



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

***“ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ  
ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΚΚΕΝΤΡΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ”***

***“THE EFFECTS OF TRAINING BACKGROUND ON FREE RADICAL  
GENERATION AND ADAPTATION AFTER ECCENTRIC EXERCISE”***

---



**Παπανικολάου Χριστίνα  
Λάρισα, 2018-19**

## ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων):** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών-Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Δημήτριος Στάγκος:** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Αθανάσιος Τζιαμούρτας:** Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας της Άσκησης, Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής & Αθλητισμού, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **Ευχαριστίες**

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δ. Κουρέτα, επιβλέπων καθηγητή, για την εμπιστοσύνη και τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετέχω στην παρούσα μελέτη, καθώς επίσης για την καθοδήγηση, την υπομονή και την στήριξη που έδειξε και συνεχίζει να δείχνει στο πρόσωπό μου.

Επίσης, τον κύριο Δ. Στάγκο για την συμβολή του στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας και τον κύριο Α. Τζιαμούρτα για την συμμετοχή του σε αυτή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου, Βίβιαν, Αλέξανδρο και Σωτηρίνα για την βοήθεια τους στην επίλυση τυχόν αποριών και προβλημάτων κατά την διάρκεια του πειραματικού τμήματος.

Ξεχωριστά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Άκη Σπανίδη, για την άψογη συνεργασία, την εμπιστοσύνη και την υπομονή που έδειξε σε όλη την διάρκεια της εργασίας, καθώς και για την υποστήριξη του τόσο σε εργαστηριακό επίπεδο όσο και σε ψυχολογικό.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, που είναι δίπλα μου και μου παρέχει τη δυνατότητα να σπουδάζω, αλλά και το στενό φιλικό περιβάλλον για την ψυχολογική στήριξη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που δέχτηκαν εθελοντικά να λάβουν μέρος στην επίπονη διαδικασία της εν λόγω εργασίας, αφού η συμμετοχή τους ήταν απαραίτητη.

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Ορισμός ελευθέρων ριζών .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών .....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών .....	9
1.2.2 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών .....	13
<b>1.3 Επιπτώσεις ελευθέρων ριζών .....</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Οξειδωτικό στρες.....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί .....</b>	<b>15</b>
1.5.1 Ενζυμικοί μηχανισμοί.....	16
1.5.2 Μη ενζυμικοί μηχανισμοί.....	18
<b>1.6 Άσκηση και οξειδωτικό στρες.....</b>	<b>19</b>
<b>1.7 Οξειδωτικό στρες και έκκεντρη άσκηση .....</b>	<b>21</b>
<b>ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>24</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>25</b>
2.1 Συμμετέχοντες.....	25
2.2 Πρωτόκολλο έκκεντρης άσκησης.....	25
2.3 Αξιολόγηση του μυϊκού πόνου.....	26
2. 4 Συλλογή και επεξεργασία του αίματος .....	26
2.5 Αξιολόγηση του sORP και cORP με το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS.....	27
2.6 Αξιολόγηση δεικτών: TBARS, CARB, TAC, GSH, CAT. ....	29
2.6.1 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).....	29
2.6.2 Πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB).....	30
2.6.3 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).....	32
2.6.4 Ανηγγμένη γλουταθειόνη σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (GSH) .....	33
2.6.6 Δραστηκότητα της καταλάσης (CAT).....	35
2.7 Στατιστική ανάλυση.....	37
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>37</b>
3.1. Αξιολόγηση μυϊκού πόνου και μυϊκής βλάβης .....	37
3.2. Δείκτες Οξειδωτικού στρες .....	37
<b>ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΔΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ ΘΕΙΟΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (TBARS).....</b>	<b>38</b>
<b>ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ .....</b>	<b>39</b>
<b>ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (TAC) .....</b>	<b>41</b>
<b>ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΝΗΓΜΕΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ .....</b>	<b>42</b>
<b>ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ.....</b>	<b>44</b>
<b>Static ORP (sORP) .....</b>	<b>46</b>
<b>Capacity ORP (cORP) .....</b>	<b>47</b>
<b>4. Συζήτηση .....</b>	<b>50</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>55</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Έρευνες στη βιβλιογραφία αναφέρονται στην πρόκληση οξειδωτικού στρες και στην παραγωγή ελευθέρων ριζών μετά από έντονη και επίπονη άσκηση, όπως η έκκεντρη, δεν υπάρχουν όμως επαρκή στοιχεία σχετικά με το ρόλο του αθλητικού ιστορικού στο οξειδωτικό στρες. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ατόμων μετά από πραγματοποίηση έκκεντρης άσκησης σε ισοκινητικό δυναμόμετρο, καθώς και η διερεύνηση εάν το αθλητικό ιστορικό τελικά αποτελεί καιρό παράγοντα για το οξειδοαναγωγικό προφίλ των ατόμων. Στην έρευνα συμμετείχαν 22 εθελοντές, εκ των οποίων 12 αθλούμενοι και 10 μη αθλούμενοι. Όλοι τους πραγματοποίησαν 5 σετ των 15 μέγιστων έκκεντρων επαναλήψεων και οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε δείγμα αίματος που συλλέχθηκε πριν την άσκηση, 24, 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση. Η αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης εξετάστηκε με τη μέτρηση δεικτών οξειδωτικού στρες φασματοφωτομετρικά και πιο συγκεκριμένα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (CARB), των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της καταλάσης (CAT). Παράλληλα, έγιναν μετρήσεις με τη χρήση του διαγνωστικού συστήματος (RedoxSYS) που έχει την ικανότητα να προσδιορίζει το στατικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό (sORP) και τη διαθεσιμότητα των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων (cORP). Όταν οι συμμετέχοντες εξετάστηκαν ως ενιαία ομάδα παρατηρήσαμε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα στα TBARS, με σημαντική αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης στις 48 ώρες της τάξης του 22,15%, στα επίπεδα της GSH, παρατηρήθηκε αύξηση σε σχέση με το δείγμα ελέγχου στις 48 ώρες κατά 22,14% και στον δείκτη cORP αύξηση των επιπέδων κατά 13,2% και 13,19% στις 24 και 48 ώρες, αντίστοιχα. Όταν οι εθελοντές διακρίθηκαν σε αθλούμενους και μη αθλούμενους παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές ανάμεσα στις δύο ομάδες και πιο συγκεκριμένα στους δείκτες TBARS, CARBS, GSH, sORP και cORP. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η επαναλαμβανόμενη έκθεση του οργανισμού σε κάποια μορφή άσκησης οδηγεί σε προσαρμογές στην για την αποτελεσματική αντιμετώπιση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών μετά από έκκεντρη άσκηση. Επιπλέον, βρέθηκε ότι το σύστημα RedoxSYS αποτελεί ένα αξιόπιστο εργαλείο για την εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης αθλούμενων και μη.

## ABSTRACT

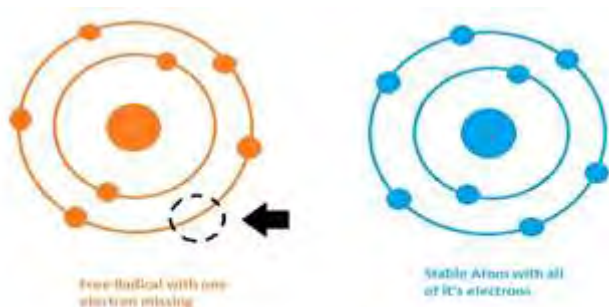
Numerous studies in the relevant literature have shown that strenuous exercise modalities, such as eccentric exercise lead to excessive free radical generation. However, there is not sufficient evidence regarding the role of athletic/training background. Thus, the aim of this study was to evaluate the blood redox status in participants after a protocol of eccentric exercise on an isokinetic dynamometer, as well as to investigate whether athletic background is a crucial factor for that. According to the experimental design, 22 volunteers (12 of which performed exercise recreationally at least 4 times per week whereas the rest 10 were untrained). All volunteers performed five sets of 15 maximum eccentric repetitions and blood samples were collected for analysis before exercise (control sample) and 24, 48 and 72 hours after the exercise. The redox state was evaluated by oxidative stress biomarkers, that is protein carbonyls (CARB), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total antioxidant capacity (TAC), reduced glutathione (GSH) and catalase (CAT). In addition, two novel redox biomarkers, namely static oxidation-reduction potential (sORP) and the available antioxidants reserves (Capacity Oxidation-Reduction Potential-cORP) were measured with a new diagnostic system (RedoxSYS). When the participants were examined as one group, we found statistically significant differences in TBARS, with a 22.15% increase at 48 h, GSH was also increased by 22.14% at 48 h compared with the control sample and cORP was increased by 13.21% and 13.19% at 24 and 48 h, respectively. When the volunteers were divided in trained and not trained, significant differences were observed between the two groups at the following markers: TBARS, CARB, GSH, sORP and cORP. These results demonstrate that continuous exposure of the organism to some kind of exercise leads to useful adaptation against free radical production. Furthermore, we report that RedoxSYS is a reliable model for the evaluation of blood redox status.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Ορισμός ελευθέρων ριζών

Τα άτομα δομούνται από τον πυρήνα, ο οποίος περιέχει πρωτόνια και νετρόνια και γύρω του περιστρέφονται ηλεκτρόνια σε τροχιακά. Σε κάθε τροχιακό μπορούν να συνυπάρχουν δύο ηλεκτρόνια, με αντιπαράλληλα spin, λειτουργώντας σαν ζεύγος. Η δομή αυτή, τα κάνει πιο σταθερά.

Κάθε άτομο ή μόριο στοιχείου ή χημικής ένωσης, που περιέχει ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους, ορίζεται ως ελεύθερη ρίζα (Jenkins, 1988). Χαρακτηρίζονται ως ασταθείς δομές με σύντομη διάρκεια ζωής, λόγω της αντίδρασής τους με παρακείμενα μόρια, για την απόσπαση ενός ηλεκτρονίου, με στόχο να συζευχθεί με το δικό τους. Ακολουθεί μετατροπή αυτών των μορίων σε ελεύθερες ρίζες, οδηγώντας στη διαταραχή της μοριακής τάξης και πυροδοτώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση που καταλήγει σε κυτταρική βλάβη (J. G. Salway, 2006). Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν και μεταξύ τους σχηματίζοντας διμερή, αν δύο από αυτές έρθουν σε επαφή μεταξύ τους, ή ακόμα και πολυμερή, αν περισσότερες από αυτές έρθουν σε επαφή. Βρισκόμενες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, σε αδρανή μέσα (ευγενή αέρια) ή το κενό, οι ελεύθερες ρίζες είναι σταθερές.

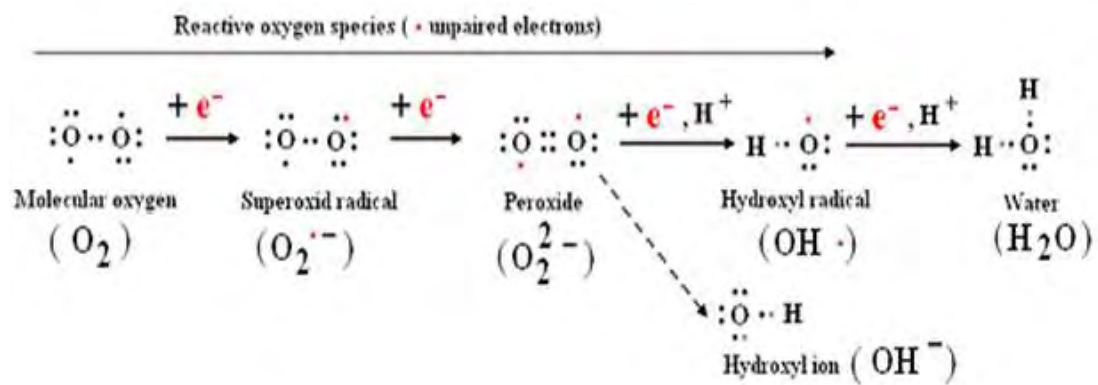


Εικόνα 1: Σχηματισμός ελεύθερης ρίζας

Οι ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται με δύο τρόπους. Είτε μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, ο συνηθέστερος στα βιολογικά συστήματα, είτε μέσω ομοιοπολικής διάσπασης, μέσω της οποίας το ζεύγος των ηλεκτρονίων υπάρχει στο μητρικό μόριο και σχηματίζονται δύο ιόντα ή διαχωρίζεται και προκύπτουν δύο ρίζες.

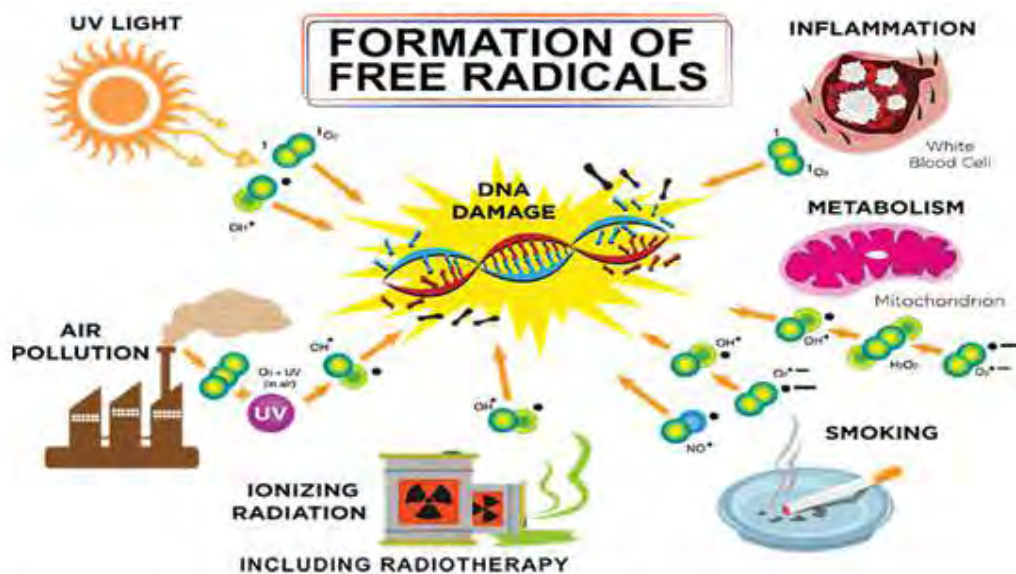
Το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο είναι η πιο απλή ελεύθερη ρίζα.

