



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΝΑΓΩΓΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΚΕΝΤΡΗ ΑΣΚΗΣΗ ΣΕ ΙΣΟΚΙΝΗΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΟΜΕΤΡΟ*

*ESTIMATION OF REDUCING POWER IN HUMAN PLASMA AFTER
ECCETRIC EXERCISE IN ISOKINETIC DYNAMOMETER*



ΘΕΟΔΟΣΗ ΑΝΤΡΙΑ

Λάρισα 2017

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

Ευχαριστίες

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

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

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

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

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	5
Abstract	6
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Ελεύθερες Ρίζες	7
1.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών	8
1.2.1. Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	10
i) Αναπνευστική αλυσίδα- Οξειδωτική φωσφορυλίωση	10
ii) Ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450	12
iii) Υπεροξειδιοσώματα	13
iv) Αιμοσφαιρίνη	13
v) Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ	14
vi) Φλεγμονή	15
vii) Κατεχολαμίνες	16
1.2.2. Εξωγενείς πηγές παραγωγή ελευθέρων ριζών	16
1.3. Επιδράσεις ελευθέρων ριζών	17
1.4. Οξειδωτικό στρες	18
1.5. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	19
1.5.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί	20
1.5.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί	26
1.6. Άσκηση και οξειδωτικό στρες	31
1.7. Έκκεντρη άσκηση και οξειδωτικό στρες	33
ΣΚΟΠΟΣ	36
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
2.1. Συμμετέχοντες	37
2.2. Πρωτόκολλο έκκεντρης άσκησης	37
2.3. Αξιολόγηση του μυϊκού πόνου	38
2.4 Σύλλογή του αίματος και επεξεργασία	39
2.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα O ₂	40
2.6 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα	42
2.7 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμη	44
2.8 Στατιστική ανάλυση	45
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
3.1. Αξιολόγηση μυϊκού πόνου και μυϊκής βλάβης	46
3.2 Δείκτες Οξειδωτικού στρες	47
3.3 Αναγωγική Δύναμη	48
3.4 Εξουδετέρωση της ρίζας του σουπεροξειδίου	50
3.5 Εξουδετέρωση της ρίζας του υδροξυλίου	52
3.6 Συσχέτιση δειχτών	55
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	56
Βιβλιογραφία	64

Περίληψη

Πλήθος εργασιών στη βιβλιογραφία αναφέρεται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών που έχουν ως συνέπεια την πρόκληση οξειδωτικού στρες, έπειτα από έντονη και επίπονη άσκηση όπως η έκκεντρη. Τα άτομα που πραγματοποίησαν αυτού του είδους την άσκηση παρουσίασαν διαφορές μεταξύ τους και έτσι προέκυψε η ανάγκη για περαιτέρω μελέτη και εύρεση χαρακτηριστικών που να διακρίνουν και να ομαδοποιούν τα άτομα και σαφέστατα ένας βασικός χαρακτήρας είναι το αθλητικό ιστορικό κάθε εξεταζόμενου. Έτσι, σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν να αξιολογηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση των ατόμων μετά από πραγματοποίηση έκκεντρης άσκησης σε ισοκινητικό δυναμόμετρο, όπως επίσης και να διερευνηθεί το γεγονός αν η ενασχόληση με οποιαδήποτε μορφής άσκησης επιφέρει διαφορετικά αποτελέσματα στο οξειδοαναγωγικό προφίλ των ατόμων σε σχέση με άτομα που δεν έχουν επαφή με κάποια αθλητική δραστηριότητα. Για το λόγο αυτό στο πείραμα συμμετείχαν 40 εθελοντές από τους οποίους οι 22 ήταν αθλούμενοι και οι 18 μη αθλούμενοι. Όλοι οι εθελοντές πραγματοποίησαν 5 σετ των 15 μέγιστων έκκεντρων επαναλήψεων και οι αναλύσεις έγιναν σε δείγμα αίματος που συλλέχθηκε πριν την άσκηση, καθώς και 24, 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση. Η αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης εξετάστηκε με τη μέτρηση συμβατικών δεικτών οξειδωτικού στρες στους οποίους ανήκουν η αναγωγική δύναμη (reducing power) ρίζα του σουπεροξειδίου (O_2^-) και η ρίζα του υδροξυλίου ($\bullet OH$). Όταν οι συμμετέχοντες εξετάστηκαν ως μία ομάδα, λάβαμε στατιστικώς σημαντικά αποτελέσματα στα επίπεδα εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στις 24 ώρες κατά 6.67% σε σχέση με το δείγμα pre. Όταν οι εθελοντές διακρίθηκαν σε αθλούμενους και μη αθλούμενους παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές ανάμεσα στις δύο ομάδες και πιο συγκεκριμένα στους δείκτες αναγωγικής δύναμης και σουπεροξειδίου. Τα αποτελέσματα που λάβαμε καταδεικνύουν πως η μεγάλη έκθεση του οργανισμού σε κάποιου είδους άσκηση, έχει ως συνέπεια ο οργανισμός να αναπτύσσει διαφορετική εξειδίκευση στην εξουδετέρωση ριζών. Σε αυτό το γεγονός βασίζεται και η μελέτη μας παρουσιάζεται ετερογένεια ανάλογα με τον αθλητικό ιστορικό, αφού η αθλούμενοι παρουσιάζουν καλύτερη προσαρμογή στη άσκηση.

Abstract

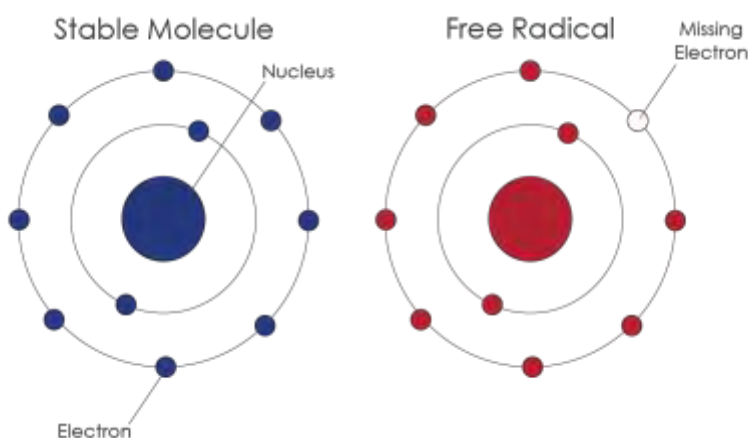
Numerous of studies in the bibliography concerning the production of free radicals that result in oxidative stress, following intensive and strenuous exercise , such as eccentric. According to bibliography, The people who performed this kind of exercise showed differences between them and there was a need for further study and finding features that distinguish and group people, and clearly a basic character is the athletic background of each participant. Thus, the purpose of this study was to evaluate the redox status of individuals after performing eccentric exercise on an isokinetic dynamometer, as well as to investigate whether dealing with any form of exercise has different effects on the redox profile of people relative to individuals who they are not dealing with any sporting activity. For this reason, 40 volunteers participated in the experiment, of whom 22 were trained 18 and non-trained. All volunteers performed 5 sets of 15 maximum eccentric repetitions and the analyzes were performed on a sample of blood collected before exercise, as well as 24, 48 and 72 hours after exercise. The redox state was examined by measuring conventional oxidative stress markers to which the reducing power ,the superoxide radical(O⁻²) and the hydroxyl radical (OH). When participants were tested as one group, we received statistically significant results in the levels of sulperoxide radical neutralization, a significant increase in 24 hours was observed by 6.67% relative to the pre sample. When the volunteers were distinguished in athletes and non-athletes, there were significant differences between the two groups and more specifically in the marker of reducing power and superoxide. The results we received showed that the body's large exposure to some kind of exercise, develops a different specialization in radical neutralization. This fact is based on this fact and our study as the heterogeneity in response to inflammation caused by eccentric exercise among different individuals considered to be associated with the athletic background of each person.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες Ρίζες

Τα άτομα αποτελούνται από έναν πυρήνα, εκεί υπάρχουν τα πρωτόνια και τα νετρόνια. Γύρω από τον πυρήνα βρίσκονται τα ηλεκτρόνια που περιστρέφονται σε τροχιακά. Σε κάθε τροχιακό συνυπάρχουν δύο ηλεκτρόνια με αντιπαράλληλο περιστροφή που λειτουργούν ως ζεύγος. Η δομή αυτή κάνει τα άτομα πιο σταθερά.

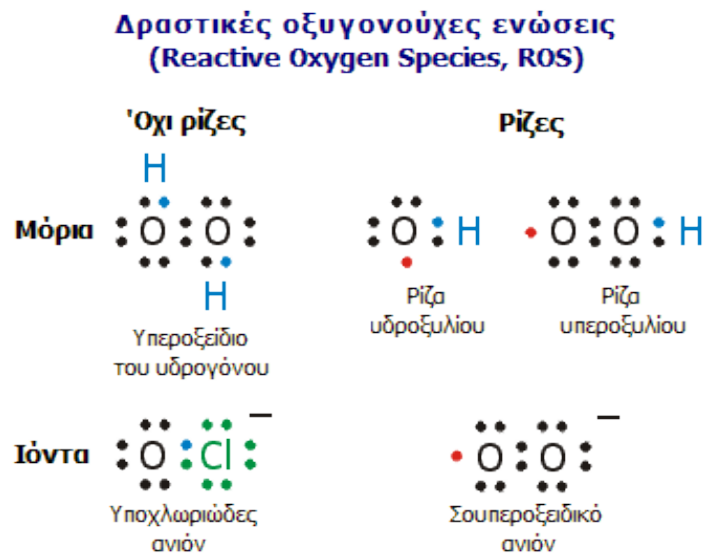
Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Jenkins, 1988). Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ ασταθείς δομές με σύντομη διάρκεια ζωής αφού αντιδρούν άμεσα με παρακείμενα μόρια, αποσπώντας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



Εικόνα 1: Σχηματισμός ελεύθερης ρίζας

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

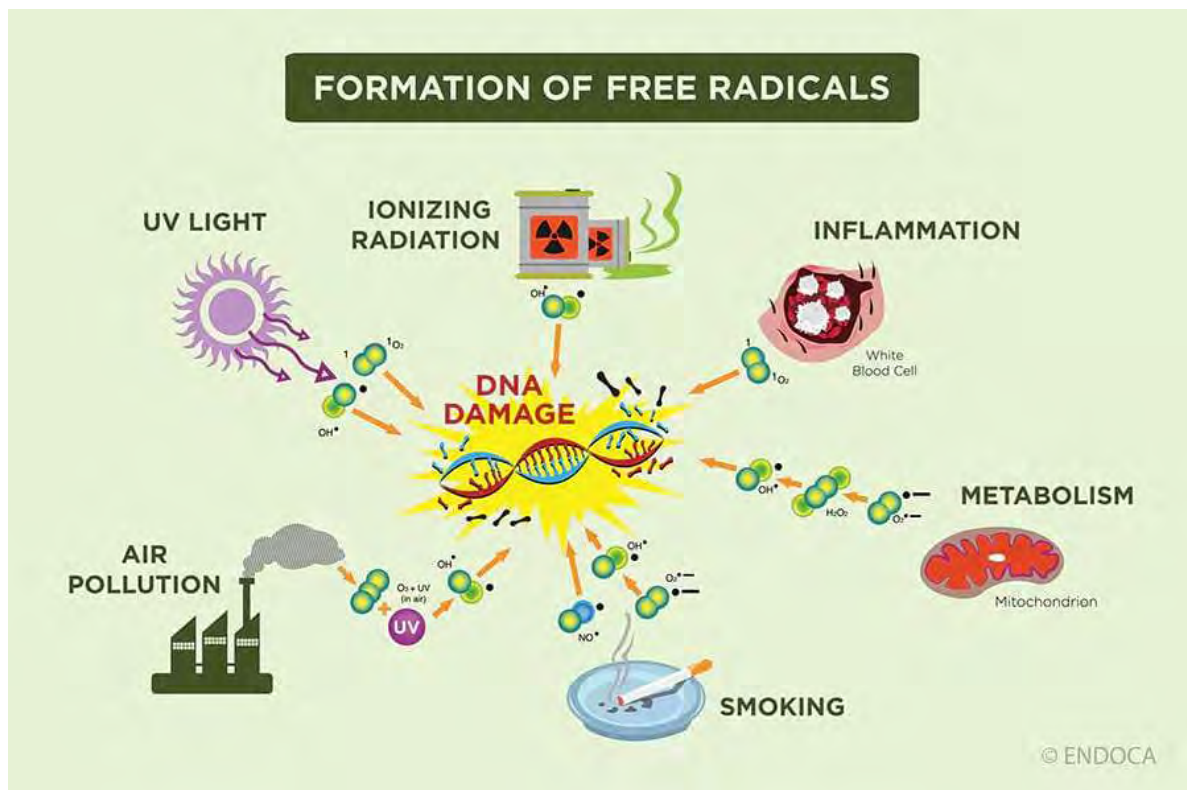
Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου, το οποίο διαθέτει ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Στο εσωτερικό των κυττάρων οι συνηθέστερες ρίζες είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) στις οποίες συγκαταλέγονται οι ρίζες υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), αλκοξειδίου ($\text{RO}\cdot$) και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



Εικόνα 2 : Δραστικές οξυγονούχες ενώσεις

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

1.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών



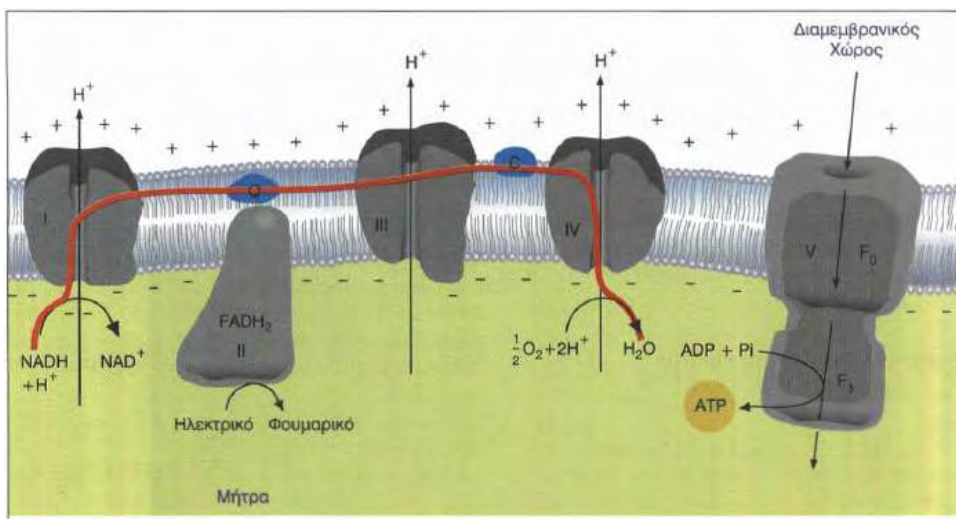
Εικόνα 3: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από εδογενείς και εξωγενείς πηγές

1.2.1. Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

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

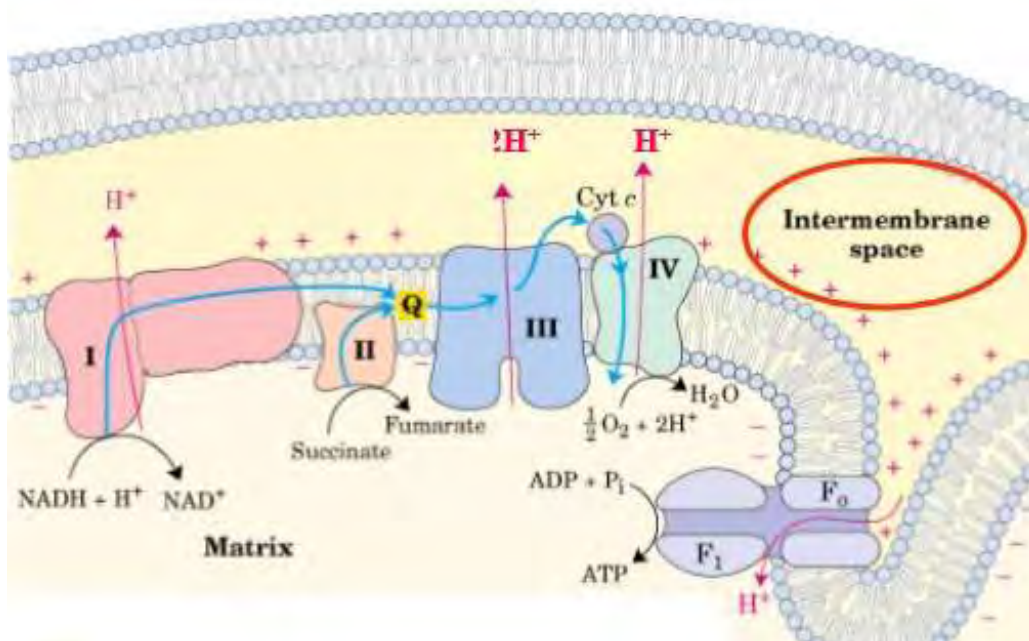
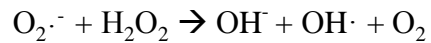
ι) Αναπνευστική αλυσίδα- Οξειδωτική φωσφορυλίωση

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



Εικόνα 4: Αναπνευστική αλυσίδα

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



Εικόνα 5: Ροή ηλεκτρονίων από το NADH στο O₂ μέσω μιας αλυσίδας τριών μεγάλων πρωτεϊνικών συμπλόκων.

