπάθεια. Η υψηλότερη τιμή παρατηρήθηκε αμέσως μετά την άσκηση με αύξηση 50 %. Οι μεταβολές που παρουσιάστηκαν κατά τη συνθήκη ελέγχου δεν ήταν σημαντικές ($p > 0,05$). Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης εμφανίστηκαν ($p < 0,002$) στα τρία πρώτα δείγματα μετά την προσπάθεια. Στο σχήμα 5 παρουσιάζονται οι μεταβολές της δραστηριότητας του ενζύμου στο 24ωρο.



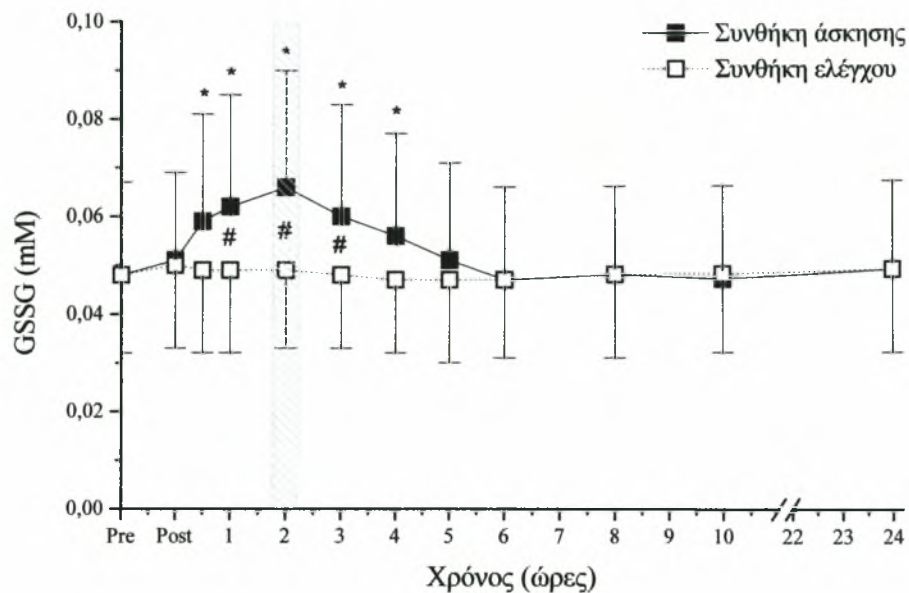
Σχήμα 5. Μεταβολή της δραστηριότητας της καταλάσης (CAT) 24 ώρες μετά την άσκηση.
 * Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας. # Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.

Τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης μετά την άσκηση μειώθηκαν σημαντικά για τις επόμενες πέντε ώρες ($p < 0,001$). Από το δείγμα των έξι ωρών μέχρι και αυτό των 24 η συγκέντρωσή της GSH προσέγγισε τα πριν την άσκηση επίπεδα. Η μεγαλύτερη μείωση ήταν της τάξεως του 62,8 % και εμφανίστηκε δύο ώρες μετά την προσπάθεια. Κατά τη συνθήκη ελέγχου δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές μεταβολές ($p > 0,05$). Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης εμφανίστηκαν ($p < 0,002$) από το δείγμα των 30 λεπτών έως και αυτό των τεσσάρων ωρών. Η συνολική εικόνα των αλλαγών για την GSH παρουσιάζεται στο σχήμα 6.



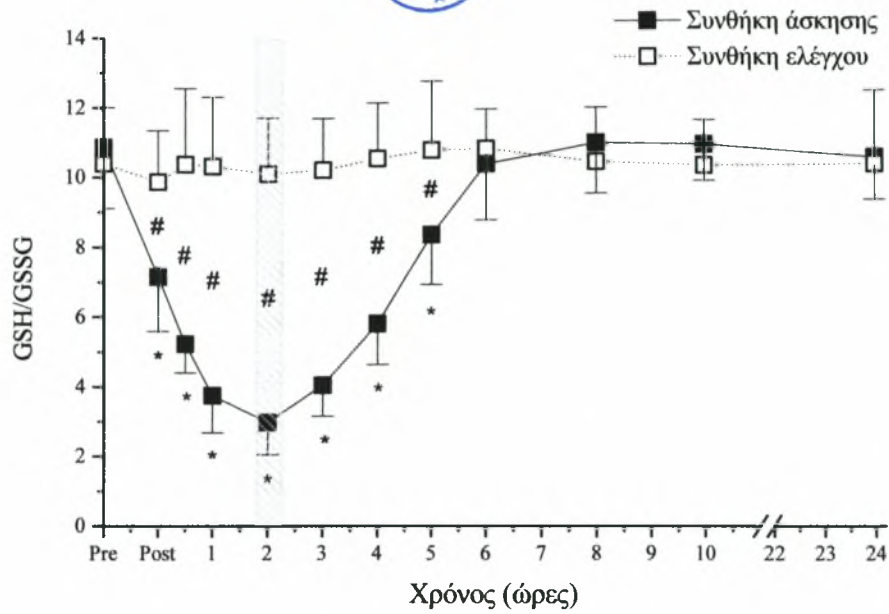
Σχήμα 6. Μεταβολή της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) 24 ώρες μετά την άσκηση. * Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας. # Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.

Η GSSG παρουσίασε αύξηση ($p < 0,002$) μετά την άσκηση με τις σημαντικές μεταβολές να εμφανίζονται από το δείγμα των 30 λεπτών μέχρι και αυτό των τεσσάρων ωρών. Η υψηλότερη τιμή της συγκέντρωσής της εμφανίστηκε στο δείγμα των δύο ωρών μετά την προσπάθεια και επήλθε έπειτα από αύξηση της τάξεως του 38,5 %. Τα επίπεδα της οξειδωμένης γλουταθειόνης πλησίασαν τις τιμές που εμφάνιζαν πριν την άσκηση από το δείγμα των πέντε ωρών και μετά. Κατά τη συνθήκη ελέγχου δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές μεταβολές ($p > 0,05$). Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης εμφανίστηκαν ($p < 0,001$) στα δείγματα στις μία, δύο και τρεις ώρες μετά την άσκηση. Τα αποτελέσματα των μεταβολών της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης παρουσιάζονται στο σχήμα 7.



Σχήμα 7. Μεταβολή της συγκέντρωσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) 24 ώρες μετά την άσκηση. * Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας. # Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.

Τέλος ο λόγος GSH/GSSG παρουσίασε σημαντική πτώση ($p < 0,001$) στα επτά πρώτα δείγματα μετά την άσκηση. Στη μικρότερη τιμή του που εμφανίστηκε στο δείγμα των δύο ωρών μετά την προσπάθεια υπήρξε πτώση 72,6 %. Από τις έξι ώρες και μετά η τιμή του προσέγγισε τα πριν την δοκιμασία επίπεδα. Κατά τη συνθήκη ελέγχου δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές μεταβολές ($p > 0,05$). Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης εμφανίστηκαν ($p < 0,001$) στο διάστημα από το δείγμα αμέσως μετά την άσκηση μέχρι και αυτό των πέντε ωρών. Οι μεταβολές των τιμών του λόγου παρουσιάζονται στο σχήμα 8.