Εσωτερικά των κυττάρων συναντούνται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), δηλαδή ενώσεις παραγόμενες με αναγωγή του μοριακού οξυγόνου ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, και ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξείδια παραγόμενα μετά από την αντίδραση ενώσεων με το οξυγόνο (Cheeseman & Slater, 1993). Περιλαμβάνουν τις ρίζες υδροξυλίου (OH·), αλκοξειδίου (RO·) και υπεροξειδίου (RO<sub>2</sub>·), μαζί με τα ανιόντα σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) και υπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>2-</sup>). Ακόμα, στις ROS συμπεριλαμβάνονται και παράγωγα οξυγόνου που δεν είναι ρίζες, αλλά μπορούν και προκαλούν παραγωγή ελευθέρων ριζών (Halliwell, 2015).



Εικόνα 2: Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

## 1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών



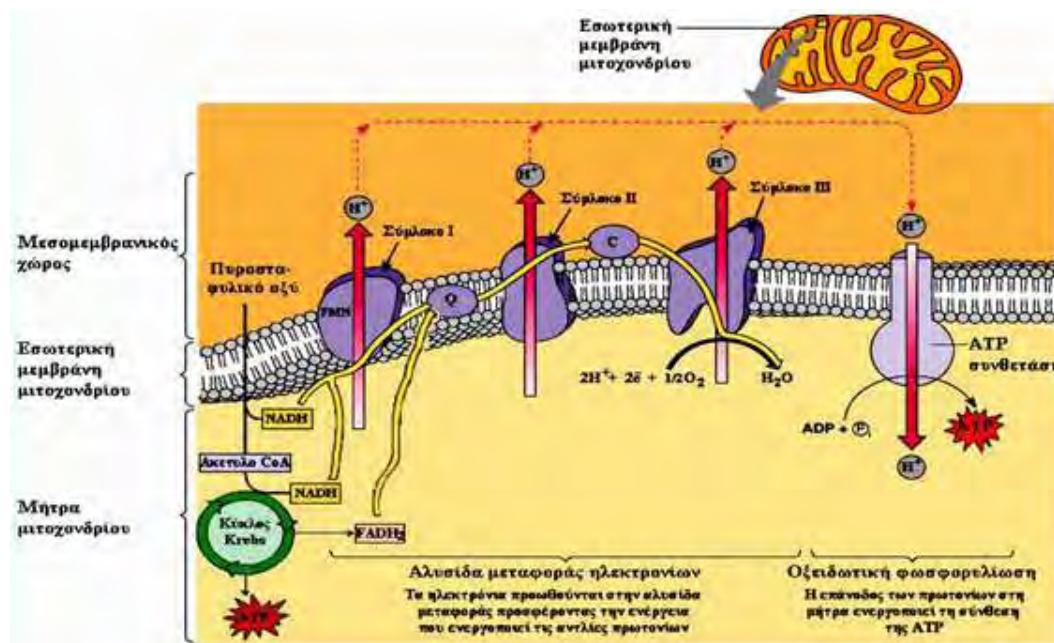
Εικόνα 3 : Ενδογενείς και εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών



### 1.2.1 Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

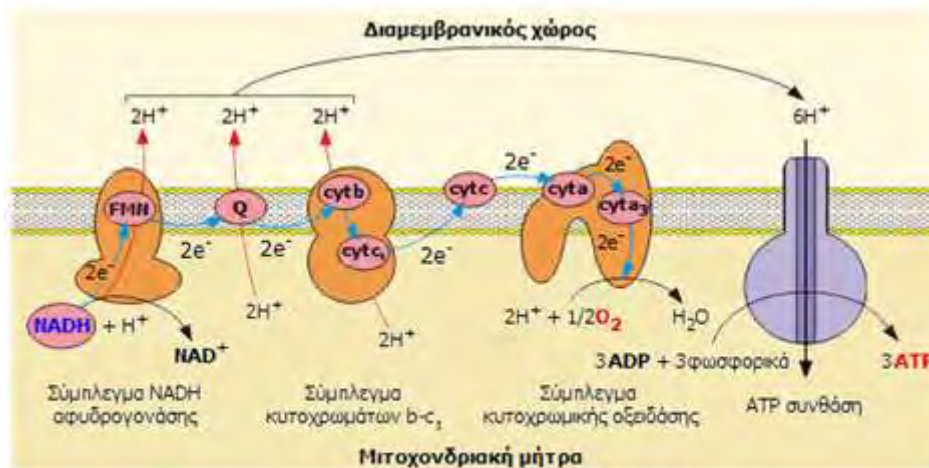
Εξαιτίας του φυσιολογικού μεταβολισμού των κυττάρων και των ενδογενών βιοχημικών διεργασιών που συμβαίνουν, παρατηρείται η μεγαλύτερη παραγωγή ελευθέρων ριζών, με κυριότερη πηγή το οξυγόνο. Παρά το γεγονός ότι υψηλές συγκεντρώσεις των επίπεδων των δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου είναι επιβλαβείς για τον οργανισμό, σε χαμηλά επίπεδα έχουν ευεργετικές ιδιότητες, διότι συμμετέχουν σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες. Τέτοια χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η μυϊκή σύσπαση, η μεταγωγή σήματος, η αναδίπλωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση, η συμβολή τους στην φαγοκυττάρωση, εξασφαλίζοντας έτσι την εύρυθμη λειτουργία των κυττάρων.

#### 1) Οξειδωτική Φωσφορλίωση-Αναπνευστική αλυσίδα



Εικόνα 4: Αναπνευστική αλυσίδα

Ως οξειδωτική φωσφορλίωση ορίζουμε την διαδικασία παραγωγής του μεγαλύτερου μέρους της ενέργειας στους αερόβιους οργανισμούς. Πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων.



Εικόνα 5: Ροή ηλεκτρονίων από το NADH στο O<sub>2</sub>

Σύμφωνα με αυτή τη διαδικασία, παράγεται ATP και μεταφέρονται ηλεκτρόνια (e<sup>-</sup>) από το NADH ή/ και το FADH<sub>2</sub> προς το O<sub>2</sub>, από μια σειρά φορέων e<sup>-</sup>. Τα μόρια των NADH και FADH<sub>2</sub> που προκύπτουν από μεταβολικές διαδικασίες, αποτελούν μόρια με ένα ζευγάρι ηλεκτρονίων με υψηλό δυναμικό μεταφοράς. Η ροή των ηλεκτρονίων από το NADH ή το FADH<sub>2</sub> στο O<sub>2</sub>, πραγματοποιείται μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Η ηλεκτρονιακή ροή προς το μοριακό οξυγόνο παράγει O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Chance, Sies, & Boveris, 1979). Αυτό ανάγεται σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από τη Mn-SOD. Το O<sub>2</sub><sup>-</sup> μπορεί να αντιδράσει με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, μέσω της αντίδρασης που καλείται “Haber-Weiss”, με την παραγωγή OH<sup>-</sup>:  $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow OH^- + OH^{\cdot} + O_2$ .

Επομένως, μέσω της διαδικασίας παραγωγής ATP, ηλεκτρόνια διαφεύγουν της αναπνευστικής αλυσίδας, καταλήγοντας στην παραγωγή ελευθέρων ριζών σε μορφή ROS (θεωρούνται παραπροϊόντα), θέτοντας σε κίνδυνο πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα.

## ii) Φλεγμονή

Ως φλεγμονώδη απόκριση, ορίζουμε τα φαινόμενα που επάγονται από μια ιστική βλάβη που μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες, αποτελώντας έναν σημαντικό μηχανισμό που συμβάλλει στην άμυνα του οργανισμού. Η οξεία φλεγμονώδης απόκριση εξουδετερώνει μία μόλυνση σε πρώιμο στάδιο και πυροδοτεί διεργασίες που στοχεύουν στην επιδιόρθωση ιστικών βλαβών. Τα λευκοκύτταρα προσκολλώνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων της φλεγμαίνουσας περιοχής και περνούν διαμέσου του τοιχώματος των τριχοειδών αγγείων στο μεσοκυττάριο

υγρό (εξαγγείωση). Χημειοτακτικοί παράγοντες, προερχόμενοι από τα κατεστραμμένα κύτταρα, προσελκύουν φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα και μακροφάγα) στην περιοχή της ιστικής βλάβης (Kuby, 2007). Τα ουδετερόφιλα και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, απελευθερώνουν ROS και υποχλωριώδες οξύ κατά τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις (Robinson, 2008).

### *iii) Αιμοσφαιρίνη*

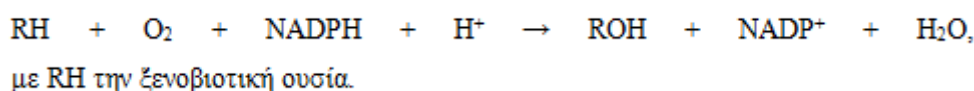
Η αιμοσφαιρίνη είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη των ερυθροκυττάρων και συνολικά στο αίμα και δεσμεύει το ατμοσφαιρικό οξυγόνο. Η δομή της είναι σφαιρική, αποτελούμενη από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ανά δύο όμοιες και τέσσερα μόρια αίμης ενωμένα ανά ένα σε κάθε αλυσίδα. Ένα άτομο σιδήρου περιέχεται σε κάθε μόριο αίμης, προκαλώντας υψηλή τάση σύνδεσης με το οξυγόνο και χαμηλότερη με το διοξείδιο του άνθρακα. Βάσει αυτού, πραγματοποιείται σύνδεση οξυγόνου και αιμοσφαιρίνης στους πνεύμονες, όπου παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση οξυγόνου, και έχουμε την δημιουργία οξυαιμοσφαιρίνης. Με αυτόν τον τρόπο καθίσταται εφικτή η μεταφορά  $O_2$  στα τριχοειδή αγγεία, εξαιτίας της ιδιότητας της οξυαιμοσφαιρίνης για εύκολη αποβολή οξυγόνου.

Αρτηριακό είναι το αίμα κορεσμένο σε οξυγόνο, με μεγάλη ποσότητα οξυαιμοσφαιρίνης. Φτάνοντας στα λεπτά τριχοειδή αγγεία διασπάται σε αιμοσφαιρίνη και οξυγόνο και το οξυγόνο μεταφέρεται στους ιστούς. Η μυοσφαιρίνη εντοπίζεται στους μυς και παραλαμβάνει οξυγόνο από το αίμα, το αποθηκεύει και το μετακινεί στα μυϊκά κύτταρα, βοηθώντας το μυ να αντιμετωπίσει ξαφνικά αυξημένη ζήτηση οξυγόνου κατά την άσκηση. Η οξυγονωμένη μορφή της μυοσφαιρίνης αποτελεί την οξυμυοσφαιρίνη (Mougiou Vassilis C., 2008). Σε συνθήκες έντονης και επίπονης άσκησης ο οργανισμός έχει αυξημένες απαιτήσεις σε οξυγόνο, για αυτό η αιμοσφαιρίνη ενδέχεται να αυτό-οξειδωθεί, οδηγώντας στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Συνεπώς, αυτό-οξείδωση της αιμοσφαιρίνης καταλήγει στην παραγωγή  $O_2^{\bullet-}$  (Cooper, Vollaard, Choueiri, & Wilson, 2002), και η αυτό-οξείδωση της μυοσφαιρίνης μπορεί όμοια να απελευθερώσει  $H_2O_2$  (Brantley, Smerdon, Wilkinson, Singleton, & Olson, 1993).

### *iv) Κυτόχρωμα P450*

Οι αιμοπρωτεΐνες είναι τα ένζυμα του συστήματος P450, βρισκόμενα στους ιστούς και κυρίως στα ηπατοκύτταρα (ενδοπλασματικό δίκτυο). Συμβάλλουν στην

αδρανοποίηση και απομάκρυνση των ξενοβιοτικών από τον οργανισμό, ενώ οδηγούν και στη μετατροπή τους σε καρκινογόνες και τοξικές ενώσεις. Τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450 παράγουν ελεύθερες ρίζες κατά την δράση τους. Ειδικότερα, συμμετέχοντας σε αντιδράσεις της οξειδωτικής φωσφορλίωσης, αλλά και στον μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών, όπως στον μεταβολισμό φάρμακων, αφού μεταφέρουν  $e^-$  από το NADH ή το NADPH στο  $O_2$  και οξειδώνουν το υπόστρωμα (δηλαδή το ξενοβιοτικό):



#### *v) Υπεροξειδισώματα*

Είναι μεμβρανικά κυστίδια που διαθέτουν οξειδωτικά ένζυμα και συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξείδωσης στοχεύοντας στην καταστροφή επιβλαβών ουσιών του κύτταρου. Συμβάλλουν και στην αποδόμηση των λιπιδίων μέσω οξείδωσης. Σύμφωνα με την οξείδωση των λιπιδίων παράγεται  $H_2O_2$  διαμέσου της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το λιπαρό οξύ στο FAD για τον σχηματισμό  $FADH_2$  και από αυτό στο μοριακό οξυγόνο  $O_2$  (Berg et al., 2010). Τέλος, αδρανοποιούν το  $H_2O_2$  μετά από μετατροπή του σε  $H_2O$ .