I: οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q,

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

II: αναγωγή του ζεύγους ηλεκτρικού-Q

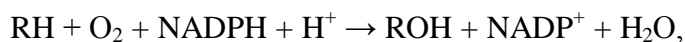
III: οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c

IV: οξειδάση του κυτοχρώματος c

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

ii) Ενζυμικό σύστημα του κυτοχρώματος P450

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



όπου με RH συμβολίζεται η ξενοβιοτική ουσία.

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

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

iii) Υπεροξειδιοσώματα

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

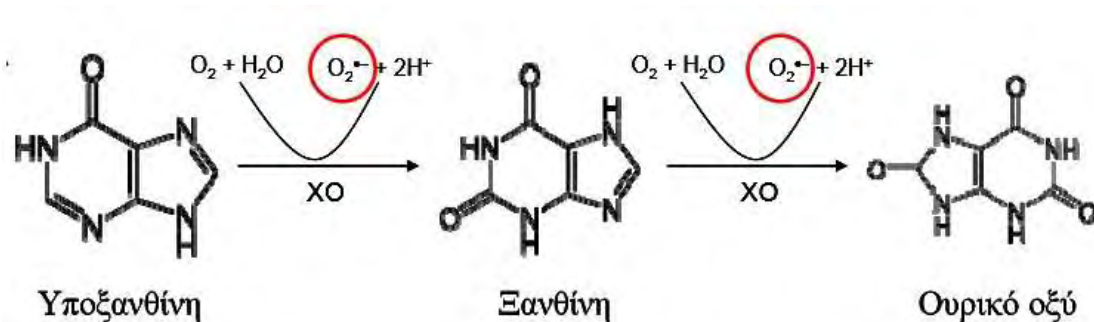
iv) Αιμοσφαιρίνη

Η αιμοσφαιρίνη είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων και του αίματος συνολικά. Ο βασικός της ρόλος είναι ότι μπορεί να δεσμεύει το οξυγόνο της ατμοσφαιρας στα τριχοειδή αγγεία που περιβάλλουν τις κυψελίδες των πνευμόνων και να μετατρέπεται σε οξυαιμοσφαιρίνη. Έπειτα τα ερυθροκύτταρα μεταφέρουν την οξυαιμοσφαιρίνη σε όλους τους ιστούς. Το οξυγόνο αποδεσμεύεται από την αιμοσφαιρίνη στα τριχοειδή αγγεία των ιστών και

διαχέεται μέσα στα κύτταρα. Στους μύες βρίσκεται η μυοσφαιρίνη και χρησιμεύει στην παραλαβή οξυγόνου από το αίμα, στην αποθήκευσή του και στη μετακίνησή του μέσα στα μυϊκά κύτταρα. Αυτό βοηθά το μυ να αντιμετωπίζει ξαφνικές αυξήσεις στη ζήτηση οξυγόνου κατά την άσκηση. Η οξυγονωμένη μορφή της μυοσφαιρίνης ονομάζεται οξυμυοσφαιρίνη (Mougiou Vassilis C., 2008). Ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης οι απαιτήσεις του οργανισμού σε οξυγόνο είναι αυξημένες. Κάτω από αυτές τις συνθήκες η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει στην παραγωγή ROS. Έτσι, η αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης οδηγεί στην παραγωγή $O_2^{\bullet-}$ (Cooper et al., 2002), ενώ και η αυτοοξείδωση της μυοσφαιρίνης μπορεί με ανάλογο τρόπο να απελευθερώσει H_2O_2 (Brantley et al., 1993).

v) Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

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



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

vi) Φλεγμονή

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

vii) Κατεχολαμίνες

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

1.2.2. Εξωγενείς πηγές παραγωγή ελευθέρων ριζών

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

1.3. Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

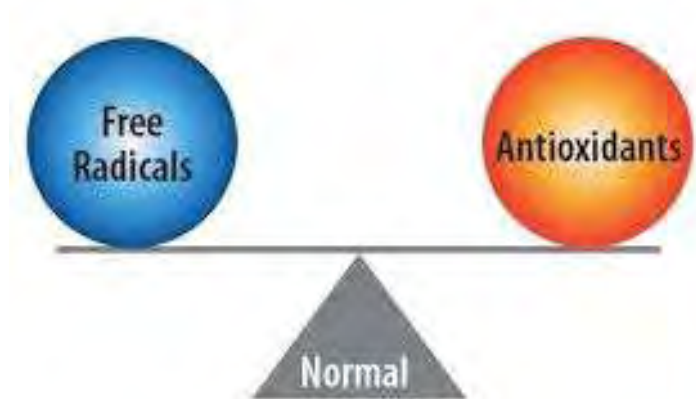
Οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν πολλαπλό ρόλο στον οργανισμό, ακολουθώντας το φαινόμενο της όρμησης (hormesis). Κατά το φαινόμενο αυτό, χαμηλές συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών έχουν ευεργετικό ρόλο στον οργανισμό διότι είναι απαραίτητες για ορισμένες θεμελιώδεις διεργασίες των κυττάρων. Όταν όμως οι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

Οι θετικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών, χαρακτηριστικά είναι η συμμετοχή τους σε σημαντικές βιοχημικές οδούς όπως η μεταγωγή σήματος και η γονιδιακή έκφραση. Επιπλέον, κατέχουν σπουδαίο ρόλο στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος και πιο συγκεκριμένα στις διαδικασίες της φαγοκυττάρωσης και της φλεγμονής. Τέλος, η δράση τους εντοπίζεται κατά την ενεργοποίηση ενζύμων, την αποτοξίνωση του οργανισμού από φάρμακα και τη μυϊκή σύσπαση.

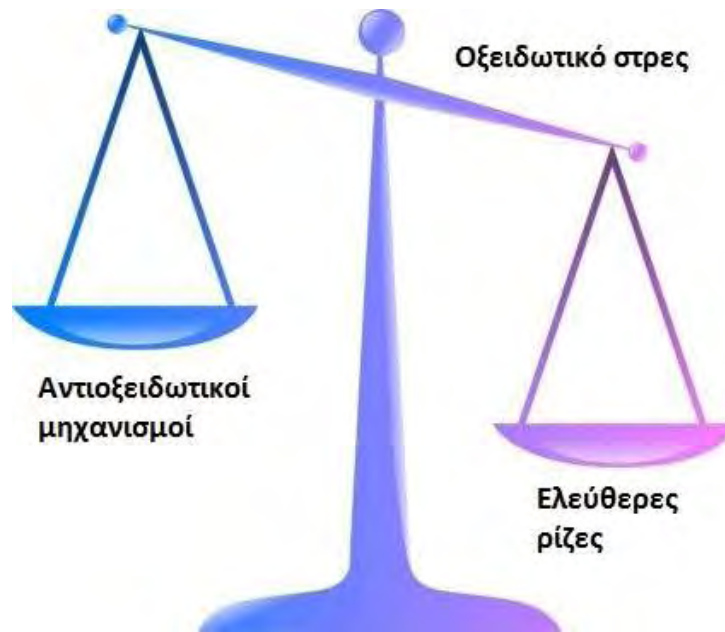
Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε σε αυξημένες τιμές οι ελεύθερες ρίζες έχουν αρνητικές επιδράσεις, εφόσον είναι πολύ δραστικά μόρια που αλληλεπιδρούν με βασικά δομικά και λειτουργικά στοιχεία του οργανισμού όπως τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες και το DNA προκαλώντας αλλοίωση ή καταστροφή τους. Βασικό χαρακτηριστικό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

1.4. Οξειδωτικό στρες

Σε φυσιολογικές συνθήκες οι ελεύθερες ρίζες βρίσκονται σε ισορροπία με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού. Ο όρος του οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου και αζώτου και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού. Ουσιαστικά, είναι η διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων (Halliwell & Gutteridge, 1990, Dotan, 2004). Η διατάραξη της ισορροπίας αυτής μπορεί οφείλεται αφενός σε μειωμένη δράση των ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων και αφετέρου σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών εξαιτίας παρατεταμένης έκθεσης σε κάποιο οξειδωτικό παράγοντα. Έτσι, η εμφάνισή του εξαρτάται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς παράγοντες και εμπλέκεται στη παθογένεια πολλών νοσημάτων (Mylonas C and Kouretas D., 1999; Meeus M. Et al., 2013). Δεν είναι τυχαίο που μέχρι σήμερα έχει αποτελέσει τόσο αιτία όσο και αποτέλεσμα ασθενειών όπως ο καρκίνος και οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Halliwell, 2001).



εικόνα 7: φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού

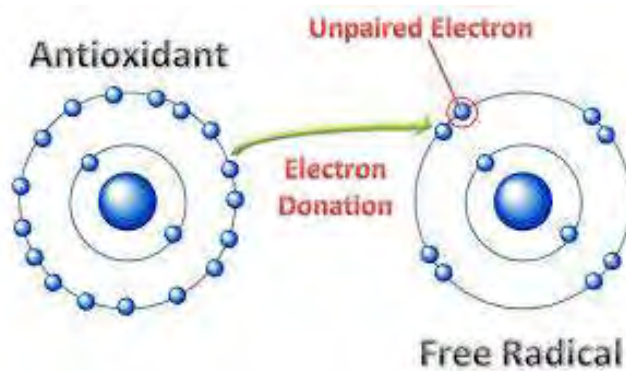


Εικόνα 8: Οξειδωτικό στρες

1.5. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Αντιοξειδωτικό ορίζεται κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell & Gutteridge, 1999). Ο κυριότερος και φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Yiannakopoulou E, 2009). Μπορεί να παράγονται ενδογενώς από τον οργανισμό ή να είναι μόρια, που προσλαμβάνονται κυρίως μέσω της διατροφής και συνήθως έχουν μικρό μοριακό βάρος. Ένα μόριο για να θεωρηθεί ότι δρα αντιοξειδωτικά πρέπει έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες και αφετέρου να σχηματίζει σχετικά αδρανή και λιγότερο δραστικά προϊόντα από τις ρίζες που αδρανοποιεί.

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



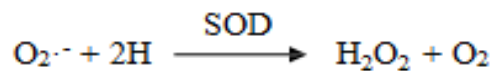
Εικόνα 8: Εξουδετέρωση ελεύθερης ρίζας από αντιοξειδωτικό

1.5.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί

Πολύ σημαντικό ρολό έχουν τα αντιοξειδωτικά ενζύμα όπου με την δράση του πραγματοποιείται διάσπαση των ελευθέρων ριζών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ενζύμων αποτελούν η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης (Prx) και η αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

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

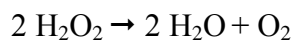


Το ένζυμο αυτό εμφανίζεται με τρεις μορφές ανάλογα με το σημείο εντοπισμού του. Έτσι διακρίνεται η κυτταροπλασματική μορφή που περιέχει Cu και Zn στο ενεργό της κέντρο (Cu/ZnSOD), η μιτοχονδριακή με Mn στο ενεργό κέντρο (MnSOD) και η εξωκυτταρική. Το μεγαλύτερο μέρος του $O_2^{\cdot-}$ παράγεται στα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

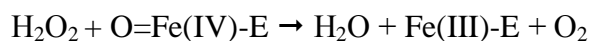
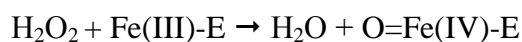
Καταλάση (CAT)

Η καταλάση, σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο, το οποίο συναντάται σε όλους σχεδόν τους ζώντες οργανισμούς που έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο. Είναι παρούσα σε όλα τα κύτταρα και κυρίως στα ερυθροκύτταρα και στο ήπαρ, ενώ ενδοκυτταρικά εντοπίζεται στα υπεροξειδισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Ως προϊόν του μεταβολισμού σε πολλούς οργανισμούς παράγεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), που είναι ιδιαίτερα τοξικό και πρέπει να μετατραπεί άμεσα σε μία λιγότερο επικίνδυνη χημική ένωση. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζει η καταλάση καταλύοντας την αποσύνθεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου

σε νερό και οξυγόνο που είναι αβλαβή για τον οργανισμό. Είναι ένα τετραμερές με τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν τέσσερις πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το H_2O_2 . Η αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου από την καταλάση είναι η ακόλουθη:



Η αντίδραση πραγματοποιείται σε δύο στάδια:



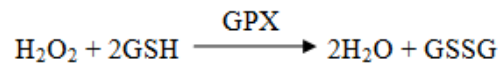
Όπου το σύμπλοκο Fe-E αντιπροσωπεύει το κέντρο με το σίδηρο της ομάδας της αίμης που είναι προσδεδεμένη στο ένζυμο.

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



Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

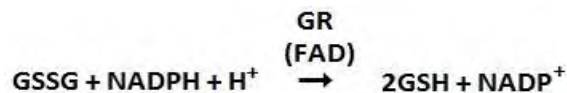
Η GPX είναι ένα ένζυμο που εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα και δρα διασπώντας το H_2O_2 σε αδρανές H_2O . Αυτό το κατορθώνει χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η οποία οξειδώνεται από το H_2O_2 και μεταβαίνει στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Η πορεία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

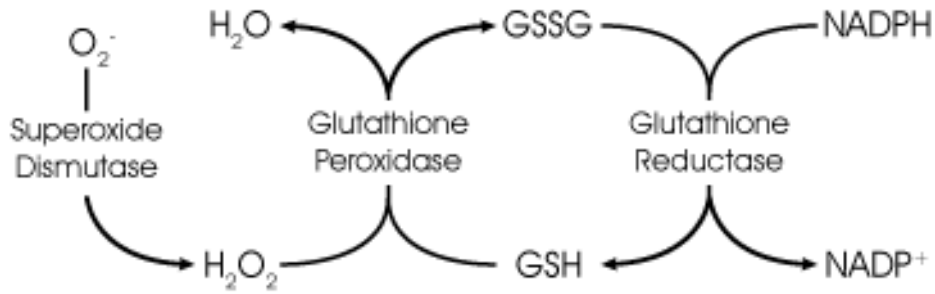


Η GPX και η CAT έχουν την ίδια δράση πάνω στο H_2O_2 αλλά η GPX έχει μεγαλύτερη συγγένεια με αποτέλεσμα να το αποικοδομεί κατά προτίμηση σε φυσιολογικές συνθήκες (Antunes et al., 2002).

Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Το ένζυμο αναγωγή της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της GSH σε GSSG, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στην οξειδωμένη και την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης μέσα στο κύτταρο. Η αντίδραση γίνεται παρουσία NADPH που λειτουργεί ως αναγωγικό μέσο. Η GR χρησιμοποιεί σα συνένζυμο το FAD (φλαβινο-αδενινωδινουκλεοτίδιο). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης, οδηγώντας έτσι στη διάσπασή τους. Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα είναι η ακόλουθη:

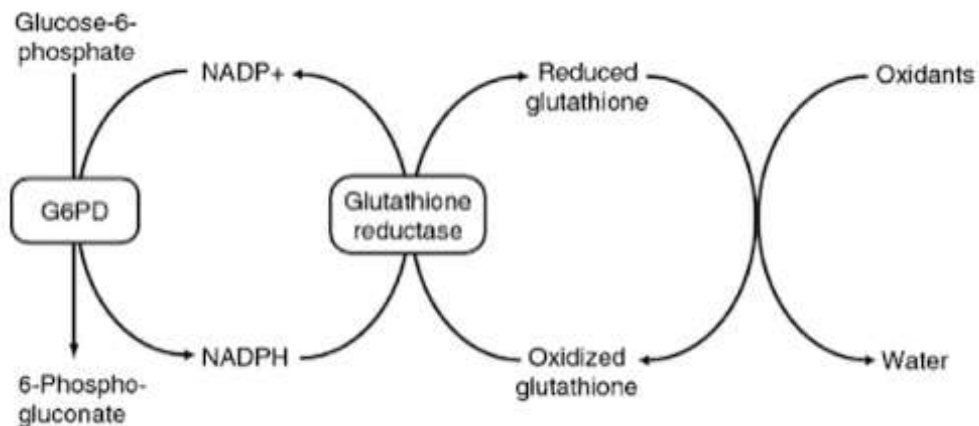




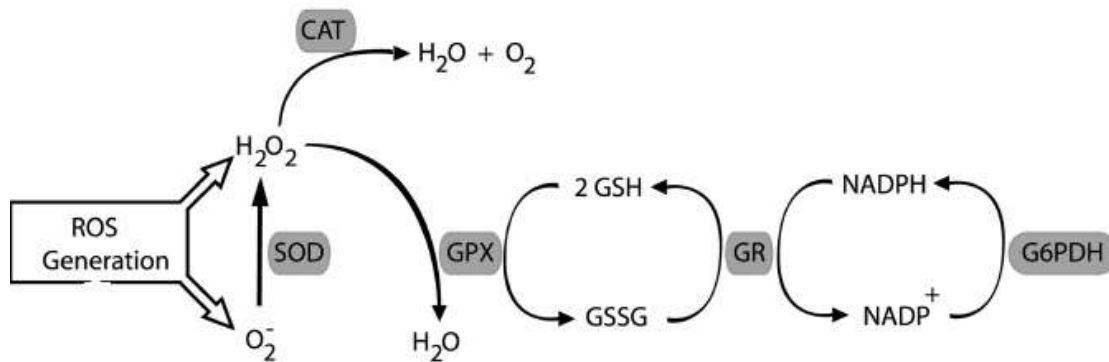
Εικόνα 9: Ανακύκλωση της γλουταθειόνης

Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD)

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



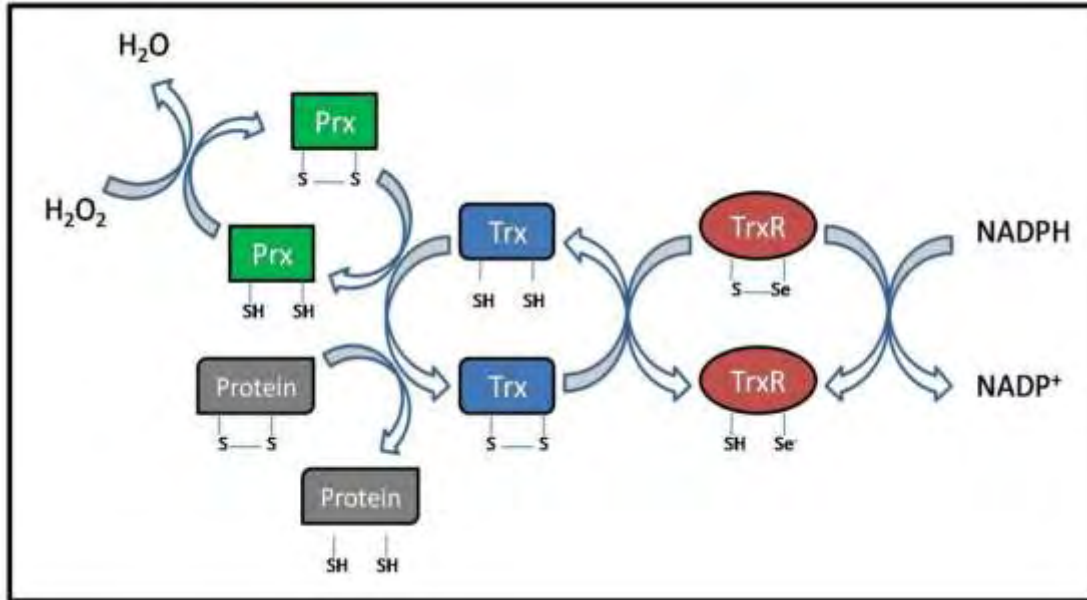
Εικόνα 10: Σύνδεση G6PD με την Αναγωγή της γλουταθειόνης



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

Υπεροξειδάση (Prx) και Αναγωγή (TrxR) της θειορεδοξίνης

Η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης (Prx) ανάγει τόσο το H_2O_2 όσο και τα αλκυλ-υδροϋπεροξειδία σε συνδυασμό με την αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR), τη θειορεδοξίνη και το NADPH (Netto et al., 1996).



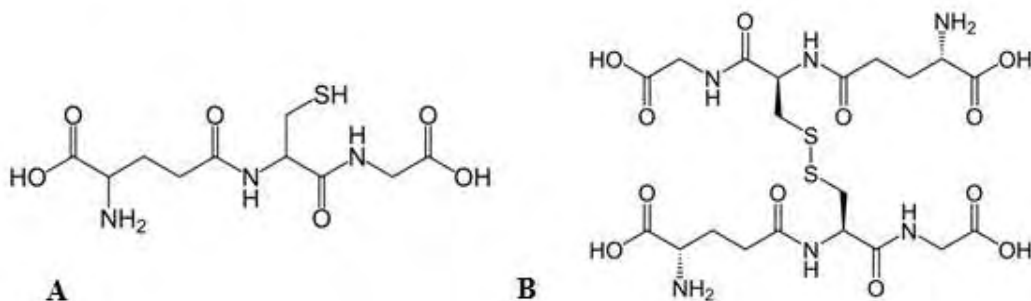
Εικόνα 12: Μηχανισμός δράσης των ενζύμων Prx και TrxR

1.5.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

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

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι η άφθονότερη θειόλη στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. Ενδοκυττάρια εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) ιδιότητές της παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων. Λαμβάνει μέρος επιπλέον, στο μεταβολισμό φαρμάκων, ασβεστίου καθώς και στις λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και σε διαδικασίες όπως η απομάκρυνση των ξеноβιοτικών, η διατήρηση των επιπέδων των θειολικών ομάδων των πρωτεϊνών, η απομάκρυνση υπεροξειδίων και ελευθέρων ριζών και η μεταφορά αμινοξέων διαμέσου των μεμβρανών. Η γλουταθειόνη απαντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) και λιγότερο στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG). Συνήθως, η GSSG είναι το 10% της GSH. Η GSH και η GSSG βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία και ο λόγος τους είναι συχνά ενδεικτικός της παρουσίας οξειδωτικού στρες.

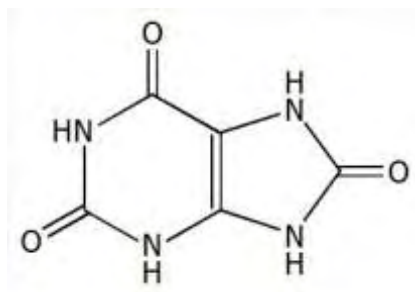


Εικόνα 13: Συντακτικός τύπος ανηγμένης (A) και οξειδωμένης (B) γλουταθειόνης

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

Ουρικό οξύ

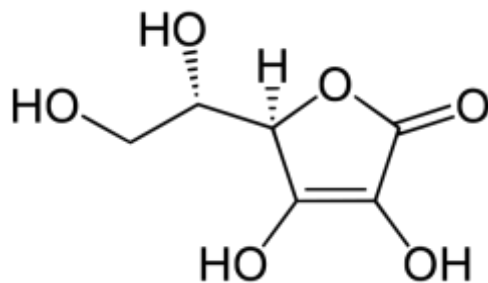
Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του στο πλάσμα του αίματος (Green and Fraser, 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και να συμβάλει στην προστασία από τις ελεύθερες ρίζες. Το ουρικό οξύ μπορεί να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



Εικόνα 14: Συντακτικός τύπος ουρικού οξέος

Βιταμίνη C

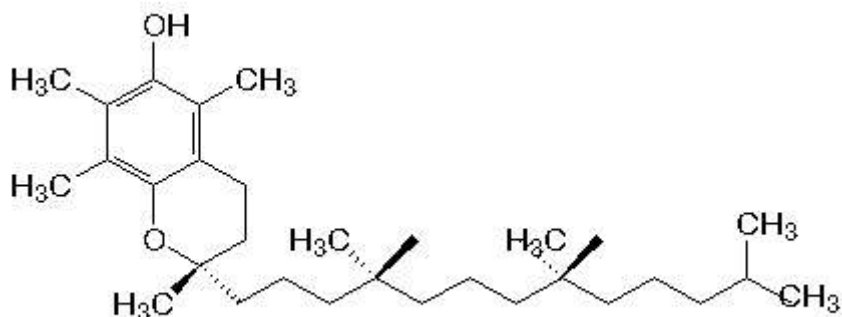
Η βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ, είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη δραστική τόσο στο εξωκυττάριο υγρό όσο και στο κυτταρόπλασμα. Λειτουργεί ως αναγωγικό μέσο, δίνοντας ηλεκτρόνια σε ενζυμικές και μη ενζυμικές αντιδράσεις. Επιπλέον, αποτελεί ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο, εφόσον μπορεί να εξουδετερώνει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



Εικόνα 15: Συντακτικός τύπος ασκορβικού οξέος

Βιταμίνη Ε

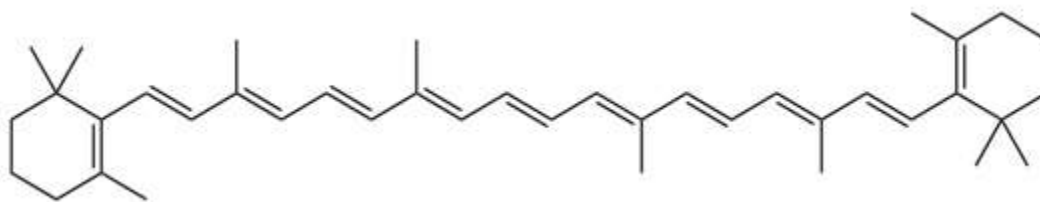
Η βιταμίνη Ε είναι λιποδιαλυτή και συναντάται σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η α-τοκοφερόλη είναι η πλέον δραστική μορφή της βιταμίνης Ε στους ανθρώπους και αποτελεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό. Λόγω της λιποδιαλυτής φύσης της έχει την ικανότητα να ενσωματώνεται σε κυτταρικές μεμβράνες και να τις προστατεύει από οξειδωτικές βλάβες. Ως αντιοξειδωτική ουσία, έχει την σταματά την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου που σχηματίζονται κατά την λιπιδική υπεροξειδωση δημιουργώντας μια ρίζα τοκοφερόλης, η οποία στη συνέχεια ανάγεται από μια άλλη αντιοξειδωτική ουσία. Επίσης, προστατεύει από την οξείδωση την βιταμίνη Α (Halliwell & Gutteridge, 1999).



Εικόνα 16: Βιταμίνη Ε (α-τοκοφερόλη)

B-καροτένιο

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



Εικόνα 17: Δομή Β-καροτενίου

Σελήνιο (Se)

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

1.6. Άσκηση και οξειδωτικό στρες

Πλήθος εργασιών αποδεικνύουν ότι η άσκηση μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών μέσω πολλών διαφορετικών μηχανισμών (Davies *et al.*, 1982; Pal *et al.*, 2017). Βασικό χαρακτηριστικό είναι ότι παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση συνδέεται άμεσα από την έντασή της. Έτσι, μεγάλης έντασης άσκηση έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (Palmer *et al.*, 2003), σε τέτοια επίπεδα που η αντιοξειδωτική άμυνα των ιστών να μην μπορεί να τα εξουδετερώσει. Έτσι προκαλείται το οξειδωτικό στρες, το οποίο προκαλεί οξειδωτική καταστροφή πρωτεϊνών, λιπιδίων και άλλων βιομορίων (Finaud *et al.*, 2006).

Κατά τη διάρκεια της άσκησης, αλλά και για κάποιο χρονικό διάστημα μετά την ολοκλήρωσή της, παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές σε διάφορες διεργασίες του οργανισμού. Συνεπώς, η άσκηση μπορεί να επηρεάσει ενδογενείς μηχανισμούς και να αυξήσει ή να μειώσει τη συγκέντρωση ουσιών, οδηγώντας σε ποικίλες προσαρμογές. Χαρακτηριστικές αποκρίσεις του οργανισμού στην άσκηση είναι η αύξηση της αιματικής ροής και της καρδιακής συχνότητας, όπως επίσης και η αύξηση στην πρόσληψη και την κατανομή του οξυγόνου στους ιστούς για την κάλυψη των αυξημένων αναγκών των μυών. Επιπλέον, ενισχύονται διεργασίες που οδηγούν στην παραγωγή ενέργειας όπως η γλυκόλυση, η γλυκογονόλυση, η λιπόλυση και φυσικά η οξειδωτική φωσφορυλίωση μέσω της οποίας παράγεται και το μεγαλύτερο μέρος του ATP στα μιτοχόνδρια. Παράλληλα κατά την διάρκεια της άσκησης, παρατηρείται αυξημένη παραγωγή μορίων όπως οι κατεχολάμινες, αλλά και βιοσύνθεση και δράση των ενζύμων όπως η οξειδάση της ξανθίνης, η υπεροξειδική δισμουτάση, η υπεροξειδάση και η αναγωγή της γλουταθειόνης καθώς και πολλά άλλα. Επιπρόσθετα, εξαιρετικά επίπονη άσκηση οδηγεί σε φαινόμενα φλεγμονώδους αντίδρασης στους μύες, ενεργοποιώντας το αμυντικό σύστημα του οργανισμού. Απόρροια όλων αυτών των διεργασιών είναι τόσο ο σχηματισμός όσο και η εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών, διατηρώντας έτσι μια δυναμική ισορροπία απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία και επιβίωση του οργανισμού.

Το 1982 πραγματοποιήθηκε η πρώτη μελέτη που κατέδειξε τη σχέση ανάμεσα στην άσκηση και το οξειδωτικό στρες (Davies et al., 1982) και έπειτα ακολούθησαν αρκετές έρευνες που συσχέτισαν την άσκηση με το οξειδωτικό στρες. Έτσι, μετά από χρόνια άσκηση βρέθηκε αυξημένη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, GPX) στο σκελετικό μυ, την καρδιά και το ήπαρ (Jenkins, 1988; Ji, 1999),

Όσον αφορά την αερόβια άσκηση (τρέξιμο, ποδηλασία, κολύμπι) έχει παρατηρηθεί αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών στους σκελετικούς μυς και την καρδιά (Davies, Quintanilla 1982; Kumar, et al., 1992), γεγονός που μπορεί να διαπιστωθεί από τη μεταβολή συγκεκριμένων δεικτών στο αίμα. Η άσκηση αύξησε σημαντικά την οξείδωση της γλουταθειόνης μετά από μετρήσεις που έγιναν σε δείγμα αίματος αθλητών ποδηλασίας (Aguilo et al., 2005), ενώ η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αυξήθηκε σε ποδηλάτες που ασκήθηκαν στο 100% της VO_{2max} σε σύγκριση με ποδηλάτες που ασκήθηκαν στο 40% της VO_{2max} (Lovlin et al., 1987). Επιπλέον, μετρήσεις στο αίμα αθλητών κολύμβησης των 800 μέτρων έδειξαν αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου καταλάση (Inal et al., 2001). Στην περίπτωση της αερόβιας άσκησης, τέλος, φαίνεται πως αυξάνεται και η συγκέντρωση τόσο των ενζυμικών όσο και των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών (Inal, Akyuz, Turgut, 2001).

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

1.7. Έκκεντρη άσκηση και οξειδωτικό στρες

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

Αρκετές έρευνες στη βιβλιογραφία έχουν ως αντικείμενο έρευνας και μελέτης το μυϊκό ιστό. Μικρός αριθμός από αυτές επικεντρώθηκαν στη μυϊκή βλάβη και τις φυσιολογικές αλλαγές που επέρχονται στον οργανισμό μετά από έκκεντρη άσκηση. Με βάση τα δεδομένα αυτά μας είναι πλέον γνωστό ότι η έκκεντρη άσκηση προκαλεί μυϊκή βλάβη (Jamurtas et al., 2000; Paschalis et al., 2005) καθώς και αλλαγές σε δείκτες προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες (Close, Ashton, Cable, Doran, & MacLaren, 2004; Close, Ashton, McArdle, & Maclaren, 2005; Goldfarb, Bloomer, & McKenzie, 2005; Lee et al., 2002). Στην έναρξη αλλά και στην εξέλιξη της βλάβης αυτής έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) (Silva et al., 2010, 2011). Η παραγωγή ROS κατά τη διάρκεια μιας εκτεταμένης περιόδου έκκεντρης άσκησης έχει αποδοθεί σε διαφορετικούς μηχανισμούς όπως στην παραγωγή ξανθίνης και οξειδάσης του NADPH, στο φαινόμενο της ισχαιμίας- επαναιμάτωσης, στο μεταβολισμό κατεχολαμινών, στη διάσπαση πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο, και στην υπερβολική συσσώρευση του ασβεστίου (McHugh et al., 1999).