Σχήμα 8. Μεταβολή των τιμών του λόγου ανηγμένης προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH/GSSG) 24 ώρες μετά την άσκηση. * Στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με την τιμή ηρεμίας. # Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης ελέγχου και της συνθήκης άσκησης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι υπάρχουν διαφορές στις μεταβλητές που εξετάστηκαν μεταξύ των συνθηκών ελέγχου και άσκησης που οφείλονται στη σωματική δραστηριότητα. Επίσης, η άσκηση προκάλεσε μεταβολές στις συγκεντρώσεις των δεικτών του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Τέλος, δεν εμφανίστηκαν μεταβολές στις συγκεντρώσεις των παραπάνω δεικτών στην συνθήκη ελέγχου.

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι η αερόβια άσκηση υψηλής σχετικά έντασης και διάρκειας επηρεάζει τους δείκτες του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού. Ωστόσο, δεν είναι γνωστή η διάρκεια και η μορφή των αλλαγών, που μπορεί να επέλθει στους παραπάνω δείκτες, μετά την άσκηση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι σε προηγούμενες έρευνες συλλέχθηκε περιορισμένος αριθμός δειγμάτων μετά την προσπάθεια ή συλλέχθηκαν αρκετά δείγματα αλλά σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά το τέλος της άσκησης.

Στην παρούσα μελέτη η συγκέντρωση των TBARS αυξήθηκε σημαντικά αμέσως μετά την άσκηση (45,6 %) μέχρι τρεις ώρες αργότερα (30,5 %). Οι Vider et al. (2001) και οι Sumida et al. (1989) αναφέρουν αυξήσεις στα επίπεδα των TBARS και της MDA αντίστοιχα της τάξεως του 19,2 % και 2,3 %. Επίσης οι Jammes et al. (2004) βρήκαν σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS για 30 λεπτά μετά την άσκηση (176,2 %), ενώ σε μελέτη τους οι Senturk et al. (2005) αναφέρουν μεταβολές 12 ώρες αργότερα (120 %). Οι συγκεντρώσεις στις παραπάνω μελέτες, με εξαίρεση την τελευταία, επέστρεψαν στα πριν την άσκηση επίπεδα μία ώρα μετά το τέλος της. Ακόμη οι συμμετέχοντες στην μελέτη των Vider et al. (2001) ήταν καλά προπονημένοι αθλητές αντοχής και το πρωτόκολλο άσκησης που εφάρμοσαν πιθανόν δεν αύξησε τα επίπεδα των TBARS αρκετά. Στη βιβλιογραφία ωστόσο υπάρχουν έρευνες που δεν βρήκαν σημαντική επίδραση της άσκησης στον παραπάνω δείκτη (Bloomer et al. 2005; Ilhan et al. 2004; Schneider et al. 2003).

Από την κινητική της παρούσας μελέτης για τα TBARS φάνηκε η μεγαλύτερη τιμή να εμφανίζεται μία ώρα μετά την άσκηση (122,6 %) και πλησίασε τα πριν την άσκηση επίπεδα τέσσερις ώρες αργότερα (-1,7 %). Οι Borsheim et al. (1999) πήραν τρία δείγματα

σε διάστημα τεσσεράμισι ωρών μετά την δοκιμασία και βρήκαν αύξηση στα επίπεδα των TBARS αλλά μη σημαντική. Οι Bloomer et al. (2005) δεν ανέφεραν σημαντικές αλλαγές στη συγκέντρωση της MDA, ενώ οι Schneider et al. (2003) βρήκαν μικρή πτώση στα επίπεδα των TBARS για 48 ώρες μετά την άσκηση. Πιθανότατα ο κύριος μηχανισμός με τον οποίο αυξάνεται η υπεροξειδωση των λιπιδίων μετά την άσκηση είναι η αύξηση της ευαισθησίας στην υπεροξειδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων (Houlbert, 2005), καθώς η αερόβια άσκηση αυξάνει σημαντικά τη συγκέντρωση των μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων στο αίμα (Nikolaidis, Mougios, 2004).

Τα δεδομένα σχετικά με τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά από οξεία αερόβια άσκηση σε ανθρώπους είναι περιορισμένα. Πιο συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη βρέθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του δείκτη αυτού από το δείγμα των 30 λεπτών (32,3 %) μέχρι και οκτώ ώρες (30,5 %) μετά την άσκηση, ενώ πλησίασε τα επίπεδα πριν την άσκηση (3,5 %) 24 ώρες μετά. Οι Alessio et al. (2000) σε μελέτη τους βρήκαν αύξηση στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αμέσως μετά την άσκηση (63,6 %), ενώ μία ώρα αργότερα μειώθηκε η συγκέντρωσή τους και σε σχέση με τα επίπεδα ηρεμίας ήταν αυξημένα κατά 22,7 %. Σε μια άλλη μελέτη σε ανθρώπους οι Bloomer et al. (2005) βρήκαν αύξηση στη συγκέντρωση του δείκτη κατά 66,7 % αμέσως μετά το τέλος του πρωτοκόλλου αλλά μη σημαντική. Στα υπόλοιπα 3 δείγματά τους ήταν αυξημένη η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αλλά σε μικρότερο ποσοστό. Οι διαφορές μεταξύ των ευρημάτων των μελετών που αναφέρθηκαν και της παρούσας μελέτης πιθανότατα οφείλεται στο πρωτόκολλο άσκησης που χρησιμοποιήσαμε και ήταν περισσότερο απαιτητικό από το δικό τους. Επίσης στην έρευνα των Bloomer et al. (2005) οι συμμετέχοντες ήταν αερόβια προπονημένοι και πιθανότατα είχαν περιορισμένη αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με μη γυμνασμένους όπως ήταν οι εθελοντές της παρούσας μελέτης.

Οι Kinnunen et al. (2005) σε έρευνα τους σε άλογα βρήκαν σημαντική αύξηση στα επίπεδα του δείκτη αμέσως μετά την άσκηση (23,8 %), στις τέσσερις (33,3 %) και στις 24 ώρες (14,3 %) αργότερα. Επίσης οι Sumida et al. (2004) σε μελέτη τους σε ποντίκια βρήκαν αύξηση στις έξι (12,6 %) και 12 (15,2 %) ώρες μετά τη δοκιμασία.

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που εξετάζει τη μεταβολή του παραπάνω δείκτη για 24 ώρες μετά την άσκηση με λήψη 11 δειγμάτων αίματος στο διάστημα αυτό. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αυξήθηκε μετά την άσκηση και η μεγαλύτερη τιμή παρατηρήθηκε στις τέσσερις ώρες μετά (95,7 %) παραμένοντας υψηλά

και στις πέντε ώρες (94,4 %). Μετά από αυτό το χρονικό σημείο ακολούθησε προοδευτική μείωση μέχρι τις 24 ώρες όπου πλησίασε τα πριν την άσκηση επίπεδα (3,5 %).

Η αλβουμίνη αποτελεί περίπου το 60 % των πρωτεϊνών του ορού (Anderson, N.L., Anderson, N.G., 2002). Η αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων που εμφανίζεται μετά την άσκηση πρέπει να οφείλεται κυρίως στην οξειδωση της αλβουμίνης και των άλλων κύριων πρωτεϊνών του ορού (αντισώματα, τρανσφερίνη κ.ά.). Τα καρβονύλια σχηματίζονται από την οξειδωση των αμινοξέων (αργινίνη, λυσίνη, θρεονίνη, προλίνη). Τα PC παράγονται ως αποτέλεσμα δευτερευόντων αντιδράσεων με αμινοξέα, υδατάνθρακες και λιπαρά οξέα (Uchida, Stadtman, 1993) και περιέχουν αμινοξέα ή αμινομάδες οι οποίες αποβάλλονται από τον οργανισμό με τον ιδρώτα και τα ούρα.