#### *vi) Κατεχολαμίνες*

Κατά την άσκηση παρατηρείται αύξηση των κατεχολαμινών, διότι δρουν παράλληλα της αύξησης του οξειδωτικού μεταβολισμού σκελετικών μυών και μυοκαρδίου, διαμέσω ενεργοποίησης β-αδενεργικών υποδοχέων. Για αυτό, αυξάνεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών εσωτερικά τις μεμβράνης του μιτοχονδρίου (Elosua et al., 2003).

#### *vii) Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ*

Με την αναερόβια άσκηση δημιουργείται το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαιμιάωσης. Στην ισχαιμία, η παροχή οξυγόνου στους ιστούς μειώνεται, ενώ με την αποκατάσταση της κυκλοφορίας, οι ιστοί επαναιματώνονται, οδηγώντας σε αύξηση κυρίως  $O_2^{\bullet-}$  και στην οξειδωτική καταστροφή των ιστών (McBride & Kraemer, 1999). Στις καταστάσεις ισχαιμίας-επαιμιάωσης, συμβάλλει το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης και οι αντιδράσεις που καταλύει το ένζυμο αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών και ουρικού οξέος. Στη διάρκεια

επίπονης άσκησης, ο οργανισμός χρειάζεται άμεση ενέργεια, έτσι πραγματοποιείται διάσπαση του ATP σε ADP και έπειτα σε AMP. Εάν υπάρχουν ανεπαρκή αποθέματα οξυγόνου, τότε το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, αυτή με τη σειρά της σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. (Radak et al., 1999; Vina et al., 2000).

### 1.2.2 Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Κύριοι εξωτερικοί παράγοντες που ευθύνονται για την δημιουργία ελευθέρων ριζών είναι οι περιβαλλοντικοί. Απόβλητα βιομηχανιών, χρήση φυτοφαρμάκων και εντομοκτόνων και η γενικότερη χρήση ξενοβιοτικών ουσιών, μπορούν να παράγουν ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, η υπεριώδη ακτινοβολία UVB επηρεάζει το δέρμα και τα μάτια, ενώ η υψηλή θερμοκρασία προκαλεί ως απόκριση την ενεργοποίηση πρωτεϊνών θερμικού σοκ. Κύριο ρόλο έχει η διατροφή, καθώς όταν αυτή είναι φτωχή σε αντιοξειδωτικές βιταμίνες και ελλειπή σε μέταλλα επηρεάζει την εύρυθμη λειτουργία των αντιοξειδωτικών ενζύμων, αφού για την δράση τους είναι αναγκαίοι συμπαράγοντες τα μέταλλα. Τέλος, το αλκοόλ, το κάπνισμα, το στρες και η άσκηση συγκαταλέγονται στις εξωγενείς πηγές (Halliwell & Gutteridge, 2007).

### 1.3 Επιπτώσεις ελευθέρων ριζών

Υπερβολική παραγωγή τους οδηγεί σε οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα την καταστροφή βιομορίων και κυτταρικών δομών, καθώς και των λιπιδίων και των μεμβρανών των πρωτεϊνών και του DNA. Επιπλέον, είναι συνυφασμένες με την εμφάνιση παθήσεων (Halliwell & Gutteridge 2015; Halliwell, 2001), ενώ οδηγούν και σε χρόνια φλεγμονή (Halliwell & Gutteridge 2015; Halliwell, 2001).

Σε χαμηλές όμως συγκεντρώσεις παρουσιάζουν ευεργετικά αποτελέσματα για τον οργανισμό, όπως η μεταγωγή σήματος, η συστολή των μυών και η άμυνα του οργανισμού, όπου σύμφωνα με την διαδικασία της φαγοκυττάρωσης απομακρύνουν αντιγόνα.

- **DNA**

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν άμεσα βλάβες στο DNA αλλοιώνοντας τη δομή του, παρά την σταθερότητά του. Οι βλάβες αυτές περιλαμβάνουν σπασίματα στο DNA, τροποποιήσεις και απώλειες βάσεων και βλάβες στο επιδιορθωτικό σύστημα. Απόρροια αυτών αποτελούν η δημιουργία μεταλλάξεων που οδηγούν σε γήρανση και καρκινογένεση, ενώ ρίζες



υδροξυλίου ( $\text{OH}\cdot$ ) και περοξυλίου ( $\text{ROO}\cdot$ ) προκαλούν μονόκλωνες ρίζες σε πλασμιδιακό DNA (Radak et al., 1999).

- **Πρωτεΐνες**

Η οξείδωση των πρωτεϊνών οδηγεί στον σχηματισμό πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των αμινοξέων στον σχηματισμό οξειδωμένων αμινοξέων. Η καρβονυλίωση αποτελεί μία μη αναστρέψιμη διαδικασία, με πρωτεΐνες που έχουν καρβονυλιωθεί σε μέτριο βαθμό να μπορούν να διασπαστούν από το πρωτεάσωμα και τα λυσοσώματα (Sweda et al. 2002). Ωστόσο, όταν οι πρωτεΐνες έχουν υποστεί οξεία βλάβη, δεν μπορούν να διασπαστούν και καταλήγουν στο σχηματισμό συσσωματώματων μεγάλου μοριακού βάρους. Σημειώνεται ότι η καρβονυλίωση έμμεσα, ίσως επηρεάσει τη λειτουργία άλλων βιομορίων, όπως για παράδειγμα το DNA, για αυτό η καρβονυλίωση ενζύμων που συμμετέχουν στη σύνθεση ή την επιδιόρθωση του γενετικού υλικού, οδηγεί στην απορρύθμιση των αντίστοιχων διαδικασιών που συμμετέχουν (Levine 2002).

- **Λιπίδια**

Η παρουσία ελευθέρων ριζών, δημιουργεί οξειδωτικό περιβάλλον στο κύτταρο, σχηματίζοντας άκρως ενεργά και ασταθή υπεροξειδία των λιπιδίων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως λιπιδική υπεροξείδωση και τα ασταθή προϊόντα της διασπώνται και προκύπτουν ρίζες περοξυλίου  $\text{ROO}\cdot$ , συζυγή διένια και μηλονική διαλδεϋδη (MDA). Επειδή βασικά δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών αποτελούν τα πολυακόρεστα λιπαρά, η καταστροφή οδηγεί συχνά στον κυτταρικό θάνατο (Young & McEneny, 2001).

## 1.4 Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται στη δυσαναλογία ανάμεσα στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Πιο συγκεκριμένα είναι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών, η οποία οδηγεί στη διατάραξη της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και στη οξειδωτική τροποποίηση βιομορίων (Dotan, Lichtenberg, & Pinchuk, 2004; Halliwell & Gutteridge, 1990). Η διατάραξη της ισορροπίας συμβαίνει εξαιτίας της μειωμένης δράσης των ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων,

καθώς και λόγω της αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών κατόπιν παρατεταμένης έκθεσης σε οξειδωτικό παράγοντα (Mylonas & Kouretas, 1999).

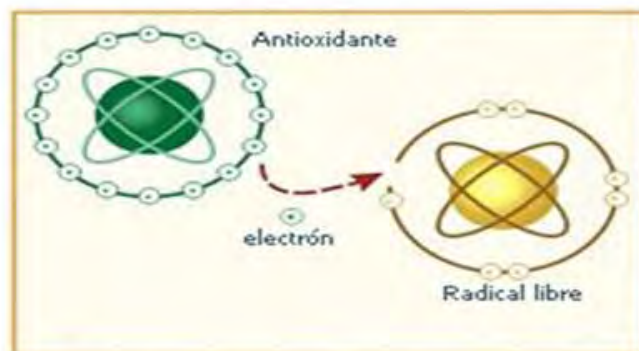


Εικόνα 6: Οξειδωτικό στρες

### 1.5 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

Με τον όρο αντιοξειδωτικό, ορίζουμε κάθε ουσία η οποία βρισκόμενη σε μικρή ποσότητα, συγκριτικά με το προς οξείδωση υπόστρωμα, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωσή του (Halliwell & Gutteridge, 1999). Παράγονται είτε ενδογενώς από τον οργανισμό, είτε αποτελούν μόρια με μικρό μοριακό βάρος που προσλαμβάνονται διαμέσω της διατροφής.

Ο οργανισμός για την προστασία του από τις επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών διαθέτει προστατευτικούς μηχανισμούς, οι οποίοι είναι είτε ενζυμικοί είτε μη ενζυμικοί, με σκοπό να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε αδρανή στοιχεία και να επιδιορθώνουν βλάβες που αυτές προκαλούν.



Εικόνα 7: Εξουδετέρωση ελεύθερης ρίζας από αντιοξειδωτικό

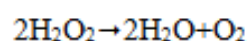
### 1.5.1 Ενζυμικοί μηχανισμοί

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), η αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR), η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD), η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης (Prx) και η αναγωγάση της θειορεδοξίνης (TrxR).

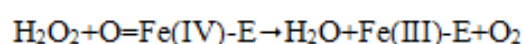
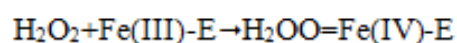
#### ➤ **Καταλάση (CAT)**

Συναντάται στους έμβιους οργανισμούς που αλληλεπιδρούν με το οξυγόνο. Είναι ένα τετραμερές, με τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Υπάρχουν τέσσερις πορφυρινικές ομάδες αίμης, που βοηθούν την καταλάση να αντιδρά με το  $H_2O_2$ . Βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα και κυρίως στα ερυθροκύτταρα και στο ήπαρ, ενώ ενδοκυτταρικά συναντάται στα υπεροξειδισώματα, στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), αποτελεί προϊόν του μεταβολισμού σε διάφορους οργανισμούς και λόγω της τοξικότητάς του είναι άμεσα απαραίτητο να μετατραπεί σε λιγότερο επικίνδυνη χημική ένωση. Η CAT είναι αυτή που διασπά το  $H_2O_2$  σε νερό και οξυγόνο, τα οποία είναι αβλαβή για τον οργανισμό.

Η αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου από την καταλάση είναι η:



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.

Τέλος, η καταλάση χρησιμοποιεί το  $H_2O_2$  για να απομακρύνει τοξικές ουσίες ( $H_2A$ ), με τη χρήση υποστρώματος (αιθανόλη), όπως φαίνεται στην αντίδραση:  
 $H_2O_2 + H_2A \text{ (substrate)} \rightarrow 2 H_2O + A$

#### ➤ **Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)**

Ανάγει το υπεροξείδιο του υδρογόνου ή των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων, με τη χρήση της γλουταθειόνης (GSH) ως αναγωγική ουσία. Κατά την αντίδραση αυτή η γλουταθειόνη οξειδώνεται:  $2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ . Η GPX και η CAT δρουν το



ίδιο πάνω στο  $H_2O_2$ , ωστόσο η GPX έχει μεγαλύτερη συγγένεια αποικοδομώντας το σε φυσιολογικές συνθήκες (Antunes, Han, & Cadenas, 2002).

➤ **Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)**

Η GR ανάγει τη GSSG σε GSH, διατηρώντας την αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Συνένζυμο της GR είναι το φλαβινο-αδενινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, μεταφέροντας τα  $e^-$  στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει τα δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης, διασπώντας τα.

➤ **Αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD)**

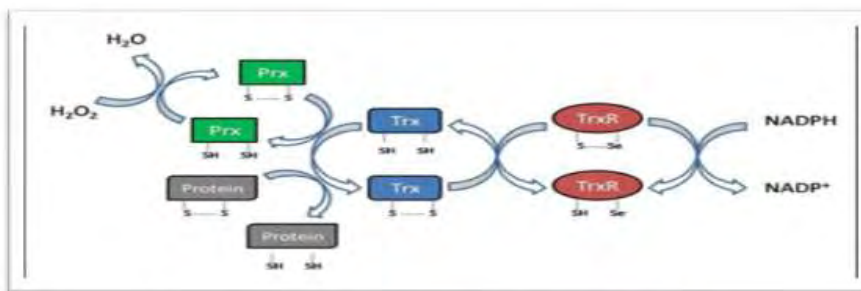
Είναι ένα ένζυμο που υπάρχει στα ερυθροκύτταρα και αποτελεί μέρος του βιοχημικού μονοπατιού της φωσφορικής πεντόζης, που μεταβολίζει τη γλυκόζη και λειτουργεί προστατευτικά έναντι βλαβών που προκαλούνται από οξειδωτικούς παράγοντες. Η G6PD μετατρέπει την 6-φωσφορική γλυκόζη σε 6-φωσφογλυκονικό, ενώ παρουσία του αναγωγικού NADPH αποτελεί πηγή ανηγμένης γλουταθειόνης για τα ευθροκύτταρα.