Ο σημαντικότερος αιτία για τις μεταβολές αυτές στους δείκτες του οξειδωτικού στρες φαίνεται να είναι η φλεγμονώδης αντίδραση του οργανισμού στην προκληθείσα μυϊκή βλάβη. Έπειτα από μια επίπονη άσκηση βρέθηκε μια σημαντική διεύδυση φαγοκυττάρων στο μυ και

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

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

οξειδωτικού στρες έπειτα από έκκεντρη άσκηση. Ο λόγος είναι ότι οι μετρήσεις που χρησιμοποιούνται για να προσδιορίσουν τη μυϊκή βλάβης καθώς και οι δείκτες προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες συχνά παρουσιάζουν και διαφορετική κινητική ακόμη και στο ίδιο ερέθισμα.

Η αύξηση της παράγωγης δραστικών στοιχείων είναι και επιθυμητή για να αντιμετωπιστεί η φλεγμονή που δημιουργήθηκε μετά από την έκκεντρη άσκηση και να γίνει επιδιόρθωση του μυός.

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

ΣΚΟΠΟΣ

Σε παλιότερες έρευνες στη βιβλιογραφία, βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στους δείκτες του οξειδωτικού στρες ανάμεσα στα άτομα (Margaritelis *et al*, 2014; Stagos *et al*, 2015) . Η παρούσα εργαστηριακή μελέτη είχε σκοπό τη μελέτη επιπέδου εξουδετέρωσης κάθε ρίζας μεμονωμένα, έπειτα από την πραγματοποίηση έκκεντρης άσκησης σε ισοκινητικό δυναμόμετρο. Επίσης μελετήσαμε κατά πόσο οξειδωτικοί δείκτες μεταβάλλονται διαφορετικά σε άτομα που αθλούνται και σε άτομα που δεν έχουν επαφή με κάποιο είδος άθλησης. Και οι δύο ομάδες υποβλήθηκαν στην έκκεντρη άσκηση.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Συμμετέχοντες

Στη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης συμμετείχαν σαράντα νέοι εθελοντές, άνδρες και γυναίκες (ηλικία: $22,5 \pm 0,58$ χρόνια, ύψος: $175,1 \pm 1,56$ cm και βάρος: $75,43 \pm 2,27$ kg). Από την έρευνα αποκλείστηκαν άτομα που είχαν κάποιο ιστορικό μυοσκελετικό τραυματισμό στα κάτω άκρα και συνεπώς τους περιόριζε τη δυνατότητα να εκτελέσουν το πρόγραμμα της άσκησης. Το κάπνισμα και η κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής τους τελευταίους τρεις μήνες πριν από την έναρξη της μελέτης ήταν επίσης κριτήριο αποκλεισμού. Κατά την πρώτη τους επίσκεψη, μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5 kg η μάζα σώματος (δοκός ισοροπίας 710, Seca, Ηνωμένο Βασίλειο), ενώ οι εθελοντές ήταν ελαφρά ντυμένοι και ξυπόλητοι. Το ύψος τους μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5 cm (Υψόμετρο 208, Seca).

Οι εθελοντές είχαν εντολή να απέχουν από οποιαδήποτε έντονη άσκηση κατά τη διάρκεια της συμμετοχής τους στη μελέτη, καθώς και για πέντε ημέρες πριν και 3 μέρες μετά τη συνεδρία άσκησης. Τα άτομα ενθαρρύνθηκαν επίσης να μην πάρουν αντι-φλεγμονώδη ή αναλγητικά φάρμακα για όλη τη διάρκεια της μελέτης. Λήφθηκε η γραπτή συγκατάθεση από όλους τους συμμετέχοντες, αφού ενημερώθηκαν για τους κινδύνους, ταλαιπωρίες και τα οφέλη της συμμετοχής στη μελέτη. Οι διαδικασίες ήταν, σύμφωνα με τη δήλωση του Ελσίνκι του 1975, όπως αναθεωρήθηκε το 2000.

2.2. Πρωτόκολλο έκκεντρης άσκησης

Η συνεδρία έκκεντρης άσκησης πραγματοποιήθηκε σε ένα ισοκινητικό δυναμόμετρο (Cybex Norm, Ronkonkoma, NY). Τα πρωτόκολλα άσκησης έγιναν από την καθιστή θέση (120° γωνία ισχίου), αφού οι συμμετέχοντες είχαν σταθεροποιηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του

κατασκευαστή. Οι συμμετέχοντες συμπλήρωσαν 5 σετ των 15 μέγιστων έκκεντρων συστολών (γόνατο εύρος, 0° πλήρης έκταση έως 90° κάμψη) σε γωνιακή ταχύτητα 60° / s. Μεταξύ των σετ υπήρχε διάλλειμα 2 λεπτών, ενώ συνολικός χρόνος άσκησης ήταν 15 λεπτά. Η ανατροφοδότηση της έντασης και της διάρκειας της άσκησης παρέχονται αυτόματα από το δυναμόμετρο. Κατά τη διάρκεια της άσκησης, οι εθελοντές ενθαρρύνονταν λεκτικά, ώστε η προσπάθειά τους να είναι η μέγιστη δυνατή. Πριν από την πραγματοποίηση της άσκησης, οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε ζέσταμα 8 λεπτών που περιελάμβανε ποδηλασία σε κυκλικό εργόμετρο (70 rpm, 50 W). Επιπλέον, πραγματοποίησαν 1 σετ των 9 ομόκεντρων επαναλήψεων, καθώς και 1 σετ των 7 έκκεντρων επαναλήψεων στο ισοκινητικό δυναμόμετρο ως ζέσταμα και εξοικείωση με τη διαδικασία. Η επιλογή του ποδιού που πραγματοποίησε την άσκηση έγινε τυχαία από τους ίδιους τους εθελοντές.

2.3. Αξιολόγηση του μυϊκού πόνου

Από τους εθελοντές που συμμετείχαν ζητήθηκε να αξιολογήσουν τον καθυστερημένο μυϊκό πόνο (delayed onset muscle soreness, DOMS) που ένιωθαν αμέσως μετά την συνεδρία της έκκεντρης άσκησης, καθώς και 24, 48 και 72 ώρες μετά. Η αξιολόγηση έγινε με κριτήριο το βάδισμα (DOMSw) και το κάθισμα (DOMSq). Ο κάθε ασκούμενος αξιολογούσε προφορικά τον πόνο που ένιωθε σε αυτές τις δύο δοκιμασίες με βάση μια κλίμακα από το μηδέν («χωρίς πόνο») ως το δέκα («χειρότερος πόνος που μπορεί να φανταστεί κανείς»).

2.4. Συλλογή του αίματος και επεξεργασία

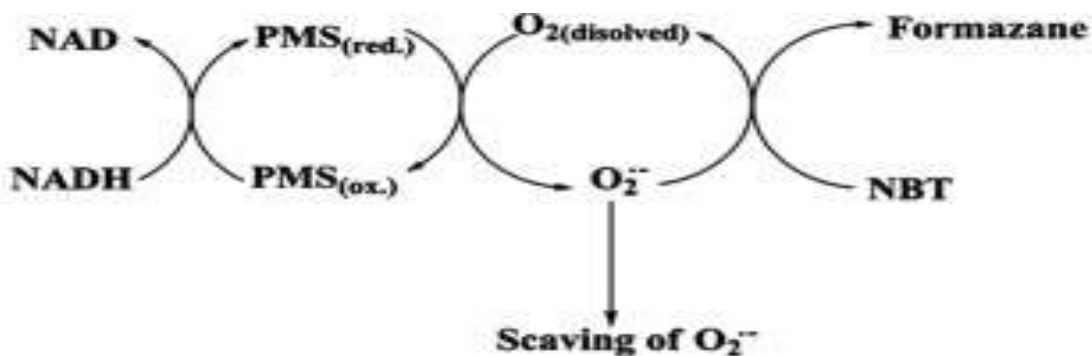
Από όλους τους συμμετέχοντες στο πείραμα λήφθηκε φλεβικό αίμα από τον βραχίονα (7mL) πριν, και 24, 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση. Τα 6ml αίματος συλλέχθηκαν σε σωληνάρια EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) για τις μετρήσεις της αναγωγικής δύναμης, ρίζα του σουπεροξειδίου και η ρίζα υδροξυλίου. Ενώ το υπόλοιπο 1ml αίματος που χρησιμοποιήθηκε για συλλέχθηκε σε σωληνάρια ηπαρίνης για την εκπόνηση άλλου παράλληλου με το δικό μας πειράματος. Τα δείγματα αίματος φυγοκεντρήθηκαν αμέσως στα 1370 g (όπου g η σχετική φυγοκεντρική δύναμη, RCF) για 10 λεπτά στους 4 °C για το διαχωρισμό του πλάσματος, το οποίο συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε σε μικρά σωληνάκια (eppendorf). Στη συνέχεια, τα συμπυκνωμένα ερυθροκύτταρα στο κάτω μέρος των σωλήνων λύθηκαν με τη χρήση απεσταγμένου νερού 1:1 (v/v), έπειτα από έντονη ανάδευση. Ακολούθησε φυγοκέντριση στα 4020 g για 15 λεπτά στους 4 °C και συλλογή του προϊόντος λύσης των ερυθροκυττάρων για τη μέτρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης και της δραστηρότητας του ενζύμου καταλάσης. Το πλάσμα και το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα φυλάχθηκαν στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί για τις απαιτούμενες βιοχημικές αναλύσεις.

2.5 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα $O_2^{\cdot-}$

Αρχή Μεθόδου

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot-}$ πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του Gulcin et al., 2004.

Η ρίζα $O_2^{\cdot-}$ έχει παρατηρηθεί ότι προκαλεί θανάτωση των κυττάρων, απενεργοποίηση ενζύμων και αποικοδόμηση του DNA, των κυτταρικών μεμβρανών και των πολυσακχαριτών. Η ρίζα αυτή επίσης, ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην υπεροξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων και πιθανώς άλλων ευαίσθητων ουσιών. Οι ανιονικές ρίζες σουπεροξειδίου προέρχονται από τα συστήματα PMS-NADH μέσω οξείδωσης του NADH και αναλύονται μέσω της μείωσης του NBT. Το $O_2^{\cdot-}$ μειώνει το κίτρινο χρώμα που προέρχεται από το NBT^{2+} με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ένα μπλε χρώμα το οποίο μετράται φασματοσκοπικά στα 560 nm. Ουσίες με αντιοξειδωτικές ιδιότητες μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό του μπλε NBT (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Σχηματισμός του προϊόντος φορμαζάνη από τη ρίζα σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) μέσω του συστήματος μεθοσουλφονική φαιναζίνη (PMS)-νικοτιναμιδο αδενινονουκλεοτίδιο (NADH)

Πειραματικό πρωτόκολλο

1. Σε 2,5 ml Tris-HCl (16mM, pH 8.0) προστίθενται 500 μl NBT (300μM),
2. προσθέτουμε 500 μl NADH (468μM) και 250 μl πλάσματος
3. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 500 μl PMS (60μM).
4. Τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά κα
5. ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 3000 rpm για 10 λεπτά στους 25°C.
6. Η απορρόφηση μετράται στα 560 nm.

Υπολογισμοί

Σε κάθε πείραμα τα δείγματα που δεν περιείχαν PMS (60μM) αποτελούσαν το τυφλό και τα δείγματα που δεν περιείχαν το δείγμα αποτελούσαν το μάρτυρα. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 560 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας $O_2^{\cdot -}$ υπολογίζεται από τον τύπο:

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

A_0 : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 560 nm

A_δ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 560 nm

2.6 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα OH[•]

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•] έγινε με τη μέθοδο των Chung et al., 1997.

Η ρίζα του υδροξυλίου είναι εξαιρετικά δραστική στα βιολογικά συστήματα και έχει χαρακτηριστεί ως εξαιρετικά βλαβερό είδος στην παθολογία των ελεύθερων ριζών, ικανό να προκαλέσει βλάβη σε βιομόρια των ζωντανών κυττάρων. Η ρίζα αυτή αλληλεπιδρά με νουκλεοτίδια στο DNA και προκαλεί σπάσιμο των αλυσίδων, γεγονός που οδηγεί στην καρκινογένεση, τη μεταλλαξιγένεση και την κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•] μιας ουσίας συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος.

Η επίδραση των ριζών υδροξυλίου εκτιμήθηκε με τη μέθοδο οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης. Η 2-δεοξυριβόζη οξειδώνεται από τις ρίζες υδροξυλίου που δημιουργούνται κατά την αντίδραση Fenton και διασπάται σε μαλονδιαλδεΐδη (Gutteridge, 1984, 1987). Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου εκτιμάται ως ο ρυθμός αναστολής της οξείδωσης της 2-δεοξυριβόζης από τις ρίζες υδροξυλίου.

Πειραματικό Πρωτόκολλο

1. 75 μL πλάσματος προστέθηκαν σε 450 μl sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4),
2. Έπειτα προσθέτουμε 150 μl 2-deoxyribose (10 mM), 150 μl FeSO_4 - EDTA (10 mM), 525 μl H_2O και 150 μl H_2O_2 (10 mM)
3. Τα επωάζουμε για 4 ώρες στους 37°C
4. Στη συνέχεια προστίθενται 750 μl TCA (2.8 %) και 750 μl TBA (1 %)
5. Τα δείγματα επωάζονται στους 95°C για 10 min.
6. Ακολουθεί μεταφορά των δειγμάτων στον πάγο για 5 λεπτά
7. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 3000 rpm για 10 λεπτά.
8. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 520 nm.

Σε κάθε πείραμα τα δείγματα που δεν περιείχαν H_2O_2 (10 mM) αποτελούσαν το τυφλό και τα δείγματα που δεν περιείχαν πρωτεΐνη αποτελούσαν το μάρτυρα. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 520 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Υπολογισμοί :

Η % ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας $\text{OH}\cdot$ υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (\text{A}_0 - \text{A}_\delta) / \text{A}_0 \times 100$$

A_0 : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 520 nm

A_δ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 520 nm

2.7 Μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικής δύναμης

Η αναγωγική δύναμη προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen & Duh (1994).

Η αναγωγική δύναμη μιας ουσίας σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της ικανότητα και αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη της. Ενώσεις με αναγωγική δύναμη υποδεικνύουν ότι είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα της λιπιδικής υπεροξειδωσης, έτσι ώστε να δράσουν ως αρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Στη μέθοδο αυτή, ουσίες, που μπορεί να έχουν κάποια αναγωγική ικανότητα, αντιδρούν με τον Fe^{3+} και τον ανάγουν σε Fe^{2+} , όπου όταν αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο δίνει ένα σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 700 nm. Το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος αλλάζει σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα με την αναγωγική δύναμη της εξεταζόμενης ουσίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση στα 700nm, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αναγωγική δύναμη.

Πειραματικό πρωτόκολλο :

1. Το πλάσμα διαλύθηκε σε phosphate buffer (0.2M, pH 6.6) .
2. Προστέθηκαν 2.5 ml από το διάλυμα του δείγματος μας σε 2.5 ml potassium ferricyanide (1%)
3. Τα δείγματα μας επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 50 °C για 20 λεπτά.
- 4, Ακολουθεί μεταφορά τους στον πάγο για 5 λεπτά.
5. Στη συνέχεια, προστίθενται 2.5 ml TCA (10%)
6. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά στους 25°C.