Ο οργανισμός στην προσπάθειά του να αποφύγει τη συγκέντρωση άχρηστων πρωτεϊνών προχωρά στην αποδόμησή τους με τη βοήθεια ενζύμων που ονομάζονται πρωτεϊνάσες. Η ενδοκυτταρική αποδόμηση των πρωτεϊνών είναι μια αυστηρά ελεγχόμενη φυσιολογική διαδικασία (Radak, 2000). Τα PC περιέχουν αμινοξέα ή αμινομάδες οι οποίες πιθανότατα αποβάλλονται από τον οργανισμό με μια διαδικασία τριών σταδίων. Το πρώτο ονομάζεται τρανσαμίνωση και γίνεται με τη βοήθεια ενζύμων, των αμινοτρανσφερασών. Η συγκέντρωση των ενζύμων αυτών είναι μεγάλη στο ήπαρ και πολύ χαμηλή στο αίμα. Τα άλλα δυο στάδια είναι η οξειδωτική απαμίνωση και ο κύκλος της ουρίας (Μούγιος, 1995). Αυτές οι διαδικασίες πραγματοποιούνται στο ήπαρ το οποίο απαιτεί αρκετό χρόνο για να τις ολοκληρώσει. Πιθανόν αυτός είναι και ο λόγος που βρήκαμε αυξημένη σημαντικά τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων για οκτώ ώρες μετά την άσκηση.

Η συγκέντρωση της TAC από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φάνηκε να αυξάνεται σημαντικά για τις τρεις πρώτες ώρες μετά την άσκηση. Οι Vider et al. (2001) χρησιμοποίησαν στην μελέτη τους άτομα προπονημένα αερόβια και βρήκαν σημαντική αύξηση της TAC αμέσως μετά την άσκηση (4,3 %) και 30 λεπτά αργότερα (6,5 %). Οι Ashton et al. (1998) βρήκαν μικρή αύξηση (10,8 %) αμέσως μετά την άσκηση. Η μέγιστη συγκέντρωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε δύο ώρες μετά την άσκηση (21,3 %) και επέστρεψε στα επίπεδα ηρεμίας πέντε ώρες αργότερα (0,06 %).

Η αύξηση της TAC μετά την άσκηση δείχνει ότι ενεργοποιείται η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Η κινητικότητα προς το πλάσμα των αποθηκευμένων αντιοξειδωτικών στους ιστούς (όπως το ουρικό οξύ) είναι πιθανόν ένας από τους μηχανισμούς στους οποίους οφείλεται η αύξηση (και όχι η μείωση όπως αναμενόταν) της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας μετά την άσκηση. Αυτό είναι ένα ευρέως αποδεκτό

φαινόμενο το οποίο θα μπορούσε να βοηθήσει στο χειρισμό ή και στην αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα όταν θα υπήρχε ανάγκη (Prior et al. 1999). Η αύξηση της δραστηριότητας της CAT μετά την άσκηση μπορεί επίσης να συμβάλει στην αύξηση της TAC.

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω η TAC είναι ένας δείκτης που συναθροίζει τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών (ουρικό οξύ, βιταμίνες E, C, β-καροτένιο, γλουταθειόνη, καταλάση, υπεροξειδίο της δισμουτάσης κ.ά.). Στα βιολογικά υγρά το ουρικό οξύ αποτελεί το βασικό στοιχείο των περισσότερων διαδικασιών μέτρησης της TAC. Αρκετές φορές αποτελεί περισσότερο από το 50 % της ολικής αντιοξειδωτικής δραστηριότητας (Young, 2001) και αυτός είναι ο λόγος που θα εστιάσουμε στην παράμετρο αυτή. Είναι γνωστό ότι το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών (Radak, 2000; Sjodin, Westing, Apple, 1990). Η συγκέντρωσή του αυξάνεται στο αίμα μετά από μια έντονη μυϊκή συστολή (Green, Fraser, 1988; Radak et al. 1995). Ο οργανισμός πρέπει να απομακρύνει το ουρικό οξύ γιατί θα δημιουργηθούν προβλήματα στις αρθρώσεις με την εναπόθεσή του σ' αυτές ως άλας. Το ρόλο αυτό αναλαμβάνουν τα νεφρά που απομακρύνουν τα 2/3 του ουρικού οξέος που παράγεται ημερησίως, ενώ το υπόλοιπο 1/3 απομακρύνεται με τα κόπρανα. Γίνεται αντιληπτό ότι απαιτούνται ορισμένες ώρες ώστε τα νεφρά να φιλτράρουν το αίμα και να μειώσουν την συγκέντρωση του ουρικού οξέος που αυξήθηκε μετά την άσκηση.

Για την CAT από τα αποτελέσματά της παρούσας έρευνας φάνηκε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της για μία ώρα μετά τη δοκιμασία. Σημαντική αύξηση αμέσως μετά την άσκηση (28,1 %) βρέθηκε και από τους (Vider et al. 2001). Οι Tauler et al. (2003) βρήκαν σημαντική αύξηση αμέσως μετά την άσκηση (338 %) και μία ώρα αργότερα (520 %) στα λεμφοκύτταρα. Στα ουδετερόφιλα βρήκαν σημαντική μείωση αμέσως μετά την άσκηση (-28,4 %). Σε μια άλλη μελέτη των Tauler et al. (2003) αναφέρεται αύξηση 16,3 % στο πρώτο δείγμα μετά την άσκηση και πτώση κατά 16,6 % μία ώρα αργότερα. Είναι απαραίτητο να αναφέρουμε ότι οι Tauler et al. (2003) χρησιμοποίησαν για πρωτόκολλο άσκησης έναν αγώνα διάθλου και συμμετείχαν αθλητές. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε ένα λιγότερο απαιτητικό πρωτόκολλο σε μη αθλούμενους. Επίσης στη μια μελέτη τους οι Tauler et al. (2003) μέτρησαν τους δείκτες του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα (λευκά αιμοσφαίρια). Το γεγονός αυτό σίγουρα αποτελεί παράγοντα διαφοροποίησης των ευρημάτων τους σε σχέση με μελέτες όπου έκαναν τις μετρήσεις στον ορό. Αυτοί πιθανόν είναι οι λόγοι των διαφορών μεταξύ των ευρημάτων των προαναφερθέντων ερευνών. Επίσης στη βιβλιογραφία υπάρχουν μελέτες

που δεν βρήκαν σημαντικές μεταβολές (Duthie et al. 1990; Khassaf et al. 2001). Η μεγαλύτερη δραστικότητα της CAT στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε αμέσως μετά την άσκηση και πλησίασε τα πριν την δοκιμασία επίπεδα δύο ώρες αργότερα (2 %).

Η CAT δεν έχει κάποια συγκεκριμένη λειτουργία στον ορό καθώς αποτελεί ένα ενδοκυτταρικό ένζυμο. Για αυτό η αυξημένη δραστικότητά της μετά την άσκηση πιθανόν δείχνει αυξημένη καταστροφή μυϊκών ινών ή ερυθροκυττάρων και εκροή της CAT στο πλάσμα του αίματος.