➤ **Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)**

Η SOD καταλύει την αντίδραση μετατροπής του  $O_2^{\cdot-}$  σε  $H_2O_2$ , εξουδετερώνοντας τις  $O_2^{\cdot-}$  με υψηλές ταχύτητες αντίδρασης. Αποτελεί ένα σημαντικό ενδοκυτταρικό σύστημα. Στον άνθρωπο συναντούμε, την κυτταροπλασματική, τη μιτοχονδριακή και την εξωκυττάρια.

➤ **Υπεροξειδάση (Prx) και Αναγωγή (TrxR) της θειορεδοξίνης**

Η υπεροξειδάση της θειορεδοξίνης (Prx) ανάγει το  $H_2O_2$  και τα αλκυλ-υδροϋπεροξειδία, μαζί με την αναγωγή της θειορεδοξίνης (TrxR), τη θειορεδοξίνη και το NADPH (Netto, Chae, Kang, Rhee, & Stadtman, 1996).



Εικόνα 8: Μηχανισμός δράσης των ενζύμων Prx και Trx

### 1.5.2 Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται υδατοδιαλυτά και λιποδιαλυτά μικρά μόρια, γλουταθειόνη, η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, τα καροτενοειδή, το σελήνιο και το ουρικό.

#### ➤ Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Αποτελεί την πιο άφθονη θειόλη στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. Μπορεί να εντοπιστεί στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια. Συναντάται κυρίως στην ανηγμένη (GSH) της μορφή και όχι τόσο στην οξειδωμένη (GSSG), η GSSG είναι το 10% της GSH. Οι δύο μορφές βρίσκονται σε δυναμική ισορροπία και ο λόγος τους υποδεικνύει την παρουσία οξειδωτικού στρες. Συμβάλλει στο μεταβολισμό ασβεστίου, φαρμάκων, σε λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και στην απέκκριση των ξενοβιοτικών και ελευθέρων ριζών, στη διατήρηση των επιπέδων των θειολικών ομάδων των πρωτεϊνών, και στη μεταφορά αμινοξέων μέσω των μεμβρανών.

#### ➤ Βιταμίνη E

Είναι λιποδιαλυτή και η δραστική μορφή της βιταμίνης E στους ανθρώπους είναι η α-τοκοφερόλη και ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία. Εξαιτίας της λιποδιαλυτής φύσης της, ενσωματώνεται σε κυτταρικές μεμβράνες, προστατεύοντάς τες από οξειδωτικές βλάβες. Δρώντας ως αντιοξειδωτικό, διακόπτει την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου που σχηματίζονται κατά την λιπιδική υπεροξείδωση, δημιουργώντας μια ρίζα τοκοφερόλης, η οποία ανάγεται από μια άλλη αντιοξειδωτική ουσία. (Halliwell & Gutteridge, 1999).

#### ➤ Βιταμίνη C

Είναι υδατοδιαλυτή και συμμετέχει στη σύνθεση του κολλαγόνου. Επιπλέον, διευκολύνει την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και παράλληλα συμβάλλει στην καλή λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Γιαννακοπούλου, 2009). Η αντιοξειδωτική δράση της είναι πολύ ισχυρή, αφού μπορεί και εξουδετερώνει άμεσα της ενεργές μορφές οξυγόνου.

#### ➤ **B- καροτένιο**

Το B-καροτένιο, είναι μέλος της οικογένειας των καροτενοειδών, που αποτελούν φυσικές χρωστικές. Είναι μία προβιταμίνη, αφού μετατρέπεται σε βιταμίνη Α. Αποτελεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, δεσμεύοντας το μονήρες οξυγόνο (Pham-Huy, He, & Pham-Huy, 2008). Είναι λιποδιαλυτό μόριο, καταναμημένο στις κυτταρικές μεμβράνες, αδρανοποιώντας τις ελεύθερες ρίζες και περιορίζοντας την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Τέλος, συμβάλλει στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (Halliwell & Gutteridge, 1998).

#### ➤ **Σελήνιο**

Αναγκαίο μέταλλο που ανήκει στα ιχνοστοιχεία. Συμβάλλει στην πρόληψη ασθενειών και συγχρόνως αποτελεί συμπράγοντα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. (Halliwell & Gutteridge, 1999).

#### ➤ **Ουρικό οξύ**

Κατά τη διάρκεια άσκησης τα επίπεδα του ουρικού στο πλάσμα αυξάνονται (Green & Fraser, 1988). Έπειτα, διαχέεται στα μυϊκά κύτταρα συμμετέχοντας στην προστασία από ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό, κυρίως στο πλάσμα, διότι εκεί εντοπίζεται σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις (Sautin & Johnson, 2008).

### **1.6 Άσκηση και οξειδωτικό στρες**

Παλαιότερες έρευνες απέδειξαν πως η άσκηση οδηγεί σε παραγωγή ελευθέρων ριζών διαμέσου πολλών και διαφορετικών μηχανισμών. Ο σχηματισμός των ριζών, εξαρτάται από την ένταση της άσκησης, με μεγάλη έντασης άσκηση να επιφέρει αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και αδυναμία εξουδετέρωσής τους. (Palmer et al., 2003). Έτσι, δημιουργείται το προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες,

που προκαλεί οξειδωτική καταστροφή πρωτεϊνών, λιπιδίων και άλλων βιομορίων (Finaud, Lac, & Filaire, 2006). Για τον λόγο αυτό, το ενδιαφέρον αρκετών ερευνητών έχει στραφεί στο να μελετήσουν τις επιδράσεις της όποιας μορφής άσκησης (αερόβιας ή αναερόβιας) στο οξειδωτικό στρες σε πειραματόζωα, και στον άνθρωπο.

Στη διάρκεια της άσκησης και για ορισμένο χρονικό διάστημα αφού ολοκληρωθεί, επισημάνονται σημαντικές μεταβολές σε διάφορες διεργασίες του οργανισμού. Επομένως, η άσκηση επηρεάζει ενδογενείς μηχανισμούς και μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει τη συγκέντρωση ουσιών, καταλήγοντας σε διάφορες προσαρμογές. Χαρακτηριστικές αποκρίσεις του οργανισμού στην άσκηση αποτελούν η αυξημένη αιματική ροή και καρδιακή συχνότητα, καθώς και η αύξηση πρόσληψης και κατανομής του οξυγόνου στους ιστούς, για να καλυφθούν οι αυξημένες ανάγκες των μυών. Ακόμα, επίπονη άσκηση οδηγεί σε φαινόμενα φλεγμονώδους αντίδρασης στους μύες, και παρατηρείται ενεργοποίηση του αμυντικού συστήματος του οργανισμού. Επίσης, έχουμε ενίσχυση των διεργασιών, οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή ενέργειας όπως η γλυκόλυση, η γλυκογονόλυση, η λιπόλυση και η οξειδωτική φωσφορυλίωση, μέσω της οποίας παράγεται και το μεγαλύτερο μέρος του ATP στα μιτοχόνδρια. Συγχρόνως, παρατηρείται αύξηση στην παραγωγή μορίων (π.χ. κατεχολάμινες), καθώς και στη βιοσύνθεση και στη δράση διαφόρων ενζύμων (οξειδάση της ξανθίνης, υπεροξειδική δισμουτάση, υπεροξειδάση και η αναγωγή της γλουταθειόνης κ.α.). Αποτέλεσμα αυτών, είναι αρχικά ο σχηματισμός και στη συνέχεια η εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών, για την διατήρηση της δυναμικής ισορροπίας, απαραίτητη για την εύρυθμη λειτουργία και επιβίωση του οργανισμού.

Ειδικότερα, για την αερόβια άσκηση (κολύμπι, τρέξιμο, ποδηλασία) έχει επισημανθεί αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών τόσο στην καρδιά όσο και στους σκελετικούς μυς (Davies, Quintanilha, Brooks, & Packer, 1982; Kumar, Reddy, Prasad, Thyagaraju, & Reddanna, 1992), κάτι που επιβεβαιώνεται από τη μεταβολή συγκεκριμένων δεικτών στο αίμα. Για αυτό, μετά από εξαντλητική άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο επισημάνθηκε αυξημένη λιπιδική υπεροξειδωση και πρωτεϊνική οξείδωση και μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα (Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2006). Ακόμα, μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν στο αίμα κολυμβητών 800 μέτρων, ανέδειξαν υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου καταλάση (Inal, Akyuz, Turgut, & Getsfrid, 2001). Στην

αερόβια άσκησης, φάνηκε πως αυξήθηκε η συγκέντρωση των ενζυμικών και των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών (Inal, Akyuz, Turgut, & Getsfrid, 2001). Μετρήσεις που έγιναν σε δείγμα αίματος αθλητών ποδηλασίας, η άσκηση φάνηκε να αυξάνει σημαντικά την οξειδωση της γλουταθειόνης (Aguilo et al., 2005), όμως η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αυξήθηκε στους ποδηλάτες που ασκήθηκαν στο 100% της  $VO_{2max}$  σε αντίθεση με όσους ασκήθηκαν στο 40% της  $VO_{2max}$  (Lovlin et al., 1987).

Όσον αφορά την αναερόβια άσκηση (άρση βαρών, σπριντ και άλματα), οι έρευνες που έγιναν κατέληξαν σε παρόμοια αποτελέσματα (Groussard et al., 2003). Ωστόσο, και κατά τη διαλειμματική άσκηση (ποδόσφαιρο,μπάσκετ), που χαρακτηρίζεται από διαστήματα έντονης προσπάθειας εναλλασσόμενα με διαστήματα ηπιότερης προσπάθειας (διαλείμματα ανάπαυσης ή ενεργητικής ανάπαυσης), σημειώθηκε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (Svensson et al., 2002).

### 1.7 Οξειδωτικό στρες και έκκεντρη άσκηση

Έκκεντρη συστολή παρατηρείται όταν το μήκος του μυ αυξάνεται προσπαθώντας να υπερνικήσει μια εξωτερική αντίσταση. Στην έκκεντρη συστολή, όπως και στην ομόκεντρη (μείωση του μήκος του μυός), έχουμε ενεργοποίηση του κύκλου των εγκάρσιων γεφυρών, με τη διαφορά πως τα μυονημάτια της ακτίνης τραβιούνται μακριά από το κέντρο της ζώνης A και το σαρκομέριο επιμηκύνεται. Βασική διαφορά της έκκεντρης άσκησης από την ομόκεντρη είναι πως στην πρώτη προκαλείται μεγαλύτερη μυϊκή βλάβη (Jamurtas et al., 2000; Paschalis, Koutedakis, Jamurtas, Mougios, & Baltzopoulos, 2005). Η μυϊκή βλάβη, συνοδεύεται από αποδιοργάνωση του σαρκειλήματος, καταστροφή του σαρκοπλασματικού δικτύου (Armstrong, 1990), καταστροφή του κυτταροπλάσματος (Friden, 1984), καθώς επίσης και πρόκληση ανωμαλιών στον εξωκυττάριο χώρο της μυϊκής ίνας (Stauber, 1989). Συμπτώματα της μυϊκής βλάβης αποτελούν ο μυϊκός πόνος, η μείωση του εύρους κίνησης του μυός, η πτώση της μυϊκής δύναμης, η αποδιοργάνωση της δομής του και η εκκροή μυϊκών πρωτεϊνών στο αίμα.

Έρευνες στη βιβλιογραφία παρόλο που μελετούν το μυϊκό ιστό, λίγες έχουν επικεντρωθεί στην έκκεντρη άσκηση, στη μυϊκή βλάβη και στις αλλαγές που παρατηρούνται στον οργανισμό μετά την εκτέλεση της. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, η έκκεντρη άσκηση μπορεί να προκαλέσει μυϊκή βλάβη (Jamurtas et al., 2000; Paschalis et al., 2005) και αλλαγές στους δείκτες προσδιορισμού του

οξειδωτικού στρες (Close, Ashton, Cable, Doran, & MacLaren, 2004; Close, Ashton, McArdle, & MacLaren, 2005; Goldfarb, Bloomer, & McKenzie, 2005; Lee et al., 2002). Διαπιστώθηκε, πως οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) συμμετέχουν στην έναρξη και στην εξέλιξη της βλάβης (Silva et al., 2010, 2011). Στη διάρκεια μιας μεγάλης περιόδου εκτέλεσης έκκεντρης άσκησης, η παραγωγή ROS αποδόθηκε σε διαφορετικούς μηχανισμούς, για παράδειγμα στο φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, στο μεταβολισμό προστανοειδών και κατεχολαμινών, στην υπερβολική συσσώρευση του ασβεστίου καθώς και στη διάσπαση πρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο (McHugh et al., 1999).