7. Στο υπερκείμενο (2.5 ml) προστίθενται 2.5 ml απιονισμένου νερού και 500 μl χλωριούχου σιδήρου (0.1 %) και ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

8. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 700 nm. Επίσης, ελέγχθηκε αν οι πρωτεΐνες απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 700 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

2.8 Στατιστική ανάλυση

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

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αξιολόγηση μυϊκού πόνου και μυϊκής βλάβης

Σύμφωνα με την αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου στην οποία υποβλήθηκαν οι συμμετέχοντες στην παρούσα εργασία, φαίνεται ότι ο δείκτης αυτός αυξήθηκε μετά την άσκηση από 3,94 φορές έως 4,66 φορές κατά το βάδισμα και από 3,46 φορές έως 5,16 φορές κατά το κάθισμα. Επιπλέον ο μέγιστος μυϊκός πόνος παρατηρήθηκε τόσο στη δοκιμασία του βαδίσματος όσο και σ' αυτή του καθίσματος, εμφανίστηκε κατά τις 48 ώρες μετά την πραγματοποίηση την έκκεντρης άσκησης, ενώ από τις 72 ώρες και μετά οι τιμές αρχίζουν να επανέρχονται στα αρχικά τους επίπεδα. Αυτό το γεγονός αποδεικνύει ότι πράγματι προκλήθηκε μυϊκή βλάβη στους συμμετέχοντες. Τα αποτελέσματα αυτά παρουσιάζονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 1).

	Πριν	Αμέσως μετά	24 ώρες μετά	48 ώρες μετά	72 ώρες μετά
DOMS Περπάτημα	1,00 ± 0,00	3,94 ± 0,47	3,88 ± 0,44	4,66 ± 0,48	4,01 ± 0,41
DOMS Κάθισμα	1,00 ± 0,00	3,44 ± 0,35	4,94 ± 0,47	5,16 ± 0,46	3,64 ± 0,48

Πίνακας 1: Αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου (DOMS) μετά την έκκεντρη άσκηση. Δίνονται οι μέσες τιμές ± SEM (τυπική απόκλιση).

3.2 Δείκτες Οξειδωτικού στρες

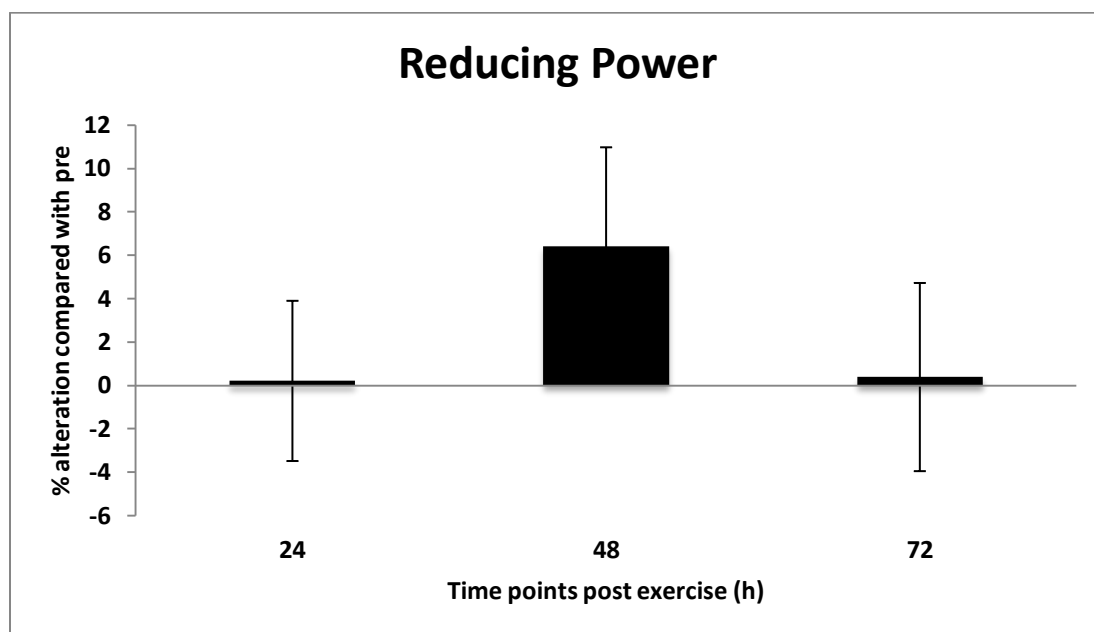
Στα διαγράμματα που ακολουθούν, παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα από τη μελέτη των επί τοις εκατό μεταβολών στους δείκτες του οξειδωτικού στρες, μετά από την πραγματοποίηση της έκκεντρης άσκησης. Στην έρευνα έλαβαν μέρος 40 εθελοντές εκ των οποίων οι 22 είναι άτομα τα όποια βρίσκονταν σε επαφή με κάποιου είδους αθλητικής δραστηριότητας και χαρακτηρίζονται ως “αθλούμενοι”, ενώ οι υπόλοιποι 18 δεν πραγματοποιούσαν κανένα είδος άθλησης και αναφέρονται ως “μη αθλούμενοι”. Οι συμμετέχοντες εξετάστηκαν αναφορικά με τους δείκτες του οξειδωτικού στρες, τόσο στο σύνολό τους όσο και μετά από διάκρισή τους στις δύο προαναφερθείσες κατηγορίες (αθλούμενοι και μη αθλούμενοι) και τα αποτελέσματα που λάβαμε παρουσιάζονται εκτενώς στα διαγράμματα που ακολουθούν. Επιπλέον, τα διαγράμματα συνοδεύονται από τους αντίστοιχους πίνακες, στους οποίους παραθέτονται τα επί τοις εκατό ποσοστά μεταβολής του κάθε δείκτη στις διάφορες χρονικές στιγμές μετά την άσκηση σε σχέση με το δείγμα pre (χρησιμοποιείται ως control).

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

3.3 Αναγωγική Δύναμη

Στην Αναγωγική δύναμη (Reducing Power) δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στην ομαδική ανάλυση, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 1 . Ωστόσο, μετά το διαχωρισμό σε δυο ομάδες παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στις 72 ώρες ανάμεσα στις δυο ομάδες

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στην αναγωγή του Fe (III) σε Fe (II) μπορούν να συμμετέχουν μόρια όπως το Ουρικό οξύ, η α-Τοκοφερόλη, η χολερυθρίνη, το ασκορβικό οξύ (Reddy *et al.*, no date; Benzie and Strain, 1996).

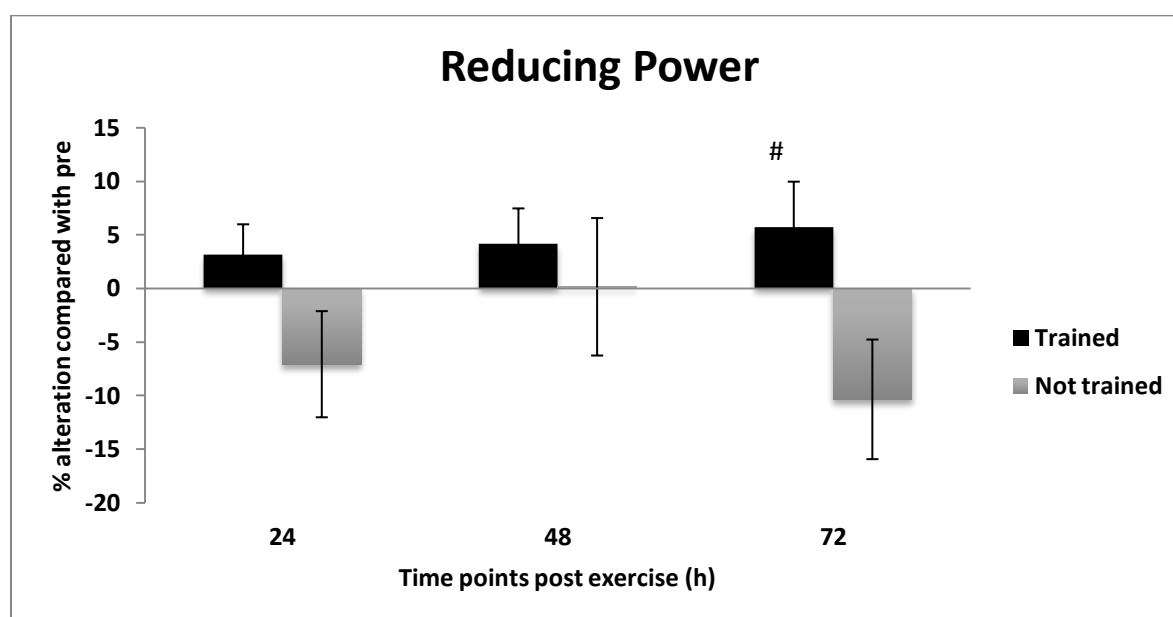


Διάγραμμα 1: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη αναγωγικής δύναμης στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα *pre*.

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
Reducing power (%)	0,18 ± 3,61	6,25 ± 4,41	-0,54 ± 4,20

Πίνακας 2: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη Αναγωγική δύναμη (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα pre.

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



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

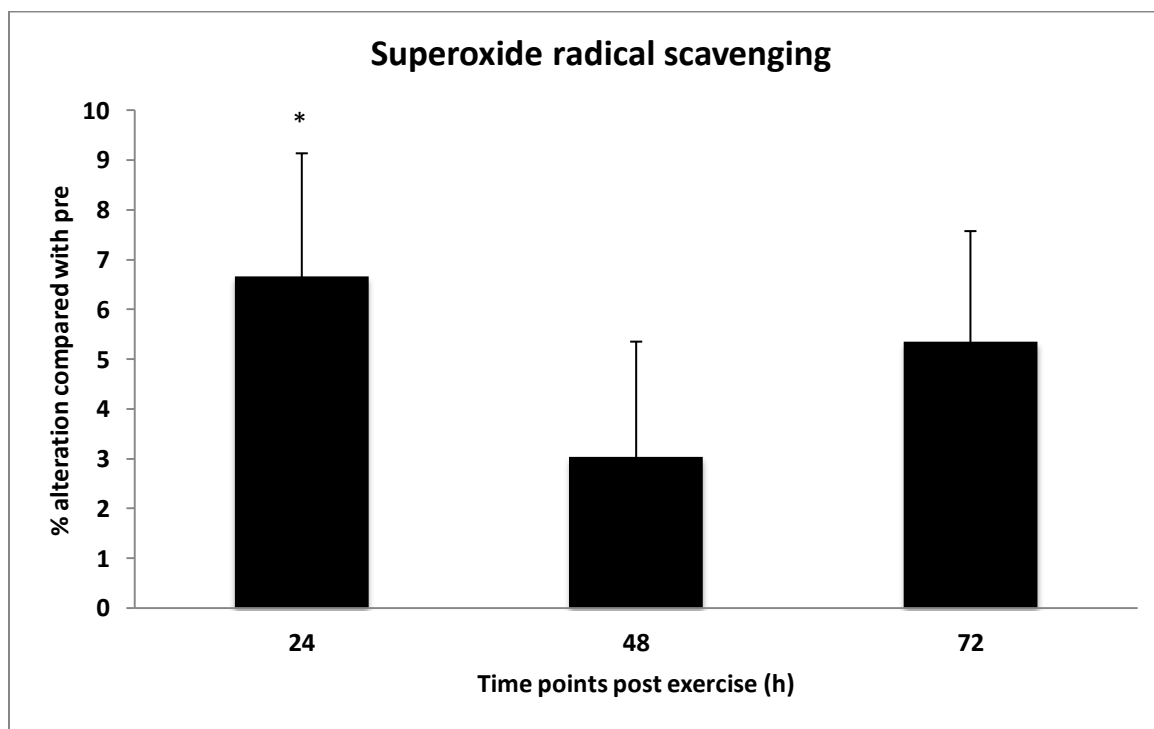
(#) Σημαντικά στατιστική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των δύο ομάδων

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
αθλούμενοι	3,14 ± 2,82	4,12 ± 3,32	5,72 ± 4,22
μη αθλούμενοι	-7,08 ± 4,95	0,14 ± 6,41	-10,36 ± 5,58

Πίνακας 3: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη Reducing Power (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα pre.

3.4 Εξουδετέρωση της ρίζας του σουπεροξειδίου

Στο ακόλουθο διάγραμμα φαίνεται η ομαδική ανάλυση για την εξουδετέρωση της ρίζας του σουπεροξειδίου σε σχέση με το δείγμα *pre*. Όπου παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στις 24 ώρες

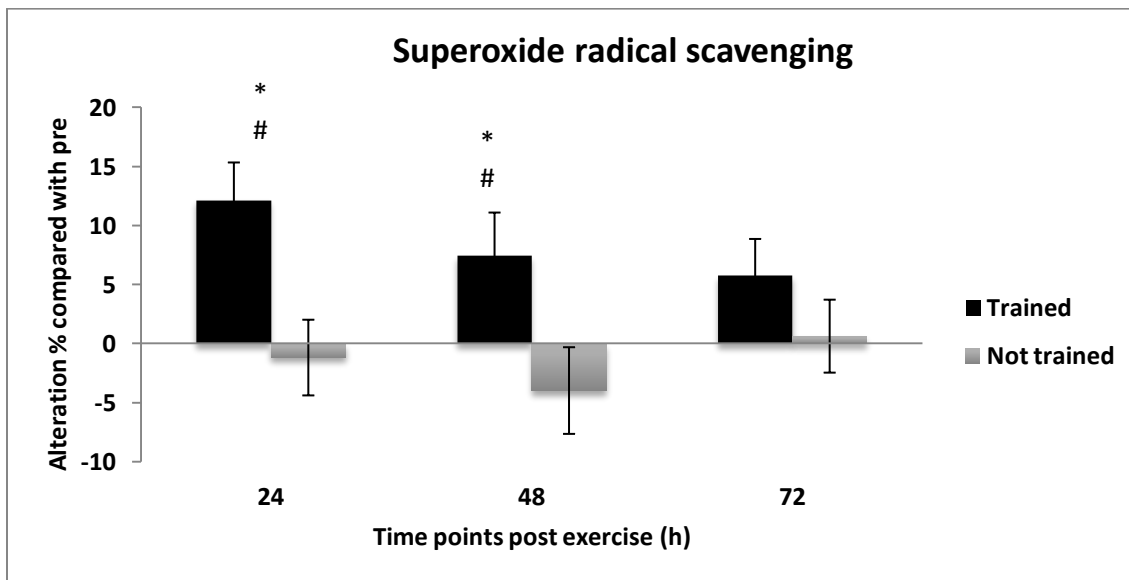


Διάγραμμα 3 :() Σημαντικά στατιστική διαφορά ($p < 0,05$) σε σχέση με το δείγμα *pre* .Στα επίπεδα εξουδετέρωσης της ρίζας σουπεροξειδίου, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στις 24 ώρες κατά 6.67% σε σχέση με το δείγμα *pre*.*

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
Superoxide Radical Scavenging (%)	6,67 ± 2,47	3,04 ± 2,31	5,35 ± 2,23

Πίνακας 4: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη Superoxide Radical (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα pre.

Μετά το διαχωρισμό σε δυο ομάδες παρατηρούμε στο παρακάτω διάγραμμα ότι οι γυμνασμένοι έχουν σημαντικά αυξημένα τα επίπεδα εξουδετέρωσης της ρίζας του σουπεροξειδίου κατά 12.16% και 7.45% στις 24 και 48 ώρες αντίστοιχα, σε σχέση με το δείγμα pre. Ταυτόχρονα, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων στις συγκεκριμένες χρονικές στιγμές υποδηλώνοντας αυξημένη δραστηριότητα στους γυμνασμένους.