Για την GSH από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φάνηκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσής της αμέσως μετά την άσκηση (-30,4 %) που διατηρήθηκε για πέντε ώρες (-18,8 %). Οι Weiss et al. (2002) ανέφεραν σημαντική πτώση αμέσως μετά την άσκηση (-25 %), ενώ τα επίπεδά της παρέμειναν κάτω από τα επίπεδα ηρεμίας 24 ώρες αργότερα. Σε μια άλλη μελέτη οι Duthie et al. (1990) βρήκαν μειωμένα τα επίπεδα της GSH για 72 ώρες μετά τη δοκιμασία αλλά σημαντικές μεταβολές παρατήρησαν στα δείγματα πέντε λεπτά μετά την άσκηση (-35,06 %) (όπως και οι Jammes et al. 2004, -22,2 %) και 24 ώρες μετά (-18,2 %). Από την άλλη πλευρά οι Ilhan et al. (2004) αναφέρουν μικρή πτώση για τις τέσσερις πρώτες ώρες μετά την άσκηση και αύξηση στις 24 ώρες. Τέλος σε μελέτη που έγινε σε άλογα δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές (Mills et al. 1996). Με εξαίρεση την μελέτη των Jammes et al. (2004) οι εθελοντές των υπολοίπων μελετών συμμετείχαν σε αθλητικά γεγονότα. Είναι γνωστό ότι οι αθλητές αντιμετωπίζουν με καλύτερο τρόπο το οξειδωτικό στρες μετά την άσκηση (Goldfarb, You, Bloomer, Landes, Murphy, 2002). Αυτός πιθανόν είναι και ο λόγος για τα διαφορετικά χρονικά σημεία στα οποία βρέθηκαν οι διαφορές μεταξύ των ευρημάτων της παρούσας μελέτης και αυτών που προαναφέρθηκαν. Επίσης οι Duthie et al. (1990) ανέφεραν μεταβολές για μεγάλο χρονικό διάστημα και αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι χρησιμοποίησαν μια κούρσα ημιμαραθωνίου ως πρωτόκολλο άσκησης (πολύ πιο απαιτητικό σε σύγκριση με αυτό της παρούσας μελέτης).

Στην παρούσα έρευνα τα επίπεδα της GSH μειώνονται μετά την άσκηση και η μικρότερη τιμή παρατηρήθηκε δύο ώρες αργότερα (-62,9 %). Η επιστροφή στα πριν την άσκηση επίπεδα έγινε έξι ώρες μετά τη δοκιμασία (-6,1 %). Οι Bloomer et al. (2005) βρήκαν πτώση στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης αμέσως μετά την ποδηλασία (-32,6 %) και επιστροφή στις τιμές ηρεμίας μία ώρα αργότερα.

Όσο αφορά τη συγκέντρωση της GSSG από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φάνηκε να είναι σημαντικά αυξημένη στις τέσσερις πρώτες ώρες μετά την άσκηση. Οι Bloomer et al. (2005) βρήκαν σημαντική αύξηση αμέσως μετά την άσκηση,

ενώ οι Watson et al. (2005) αμέσως μετά την άσκηση ήπιας έντασης του πρωτοκόλλου τους. Επίσης στην έρευνα των Mills et al. (1996) σε άλογα βρέθηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα της GSSG στα πέντε λεπτά μετά τη δοκιμασία, με τη συγκέντρωσή της να παραμένει αρκετά υψηλά και για τις επόμενες δυο ώρες. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση της GSSG παρατηρήθηκε στις δύο ώρες μετά την άσκηση (38,5 %) στην παρούσα μελέτη. Οι Weiss et al. (2002) αναφέρουν αύξηση των επιπέδων της GSSG μετά την άσκηση για έξι ώρες και πτώση στις 24 ώρες αλλά χωρίς αυτές οι μεταβολές να είναι σημαντικές. Οι Bloomer et al. (2005) βρήκαν αύξηση που άγγιζε τη στατιστική σημαντικότητα αμέσως μετά την άσκηση και επιστροφή στις τιμές ηρεμίας μία ώρα αργότερα. Όπως έχουμε προαναφέρει οι συμμετέχοντες των παραπάνω ερευνών ήταν προπονημένοι αερόβια και ίσως αυτό να επηρέασε το ποσοστό αύξησης της GSSG.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι μετά από έντονη άσκηση η ηπατική προμήθεια σε GSH δεν επαρκεί να καλύψει τις αυξημένες ανάγκες της, που δημιουργούνται από την αύξηση των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό. Επίσης αυξάνεται η απομάκρυνση της GSH από το αίμα στη διάρκεια και αρκετές ώρες μετά το τέλος της άσκησης. Είναι ενδιαφέρον να παρατηρήσουμε ότι οι συγκεντρώσεις της GSH και της GSSG μετά την άσκηση κινούνται αντίστροφα όχι μόνο ποιοτικά αλλά και ποσοτικά. Για παράδειγμα και οι δυο ουσίες παρουσιάζουν την μέγιστη μεταβολή στη συγκέντρωσή τους στις δύο ώρες μετά την άσκηση, με την GSH να μειώνεται κατά 63 % και την GSSG να αυξάνεται κατά 38,5 %, γεγονός από το οποίο συνεπάγεται ότι η συγκέντρωση της ολικής γλουταθειόνης στο αίμα παραμένει σχετικά σταθερή. Ωστόσο φαίνεται ότι αξιόπιστα συμπεράσματα μπορούν να εξαχθούν σχετικά με το δείκτη της γλουταθειόνης εάν μετρηθεί μια από τις δυο μορφές της (GSH – GSSG).

Όπως προαναφέρθηκε το ήπαρ παίζει τον κύριο ρόλο στο μεταβολισμό της GSH. Πιθανόν αυτός είναι ο λόγος που η συγκέντρωση της GSH καθυστερεί αρκετές ώρες μετά την άσκηση να επιστρέψει στα επίπεδα ηρεμίας. Χρειάζεται αρκετό χρόνο το ήπαρ να “φιλτράρει” το αίμα και να μεταβολίσει την GSH ή την GSSG.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης φάνηκε σημαντική πτώση στο λόγο GSH/GSSG αμέσως μετά την άσκηση (-34,1 %) μέχρι πέντε ώρες αργότερα (-23,2 %), με τη μικρότερη τιμή του λόγου να παρατηρείται δύο ώρες μετά την άσκηση (-72,6 %) και να προσεγγίζει την τιμή ηρεμίας στις έξι ώρες (-4,5 %). Οι Watson et al. (2005) βρήκαν σημαντική μείωση του λόγου αμέσως μετά τη δοκιμασία (-42,3 %) και μία ώρα αργότερα (-38,5 %), ενώ οι Weiss et al. (2002) βρήκαν σημαντική πτώση μόνο στο δείγμα αμέσως μετά την άσκηση.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επτά δείκτες του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού σε αντίθεση με τις περισσότερες μελέτες όπου χρησιμοποιούνται δυο με τρεις δείκτες. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι κανένας δείκτης από μόνος του δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αξιόπιστα για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες γιατί όλοι εμφανίζουν ορισμένα μειονεκτήματα (Ashton et al. 1999; Clarkson et al. 2000; Cooper et al. 2002; Jenkins, 2000; Ji, 1995; Kohen et al. 2000). Έτσι ένα σύνολο δεικτών του οξειδωτικού στρες θα αποτελούσε μια περισσότερο αξιόπιστη μέθοδο για την εκτίμησή του. Οι δείκτες αυτοί θα πρέπει να σχετίζονται με τις επιδράσεις των ριζών στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και το DNA. Επίσης καλό είναι να περιλαμβάνεται η TAC και άλλα αντιοξειδωτικά. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείκτες για όλα όσα προαναφέρθηκαν εκτός από την καταστροφή του DNA. Επίσης όλοι οι δείκτες μετά την άσκηση που πραγματοποιήθηκε έδειξαν αύξηση του οξειδωτικού στρες.