Η μεταβολή των δεικτών οξειδωτικού στρες, ενδεχόμενος οφείλονται στη φλεγμονώδη αντίδραση του οργανισμού από την προκληθείσα μυϊκή βλάβη. Μετά από επίπονη άσκηση, παρατηρήθηκε επέλαση φαγοκυττάρων στο μυ και φλεγμονώδη αντίδραση, οι οποίες συνδέονται με την εμφάνιση καθυστερημένου μυϊκού πόνου (Aoi et al., 2004). Στόχος της φλεγμονώδους αντίδρασης του οργανισμού, αποτελεί η αναστολή της αποκατάστασης του μυός, στοχεύοντας στην επούλωση του τραυματισμένου ιστού. Παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης λευκοκυττάρων στο αίμα και είσοδος φαγοκυττάρων στο μυ, αυξάνοντας τα δραστικά στοιχεία κατευθείαν μετά την μυϊκή βλάβη που προκλήθηκε από την άσκηση, αλλά και ώρες μετά (Close, Ashton, McArdle et al., 2005). Εξαιτίας της προκληθείσας μυϊκής βλάβης από την έκκεντρη άσκηση, παρατηρείται λευκοκυτταρική διήθηση, συνεπώς οξειδωτικό στρες, διότι τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα διεγείρουν την παραγωγή οξειδωτικών μέσων, στοχεύοντας στην απομάκρυνση και επιδιόρθωση του κατεστραμμένου μυϊκού ιστού. (Close, Ashton, McArdle et al., 2005). Η ανεξέλικτη δράση των δραστικών στοιχείων καταστρέφουν και υγιή μυϊκό ιστό (Close, Ashton, McArdle et al., 2005). Η έκκριση των δραστικών στοιχείων, συνδέεται με την αντιμετώπιση της φλεγμονής, διαρκώντας έως και τρεις ημέρες, μετά την εκτέλεση έκκεντρης άσκησης (Close et al., 2004). Επομένως καταλήγουμε, πως μέρος της αύξησης του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό μετά από εκτέλεση έκκεντρης άσκησης, μπορεί και να οφείλεται στα ουδετερόφιλα, τα οποία ενεργοποιούνται στο σημείο της φλεγμονής.

Ταυτόχρονα με τις μεταβολές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του αίματος, εξαιτίας της έκκεντρης άσκησης, μπορεί να προκληθεί και μείωση της λειτουργικής ικανότητας του μυός. Αναλυτικότερα, συμβαίνει μείωση στην παραγόμενη ροπή και στο εύρος κίνησης του μυός, (Bloomer, Goldfarb, Wideman, McKenzie, & Consitt,

2005), δύο σημαντικοί δείκτες για τον προσδιορισμό της προκληθείσης μυϊκής βλάβης (Aguilo et al., 2005; Warren, Lowe, & Armstrong, 1999). Εύλογα λοιπόν, αναρωτιέται κανείς αν οι αλλαγές που επήλθαν στους δείκτες προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες, μπορούν να συσχετιστούν και να ερμηνεύσουν διακυμάνσεις στους δείκτες προσδιορισμού της μυϊκής βλάβης. Σε δυο έρευνες (Close et al., 2004; Close, Ashton, Cable et al., 2005) όπου μετρήθηκε η μέγιστη παραγόμενη ροπή και σε άλλες δύο (Lee et al., 2002; Saxton, Donnelly & Roper, 1994) που μετρήθηκε η μέγιστη παραγόμενη ροπή καθώς και το εύρος της κίνησης μετά από μυϊκή βλάβη, δεν παρατηρήθηκε κοινή εκδήλωση των δεικτών μυϊκής βλάβης και του οξειδωτικού στρες. Όμως, το να αποδείξουμε την ύπαρξη κοινής σχέσης, έπειτα από εκτέλεση έκκεντρης άσκησης, ανάμεσα στις μεταβολές δεικτών μυϊκής βλάβης και οξειδωτικού στρες καθίσταται δύσκολο, διότι οι μετρήσεις προσδιορισμού των δεικτών αυτών, συνήθως εκδηλώνουν διαφορετική κινητική ακόμα και στο ίδιο ερέθισμα.

Σημειώνεται πως οι πιο πολλές από τις έρευνες που ασχολούνται και αναφέρονται στα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες και στη μυϊκή βλάβη μετά από εκτέλεση έκκεντρης άσκησης, δεν αποτελούν κατά κανόνα μια αρνητική κατάσταση για τον οργανισμό. Η αυξημένη παράγωγή δραστικών στοιχείων, μπορεί να είναι θεμιτή για την αντιμετώπιση της προκληθείσης φλεγμονής, έπειτα από έκκεντρη άσκηση, συμβάλλοντας στη επιδιόρθωση του μυός.

Συνοψίζοντας, η έκκεντρη άσκηση συμβάλλει στην αύξηση της συγκέντρωσης των δεικτών οξειδωτικού στρες στον οργανισμό. Τα αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες διαρκούν για αρκετές ημέρες μετά το πέρας της έκκεντρης άσκησης, αντίθετα με άλλα είδη άσκησης που δεν προκαλούν μυϊκή βλάβη, στα οποία οι δείκτες αυτοί επανέρχονται σε φυσιολογικά επίπεδα έπειτα από λίγες ώρες (Aguilo et al., 2005; Bloomer & Goldfarb, 2004; Close et al., 2004).

## ΣΚΟΠΟΣ

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχουν παρατηρηθεί αξιοσημείωτες διαφορές στους δείκτες οξειδωτικού στρες μεταξύ των ατόμων (Margaritelis et al,2014; Stagos et al,2015). Για αυτό, σκοπός της εργαστηριακής αυτής μελέτης ήταν να διερευνηθεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση των ατόμων τις επόμενες μέρες έπειτα από εκτέλεση έκκεντρης άσκησης σε ισοκινητικό δυναμόμετρο. Ακόμα, θέλαμε να ελέγξουμε κατά πόσο η ύπαρξη αθλητικού ιστορικού των ατόμων επηρεάζει τις μεταβολές των δεικτών οξειδωτικού στρες συγκριτικά με άτομα τα οποία δεν έχουν επαφή με κάποιου είδους άσκηση, υποβάλλοντας αυτές τις δύο ομάδες σε έκκεντρη άσκηση. Επιπλέον, στόχος ήταν να ελεγχθεί η αξιοπιστία μίας νέας συσκευής που ονομάζεται RedoxSYS, στην εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του αίματος μετά από άσκηση.



## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Συμμετέχοντες

Στην παρούσα έρευνα συμμετείχαν 22 εθελοντές άνδρες και γυναίκες. Βασική προϋπόθεση για την επιλογή τους ήταν να μην είχαν στο ιστορικό τους κάποιο μυοσκελετικό τραυματισμό στα κάτω άκρα (αδυναμία εκτέλεσης του προγράμματος της άσκησης). Επίσης, από την παρούσα μελέτη αποκλείστηκαν άτομα που κάπνιζαν ή είχαν καταναλώσει συμπληρώματα διατροφής τουλάχιστον τους τρεις τελευταίους μήνες πριν από την πραγματοποίηση της άσκησης.

Αρχικά, με ακρίβεια 0,5kg μετρήθηκε η μάζα σώματος των εθελοντών (δοκός ισορροπίας 710, Seca, Ηνωμένο Βασίλειο) όντες ντυμένοι ελαφρώς και ξυπόλυτοι. Το ύψος μετρήθηκε με ακρίβεια 0,5cm (υψόμετρο 208, Seca).

Κάτα τη διάρκεια της συμμετοχής στη μελέτη και για 5 ημέρες πριν και 3 ημέρες μετά τη συνεδρία της άσκησης ζητήθηκε από τους εθελοντές η αποχή από οποιαδήποτε μορφή άσκησης. Ακόμα, επισημάνθηκε στους συμμετέχοντες να μην καταναλώσουν αντιφλεγμονώδη ή αναλγητικά φάρμακα καθόλη τη διάρκεια της συμμετοχής τους στην παρούσα μελέτη. Οι εθελοντές ενημερώθηκαν για τα οφέλη της συμμετοχής τους στην παρούσα έρευνα, καθώς και για ενδεχόμενους κινδύνους-ταλαιπωρίες και στη συνέχεια έδωσαν γραπτή συγκατάθεση.

Σύμφωνα με τη δήλωση του Ελσίνκι του 1975, όπως αναθεωρήθηκε το 2000, πραγματοποιήθηκαν οι διαδικασίες.

### 2.2 Πρωτόκολλο έκκεντρης άσκησης

Η συνεδρία έγινε σε ισοκινητικό δυναμόμετρο (Cybex Norm, Ronkonkoma, NY). Το πρωτόκολλο άσκησης πραγματοποιήθηκε από την καθιστή θέση (120° γωνία ισχίου), ύστερα από σταθεροποίηση των εθελοντών σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πριν την έναρξη της άσκησης, τα άτομα υποβλήθηκαν σε ζέσταμα 10 λεπτών σε στατικό ποδήλατο (70rpm, 50W) και στη συνέχεια εκτέλεσαν 1 σετ των 9 ομόκεντρων επαναλήψεων, και 1 σετ των 7 έκκεντρων επαναλήψεων σε ισοκινητικό δυναμόμετρο ως ζέσταμα και εξοικείωση με τη διαδικασία. Το πρόγραμμα της άσκησης των εθελοντών περιλάμβανε 5 σετ των 15 μέγιστων έκκεντρων συστολών (γόνατο εύρος, 0° πλήρης έκταση έως 90° κάμψη) με γωνιακή

ταχύτητα  $60^\circ / s$ . Ανάμεσα στα σετ υπήρχε χρόνος ξεκούρασης δύο λεπτά και η συνολική διάρκεια της άσκησης ήταν 15 λεπτά. Η ανατροφοδότηση της έντασης γινόταν αυτόματα από το δυναμόμετρο κατά τη διάρκεια της άσκησης. Για την επίτευξη της μέγιστης δυνατής προσπάθειας από τους εθελοντές, ενθαρρύνθηκαν λεκτικά. Η επιλογή του ποδιού πραγματοποίησης της άσκησης ήταν επιλογή του εκάστοτε συμμετέχοντα.



Εικόνα 9: Ισοκινητικό δυναμόμετρο

### 2.3 Αξιολόγηση του μυϊκού πόνου

Απευθείας μετά τη συνεδρία της άσκησης, 24, 48 και 72 ώρες μετά, ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες η αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου (delayed onset muscle soreness, DOMS). Η αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με βάση το βάδισμα (DOMS<sub>w</sub>) και το κάθισμα (DOMS<sub>sq</sub>). Το κάθε άτομο αξιολόγησε λεκτικά τον πόνο που αισθανόταν καθώς εκτελούσε τις δύο ασκήσεις, με βάση μια κλίμακα από το 1 (=καθόλου πόνος) έως το 10 (= μέγιστος πόνος).

### 2.4 Συλλογή και επεξεργασία του αίματος

Λήφθηκε φλεβικό αίμα όλων των συμμετεχόντων από τον βραχίονα (7 mL) πριν (δείγμα ελέγχου), 24, 48 και 72 ώρες μετά την εκτέλεση της άσκησης, από τα οποία 6 ml τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια EDTA (αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ) για μετρήσεις των TAC, TBARS, πρωτεϊνικών καρβονυλίων, γλουταθειόνης και καταλάσης, ενώ 1 ml αίματος τοποθετήθηκε σε σωληνάρια ηπαρίνης για τη μέτρηση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού (ORP). Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1370 g για 10 λεπτά στους 4 °C ώστε να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός του πλάσματος. Το

πλάσμα συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε σε σωληνάκια (erpendorf). Έπειτα, η λύση των συμπυκνωμένων ερυθροκυττάρων στο κάτω μέρος των σωλήνων επετεύχθη με τη χρήση αποσταγμένου νερού 1:1 (v/v), ακολουθημένη από έντονη ανάδευση. Φυγοκεντρήθηκαν στα 4000 g για 15 λεπτά στους 4 °C και το προϊόν συλλέχθηκε για μέτρηση των επιπέδων της γλουταθειόνης, της αιμοσφαιρίνης και της δραστηριότητας του ενζύμου καταλάσης. Το πλάσμα και το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα αποθηκεύτηκαν στους -80 °C, μέχρι τη χρήση τους στις απαιτούμενες βιοχημικές αναλύσεις.

## 2.5 Αξιολόγηση του sORP και cORP με το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS

Ο προσδιορισμός των τιμών sORP και cORP πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS (Luoxis Diagnostics, Inc, Englewood, Κολοράντο, Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής), όπως και σε άλλες έρευνες του εργαστηρίου μας (Spanidis et al., 2015; Stagos et al., 2015). Το διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS πραγματοποιεί μία ισχυρή και γρήγορη εκτίμηση του οξειδωτικού στρες, υπολογίζοντας μέσω 20μL πλάσματος, σε περίπου 4 λεπτά, το static ORP (sORP) και capacity ORP (cORP), δύο διακριτοί δείκτες για τον προσδιορισμό του ORP, ένα ολοκληρωμένο μέτρο ισοροπίας ανάμεσα στις συνολικές οξειδωτικές ουσίες και στα συνολικά αναγωγικά (Harris and Hansen, 2012).

Ο δείκτης sORP, αποτελεί την πλήρη ισοροπία οξειδωτικών και αναγωγικών σε ένα δείγμα, μονάδα μέτρησής του είναι τα millivolt (mV) και είναι αυτό που ορίζεται ως ORP. Παρατήρηση χαμηλών τιμών στο βιολογικό δείγμα, αντιπροσωπεύουν πως αυτό βρίσκεται στο εύρος των φυσιολογικών ορίων της οξειδωαναγωγικής κατάστασης. Αντιθέτως τιμές πάνω από το φυσιολογικό αποδικνύουν ανισοροπία, με αυξημένη ποσότητα οξειδωτικών προς τα αναγωγικά, υποδεικνύοντας οξειδωτικό στρες.

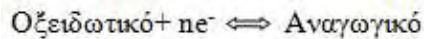
Ο δείκτης cORP, αποτελεί το αντιοξειδωτικό διαθέσιμο απόθεμα του οργανισμού και μονάδα μέτρησής του είναι τα microcoulombs (μC). Σημείωση αυξημένων τιμών στο βιολογικό δείγμα, αντιπροσωπεύουν αντιοξειδωτικά αποθέματα εντός φυσιολογικών ορίων, αντίθετα χαμηλές τιμές δείχνουν μειωμένα αντιοξειδωτικά αποθέματα.