Διάγραμμα 4:(#) Σημαντικά στατιστική διαφορά ($p < 0,05$) μεταξύ των δύο ομάδων

(*) Σημαντικά στατιστική διαφορά ($p < 0,05$) σε σχέση με το δείγμα pre

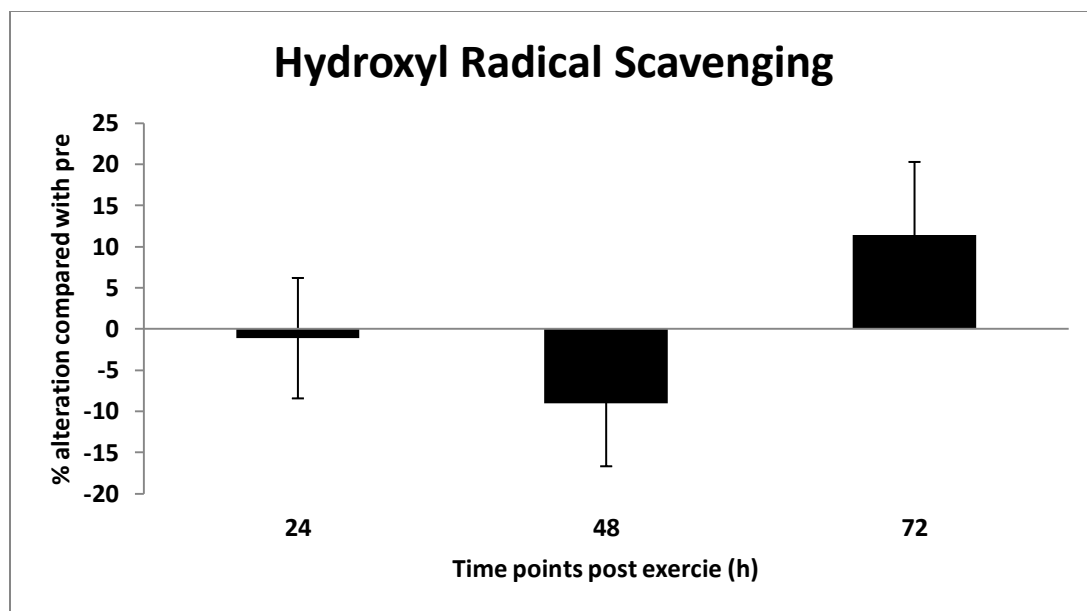
	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
αθλούμενοι	12,16 ± 3,17	7,45 ± 2,68	5,79 ± 2,79
μη αθλούμενοι	-1,16 ± 3,20	-3,96 ± 3,67	0,65 ± 3,09

Πίνακας 5: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη *Superoxide Radical* (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα *pre*.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία κυρίαρχο ρόλο στην εξουδετέρωση της ρίζας σουπεροξειδίου στο πλάσμα παίζει η SOD (Nimse and Pal, 2015). Γενικότερα, έχει τεκμηριωθεί ότι γυμνασμένοι άνθρωποι παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα SOD (JI *et al.*, 1998; Vaamonde, Du Plessis and Agarwal, 2016).

3.5 Εξουδετέρωση της ρίζας του υδροξυλίου

Στα επίπεδα εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση σε σχέση με το δείγμα *pre* (όπως φαίνεται και στο διάγραμμα).

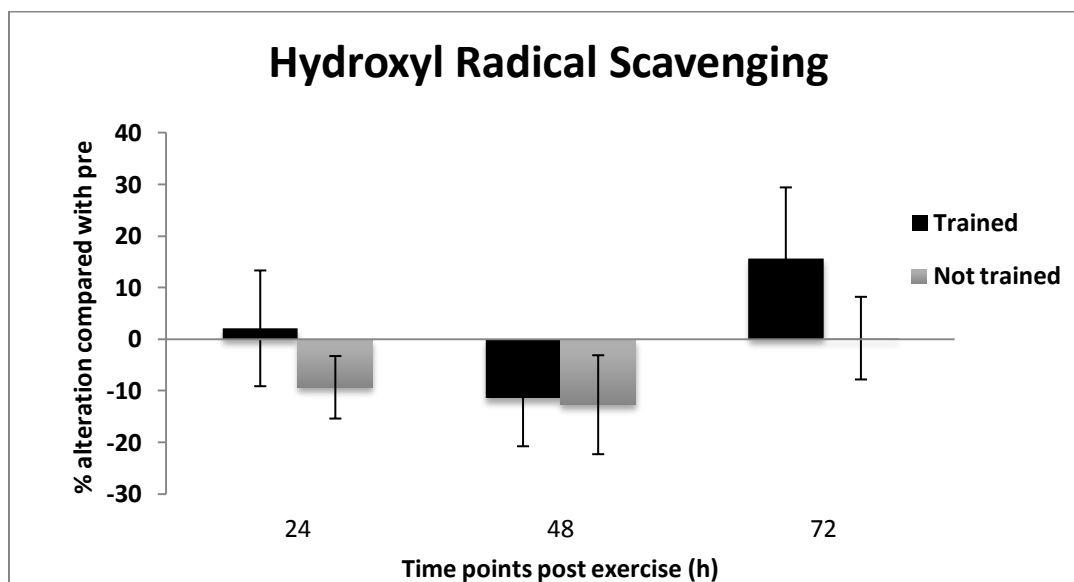


Διάγραμμα 5: επίπεδα εξουδετέρωσης της ρίζας του OH κατά την άσκηση στην συνολική ανάλυση

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
Hydroxyl Radical Scavenging (%)	-1,01 ± 6,85	-8,87 ± 7,34	10,95 ± 8,57

Πίνακας 6: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη Hydroxyl Radical Scavenging (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα pre.

Παρομοίως μετά τον διαχωρισμό σε δυο ομάδες δεν παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές σε σχέση με πριν την άσκηση ή διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων.



Διάγραμμα 6: Μεταβολή του δείκτη της ρίζα του υδροξυλίου κατά των διαχωρισμών σε δύο ομάδες

	% μεταβολή 24 h	% μεταβολή 48 h	% μεταβολή 72 h
αθλούμενοι	2,14 ± 11,22	-11,43 ± 9,29	15,76 ± 13,74
μη αθλούμενοι	-4,29 ± 6,06	-12,66 ± 9,59	1,24 ± 8,01

Πίνακας 7: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη Hydroxyl Radical Scavenging (μέση τιμή ± SEM) μεταξύ των δύο ομάδων

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μόρια που εξουδετερώνουν τη ρίζα υδροξυλίου είναι η Μαννιτόλη (Shen, Jensen and Bohnert, 1997), Μελατονίνη (Reiter *et al.*, 1995), Γλουταθειόνη (Reiter *et al.*, 1995), Κερκετίνη (Nimse and Pal, 2015), Αλβουμίνη (8).

3.6 Συσχέτιση δειχτών

A) Συνολικό γκρούπ (ν=40)

	24 ώρες			48 ώρες			72 ώρες		
	OH ⁻	O ₂ ⁻	RP	OH ⁻	O ₂ ⁻	RP	OH ⁻	O ₂ ⁻	RP
OH ⁻									
O ₂ ⁻		-,047	,133		-,194	,042		,057	,259
			,031			-,07			-,061

B) Αθλούμενοι (ν=22)

	24 ώρες			48 ώρες			72 ώρες		
	OH ⁻	O ₂ ⁻	RP	OH ⁻	O ₂ ⁻	RP	OH ⁻	O ₂ ⁻	RP
OH ⁻									
O ₂ ⁻		-,153	,514 *		-,081	,253		,155	,336
			-,107			,137			-,068

Γ) Μη αθλούμενοι (ν=18)

	24 ώρες			48 ώρες			72 ώρες		
	OH ⁻	O ₂ ⁻	RP	OH ⁻	O ₂ ⁻	RP	OH ⁻	O ₂ ⁻	RP
OH ⁻									
O ₂ ⁻		,352	-,117		-,385	,166		-,412	-,328
			-,127			-,069			,130

Πίνακας 8: Στατιστική ανάλυση κατά Spearman των αποτελεσμάτων των δεικτών i) εξουδετέρωση ρίζας υδροξειλίου (OH⁻), ii) εξουδετέρωση ρίζας υπεροξειδίου (O₂⁻), iii) Αναγωγική δύναμη (RP). Παρατίθενται οι αναλύσεις που αφορούν το συνολικό γκρούπ (A), την ομάδα των αθλούμενων (B) και των μη-αθλούμενων (Γ). Οι εξεταζόμενοι δείκτες συσχετίζονται σε κάθε χρονική στιγμή μεταξύ τους. Με * συμβολίζεται σημαντικά στατιστική συσχέτιση (p<0.05)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η παραγωγή ελευθέρων ριζών σχετίζεται άμεσα με την άσκηση (Davies *et al.*, 1982; Alessio, 1993; Alessio *et al.*, 2000; Urso and Clarkson, 2003; Powers and Jackson, 2008) μέσω διαφόρων μηχανισμών (Brantley *et al.*, 1993; MCBRIDE and KRAEMER, 1999; Cooper *et al.*, 2002; Elosua *et al.*, 2003). Επιπλέον ενδιαφέρον στοιχείο, είναι η συσχέτιση ανάμεσα στην ένταση της άσκησης και την παραγωγή των ελευθέρων ριζών, που έχει ως τελικό αποτέλεσμα την υπέρμετρη αύξηση των παραγόμενων ελεύθερων ριζών μετά από έντονη και εξαντλητική άσκηση (Palmer *et al.*, 2003; Nikolaidis *et al.*, 2007). Όταν όμως τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών υπερβούν το όριο των τιμών που μπορεί να αντιμετωπίσει η ενδογενής αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού ώστε να τις εξουδετερώσει, τότε προκαλείται μια κατάσταση που ονομάζεται οξειδωτικό στρες και αναφέρεται στην ανισορροπία μεταξύ του σχηματισμού ελευθέρων ριζών και της απομάκρυνσής τους από το αντιοξειδωτικό σύστημα (Nikolaidis *et al.*, 2007; Veskoukis *et al.*, 2008). Η κατάσταση αυτή μπορεί να επιφέρει αρνητικές συνέπειες στον οργανισμό διότι προκαλεί βλάβες στη δομή και τη λειτουργία βιομορίων, επηρεάζοντας κατά αυτόν τον τρόπο βασικές διεργασίες (Phaneuf and Leeuwenburgh, 2001; Finaud, Lac and Filaire, 2006; Schneider and Tiidus, 2007; Veskoukis *et al.*, 2008)

Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση ενεργοποιείται σαν απάντηση στην προσαρμογή σε νέα ερεθίσματα μέσω μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ελέγχονται από την κατάσταση των θειολών (με κυριότερη θειόλη τη γλουταθειόνη) (Ji *et al.*, 2006; Melikoglu *et al.*, 2008; Zembron-Lacny *et al.*, 2010; Zembron-Lacny *et al.*, 2010). Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο, καθώς γίνεται φανερό πως η οξειδοαναγωγική κατάσταση των θειολών επηρεάζει την έκφραση του πυρηνικού παράγοντα κB (NF-κB) και της πρωτεΐνης ενεργοποιητή 1 (AP-1), η έκφραση των οποίων τελικώς οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των κυτοκινών ιντερλευκίνης-6 (IL-6) και του ογκογόνου παράγοντα νέκρωσης α (TNF-α) (Ji *et al.*, 2006; Kerksick *et al.*, 2005). Τόσο η IL-6 όσο και ο TNF-α έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν την αναγέννηση του μύος και την ανάπτυξη αντοχής στις επαγόμενες από τις ROS μυϊκές βλάβες (Steensberg *et al.*, 2000).

Πληθώρα ερευνών στις ημέρες μας αναφέρονται τόσο στην αερόβια όσο και στην αναερόβια άσκηση, διαφορετικής διάρκειας και έντασης (Davies *et al.*, 1982; Jenkins, 1988; Ji, 1999; Ji, Gomez-Cabrera and Vina, 2006; Veskoukis *et al.*, 2008; Kumar, et al., 1992;(Aguiló *et al.*, 2005; Nikolaidis *et al.*, 2006; Michailidis *et al.*, 2007), ωστόσο η καταγεγραμμένη μεγάλη καταπόνηση που προκαλείται λόγω της έκκεντρης άσκησης οδήγησε στην μελέτη της μυϊκής βλάβης που προκαλείται από αναλόγου είδους άσκηση (Jamurtas *et al.*, 2000; Close *et al.*, 2004; Goldfarb, J Bloomer and McKenzie, 2005; Paschalis *et al.*, 2005; Park and Lee, 2015). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι ο όρος “έκκεντρη συστολή” αναφέρεται στην επιμήκυνση του μυός όταν προσπαθεί να υπερνικήσει μια εξωτερική αντίσταση στην οποία υποβάλλεται. Χαρακτηριστικό της άσκησης αυτής αποτελεί το γεγονός πως είναι εξαιρετικά έντονη και επίπονη, προκαλώντας σημαντική μυϊκή βλάβη και μεταβολές σε δείκτες του οξειδωτικού στρες, στοιχεία που την καθιστούν ένα πολύ καλό μοντέλο μελέτης για την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Αξιοσημείωτο και ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός επίσης, ότι παλαιότερες έρευνες τόσο του εργαστηρίου μας όσο και άλλων εργαστηρίων έχουν δείξει πως ανάμεσα στα άτομα υπάρχουν μεγάλες διαφορές στους δείκτες του οξειδωτικού στρες. Έτσι, η έκκεντρη άσκηση μπορεί όχι μόνο να προκαλέσει οξειδωτικό στρες σε μεγάλο βαθμό, αλλά και αμελητέο ή ακόμα και αναγωγικό στρες σε σημαντικό αριθμό ατόμων (Margaritelis *et al.*, 2014; Stagos *et al.*, 2015)

Για το λόγο αυτό, και προκειμένου να ληφθούν επαρκείς απαντήσεις που να καλύπτουν τα κενά σημεία που προκύπτουν από τη βιβλιογραφία, σαράντα (40) νέοι και υγιείς εθελοντές, άνδρες και γυναίκες, υποβλήθηκαν σε έκκεντρη άσκηση που πραγματοποιήθηκε σε ισοκινητικό δυναμόμετρο. Οι μετρήσεις για τον προσδιορισμών των δεικτών του οξειδωτικού στρες έγιναν σε δείγμα αίματος (μετά από επεξεργασία του) που συλλέχθηκε πριν και 24, 48 και 72 ώρες μετά από την άσκηση.

Σε παράλληλη εργασία, τα ίδια δείγματα εξετάστηκαν από δείκτες οξειδωτικού στρες που προσδιορίζονται φωτομετρικά όπως είναι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB), ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και η δραστηριότητα του ενζύμου της καταλάσης (CAT). Στην εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης χρησιμοποιήθηκαν και δύο νέοι δείκτες: ο δείκτης δυναμικού της στατικής οξειδωσης-αναγωγής (sORP) και ο δείκτης δυναμικής ικανότητας οξειδωσης-αναγωγής (cORP) ενώ έγινε και αξιολόγηση του μυϊκού πόνου μετά την

άσκηση (Delayed Onset Muscle Soreness-DOMS). Ωστόσο, η παρούσα εργασία είχε ως επίκεντρο την μελέτη της εξουδετέρωσης της ρίζας του υδροξυλίου και σουπεροξειδίου όπως και την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή, με σκοπό να διασαφηνιστεί κατά πόσο ο κάθε μηχανισμός επηρεάζει ή επηρεάζεται από τον άλλο μέσα στον ίδιο οργανισμό. Αυτό κρίθηκε απαραίτητο καθώς οι παραπάνω δείκτες οξειδωτικού στρες, μπορεί από τη μια πλευρά να αντικατοπτρίζουν τη γενική απόκριση του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες και τις συνέπειες που μπορεί να προκληθούν από την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ωστόσο η έρευνα μας μπορεί να δώσει ακριβείς απαντήσεις σχετικά με τον τρόπο που κάθε επιμέρους ρίζα επηρεάζεται και εξουδετερώνεται τις επόμενες μέρες από μια τέτοια άσκηση ώστε πιθανώς μέσω κατάλληλης παρέμβασης να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή αποκατάσταση.