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι εάν επιθυμούμε με τις δειγματοληψίες να βρούμε τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των παραπάνω δεικτών σε απροπόνητα άτομα, νεαρής ηλικίας θα πρέπει αυτές να γίνουν σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές μετά την άσκηση. Πιο συγκεκριμένα α) τα TBARS στη μία ώρα μετά, β) τα PC στις τέσσερις ώρες μετά, γ) η TAC στις δύο ώρες μετά, δ) η CAT αμέσως μετά και ε) η GSH, η GSSG όπως και ο λόγος τους δύο ώρες μετά. Εκτός από την CAT που είναι ένζυμο και όπως φάνηκε έχει άμεσες μεταβολές οι άλλοι δείκτες χρειάζονται χρόνο για να μεγιστοποιηθούν οι συγκεντρώσεις τους στο αίμα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά σχετικά με τις μηδενικές υποθέσεις που έγιναν μπορούν να αναφερθούν τα παρακάτω:

A) Βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της συνθήκης έλεγχου και της συνθήκης άσκησης σε όλους τους δείκτες.

B) Βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές των συγκεντρώσεων όλων των δεικτών μετά το πρωτόκολλο άσκησης.

Γ) Δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές σε κανέναν δείκτη για τη συνθήκη ελέγχου.

Εύκολα διαπιστώνουμε από τη βιβλιογραφία ότι οι δειγματοληψίες γίνονται σε ποικίλα χρονικά σημεία ανάλογα με το πρωτόκολλο και τους στόχους των ερευνών. Το γεγονός αυτό δεν επιτρέπει τη σύγκριση των αποτελεσμάτων τους. Η παρούσα μελέτη υποδεικνύει τα χρονικά σημεία στα οποία εμφανίζεται η κορύφωση των διαφόρων δεικτών του οξειδωτικού στρες μετά από οξεία αερόβια άσκηση σε απροπόνητα νεαρά άτομα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οδηγός για τους ερευνητές, ώστε να είναι συγκρίσιμα και τα αποτελέσματά τους.

Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

Η διάρκεια των μεταβολών των δεικτών του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού αποτελεί έναν τομέα στον οποίο υπάρχει περιορισμένη βιβλιογραφία. Με την παρούσα εργασία παρουσιάστηκαν πληροφορίες για το θέμα αυτό και τα ευρήματά της θα μπορούσαν να ενισχυθούν με επιπλέον μελέτες που θα κάλυπταν τα χρονικά σημεία στα οποία δεν έγιναν δειγματοληψίες. Επίσης θα μπορούσαν να προστεθούν δείκτες της επίδρασης των ελευθέρων ριζών στο DNA καθώς και πιο πρόσφατοι και αξιόπιστοι δείκτες του οξειδωτικού στρες. Επιπλέον παρόμοιες μελέτες θα μπορούσαν να γίνουν με διαφορετικά είδη άσκησης (π.χ. αναερόβια, υπερμαραθώνιοι, κ.ά.).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
- Alessio, H.M., Hagerman, A.E., Fulkerson, B.K., Ambrose, J., Rice, R.E. & Wiley, R.L. (2000). Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Medicine Science Sports & Exercise*, 32, 1576-1581.
- Ames, B.N., Catchcart, R., Schwiers, E. & Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 78, (11), 6858-6862.
- Anderson, N.L. & Anderson, N.G. (2002). The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects. *Molecular & Cellular proteomics*, 1, 845-867.
- Antunes, F., Derick, H. & Cadenas, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in vivo conditions. *Free Radical Biology & Medicine*, 33, (9), 1260-1267.
- Arosio, P. & Levi, S. (2002). Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 33, (4), 457-463.
- Aruoma, O.I. (1999). Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 8, (1), 53-63.
- Ashton, T., Rowlands, C.C., Jones, E., Young, I.S., Jackson, S.K., Davies, B. & Peters J.R. (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *European Journal Applied Physiology*, 77, (6), 498-502.
- Ashton, T., Young, I.S., Peters, J.R., Jones, E., Jackson, S.K., Davies, B. & Rowlands, C.C. (1999). Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *Journal Applied Physiology*, 87, (6), 2032-2036.
- Atanasiu, R.L., Stea, D., Mateescu, M.A., Vergely, C., Dalloz, F., Briot, F., Maupoil, V., Nadeau, R. & Rochette, L. (1998). Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 189, 127-135.
- Barja, G. (2004). Free radicals and aging. *Trends in Neurosciences*, 27, 595-598.
- Bigard, A.X. (2001). Le'sions musculaires induites par l'exercice et surentrainement. *Science in Sports*, 16: 204-215.
- Bloomer, R.J., Goldfarb, A.H., Wideman, L., McKenzie, M.J. & Consitt, L.A. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 19, 276-285.
- Borsheim, E., Knardahl, S. & Hostmark, A. (1999). Short-term effects of exercise on plasma very low density lipoproteins (VLDL) and fatty acids. *Medicine Science Sports & Exercise*, 31, 522-530.

- Boveris, A. & Chance B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemistry Journal*, 134, 707-716.
- Brantley, R.E., Smerdon, S.J., Wilkinson, A.J., Singleton, E.W. & Olson, J.S. (1993). The mechanism of autoxidation of myoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 268, (10), 6995-7010.
- Cao, G. & Prior, R.L. (2000). Postprandial increases in serum antioxidant capacity in older women. *Journal Applied Physiology*, 89, 877-883.
- Cheeseman, K.H. & Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49, (3), 481-493.
- Chen, S.S., Chang, L.S. & Wie, Y.H. (2001). Oxidative damage to proteins and decrease of antioxidant capacity in patients with varicocele. *Free Radical Biology & Medicine*, 30, (11), 1328-1334.
- Childs, A., Jacobs, C., Kaminski, T., Halliwell, B. & Leeuwenburgh, C. (2001). Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, 31, (6), 745-753.
- Clarkson, P.M. (1995). Antioxidants and physical performance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35, 131-141.
- Clarkson, P.M. & Thompson, H.S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *American Journal Clinical Nutrition*, 72, (S), 637-646.
- Close, G.L., Ashton, T., Cable, T., Doran, D. & MacLaren, D.P.M. (2004). Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayed onset muscle soreness: the role of reactive oxygen species. *European Journal Applied Physiology*, 91, 615-621.
- Cooper, C.E., Vollaard, N.B.J., Choueiri, T. & Wilson M.T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical society transactions*, 30, 280-285.
- Crane, F.L. (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition*, 20, (6), 591-598.
- Davies, K.J.A., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A., & Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 107, 1198-1205.
- Davies, K.J.A., Sevanian, A., Muakkassah-Kelly, S.F. & Hochstein, P. (1986). Uric acid-iron ion complexes: a new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochemical Journal*, 235, 747-754.
- Dekkers, J.C., Van Doornen, L.J. & Kemper, H.C. (1996). The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise induced muscle damage. *Sports Medicine*, 21, (3), 213-238.