Εικόνα 10: Διαγνωστικό σύστημα RedoxSYS και αισθητήρας μίας χρήσης

### Λειτουργία RedoxSYS

Η μέτρηση των δυναμικών sORP και cORP βασίζεται στην μεταφορά ηλεκτρονίων με μία οξειδοαναγωγική αντίδραση. Ένα σύστημα οξείδωσης – αναγωγής περιλαμβάνει μεταφορά ηλεκτρονίων από κάποιο αναγωγικό σε κάποιο οξειδωτικό όπως φαίνεται στην αντίδραση:



Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό (E) ή το δυναμικό οξείδωσης – αναγωγής (ORP) ,σε ισορροπία, υπολογίζεται με βάση την εξίσωση Nernst:

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

με R(σταθερά αερίων), T(θερμοκρασία σε Κελvίη) και F(Faraday σταθερά), σταθερές. E<sub>0</sub> το τυπικό δυναμικό ενός οξειδοαναγωγικού συστήματος μετρημένο σε σχέση με ένα ηλεκτρόδιο υδρογόνου, που αποδίδεται αυθαίρετα μια E<sub>0</sub> ίση με 0 volts και n είναι ο αριθμός των ηλεκτρονίων που μεταβιβάζονται.

Το RedoxSYS υπολογίζει το ORP χρησιμοποιώντας ένα σύστημα 3 ηλεκτροδίων, ένα εργασίας, ένα μέτρησης και ένα αναφοράς. Εφαρμόζεται μια αμελητέα ποσότητα ρεύματος μεταξύ ηλεκτροδίων εργασίας και μέτρησης και μετρά το ORP μεταξύ των ηλεκτροδίων εργασίας και αναφοράς. Όταν φτάσει σε ισορροπία η ανάγνωση του ORP, βρίσκεται το sORP, με μονάδα μέτρησης τα millivolt (mV).. Έπειτα, στο δείγμα εφαρμόζεται ένα γραμμικά αυξανόμενο ρεύμα, μεταξύ ηλεκτροδίων εργασίας και μέτρησης. Από την έναρξη της σάρωσης αυτής μέχρι το μέγιστο ρυθμό μεταβολής του ORP, ο χρόνος αυτός αποτελεί τον χρόνο μεταβίβασης και το ενσωματωμένο ρεύμα μέχρι τη στιγμή αυτή αποτελεί το cORP με μονάδα μέτρησης τα microcoulombs (μC).

## 2.6 Αξιολόγηση δεικτών: TBARS, CARB, TAC, GSH, CAT.

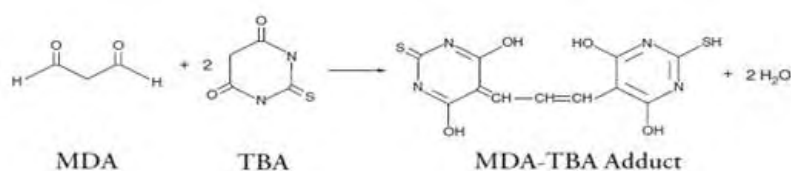
Για τον προσδιορισμό της υπεροξειδωσής των λιπιδίων χρησιμοποιούνται ως δείκτης οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβουτικό οξύ. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της οξειδωσής των πρωτεϊνών, για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ερυθροκυττάρων προσδιορίζεται η συγκέντρωση της ανηγμένης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης, η δραστηριότητα της καταλάσης και η μέτρηση της αιμοσφαιρίνης. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας προσδιορίζεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος του αίματος.

Όλοι οι δείκτες του οξειδωτικού στρες προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά και οι αρχές των μεθόδων καθώς και τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά. Σημειώνεται ότι για κάθε δείκτη που μετρήθηκε εκτελέστηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε δείγμα, προσδίδοντας μεγαλύτερη ακρίβεια στα αποτελέσματα.

### 2.6.1 Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβουρικό οξύ (TBARS)

#### Αρχή της μεθόδου

Απόρροια του οξειδωτικού στρες είναι ο σχηματισμός ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Η μαλονδιαλδεύδη (MDA) είναι το προϊόν διάσπασης των δομών αυτών και προσδιορίζεται μέσω της αντίδρασης με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Τα TBARS εκφράζονται ως ισοδύναμα της μαλονδιαλδεύδης, που σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) με αναλογία μαλονδιαλδεύδης προς θειοβαρβιτουρικό οξύ 1/2. Η μέτρηση της μαλονδιαλδεύδης πραγματοποιείται φωτομετρικά για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξειδωσής των λιπιδίων.



Εικόνα 11: Αντίδραση MDA με TBA

Ο προσδιορισμός των TBARS πραγματοποιήθηκε με ελαφρώς τροποποιημένη τη μέθοδο του Keles et al., 2001.

#### Πειραματικό πρωτόκολλο

➤ Ρύθμιση υδατόλουτρου στους 95°C
➤ Προσθήκη 100μL πλάσματος (δείγμα)/ 100μL απεσταγμένο νερό (τυφλό) σε Falcon (15mL)
➤ Προσθήκη 500 μL TCA 35% και 500 μL Tris-HCl
➤ Ανάδευση
➤ Επώαση 10 min σε θερμοκρασία δωματίου
➤ Προσθήκη 1 mL Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> – TBA
➤ Επώαση στους 95 °C για 45 min στο υδατόλουτρο.
➤ Μεταφορά Falcon στον πάγο για 5 min
➤ Προσθήκη 1 mL TCA 70%
➤ Ανάδευση
➤ Μεταφορά 1 mL σε Eppendorfs και φυγοκέντρηση στα 11200 g (10000 rpm) στους 25 °C για 3 min.
➤ Μεταφορά με πιπέτα 900 μL από το υπερκείμενο σε κυψελίδα
➤ Μέτρηση απορρόφησης στα 530nm

#### Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των TBARS ( $\mu\text{mol/L}$ ) =  $(\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156 \times 31$ , όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100  $\mu\text{L}$ ) με τον όγκο του πλάσματος (100  $\mu\text{L}$ ) ( $3100 / 100 = 31$ ). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης\* της MDA που είναι 156000 ( $\text{mol/L}$ ) διαιρούμενου με  $10^{-6}$  με σκοπό να μετατραπούν τα  $\text{mol/L}$  το  $\mu\text{mol/L}$ .

\* Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 $\text{mol/L}$ .

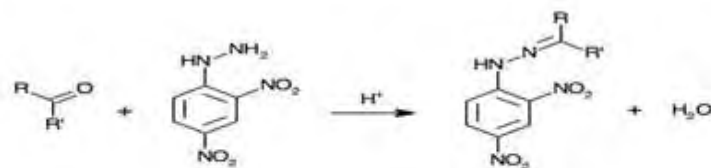
### **2.6.2 Πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB)**

#### Αρχή της μεθόδου

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αποτελούν έναν γενικό και αξιόπιστο δείκτη οξειδωσης πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως, διότι τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων ανιχνεύεται μέσω της αντίδρασης με το DNPH (2,4 – δινιτροφαινυλδραζίνη), για τον σχηματισμό του DNP-hydrazone (2,4 – δινιτροφαινυλδραζονίου).

Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων πραγματοποιήθηκε βάσει της μεθόδου του Patsoukis et al., 2004.





Εικόνα 12: Σύνδεση πρωτεΐνης με το DNPH

### Πειραματικό πρωτόκολλο

➤ Προσθήκη 50 $\mu\text{L}$ 20% TCA σε eppendorfs σε 50 $\mu\text{L}$ πλάσματος
➤ Ανάδευση
➤ Επώαση στον πάγο για 15 min και φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4 $^{\circ}\text{C}$ .
➤ Απομάκρυνση υπερκείμενου
➤ Προσθήκη στο ιζήμα 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά
➤ Διάλυση ιζήματος με την πιπέτα, ανάδευση και επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση κάθε 15 min
➤ Φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 $^{\circ}\text{C}$ .
➤ Απομάκρυνση υπερκείμενου
➤ Προσθήκη 1 mL από το 10% TCA, ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 $^{\circ}\text{C}$
➤ Απομάκρυνση υπερκείμενου
➤ Προσθήκη 0.5 mL αθανόλης και 0.5 mL οξικού αιθυλεστέρα, ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 $^{\circ}\text{C}$
➤ Επανάληψη των δυο τελευταίων βημάτων άλλες δύο φορές
➤ Απομάκρυνση υπερκείμενου
➤ Προσθήκη 1 mL 5 M ουρία (pH 2.3), ανάδευση και επώαση στους 37 $^{\circ}\text{C}$ για 15 min
➤ Φυγοκέντρηση στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4 $^{\circ}\text{C}$
➤ Μεταφορά με την πιπέτα 900 $\mu\text{L}$ σε μία κυψελίδα
➤ Μέτρηση απορρόφησης στα 375nm

### Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων ( $\text{nmol/mL}$ ) =  $A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000/50$ . Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι  $22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Το  $1000/50$  είναι ο συντελεστής αραιώσεως ( $1000 \mu\text{L}$  στην κυψελίδα /  $50 \mu\text{L}$  δείγματος). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανά πρωτεΐνη πλάσματος μπορεί να γίνει μέσω της εξίσωσης:  
 Συγκ. πρωτ. καρβ. ( $\text{nmol/mg}$ ) = συγκ. πρωτ. καρβ.  $\text{nmol/mL}$  / συγκ. πρωτ  $\text{mg/mL}$   
 Συγκέντρωση πρωτεϊνών =  $70 \text{ mg/mL}$

### 2.6.3 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Η TAC βασίζεται στα συστατικά του πλάσματος και στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες, με το καθένα από αυτά να έχει αντιοξειδωτική δράση, με διαφορετική συνεισφορά στην TAC.

Η ποσοτικοποίηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος πραγματοποιείται με δύο τρόπους. Ο πρώτος αποτελεί το συνολικό άθροισμα της αντιοξειδωτικής ικανότητας του κάθε συστατικού του πλάσματος ξεχωριστά, και ιδιαίτερα επίπονο, εφόσον υπάρχουν αρκετά μόρια που συνεισφέρουν στην αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος. Ένω ο δεύτερος περιλαμβάνει την μέτρηση της TAC ως συνόλου.

#### Αρχή της μεθόδου

Η TAC του πλάσματος μετρήθηκε με τη χρήση του DPPH (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδραζύλο ρίζα). Με την παρουσία ενός δότη υδρογόνων του πλάσματος, η ρίζα DPPH<sup>•</sup> ανάγεται και σχηματίζεται η αντίστοιχη υδραζίνης (1,1-διφαινυλο-2-πικρυλοϋδραζίνης). Η μετατροπή της ρίζας υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 520 nm. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο πρωτόκολλο των Janaszewska & Bartosz, 2002.

#### Πειραματικό πρωτόκολλο

Για το τυφλό:
➤ 500μL Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4
➤ 500μL DPPH 0.1 mM
Για το δείγμα:
➤ 480μL Phosphate buffer 10 mM, pH 7.4
➤ 20μL πλάσμα
➤ 500μL DPPH 0.1 mM
➤ Ανακίνηση Eppendorfs μερικές φορές και επώαση στο σκοτάδι για 60 λεπτά.
➤ Φυγοκέντριση για 3 λεπτά στα 20000 g στους 25 °C
➤ Μεταφορά 900 μL από το υπερκείμενο με πιπέτα σε πλαστική κυβελίδα
➤ Μέτρηση απορρόφησης στα 520nm (μηδενισμός με αέρα)



### Υπολογισμοί

Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν ως:

i) % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό, πχ, % Abs μείωση =  $(Abs \text{ τυφλού} - Abs \text{ δείγματος}) / Abs \text{ τυφλού} \times 100$

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

α) Διαρούμε με το 100 με σκοπό να μετατρέψουμε την ποσοστιαία μείωση της απορρόφησης σε απλή μείωση της απορρόφησης.

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50  $\mu\text{mol/L}$  της κυψελίδας.

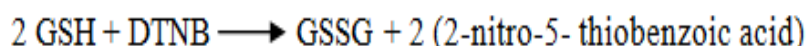
γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η αραίωση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 50-πλάσια (1000  $\mu\text{L}$  στην κυψελίδα / 20  $\mu\text{L}$  πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 50).

δ) Διαρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του πλάσματος σε mL ορού.

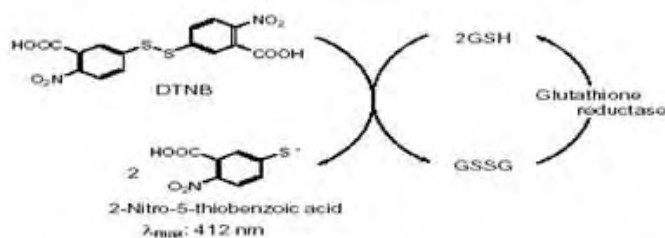
### 2.6.4 Ανηγμένη γλουταθειόνη σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα (GSH)

#### Αρχή της μεθόδου

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο είναι βασισμένο στην οξείδωση της GSH από το διθειοδου νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) και μετριέται σε αιμόλυμα. Η GSH αντιδρά με το DTNB παράγοντας GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ, ένα έγχρωμο προϊόν που απορροφά στα 412 nm. Ο προσδιορισμός της GSH βασίζεται στο πειραματικό πρωτόκολλο των Reddy et al., 2004.



Η GSH παράγεται από την GSSG μέσω της δράσης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.