Αρχικά και όσον αφορά την αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου (DOMS) και της μυϊκής βλάβης που προκλήθηκε στους συμμετέχοντες έπειτα από την πραγματοποίηση της έκκεντρης άσκησης, φαίνεται πως ο δείκτης αυτός είχε ανοδική πορεία τόσο στη δοκιμασία της βάρδισης όσο και σ' αυτή του καθίσματος. Συγκεκριμένα, ο μέγιστος μυϊκός πόνος και για τις δύο δοκιμασίες παρουσιάστηκε στις 48 ώρες μετά την άσκηση τόσο για το περπάτημα όσο και για το κάθισμα ενώ μέσα στις επόμενες μέρες η κατάσταση του μυός δείχνει να επανέρχεται στο φυσιολογικό με τις τιμές να μειώνονται (Πίνακας 1). Τα αποτελέσματα αυτά αναφέρονται στο σύνολο των εθελοντών και υποδηλώνουν την πρόκληση της μυϊκής βλάβης σε όλα τα άτομα. Η αύξηση του DOMS μετά από έκκεντρη άσκηση έχει προταθεί πως προκαλείται από ποικίλες βιοχημικές αλλαγές μετά τη μυϊκή καταστροφή και όχι από ένα μεμονωμένο γεγονός (Kim and Lee, 2014). Έτσι, η κύρια αιτία του DOMS είναι οι δομικές βλάβες των μυών, που προκαλούν θεμελιώδης ρήξεις μέσα στο μυ (J. Kim and J. Lee, 2014). Αυτή η μυϊκή βλάβη επάγει φλεγμονώδη απόκριση (π.χ., απελευθέρωση χημειοκινών, ενεργοποίηση των φλεγμονωδών κυττάρων, αύξηση προσταγλανδινών, και την παραγωγή αραχιδονικού οξέος). Αυτές οι φλεγμονώδεις ενώσεις αλληλεπιδρούν άμεσα με προσαγωγούς νευρώνες μέσω των υποδοχέων του πόνου. Όταν τα ερεθίσματα από τους προσαγωγούς νευρώνες φτάσουν στο μυελό και στον εγκεφαλικό φλοιό, ο μυϊκός πόνος γίνεται αντιληπτός (J. Kim and J. Lee, 2014). Άλλοι παράγοντες που δείχνουν να εμπλέκονται στους φυσιολογικούς μηχανισμούς που επάγονται από το DOMS είναι το γαλακτικό οξύ και τα οξείδια του αζώτου (J. Kim and J. Lee, 2014). Επιπλέον, αν και είναι σαφές ότι οι ελεύθερες ρίζες παράγονται μετά την έκκεντρη άσκηση, δεν

είναι ξεκάθαρο αν υπάρχει άμεση σχέση μεταξύ αυτών και του DOMS (Close *et al.*, 2005). Έχει προταθεί ότι η φλεγμονή που προκαλείται από έκκεντρη άσκηση μπορεί να είναι η κύρια αιτία της παραγωγής ελευθέρων ριζών. Συγκεκριμένα, η φλεγμονή στρατολογεί τα φαγοκύτταρα να μεταναστεύσουν προς το κατεστραμμένο ιστό με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών όπως το σουπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου (Close *et al.*, 2005) καθώς το ένζυμο NADPH οξειδάση, μετατρέπει το O₂ σε ρίζα σουπεροξειδίου το οποίο στη συνέχεια θα μετατραπεί σε υπεροξειδίου του υδρογόνου από τη δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) (Steinbacher and Eckl, 2015). Αυτές οι δραστικές μορφές μπορεί να προκαλέσουν περαιτέρω βλάβη καταστρέφοντας τα μυϊκά κύτταρα (G. L. Close *et al.*, 2005).

Όπως προαναφέρθηκε παραπάνω η έρευνά μας αφορούσε τη δυνατότητα αναστολής των ριζών υδροξυλίου και υπεροξειδίου καθώς και την αναγωγή του τρισθενούς σιδήρου σε δισθενή από αναγωγικά μόρια του οργανισμού. Έτσι λοιπόν και αναφορικά με τη ρίζα του υπεροξειδίου, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση της αναστολής της στις 24 ώρες κατά 6,67% σε σχέση με το δείγμα pre υποδηλώνοντας μια εντονότερη αναγωγική δράση για τη συγκεκριμένη ώρα (διάγραμμα 3, πίνακας 4). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία κυρίαρχο ρόλο στην εξουδετέρωση της ρίζας σουπεροξειδίου στο πλάσμα παίζει η SOD (Nimse and Pal, 2015). Αντίθετα τόσο στην Αναγωγική δύναμη (Reducing Power) όσο και στην εξουδετέρωση της ρίζας του υδροξειλίου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στο συνολικό γκρούπ σε σχέση με το δείγμα πριν την άσκηση (διάγραμμα 1, 5). Πιθανή αιτία για την μη ανίχνευση σημαντικών μεταβολών θεωρήθηκε η ποικιλομορφία που παρατηρείται μεταξύ των ατόμων και η διαφορετική απόκριση κάθε οργανισμού στην αντιμετώπιση κάθε μια ρίζας ξεχωριστά.

Έτσι, δεδομένης της εξατομικευμένης ανταπόκρισης των ατόμων στα οξειδωτικά ερεθίσματα μετά από άσκηση, η μελέτη μας προσανατολίστηκε στην εύρεση ενός χαρακτηριστικού που θα μπορούσε να ομαδοποιεί τα άτομα. Ως τέτοιο χαρακτηριστικό ορίστηκε το αθλητικό ιστορικό των εθελοντών που συμμετείχαν, δηλαδή αν πραγματοποιούσαν οποιοδήποτε είδος αθλητικής δραστηριότητας στο πρόσφατο παρελθόν και στο παρόν. Με αυτό το κριτήριο χωρίσαμε τους συμμετέχοντες σε δύο υποομάδες, με τους εθελοντές που έχουν επαφή με κάποιο είδος άσκησης να αναφέρονται ως «αθλούμενοι» και εκείνους που δεν είχαν καμία επαφή με άσκηση να αναφέρονται ως «μη αθλούμενοι». Από το σύνολο των εθελοντών οι είκοσι δύο (22) ήταν αθλούμενοι, ενώ οι υπόλοιποι δεκαοκτώ (18) μη αθλούμενοι.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, στο στάδιο αυτό έγινε διερεύνηση της αναγωγικής συμπεριφοράς των συμμετεχόντων μετά από διάκρισή τους στις δύο προαναφερθείσες κατηγορίες. Αρχικά, στην μελέτη εξουδετέρωσης της ρίζας του υπεροξειδίου βρέθηκε ότι οι αθλούμενοι παρουσίασαν αυξημένη αναγωγική δράση σε σύγκριση με το δείγμα πριν την άσκηση στις 24 και 48 ώρες κατά 12,16% και 7,45% αντίστοιχα (πίνακας 4). Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων στις συγκεκριμένες χρονικές στιγμές υποδηλώνοντας αυξημένη δραστηριότητα στους γυμνασμένους (διάγραμμα 4). Αυτό επιβεβαιώνεται από τη βιβλιογραφία καθώς έχει τεκμηριωθεί πως γυμνασμένα άτομα παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα SOD και ως εκ τούτου θα αντιμετωπίζεται αποτελεσματικότερα η ρίζα του υπεροξειδίου (Vaamonde et al 2015).

Αντίστοιχα, στην Αναγωγική Δύναμη, μετά το διαχωρισμό σε δυο ομάδες παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στις 72 ώρες ανάμεσα στις δυο ομάδες με τους αθλούμενους να παρουσιάζουν εντονότερη αναγωγική δράση (διάγραμμα 2). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στην αναγωγή του Fe (III) σε Fe (II) μπορούν να συμμετέχουν μόρια όπως το Ουρικό οξύ, η α-Τοκοφερόλη, η χολερυθρίνη, το ασκορβικό οξύ (Reddy *et al.*, no date; Benzie and Strain, 1996). Φαίνεται λοιπόν πως τα μόρια είναι περισσότερο αυξημένα σε άτομα που έχουν αθλητικό ιστορικό ανάγοντας τον τρισθενή σίδηρο.

Τέλος, στην εξουδετέρωση της ρίζας του υδροξυλίου δεν παρατηρούνται σημαντικά στατιστικές διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων και σε σχέση με πριν την άσκηση παρά το γεγονός πως οι αθλούμενοι φαίνεται να αντιμετωπίζουν αποτελεσματικότερα τη ρίζα αυτή στις 72 ώρες (διάγραμμα 6,πίνακας 7). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μόρια που εξουδετερώνουν τη ρίζα υδροξειλίου είναι η Μαννιτόλη (Shen, Jensen and Bohnert, 1997), Μελατονίνη (Reiter *et al.*, 1995), Γλουταθειόνη (Reiter *et al.*, 1995), Κερκετίνη (Nimse and Pal, 2015) , Αλβουμίνη (Lipinski, 2011)

Παρατηρούμε λοιπόν πως γενικότερα οι αθλούμενοι παρουσιάζουν μια καλύτερη απόκριση στην αντιμετώπιση των ριζών που παράγονται μετά από ενός τέτοιου είδους άσκηση. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την υπόθεσή μας πως η ενασχόληση με όποιας μορφής άσκηση παίζει ρόλο στο οξειδοαναγωγικό προφίλ των ατόμων. Έτσι, οι αθλούμενοι δείχνουν να είναι

περισσότερο προσαρμοσμένοι στην άσκηση και δεν επηρεάζονται στον ίδιο βαθμό από το οξειδωτικό στρες σε σχέση με τους μη αθλούμενους.

Μία πιθανή εξήγηση για αυτή τη μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των εξεταζόμενων ατόμων, θεωρείται η μεγάλη πολυπλοκότητα στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης στον άνθρωπο, δεδομένου ότι πολλοί γενετικοί, φυσιολογικοί, βιοχημικοί ή διαιτητικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα του οξειδωτικού ερεθίσματος (Simoneau and Bouchard, 1989; Kant and Graubard, 2008; Rankinen and Bouchard, 2008). Για παράδειγμα, μεταξύ των γονιδίων των οποίων η μεταβλητότητα φαίνεται να επηρεάζει την απόκριση στο οξειδωτικό στρες είναι αυτά που κωδικοποιούν για την υπεροξειδική δισμουτάση, την τρανσφεράση της γλουταθειόνης, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, την αναγωγή της θειορεδοξίνης, την αφυδρογονάση της ξανθίνης όπως επίσης και γονίδια που εμπλέκονται στην μιτοχονδριακή δραστηριότητα (Dato *et al.*, 2013). Επιπλέον, οι παρατηρούμενες παραλλαγές θα μπορούσαν να αποδοθούν στην αλλαγμένη ενσωμάτωση των οξειδοαναγωγικών συστημάτων λόγω της άσκησης. Η ενσωμάτωση αναφέρεται στο χαρακτηριστικό πολλών βιοχημικών συστημάτων, τα οποία εμφανίζουν μια συσχέτιση και αλληλεξάρτηση σε πολλά επίπεδα (π.χ. λειτουργική, δομική, αναπτυξιακή ή εξελικτική) (Costantini, Monaghan and Metcalfe, 2013). Επιπλέον, ένα άλλο σημαντικό στοιχείο είναι ότι οξειδοαναγωγικοί βιοδείκτες είναι χημικές ουσίες, των οποίων οι βιολογικές επιδράσεις, οι πολλαπλοί λειτουργικοί ρόλοι, οι δράσεις και μεταβολικές οδοί δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητές (Bruschi *et al.*, 2013; Carochio and Ferreira, 2013; Kar and Kavdia, 2013). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα επίπεδά τους μπορούν να ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό στο γενικό πληθυσμό και οι περισσότεροι από αυτούς παρουσιάζουν μια πολύπλοκη αλληλεξάρτηση (Arguelles *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2008; Costantini, Monaghan and Metcalfe, 2013; Valencia, Marin and Hardy, 2017)

Μια ακόμα πιθανή επεξήγηση των διαφορών που παρατηρούνται ανάμεσα σε αθλούμενους και μη αθλούμενους, αφορά πιθανώς τον ρόλο του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2. Συγκεκριμένα, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από οξεία άσκηση σε μιτοχόνδρια σκελετικού μυός, συνδέεται με τη θετική ρύθμιση της σηματοδότησης του REF1/Nrf2 και την ενίσχυση των οδών που συμμετέχουν στην αντιοξειδωτική αντιοξειδωτική άμυνα (Wang *et al.*, 2016). Η ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 από οξεία άσκηση μπορεί να αποτελεί το μοριακό μηχανισμό που ρυθμίζει την αντίσταση του κυττάρου

στο οξειδωτικό στρες κατά τη διάρκεια άσκησης. Μελέτες σε αρουραίους έδειξαν πως η μακροχρόνια άσκηση αυξάνει την αντιοξειδωτική άμυνα με τη συμμετοχή των παραγόντων NFκB και Nrf2 γεγονός που συμβάλλει στη μείωση του οξειδωτικού στρες (Steinbacher and Eckl, 2015). Από τα δεδομένα αυτά και σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως τα άτομα που έχουν επαφή με αθλητική δραστηριότητα πιθανόν να έχουν αναπτύξει τις απαιτούμενες προσαρμογές που οδηγούν σε ταχύτερη ενεργοποίηση της σηματοδότησης μέσω του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2, εξασφαλίζοντας κατά αυτό τον τρόπο πιο γρήγορη αποκατάσταση μετά την έκθεσή τους σε κάποιο οξειδωτικό παράγοντα.

Τέλος, ένα ακόμα σημαντικό συμπέρασμα από την παρούσα έρευνα είναι το γεγονός πως δεν υπάρχει καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τριών νέων εξεταζόμενων δεικτών, δηλαδή την εξουδετέρωση της ρίζας σουπεροξειδίου, υδροξυλίου και της Αναγωγικής δύναμης (πίνακας 8). Εξαίρεση αποτελεί μόνο η συσχέτιση μεταξύ της εξουδετέρωσης της ρίζας υδροξυλίου και της Αναγωγικής δύναμης στην ομάδα των αθλούμενων στις 24 ώρες μετά την άσκηση. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι τα ενδογενή αντιοξειδωτικά του οργανισμού στους γυμνασμένους αντιμετώπισαν με παρόμοιο αποτελεσματικό τρόπο τη ρίζα του υδροξυλίου και τον τρισθενή σίδηρο. Το αποτέλεσμα αυτό εμφανίστηκε στην ομάδα των γυμνασμένων που όπως προαναφέρθηκε έχουν αναπτύξει περισσότερες προσαρμογές στην άσκηση και ίσως η πιο άμεση ενεργοποίηση της σηματοδότησης οδήγησε στην πιο άμεση αντιοξειδωτικών μορίων και κατά συνέπεια στην αντιμετώπιση των παραγόμενων ριζών όπως η ρίζα του υδροξυλίου. Τέτοιο ένζυμο μπορεί να είναι η GPX-1 που παράγεται μετά από ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB και επιταχύνει τη δράση της γλουταθειόνης που όπως είδαμε παραπάνω είναι ένα μόριο που εξουδετώνει τη ρίζα υδροξυλίου. (Morgan and Liu, 2011; Steinbacher and Eckl, 2015)

Ωστόσο το γεγονός ότι δεν παρουσιάζεται οποιαδήποτε άλλη συσχέτιση μεταξύ των δεικτών, ενισχύει την υπόθεσή μας, ότι παρουσιάζονται δηλαδή διαφορές αναφορικά με την εξουδετέρωση ριζών, και τα επίπεδα εξουδετέρωσης κάθε ρίζας μπορεί να διαφέρουν στο ίδιο άτομο. Το συγκεκριμένο συμπέρασμα θεωρείται ιδιαίτερος σημαντικό καθώς ανοίγει το δρόμο για εξατομικευμένη προσέγγιση κάθε ατόμου και προσαρμογή της διατροφής του σύμφωνα με τις επιμέρους ανάγκες του. Ειδικότερα το εύρημα αυτό αφορά την κρίσιμη περίοδο της αποκατάστασης και σχετίζεται με την κατανάλωση πιθανώς τροφίμων ή συμπληρωμάτων που

εμπεριέχουν αντιοξειδωτικά που επιδρούν αποτελεσματικότερα στην αντιμετώπιση των ριζών εκείνων στις οποίες φαίνεται ότι υπάρχει μεγαλύτερη ανάγκη αντιμετώπισης από τον εκάστοτε οργανισμό. Η όλη προσέγγιση λοιπόν αφορά την καλύτερη δυνατή και πιο άμεση αποκατάσταση του αθλητή μετά από μια τέτοιου είδους άσκηση.

Βιβλιογραφία

1. Aguilo, A. *et al.* (2005) 'Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise.', *Physiology & behavior*. United States, 84(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.physbeh.2004.07.034.
2. Alessio, H. M. (1993) 'Exercise-induced oxidative stress.', *Medicine and science in sports and exercise*. United States, 25(2), pp. 218–224.
3. Alessio, H. M. *et al.* (2000) 'Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise.', *Medicine and science in sports and exercise*. United States, 32(9), pp. 1576–1581.
4. Aoi, W., Naito, Y., Takanami, Y., Kawai, Y., Sakuma, K., Ichikawa, H., *et al.* (2004). Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radic Biol Med*, 37(4), 480-487.
5. Arguelles, S. *et al.* (2007) 'A preliminary analysis of within-subject variation in human serum oxidative stress parameters as a function of time.', *Rejuvenation research*. United States, 10(4), pp. 621–636. doi: 10.1089/rej.2006.0528.
6. Armstrong, R. B. (1990). Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc*, 22(4), 429-435.
7. Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. (1996) 'The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay', *Analytical Biochemistry*, 239(1), pp. 70–76. doi:.
8. Berg J, Tymoczko J, Stryer L (2010). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
9. Brantley, R. E. J. *et al.* (1993) 'The mechanism of autooxidation of myoglobin.', *The Journal of biological chemistry*. United States, 268(10), pp. 6995–7010.
10. Bruschi, M. *et al.* (2013) 'Oxidized albumin. The long way of a protein of uncertain

function.’, *Biochimica et biophysica acta*. Netherlands, 1830(12), pp. 5473–5479. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.017.