- Di Meo, S. & Venditti, P. (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biological Signals and Receptorst*, 10, 125-140.
- Dill, D.B. & Costil, D.L. (1974). Calculation of percentage changes in volumes of blood plasma, and red blood cells in dehydration. *Journal Applied Physiology*, 37, 247-248.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. & Rodriguez, H. (2002). Free radical induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology & Medicine*, 32, (11), 1102-1115.
- Duthie, G.G. (1999). Determination of activity of antioxidants in human subjects. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 58, (4), 1015-1024.
- Duthie G.G., Robertson, J.D., Maughan, R.J. & Morrice, P.C. (1990) Blood Antioxidant Status and Erythrocyte Lipid Peroxidation following Distance Running. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 282: 78-83.
- Elosua, R., Molina, L., Fito, M., Arquer, A., Sanchez-Quesada, J.L., Covas, M.I., Ordonez-Lianos, J. & Marrugat, J. (2003). *Atherosclerosis*, 167, 327-334.
- Evans, W.J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *American Journal Clinical Nutrition*, 72, (S), 647-652.
- Fehrenbach, E. & Northoff, H. (2001). Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exercise Immunology Review*, 7, 66-89.
- Finaud, J., Lac, G. & Filaire, E. (2006). Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training. *Sports Medicine*, 36, (4), 327-358.
- Frank, J., Pompella, A. & Biesalski, H.K. (2000). Histochemical visualization of oxidant stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, (11), 1096-1105.
- Frederiks, W.M. & Bosch, K.S. (1995). The role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion damage of rat liver. *Histology and Histopathology*, 10, 111-116.
- Giulivi, C. & Cadenas, E. (1998). Heme protein radicals: formation, fate, and biological consequences. *Free Radical Biology & Medicine*, 24, (2), 269-279.
- Gohil, K., Viguie, C., Stanley, W., Brooks, G.A. & Packer, L. (1988). Blood glutathion oxidation during human exercise. *Journal Applied Physiology*, 64, (1), 115-119.
- Golden, T.R., Hinerfeld, D.A. & Melov, S. (2002). Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging Cell*, 1, 117-23.
- Goldfarb, A.H. (1999). Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Canadian Journal Applied Physiology*, 24, (3), 249-266.
- Goldfarb, A.H., You, T., Bloomer, R.J., Landes, S. & Murphy, C. (2002). Blood oxidative stress markers in response to aerobic exercise: Effect of gender. *Medicine Science Sports*

& *Exercise*, 34, S249.

- Gould, S.J. (1994). The evolution of life on earth. www.brembs.net/evolution
- Green, H.J. & Fraser, I.G. (1988). Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Medicine Science Sports & Exercise*, 20, 55-59.
- Grootveld, M. & Halliwell, B. (1987). Measurement of allantoin and uric acid in human body fluids: a potential index of free-radical reactions in vivo. *Biochemical Journal*, 243, 803-808.
- Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Vincent, S., Sergent, O., Cillard, J. & Gratas-Delamarche, A. (2003). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *European Journal Applied Physiology*, 89, 14-20.
- Guilland, J.C., Penaranda, T., Gallet, C., Boggio, V., Fuchs, F. & Klepping, J. (1989). Vitamin status of young athletes including the effects of supplementation. *Medicine Science Sports & Exercise*, 21, (4), 441-449.
- Gunther, M.R., Sampath, V. & Caughey, W.S. (1999). Potential roles of myoglobin autoxidation in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, (11-12), 1388-1395.
- Hamilton, K.L., Staib, J.L., Phillips, T., Hess, A., Lennon, S.L. & Powers, S.K. (2003). Exercise, antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radical Biology & Medicine*, 34, (7), 800-809.
- Hampton, M.B., Kettle, A.J. & Winterbourn, C.C. (1998). Inside the neutrophil intakes phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92, 3007-3017.
- Harel, S. & Kanner, J. (1988). The generation of ferryl or hydroxyl radicals during interaction of haemproteins with hydrogen peroxide. *Free Radical Research Communications*, 5, (1), 21-33.
- Hellsten, Y., Svensson, M., Sjodin, B., Smith, S., Christensen, A., Richter, E.A. & Bangsbo, J. (2001). Allantoin formation and urate and glutathione exchange in human muscle during submaximal exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, 31, (11), 1313-1322.
- Hellsten, Y., Tullson, P.C., Richter, E.A. & Bangsbo, J. (1997). Oxidation of urate in human skeletal muscle during exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, (1-2), 169-174.
- Heunks, L.M.A., Vina, J., Van Herwaarden, A.V., Folgering, H.T.M., Gimeno, A. & Dekhuijzen, P.N.R. (1999). Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Physiology*, 277, R1697-R1704.
- Hofer, T. & Moller, L. (2002). Optimization of the workup procedure for the analysis of 8-

oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine with electrochemical detection. *Chemical research in toxicology*, 15, 426-432.

Hooper, D.C., Scott, G.S., Zborek, A., Mikheeva, T., Kean, R.B., Koprowski, H. & Spitsin, S.V. (2000). Uric acid, a peroxynitrite scavenger, inhibits CNS inflammation, blood-CNS barrier permeability changes and tissue damage in a mouse model of multiple sclerosis. *The FASEB Journal*, 14, 691-698.

Hooper, D.C., Spitsin, S., Kean, R.B., Champion, J.M., Dickson, G.M., Chaudhry, I. & Koprowski, H. (1998). Uric acid, a natural scavenger of peroxynitrite, in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 95, 675-680.

Hulbert, A.J. (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *Journal of Theoretical Biology*, 234, 277-288.

Ilhan, N., Kamanli, A., Ozmerdivenli, R. & Ilhan, N. (2004). Variable effects of exercise intensity on reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substance levels, and glucose concentration. *Archives of medical research*, 35, 294-300.

Inoue, T., Mu, Z., Sumikawa, K., Adachi, K. & Okochi, T. (1993). Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Japanese Journal Cancer Research*, 84, (7), 720-725.

Jackson M.J., Edwards R.H.T. & Symons M.C.R. (1985). Electron spin resonance of intact mammalian skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, 847, 185-190.

Jackson, M.J. & O'Farrell, S. (1993). Free radicals and muscle damage. *British Medical Bulletin*, 49, (3), 630-641.

Jammes, Y., Steinberg, J.G., Bregeon, F. & Delliaux, S. (2004). The oxidative stress in response to routine incremental cycling exercise in healthy sedentary subjects. *Respiratory physiology & neurobiology*, 144, 81-90.

Janaszewska, A. & Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, 62, 231-236.

Jenkins, R.R. (2000). Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *American Journal Clinical Nutrition*, 72, (2- Suppl.), 670-674.

Jenkins, R.R. (1988). Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Medicine*, 5, 156-70.

Jenkins, R.R. & Goldfarb, A. (1993). Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Medicine Science Sports & Exercise*, 25, (2), 210-212.

Ji, L.L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proceedings society for experimental biology and medicine*, 222, 283-292.