Εικόνα 13: Ανακύκλωση και αρχή προσδιορισμού της γλουταθειόνης

### ***Καθαρισμός αιμολύματος για τον προσδιορισμό της ανηγμένης γλουταθειόνης***

➤ Προσθήκη 500 μL αιμολύματος σε 500 μL 5% TCA σε eppendorf
➤ Ανάδευση σε vortex
➤ Φυγοκέντρωση στα 28620 g (16000 rpm) για 5 min στους 5 °C
➤ Συλλογή υπερκείμενου σε νέα eppendorf και προσθήκη 5% TCA με την εξής αναλογία: 300 μL αιμολύματος / 90 μL 5% TCA ή 260 μL αιμολύματος / 60 μL 5% TCA
➤ Ανάδευση σε vortex
➤ Φυγοκέντρωση στα 28620 g (16000 rpm) για 5 min στους 5 °C.
➤ Μεταφορά 100 μL του καθαρού υπερκειμένου σε eppendorf
➤ Διατήρηση στους -20 °C

### ***Πειραματικό πρωτόκολλο***

Προθέτουμε τις παρακάτω ποσότητες σε Eppendorfs:
Για το τυφλό:
➤ 660 μL Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95
➤ 330 μL DTNB 1 mM
➤ 20 μL Απεσταγμένο νερό
Για το δείγμα:
➤ 660 μL Phosphate buffer 67 mM, pH 7.95
➤ 330 μL DTNB 1 mM
➤ 20 μL Αιμόλυμα
➤ Ανάδευση των eppendorfs και επώαση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά.
➤ Μεταφορά του περιεχομένου τους σε κυψελίδα
➤ Μέτρηση απορρόφησης στα 412 nm.

### ***Υπολογισμοί***

Δραστικότητα της GSH (mmol/L) =  $(Abs_{\text{δείγματος}} - \Delta Abs_{\text{τυφλού}} / 13.6) \times 262.6$ , όπου το 262.6 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του αιμολύματος (20 μL) ( $1010 / 20 = 50.5$ ), πολλαπλασιάζοντας με 2 για να συνυπολογίσουμε την 1:1 αραίωση που έγινε για τη

λύση των ερυθροκυττάρων και με  $2 \times 1.3$  για να συνυπολογίσουμε την πρώτη (500  $\mu\text{L}$  αιμολ. / 500  $\mu\text{L}$  5% TCA) και τη δεύτερη αραιώση (390  $\mu\text{L}$  / 300  $\mu\text{L}$  ή 260  $\mu\text{L}$  / 200  $\mu\text{L}$ ) που έγιναν από το TCA 5%. Το 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

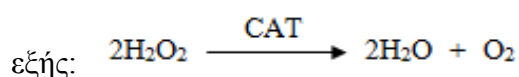
Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης μιας ουσίας ισούται με την απορρόφηση της ουσίας αυτής σε συγκέντρωση 1 mol/L.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της GSH εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση της GSH που υπολογίστηκε προηγουμένως (mmol/L). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με  $10 \times 2$ , τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων. Συγκέντρωση GSH ανά g αιμοσφαιρίνης, GSH (mmol/ g Hb).

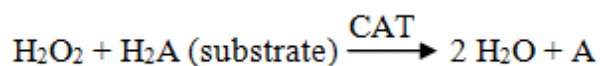
#### 2.6.6 Δραστικότητα της καταλάσης (CAT)

##### Αρχή της μεθόδου

Η CAT πραγματοποιεί τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) σε νερό και οξυγόνο. Ιδανικό pH είναι το ουδέτερο και η αντίδραση διάσπασης είναι η



Επιπλέον, χρησιμοποιεί το  $\text{H}_2\text{O}_2$  για απομάκρυνση τοξικών ουσιών ( $\text{H}_2\text{A}$ ) με τη χρήση υποστρώματος (αιθανόλη), όπως φαίνεται στην ακόλουθη αντίδραση



Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της CAT βασίζεται στο πειραματικό πρωτόκολλο του Aebi, 1984).

### Πειραματικό πρωτόκολλο

Σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες για το δείγμα:
➤ 2991 $\mu\text{L}$ Phosphate buffer 67 mM, pH 7.4
➤ 4 $\mu\text{L}$ Αιμόλυμα αραιωμένο 1/10
➤ Ανάδευση στο vortex και επώαση στον κλίβανο στους 37 °C για 10 λεπτά.
➤ Μεταφορά το περιεχόμενο σε κυψελίδα χαλαζία για μέτρηση στο υπεριώδες (UV).
➤ Προσθήκη 5 $\mu\text{L}$ 30% $\text{H}_2\text{O}_2$ στην κυψελίδα, ανακίνηση τρεις φορές χρησιμοποιώντας παραφύλμ στην κορυφή της
➤ Μέτρηση απορρόφησης στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα

### Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg Hb) =  $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample per min}} / 40) \times (750 \times 1000 \times 10 \times 2) / \text{Conc. Hb (mg/mL)}$ .

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε  $\mu\text{mol/mL}$ . Το 750 είναι ο παράγοντας αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000  $\mu\text{L}$ ) με τον όγκο του αιμόλυματος (4  $\mu\text{L}$ ) ( $3000 / 4 = 750$ ), το 10 προκύπτει από την 1:10 αραιώση του δείγματος και το 2 από την 1:1 λύση των ερυθροκυττάρων.

Ο υπολογισμός της δραστικότητας της καταλάσης εκφράζεται ως προς την αιμοσφαιρίνη. Η αιμοσφαιρίνη υπολογίζεται με τη βοήθεια ενός kit και πρέπει να εκφραστεί σε g/L ώστε η μονάδα αυτή να είναι σε συμφωνία με τη συγκέντρωση των TBARS που υπολογίστηκε προηγουμένως ( $\mu\text{mol/L}$ ). Έτσι, μετά τη φωτομέτρηση η τιμή της αιμοσφαιρίνης υπολογίζεται σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας την τιμή αυτή με  $10 \times 2$ , τη μετατρέπουμε σε g/L και ταυτόχρονα λαμβάνουμε υπόψη την 1:1 αραιώση κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων.

$\Delta \text{ Abs (min)}$  = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  στην κυψελίδα είναι 16 mM.

U =  $\mu\text{mol/min}$ . Το  $\Delta \text{ Abs}_{\text{blank}}$  είναι πάντα μηδέν, για αυτό δεν χρειάζεται να μετρήσουμε το τυφλό.

## 2.7 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της one-way ANOVA και ακολούθησαν το Dunnett's test για πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη. Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο  $P < 0,05$ . Για τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS, version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

## 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 3.1. Αξιολόγηση μυϊκού πόνου και μυϊκής βλάβης

Με βάση την αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου όπου υποβλήθηκαν οι εθελοντές, αυτός ο δείκτης μετά την άσκηση αυξήθηκε από 3,94 φορές έως 4,66 φορές στο βάδισμα και από 3,46 φορές έως 5,16 φορές στο κάθισμα. Ακόμα, ο μέγιστος μυϊκός πόνος παρατηρήθηκε και στις δύο δοκιμασίες, 48 ώρες μετά την πραγματοποίηση την έκκεντρης άσκησης, ενώ από τις 72 ώρες και μετά οι τιμές αρχίζουν να επανέρχονται, αποδεικνύοντας πως προκλήθηκε μυϊκή βλάβη στους εθελοντές. Αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων γίνεται στον πίνακα 1, όπου δίνονται οι μέσες τιμές  $\pm$  SEM.

	Πριν	Αμέσως μετά	24ώρες μετά	48ώρες μετά	72ώρες μετά
<b>DOMS Περπάτημα</b>	1,00 $\pm$ 0,00	3,94 $\pm$ 0,47	3,88 $\pm$ 0,44	4,66 $\pm$ 0,48	4,01 $\pm$ 0,41
<b>DOMS Κάθισμα</b>	1,00 $\pm$ 0,00	3,44 $\pm$ 0,35	4,94 $\pm$ 0,47	5,16 $\pm$ 0,46	3,64 $\pm$ 0,48

*Πίνακας 1: Αξιολόγηση DOMS μετά την έκκεντρη άσκηση.*

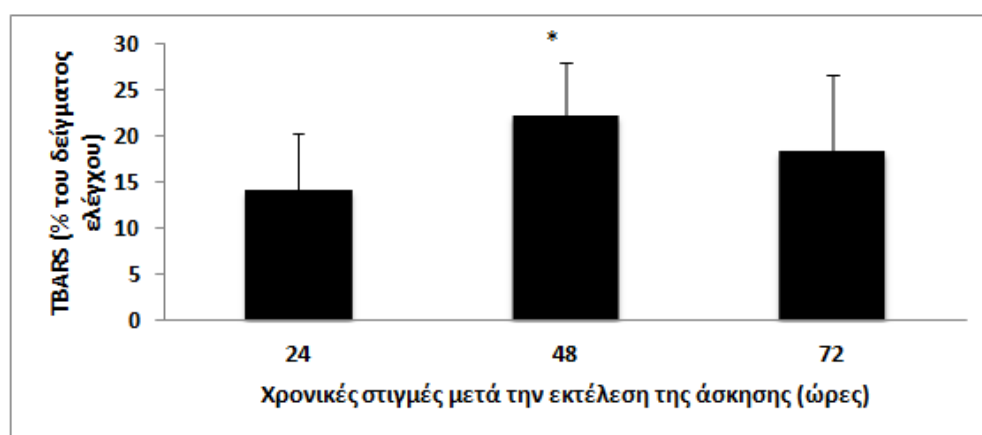
### 3.2. Δείκτες Οξειδωτικού στρες

Στα διαγράμματα που ακολουθούν πραγματοποιείται αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της μελέτης των επί τοις εκατό μεταβολών στους δείκτες οξειδωτικού στρες μετά την πραγματοποίηση της έκκεντρης άσκησης. Στη μελέτη συμμετείχαν 22 εθελοντές, 12 από τους οποίους είχαν επαφή με κάποιου είδους αθλητικής δραστηριότητας και χαρακτηρίζονται ως “αθλούμενοι”, ενώ οι υπόλοιποι 10 δεν πραγματοποιούσαν κανένα είδος άθλησης και αναφέρονται ως “μη

αθλούμενοι”. Οι εθελοντές 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). Ακόμα, τα διαγράμματα συνοδεύονται από τους αντίστοιχους πίνακες, όπου παραθέτονται τα επί τοις εκατό ποσοστά μεταβολής του κάθε δείκτη στις διάφορες χρονικές στιγμές μετά την άσκηση σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (χρησιμοποιείται ως control).

### ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΑΝΤΙΑΡΟΥΝ ΜΕ ΤΟ ΘΕΙΟΒΑΡΒΙΤΟΥΡΙΚΟ ΟΞΥ (TBARS)

Όσον αφορά το δείκτη TBARS, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στις 48 ώρες μετά την άσκηση κατά 22,15% όπως απεικονίζεται στο διάγραμμα 1, αλλά και αναλυτικότερα στον πίνακα 2.



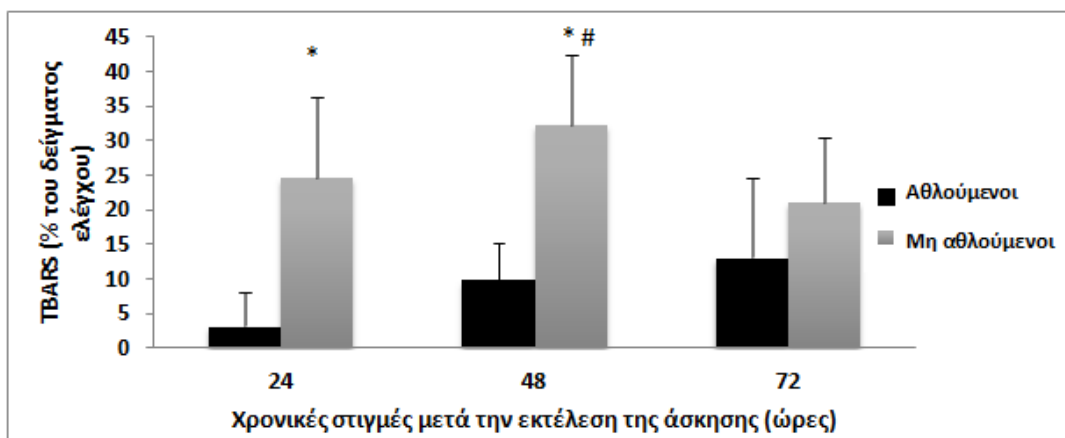
Διάγραμμα 1: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη TBARS στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

(\* ) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

	% μεταβολή 24 ώρες μετά	% μεταβολή 48 ώρες μετά	% μεταβολή 72 ώρες μετά
<b>TBARS (μmol/L)</b>	14,06 ± 6,32	22,15 ± 5,73	18,26 ± 8,29

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

Μετά τον διαχωρισμό σε αθλούμενους και μη αθλούμενους, λήφθηκε η ακόλουθη εικόνα:



Διάγραμμα 2: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη TBARS στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, σε αθλούμενους και μη αθλούμενους.