11. Bloomer, R. J., Goldfarb, A. H., Wideman, L., McKenzie, M. J., & Consitt, L. A. (2005). Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res*, 19(2), 276-285.
12. Boguslaw Lipinski, “Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2011, Article ID 809696, 9 pages, 2011
13. Carocho, M. and Ferreira, I. C. F. R. (2013) ‘A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives.’, *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. England, 51, pp. 15–25. doi: 10.1016/j.fct.2012.09.021.
14. Chance B., Sies H and Boveris A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605,1979.
15. Cheeseman, K. H. and Slater, T. F. (1993) ‘An introduction to free radical biochemistry.’, *British medical bulletin*. ENGLAND, 49(3), pp. 481–493.
16. Close, G. L., Ashton, T., Cable, T., Doran, D., & MacLaren, D. P. (2004). Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayed onset muscle soreness: the role of reactive oxygen species. *Eur J Appl Physiol*, 91(5-6), 615-62.
17. Close, G. L., Ashton, T., McArdle, A., & Maclaren, D. P. (2005). The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 142(3), 257-266.
18. Close, G. L., Ashton, T., Cable, T., Doran, D., Noyes, C., McArdle, F., et al. (2005). Effects of dietary carbohydrate on delayed onset muscle soreness and reactive oxygen species after contraction induced muscle damage. *Br J Sports Med*, 39(12), 948-953..
19. Cooper, C. E. et al. (2002) ‘Exercise, free radicals and oxidative stress.’, *Biochemical Society transactions*. England, 30(2), pp. 280–285. doi: 10.1042/

20. Costantini, D., Monaghan, P. and Metcalfe, N. B. (2011) 'Biochemical integration of blood redox state in captive zebra finches (Taeniopygia guttata)', *The Journal of Experimental Biology*, 214(7), p. 1148 LP-1152.
21. Costantini, D., Monaghan, P. and Metcalfe, N. B. (2013) 'Loss of integration is associated with reduced resistance to oxidative stress.', *The Journal of experimental biology*. England, 216(Pt 12), pp. 2213–2220. doi: 10.1242/jeb.08315.
22. Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T., & Wilson, M. T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 30(2), 280–285.
23. Dato, S. *et al.* (2013) 'Exploring the Role of Genetic Variability and Lifestyle in Oxidative Stress Response for Healthy Aging and Longevity', *International Journal of Molecular Sciences*. Molecular Diversity Preservation International (MDPI), 14(8), pp. 16443–16472. doi: 10.3390/ijms140816443.
24. Davies, K. J. *et al.* (1982) 'Free radicals and tissue damage produced by exercise.', *Biochemical and biophysical research communications*. UNITED STATES, 107(4), pp. 1198–1205.
25. Elosua, R. *et al.* (2003) 'Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women.', *Atherosclerosis*. Ireland, 167(2), pp. 327–334.
26. Finaud, J., Lac, G. and Filaire, E. (2006) 'Oxidative stress : relationship with exercise and training.', *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*. New Zealand, 36(4), pp. 327–358.
27. Friden, J. (1984). Muscle soreness after exercise: implications of morphological changes. *Int J Sports Med*, 5(2), 57-66
28. Goldfarb, A., J Bloomer, R. and Mckenzie, M. (2005) Goldfarb AH, Bloomer RJ, McKenzie MJ. Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 37, 234-239, *Medicine and science in sports and exercise*. doi: 10.1249/01.MSS.0000152887.87785.BE.
29. Green, H. J. and Fraser, I. G. (1988) 'Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration.', *Medicine and science in sports and exercise*. UNITED STATES, 20(1), pp. 55–59.

30. Groussard, C. et al. (2003) 'Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise.', *European journal of applied physiology. Germany*, 89(1), pp. 14–20. doi: 10.1007/s00421-002-0767-1
31. Gutteridge, J. M. C. (1984) *Biochem. J.* 224, 761-767
32. Gutteridge, J. M. C. (1987) *Biochem. J.* 243, 709-714
33. Halliwell B and Gutteridge JMC(1990), "Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview", in Parker L, Glazer AN , *Methods in Enzyme bgy* 186,.
34. Halliwell B (2001). Free radicals and other reactive species in disease. In: *Nature Encyclopaedia of Life Sciences*. J. Wiley and Sons (eds). *Nature Publishing Group*, New York.
35. Halliwell B and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford Univesrity Press, Midsomer Norton, Avon, England.
36. Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications.
37. Halliwell B, Gutteridge J (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York.
38. Halliwell, Barry (Mar 2015) *Free Radicals and Other Reactive Species in Disease*. In: *eLS*
39. Inal M, Akyuz F, Turgut A, Getsfrid WM (2001). Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 33 (4), 564-77
40. Jamurtas, T. et al. (2000) *Effects of Plyometric Exercise on Muscle Soreness and Plasma Creatine Kinase Levels and Its Comparison with Eccentric and Concentric Exercise*, *The Journal of Strength & Conditioning Research*. doi: 10.1519/1533-
41. Jenkins, R. R. (1988) 'Free radical chemistry. Relationship to exercise.', *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*. NEW ZEALAND, 5(3), pp. 156–170.
42. Ji, L. I. L. I. et al. (1998) 'Oxidative Stress and Aging: Role of Exercise and Its Influences on Antioxidant Systems', *Annals of the New York Academy of Sciences*.

Blackwell Publishing Ltd, 854(1), pp. 102–117. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09896.x.

43. Ji, L. L. (1999) 'Antioxidants and oxidative stress in exercise.', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*. UNITED STATES, 222(3), pp. 283–292.
44. Ji, L. L., Gomez-Cabrera, M.-C. and Vina, J. (2006) 'Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway.', *Annals of the New York Academy of Sciences*. United States, 1067, pp. 425–435. doi: 10.1196/annals.1354.061.
45. Kant, A. K. and Graubard, B. I. (2008) 'Ethnic and socioeconomic differences in variability in nutritional biomarkers.', *The American journal of clinical nutrition*. United States, 87(5), pp. 1464–1471.
46. Kar, S. and Kavdia, M. (2013) 'Endothelial NO and O₂(•-) Production Rates Differentially Regulate Oxidative, Nitroxidative and Nitrosative Stress in the Microcirculation', *Free radical biology & medicine*, 63, pp. 161–174. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.024.
47. Kerksick, C. and Willoughby, D. (2005) 'The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress.', *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. United States, 2, pp. 38–44. doi: 10.1186/1550-2783-2-2-38.
48. Kim, J. and Lee, J. (2014) 'A review of nutritional intervention on delayed onset muscle soreness. Part I', *Journal of Exercise Rehabilitation*. Korean Society of Exercise Rehabilitation, 10(6), pp. 349–356. doi: 10.12965/jer.140179.
49. Klebanoff SJ (1988). Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. In: Gallin, J. I.; Goldstein, I. M.; Synderman, R., eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York Raven, 391– 444

50. Kuby, Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne (2007). *Ανοσολογία, εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.*
51. Kumar, C. T., Reddy, V. K., Prasad, M., Thyagaraju, K., & Reddanna, P. (1992). Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 111(1-2), 109–115.
52. Lee J, Goldfarb AH, Rescino MH, Hegde S, Patrick S and Apperson K: Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc* 34: 443–448, 2002.
53. Lipinski, B. (2011) ‘Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease.’, *Oxidative medicine and cellular longevity*. United States, 2011, p. 809696. doi: 10.1155/2011/809696.
54. Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, Belcastro AN (1987). Are indices of free radical damage related to exercise intensity? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 56(3), 313-6.
55. Margaritelis, N. V *et al.* (2014) ‘Reductive stress after exercise: The issue of redox individuality.’, *Redox biology*. Netherlands, 2, pp. 520–528. doi: 10.1016/j.redox.2014.02.003.
56. MCBRIDE, J. M. and KRAEMER, W. J. (1999) ‘Free Radicals, Exercise, and Antioxidants.’, *The Journal of Strength & Conditioning Research*, 13(2).
57. McHugh M. P., Connolly D. A., Eston R. G., and Gleim G. W., "Exercise-induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect," *Sports medicine*, vol. 27, no. 3, pp. 157-170, 1999.
58. Melikoglu, M. A. *et al.* (2008) ‘The effect of regular long term training on antioxidant enzymatic activities.’, *The Journal of sports medicine and physical fitness*. Italy, 48(3), pp. 388–390.

59. Michailidis, Y. *et al.* (2007) ‘Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress.’, *Medicine and science in sports and exercise*. United States, 39(7), pp. 1107–1113. doi: 10.1249/01.mss.0b013e318053e7ba.
60. Mougios Vassilis C. (2008). Βιοχημεία της Άσκησης, εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
61. Morgan, M. J. and Liu, Z. (2011) ‘Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling.’, *Cell research*. England, 21(1), pp. 103–115. doi: 10.1038/cr.2010.178.
62. Mylonas C and Kouretas D: Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13: 295–309, 1999.
63. Netto LES , Chae HZ , Kang NA , Rhee SG , Stadtman ER (1996). Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. *J Biol Chem* 271(26):15315-21
64. Nikolaidis, M. G. *et al.* (2006) ‘Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals.’, *Medicine and science in sports and exercise*. United States, 38(8), pp. 1443–1450. doi: 10.1249/01.mss.0000228938.24658.5f.
65. Nikolaidis, M. G. *et al.* (2007) ‘Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls.’, *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. Canada, 32(2), pp. 197–205. doi: 10.1139/h06-097.
66. Nimse, S. B. and Pal, D. (2015) ‘Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms’, *RSC Advances*. The Royal Society of Chemistry, 5(35), pp. 27986–28006. doi: 10.1039/C4RA13315C
67. Pal S, Chaki B, Chattopadhyay S, Bandyopadhyay A. (2017) ‘High intensity exercise induced oxidative stress and skeletal muscle damage in post-pubertal

boys and girls: A comparative study’.

68. Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Morrow JD (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol* 89, 100-107.
69. Park, K.-S. and Lee, M.-G. (2015) ‘Effects of unaccustomed downhill running on muscle damage, oxidative stress, and leukocyte apoptosis.’, *Journal of exercise nutrition & biochemistry*. Korea (South), 19(2), pp. 55–63. doi: 10.5717/jenb.2015.15050702
70. Paschalis, V., Koutedakis, Y., Jamurtas, A. Z., Mougios, V., & Baltzopoulos, V. (2005). Equal volumes of high and low intensity of eccentric exercise in relation to muscle damage and performance. *J Strength Cond Res*, 19(1), 184-188.
71. Pham-Huy, L. A., He, H. and Pham-Huy, C. (2008) ‘Free radicals, antioxidants in disease and health.’, *International journal of biomedical science : IJBS*. United States, 4(2), pp. 89–96.
72. Phaneuf, S. and Leeuwenburgh, C. (2001) ‘Apoptosis and exercise.’, *Medicine and science in sports and exercise*. United States, 33(3), pp. 393–396.
73. Powers SK, Lennon SL (2000). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58, 1025-33.
74. Radak, Z. *et al.* (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*. UNITED STATES, 27(1–2), pp. 69–74.
75. Rankinen, T. and Bouchard, C. (2008) ‘Gene-physical activity interactions: overview of human studies.’, *Obesity (Silver Spring, Md.)*. United States, 16 Suppl 3, pp. S47-50. doi:

10.1038/oby.2008.516.

76. Reddy, P. E. *et al.* (no date) 'Ferric Reducing Ability of Plasma and Lipid Peroxidation in Hemodialysis patients: Intradialytic changes', *Nephrourol Mon. Kowsar*, 2(03 SP 414-421).
77. Reiter, R. J. *et al.* (1995) 'A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant.', *Journal of pineal research*. England, 18(1), pp. 1–11
78. Salaway J. G. (2006). *Medical Biochemistry at a Glance*.
79. Sautin, Y. Y. and Johnson, R. J. (2008) 'Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox.', *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*. United States, 27(6), pp. 608–619. doi: 10.1080/15257770802138558.
80. Schneider, B. S. P. and Tiidus, P. M. (2007) 'Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy?', *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*. New Zealand, 37(10), pp. 837–856.
81. Shen, B., Jensen, R. G. and Bohnert, H. J. (1997) 'Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals.', *Plant Physiology*, 115(2), pp. 527–532.
82. Shin-Kyo Chung, Toshihiko Osawa & Shunro Kawakishi. (1997). Hydroxyl Radical-scavenging Effects of Spices and Scavengers
83. Silva L. A., Pinho C. A., Silveira P. C. *et al.*, "Vitamin E supplementation decreases muscular and oxidative damage but not inflammatory response induced by eccentric contraction," *The journal of physiological sciences*, vol. 60, no. 1, pp. 51-57, 2010.
84. Silva L. A., Silveira P. C., Ronsani M. M. *et al.*, "Taurine supplementation decreases oxidative stress in skeletal muscle after eccentric exercise," *Cell biochemistry and Function*, vol. 29, no. 1, pp. 43-49, 2011.

85. Simoneau, J. A. and Bouchard, C. (1989) 'Human variation in skeletal muscle fiber-type proportion and enzyme activities.', *The American journal of physiology*. United States, 257(4 Pt 1), pp. E567-72.
86. Stagos, D., Goutzourelas, N., Bar-Or, D., Ntontou, A.-M., Bella, E., Becker, A. T., ... Kouretas, D. (2015). Application of a new oxidation-reduction potential assessment method in strenuous exercise-induced oxidative stress. *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 20(4), 154–162.
87. Stagos, D., Goutzourelas, N., Ntontou, A.-M., Kafantaris, I., Deli, C. K., Poulos, A., ... Kouretas, D. (2015). Assessment of eccentric exercise-induced oxidative stress using oxidation-reduction potential markers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 204615
88. Stauber, W. T. (1989). Eccentric action of muscles: physiology, injury, and adaptation. *Exerc Sport Sci Rev*, 17, 157-185.
89. Steensberg, A. *et al.* (2000) 'Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6.', *The Journal of physiology*. ENGLAND, 529 Pt 1, pp. 237–242.
90. Steinbacher, P. and Eckl, P. (2015) 'Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle.', *Biomolecules*. Switzerland, 5(2), pp. 356–377. doi: 10.3390/biom5020356.
91. Su, H. *et al.* (2008) 'Diurnal variations in salivary protein carbonyl levels in normal and cognitively impaired human subjects.', *Age (Dordrecht, Netherlands)*. Netherlands, 30(1), pp. 1–9. doi: 10.1007/s11357-007-9042-z.
92. Svensson, M. B. *et al.* (2002) 'Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet.', *Acta physiologica Scandinavica*. England, 176(1), pp. 43–56. doi: 10.1046/j.1365-201X.2002.01008.x
93. Urso, M. L. and Clarkson, P. M. (2003) 'Oxidative stress, exercise, and antioxidant

supplementation.’, *Toxicology*. Ireland, 189(1–2), pp. 41–54.

94. Vaamonde, D., Du Plessis, S. S. and Agarwal, A. (2016) *Exercise and human reproduction: induced fertility disorders and possible therapies*. Springer.
95. Valencia, E., Marin, A. and Hardy, G. (2017) ‘Circadian rhythmicity of whole-blood glutathione in healthy subjects’, *Nutrition*. Elsevier, 17(9), pp. 731–733. doi: 10.1016/S0899-9007(01)00653-0.
96. Veskokoukis, A. S. *et al.* (2008) ‘Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats.’, *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. Canada, 33(6), pp. 1140–1154. doi: 10.1139/H08-102.
97. Vina, J. *et al.* (2000) ‘Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants.’, *IUBMB life*. England, 50(4–5), pp. 271–277. doi: 10.1080/713803729.
98. Wang, P. *et al.* (2016) ‘Acute exercise stress promotes Ref1/Nrf2 signalling and increases mitochondrial antioxidant activity in skeletal muscle.’, *Experimental physiology*. England, 101(3), pp. 410–420. doi: 10.1113/EP085493.
99. Yiannakopoulou E. (2009). Oxidative stress – antioxidant mechanisms: Clinical implications. *Archives of Hellenic Medicine* 2009, 26(1):23-35.
100. Zembron-Lacny, A. *et al.* (2010) ‘Changes of muscle-derived cytokines in relation to thiol redox status and reactive oxygen and nitrogen species.’, *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. Czech Republic, 59(6), pp. 945–951.
101. Zembron-Lacny, A., Slowinska-Lisowska, M. and Ziemba, A. (2010) ‘Integration of the thiol redox status with cytokine response to physical training in professional basketball players.’, *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*