- Ji, L.L. (1995). Oxidative stress during exercise: implication of antioxidant nutrients. *Free Radical Biology & Medicine*, 18, (6), 1079-1086.
- Ji, L.L. (1993). Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Medicine Science Sports & Exercise*, 25, (2), 225-231.
- Karlsson, J. (1997). *Antioxidants and EXERCISE*. Champaign, Ill.: Human Kinetics.
- Kasai, H. (2002). Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: formation, repair, and mutagenesis. *Free Radical Biology & Medicine*, 33, (4), 450-456.
- Kaur, H. & Halliwell, B. (1994). Evidence for nitric oxide – mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Letters*, 350, 9-12.
- Kean, R.B., Spitsin, S.V., Mikheeva, T., Scott, G.S. & Hooper, D.C. (2000). The peroxynitrite scavenger uric acid prevents inflammatory cell invasion into the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis through maintenance of blood-central nervous system barrier integrity. *Journal of Immunology*, 165, 6511-6518.
- Keles, M.S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H. & Akcay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*, 28, 141-143.
- Kelman, D.J., DeGray, J.A. & Mason, R.P. (1994). Reaction of myoglobin with hydrogen peroxide forms a peroxy radical which oxidizes substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 269, (10), 7458-7463.
- Khassaf, M., Child, R.B., Mcardle, A., Brodie, D.A., Esanu, C. & Jackson, M.J. (2001). Time course of responses of human skeletal muscle to oxidative stress induced by ondamaging exercise. *Journal Applied Physiology*, 90, 1031-1035.
- Kinnunen, S., Hyypä, S., Lappalainen, J., Oksala, N., Venojärvi, M., Nakao, C., Hanninen, O., Sen, C.K. & Atalay, M. (2005). Exercise-induced oxidative stress and muscle stress protein responses in trotters. *European Journal Applied Physiology*, 93, 496-501.
- Kohen, R., Vellaichamy, E., Hrbac, J., Gati, I. & Tirosh, O. (2000). Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. *Free Radical Biology & Medicine*, 28, (6), 871-879.
- Kumar, C.T., Reddy, V.K., Prasad, M., Thyagaraju, K. & Reddanna, P. (1992). Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 111, 109-115.
- Leeuwenburgh, C., Hansen, P.A., Holloszy, J.O. & Heinecke, J.W. (1999). Hydroxyl radical generation during exercise increases mitochondrial protein oxidation and levels of urinary dityrosine. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, (1-2), 186-192.
- Lenaz, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1366, (1-2), 53-67.

- Levine, R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 32, (9), 790-796.
- Liu, M.L., Bergholm, R., Makimattila, S., Lahdenpera, S., Valkonen, M., Hilden, H., Yki-Jarvinen, H. & Taskinen, M-R. (1999). A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *American Journal of Physiology*, 276, (6), E1083-E1091.
- Lu, S.C. (2000). Regulation of glutathione synthesis. *Current topics in cellular regulation*, 36, 95-116.
- Ma, Y.S., Stone, W.L. & Leclair, I.O. (1994). The effects of vitamin C and urate on the oxidation kinetics of human low-density lipoprotein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 206, 53-59.
- Marklund, N., Ostman, B., Nalmo, L., Persson, L. & Hillered, L. (2000). Hypoxanthine, uric acid and allantoin as indicators of in vivo free radical reactions: description of a HPLC method and human brain microdialysis data. *Acta Neurochirurgica (Wien)*, 142, 1135-1142.
- Marzatico, F., Pansarasa, O., Bertorelli, L., Somenzini, L. & Della Valle, G. (1997). Blood free radical antioxidant enzymes and lipid peroxides following long-distance and lactacidemic performances in highly trained aerobic and sprint athletes. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 37, 235-239.
- Mastaloudis, A., Leonard, S.W. & Traber, M.G. (2001). Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radical Biology & Medicine*, 31, (7), 911-922.
- May, J.M., Qu, Z., Whitesell, R.R. & Cobb, C.E. (1996). Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, (4): 543-551.
- Meneghini, R. (1997). Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 23, (5), 783-792.
- Mills, P.C., Smith, N.C., Casas, I., Harris, P., Harris, R.C. & Marlin, D.J. (1996). Effects of exercise intensity and environmental stress on indices of oxidative stress and iron homeostasis during exercise in the horse. *European Journal Applied Physiology*, 74, 60-66.
- Misra, H.P. & Fridovich, I. (1972). The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 21, 6960-6962.
- Miyazaki, H., Oh-ishi, S., Ookawara, T., Kizaki, T., Toshinai, K., Ha, S., Haga, S., Ji, L.L. & Ohno, H. (2001). Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhaustive exercise. *European Journal Applied Physiology*, 84, 1-6.
- Morand, C., Crespy, V., Manach, C., Besson, C., Demigne, C. & Remecy, C. (1998). Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *American Journal of*

Physiology, 275, (44), R212-R219.

Μούγιος, Β. (1995). *Στοιχεία βιοχημείας του ανθρώπου*. Θεσσαλονίκη: Νικολοπούλου Μαρία.

Nielsen, HB., Hanel, B., Loft S., Poulsen, H.E., Pedersen, B.K., Diamant, M., Vistisen, K. & Secher, N.H. (1995). Restricted pulmonary diffusion capacity after exercise is not an ARDS-like injury. *Journal Sports Science*, 13, (2), 109-113.

Niess, AM., Hartmann, A., Grunert-Fuchs, M., Poch, B. & Speit, G. (1996). DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *International Journal Sports Medicine*, 17 (6), 397-403.

Nikolaidis, M.G., Jamurtas, A.Z., Paschalis, V., Kostaropoulos, A.I., Kladi-Skandali, A., Balamitsi, V., Koutedakis, Y. & Kouretas, D. (2006). Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Medicine Science Sports & Exercise*, 38, (8), 1443-1450

Nishizawa, J., Nakai, A., Matsuda, K., Komeda, M., Ban, T. & Nagata, K. (1999). Reactive oxygen species play an important role in the activation of heat shock factor 1 in ischemic-reperfused heart. *Circulation*, 99, 934-941.

Orino, K., Lehman, L., Tsuji, Y., Ayaki, H., Torti, S.V. & Torti, F.M. (2001). Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochemical Journal*, 357, 241-247.

Ozhogina, O.A. & Kasaikina, O.T. (1995). β -carotene as an interceptor of free radicals. *Free Radical Biology & Medicine*, 19, (5), 575-581.

Paschalis, V., Koutedakis, Y., Baltzopoulos, V., Mougios, V., Jamurtas, A.Z. & Theoharis, V. (2005). *International Journal Sports Medicine*, 26, 827-831.

Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N.T., Georgiou, C.D., Angelatou, F. & Matsokis, N.A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Letters*, 357, 83-86.

Petibois, C., Cazorla, G., Poortmans, J.R. & Deleris, G. (2002). Biochemical aspects of overtraining in endurance sports. *Sports Medicine*, 32, (13), 867-878.

Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042.

Pincemail, J., Lecomte, J., Castiau, J., Collard, E., Vasankari, T., Cheramy-Bien, J-P, Limet, R. & Defraigne, J-O. (2000). Evaluation of autoantibodies against oxidized LDL and antioxidant status in top soccer and basketball players after 4 months of competition. *Free Radical Biology & Medicine*, 28, (4), 559-565.

Poulsen, HE., Loft, S. & Vistisen, K. (1996). Extreme exercise and oxidative DNA modification. *Journal Sports Science*, 14 (4), 343-346.

Powers, S.K. & Lennon, S.L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus

- on exercise and skeletal muscle. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 58, 1025-1033.
- Prior, R.L. & Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, (11-12), 1173-1181.
- Quindry, J.M., Stone, W.L., King, J. & Broeder, C.E. (2003). The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Medicine Science Sports & Exercise*, 35, (7), 1139-1145.
- Radak, Z. (2000). *Free radicals in exercise and aging*. In: Human Kinetics, eds. Versa Press, 2000: (pp. 21-25, 52, 216).
- Radak, Z., Asano, K., Inoue, M., Kizaki, T., Oh-Ishi, S., Suzuki, K., Taniguchi, N. & Ohno, H. (1995). Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. *Journal Applied Physiology*, 79, 129- 135.
- Radak, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvari, M. Nyakas, C. & Goto, S. (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, (1-2), 69-74.
- Radak, Z., Pucso, J., Mecseki, S., Csont, T & Ferdinandy, P. (1999). Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, (7-8), 1059-1063.
- Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R. & Prabhakar, M.C. (2004). Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian Journal of Tuberculosis*, 51, 213-218.
- Rimbach, G., Hohler, D., Fischer, A., Roy, S., Virgili, F., Pallauf, J. & Packer, L. (1999). Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Archiv fur Tierernahrung*, 52, (3), 203-222.
- Sato, Y., Nanri, H., Ohta, M., Kasai, H. & Ikeda, M. (2003). Increase of human MTH1 and decrease of 8-hydroxydeoxyguanosine in leukocyte DNA by acute and chronic exercise in healthy male subjects. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 305, 333-338.
- Schneider, M. Niess, A.M., Rozario, F., Angres, C., Tschositsch, K., Battenfeld, N., Scheffer, M., Northoff, H., Dickhuth, H., Fehrenbach, E., Trommer, W.E. & Biesalski, H.K. (2003). Vitamin E supplementation does not increase the vitamin C radical concentration at rest and after exhaustive exercise in healthy male subjects. *European Journal Nutrition*, 42, 195-200.
- Sen, C.K. (2001). Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 33, (3), 368-370.
- Sen, C.K. & Packer, L. (2000). Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *American Journal Clinical Nutrition*, 72, 653S-669S.

- Senturk, U.K., Yalcin, O., Gunduz, F., Kuru, O., Meiselman, H.J. & Baskurt, O. (2005). Effect of antioxidant vitamin treatment on the time course of hematological and hemorheological alterations after an exhausting exercise episode in human subjects. *Journal Applied Physiology*, 98, 1272-1279.
- Servais, S., Couturier, K., Koubi, H., Rouanet, J.L., Desplanches, D., Sornay-Mayet, M.H., Sempore, B., Lavoie, J.M. & Favier, R. (2003). Effect of voluntary exercise on H₂O₂ release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine*, 35, (1), 25-32.
- Sevanian, A., Davies, K.J.A. & Hochstein, P. (1991). Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid. *American Journal Clinical Nutrition*, 54, 1129S-1134S.
- Sjodin, B., Westing, H. & Apple, S. (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Medicine*, 10, 236-254.
- Stadtman, E.R. & Levine, R.L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 191-208.
- Sumida, S., Nakamura, H. & Yodoi, J. (2004). Thioredoxin induction of peripheral blood mononuclear cells in mice in response to a single bout of swimming exercise. *General Physiology and Biophysics*, 23, 241-249.
- Sumida, S., Tanaka, K., Kitao, H. & Nakadomo, F. (1989). Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation. *International Journal of Biochemistry*, 21, 835-838.
- Svensson, M., Ekblom, B., Cotgreave, I., Norman, B., Sjoberg, B., Ekblom, O., Sjodin, B. & Sjodin, A. (2002). Adaptive stress response of glutathione and acid uric metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiologica Scandinavica*, 176, 43-56.
- Szweda, P.A., Friguet, B. & Szweda, L.I. (2002). Proteolysis, free radicals, and aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 33, (1), 29-36.
- Tauler, P., Aguilo, A., Gimeno, I., Fuentespina, E., Tur, J.A. & Pons, A. (2003). Influence of vitamin C diet supplementation on endogenous antioxidant defences during exhaustive exercise. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, 446, 658-664.
- Tauler, P., Aguilo, A., Gimeno, I., Noguera, A., Agusti, A., Tur, J.A. & Pons, A. (2003). Differential Response of Lymphocytes and Neutrophils to High Intensity Physical Activity and to Vitamin C Diet Supplementation. *Free Radical Research*, 37, 931-938.
- Tessier, F., Margaritis, I., Richard, M.J., Moynot, C. & Marconnet, P. (1995). Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance. *Medicine Science Sports & Exercise*, 27, (3), 390-396.
- Thomas, M.J. (2000). The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 16, (7-8), 716-718.

- Thompson-Gorman, S.L. & Zweier, J.L. (1990). Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *Journal of Biological Chemistry*, 265, (12), 6656-6663.
- Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, 27, 502-522.
- Uchida, K. & Stadtman, E.R. (1993). Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 6388-6393.
- Vasankari, T.J., Kujala, U.M., Vasankari, T.M., Vuorimaa, T. & Ahotupa, M. (1997). Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defenses. *Free Radical Biology & Medicine*, 22, (3), 509-513.
- Vider, J., Lehtmaa, J., Kullisaar, T., Vihalemm, T., Zilmer, K., Kairane, C., Landor, A., Karu, T. & Zilmer, M. (2001). Acute immune response in respect to exercise – induced oxidative stress. *Pathophysiology*, 7, 263-270.
- Vollaard, N.B., Shearman, J.P. & Cooper, C.E. (2005). Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. *Sports Medicine*, 35, 1045-1062.
- Wallace, J.W., Houtchens, R.A., Maxwell, J.C. & Caughey, W.S. (1982). Mechanism of autoxidation for hemoglobins and myoglobins: promotion of superoxide production by protons and anions. *Journal of Biological Chemistry*, 257, (9), 4966-4977.
- Wallace, S.S. (2002). Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radical Biology & Medicine*, 33, (1), 1-14.
- Watson, T.A., Callister, R., Taylor, R.D., Sibbritt, D.W., Macdonald-Wicks, L.K. & Garg, M.L. (2005). Antioxidant Restriction and Oxidative Stress in Short-Duration Exhaustive Exercise. *Medicine Science Sports & Exercise*, 37, 63-71.
- Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Barclay, L.R. & Locke, S.J. (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*, 924, 408-419.
- Weiss, C., Bierhaus, A., Kinscherf, R., Hack, V., Luther, T., Nawroth, P.P. & Bärtsch, P. (2002). Tissue factor-dependent pathway is not involved in exercise-induced formation of thrombin and fibrin. *Journal Applied Physiology*, 92, 211-218.
- Willcox, J.K., Catignani, G.L. & Roberts, L.J. (2002). Dietary flavonoids fail to suppress F2-isoprostane formation in-vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 34, (7), 795-799.
- Witt, E.H., Reznick, A.Z., Viguie, C.A., Starke-Reed, P. & Packer, L. (1992). Exercise, oxidative damage and effects of antioxidant manipulation. *Journal of Nutrition*, 122, (3 Suppl.), 766-773.

- Wu, G., Fang, Y.Z., Yang, S., Lupton, J.R. & Turner, N.D. (2004). Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *Journal of Nutrition*, 134, 489–492.
- Young, I.S. (2001). Measurement of total antioxidant capacity. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 339.
- Young, I.S. & McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29, (2), 358-362.