(\*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα ελέγχου

(#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες

	% μεταβολή 24 ώρες μετά	% μεταβολή 48 ώρες μετά	% μεταβολή 72 ώρες μετά
<b>αθλούμενοι</b>	3,10 ± 3,88	9,75 ± 4,95	13,03 ± 10,66
<b>μη αθλούμενοι</b>	24,61 ± 11,80	32,33 ± 10,11	21,06 ± 9,46

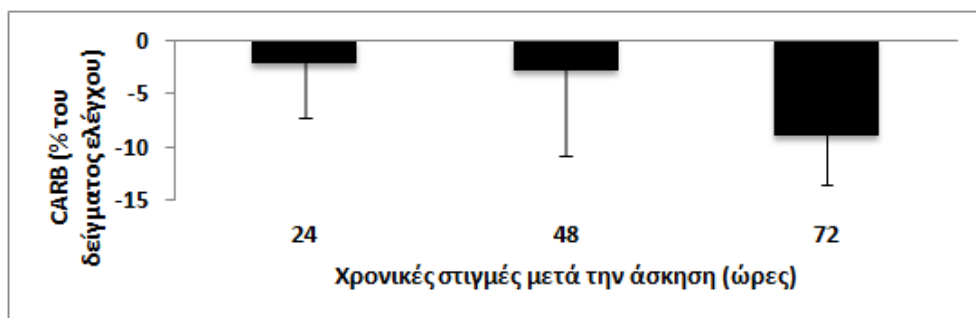
Πίνακας 3: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη TBARS (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

Παρατηρείται ότι και στις 2 ομάδες προκλήθηκε αύξηση του δείκτη TBARS μετά την άσκηση. Στην ομάδα των μη-αθλούμενων σημειώθηκε σημαντική αύξηση στις 24 και 48 ώρες κατά 24,61 και 32,33 % σε σχέση με το δείγμα ελέγχου αντίστοιχα (διάγραμμα 2, πίνακας 3). Επίσης, στις 48 ώρες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων με τους μη-αθλούμενους να έχουν υψηλότερα επίπεδα TBARS.

## ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΑ

Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά σε καμία χρονική στιγμή σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (διάγραμμα 3, πίνακας 4).



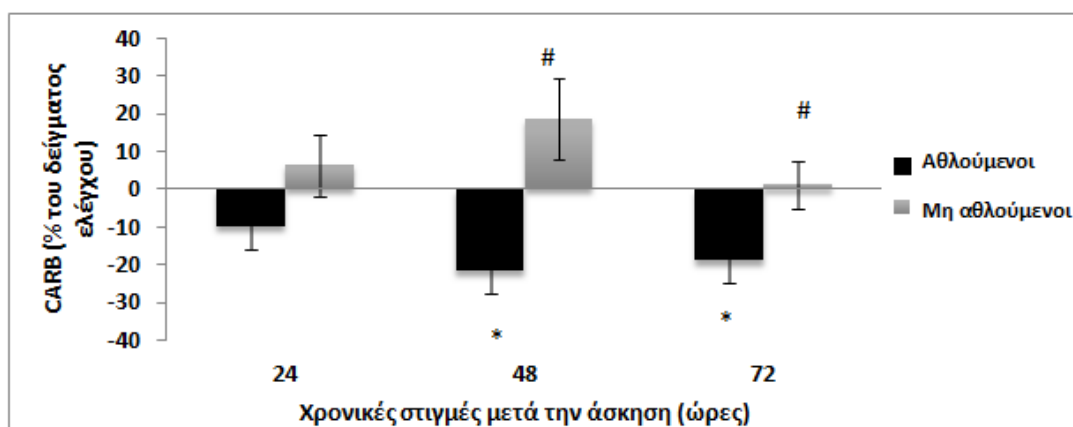


Διάγραμμα 3: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη CARB στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

	% μεταβολή 24 ώρες μετά	% μεταβολή 48 ώρες μετά	% μεταβολή 72 ώρες μετά
<b>CARB</b>	-2,21 ± 5,06	-2,83 ± 7,87	-8,94 ± 4,57

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

Μετά τον διαχωρισμό σε αθλούμενους και μη αθλούμενους, λήφθηκε η ακόλουθη εικόνα:



Διάγραμμα 4: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη CARB στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα *pre*, σε αθλούμενους και μη αθλούμενους.

(#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες

(\*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα ελέγχου



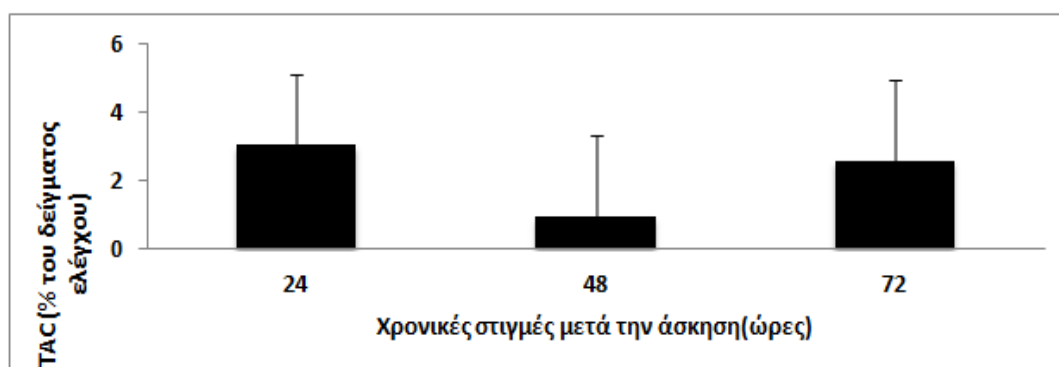
	% μεταβολή 24 ώρες μετά	% μεταβολή 48 ώρες μετά	% μεταβολή 72 ώρες μετά
<b>αθλούμενοι</b>	-9,94 ± 5,89	-21,68 ± 6,13	-19,08 ± 5,71
<b>μη αθλούμενοι</b>	6,29 ± 8,20	18,69 ± 10,95	1,21 ± 6,39

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

Παρατηρούμε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων στις 48 και 72 ώρες σε σχέση με το δείγμα ελέγχου κατά 21,68% και 19,08%, αντίστοιχα. Επίσης, στις ίδιες χρονικές στιγμές παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις ομάδες των αθλούμενων και των μη-αθλούμενων (διάγραμμα 4 και πίνακας 5).

#### **ΟΛΙΚΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ (TAC)**

Στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές συγκριτικά με το δείγμα ελέγχου όταν οι συμμετέχοντες εξετάστηκαν ως ενιαία ομάδα (διάγραμμα 5 και πίνακας 6).

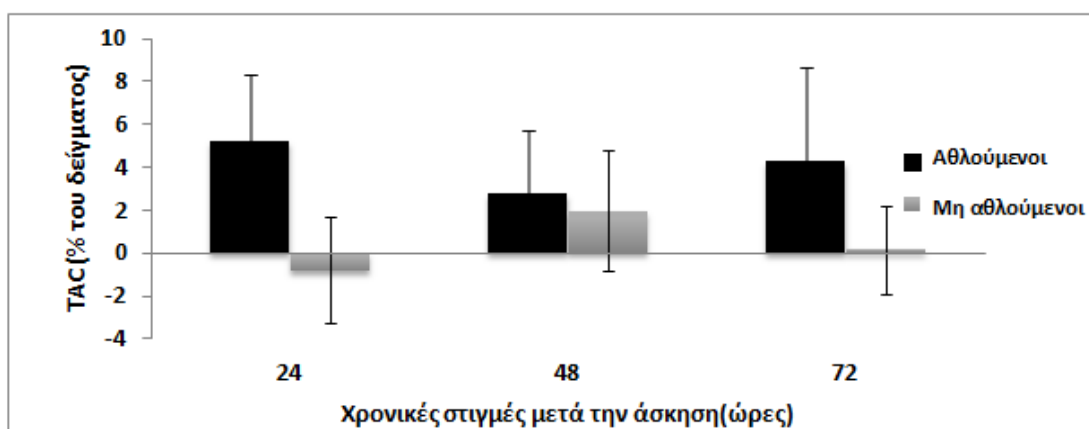


*Διάγραμμα 5: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη TAC στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.*

	% μεταβολή 24 ώρες μετά	% μεταβολή 48 ώρες μετά	% μεταβολή 72 ώρες μετά
<b>TAC</b>	3,03 ± 2,07	0,94 ± 2,37	2,57 ± 2,37

Πίνακας 6: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη TAC (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

Παρομοίως. Μετά το διαχωρισμό στις ομάδες των αθλούμενων και μη-αθλούμενων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές:



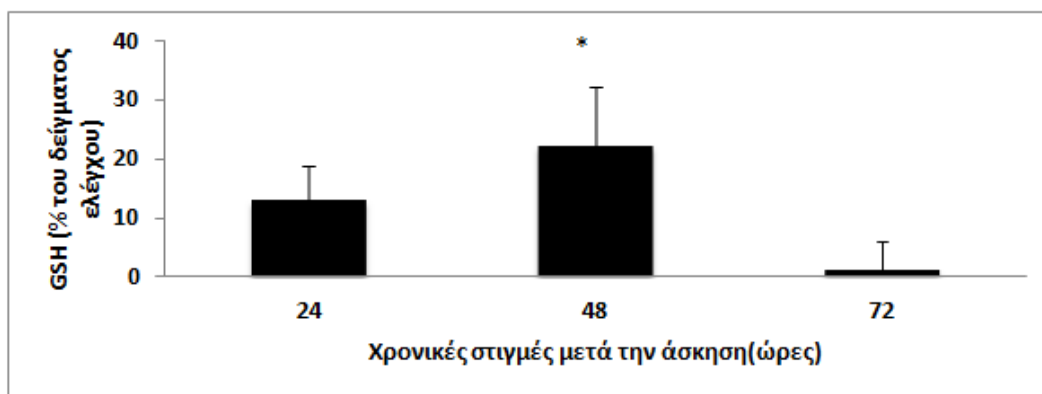
Διάγραμμα 6: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη TAC στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, σε αθλούμενους και μη αθλούμενους.

	% μεταβολή 24 ώρες μετά	% μεταβολή 48 ώρες μετά	% μεταβολή 72 ώρες μετά
<b>αθλούμενοι</b>	5,22 ± 3,13	2,77 ± 2,92	4,27 ± 4,39
<b>μη αθλούμενοι</b>	-0,79 ± 2,48	1,96 ± 2,81	0,15 ± 2,05

Πίνακας 7: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη TAC (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

## ΕΠΙΠΕΔΑ ΑΝΗΓΜΕΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ

Όσον αφορά τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στις 48 ώρες σε σχέση με το δείγμα ελέγχου κατά 22,14% (πίνακας 8).



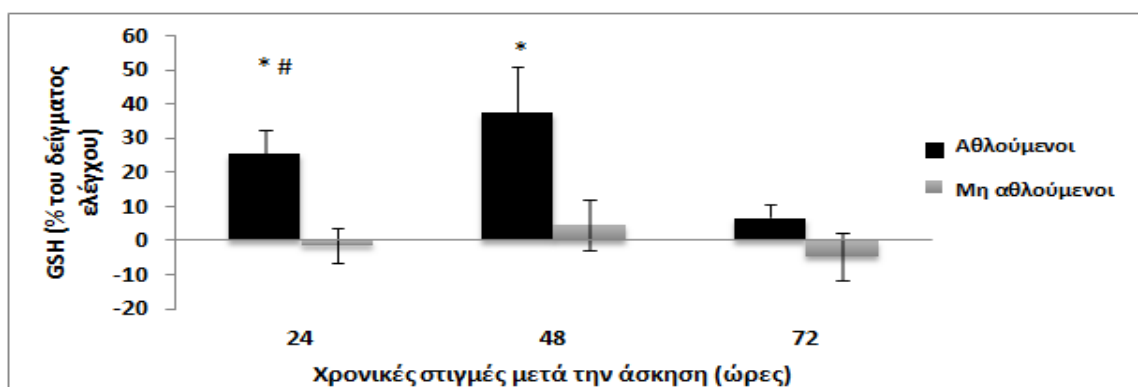
Διάγραμμα 7: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη GSH στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

(\*): στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

	% μεταβολή 24 ώρες μετά	% μεταβολή 48 ώρες μετά	% μεταβολή 72 ώρες μετά
<b>GSH</b>	12,89± 6,06	22,14 ± 10,04	1,10 ± 5,02

Πίνακας 8: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη GSH (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

Μετά το διαχωρισμό σε αθλούμενους και μη-αθλούμενους η εικόνα που λήφθηκε αντικατοπτρίζει πλήρως τα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα οι αθλούμενοι παρουσίασαν πολύ μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων GSH σε σχέση με τους μη αθλούμενους, μια διαφορά που χαρακτηρίζεται σημαντική στις 24 ώρες. Ταυτόχρονα τα επίπεδα GSH για τους αθλούμενους ήταν σημαντικά αυξημένα στις 24 και 48 ώρες μετά την άσκηση κατά 25,60% και 37,53%.



Διάγραμμα 8: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη GSH στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, σε αθλούμενους και μη αθλούμενους.

(\*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα ελέγχου

(#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες

	% μεταβολή 24 ώρες μετά	% μεταβολή 48 ώρες μετά	% μεταβολή 72 ώρες μετά
<b>αθλούμενοι</b>	25,60 ± 7,01	37,53 ± 13,25	6,69 ± 4,13
<b>μη αθλούμενοι</b>	-1,40 ± 5,16	4,51 ± 7,41	-4,64 ± 6,81

Πίνακας 9: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη GSH (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

Στο διάγραμμα 8 γίνεται διακριτή η διαφορά στην απόκριση στην άσκηση μεταξύ των αθλούμενων και των μη αθλούμενων. Συγκεκριμένα, στις 48 ώρες μετά την άσκηση υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των μεταβολών τους αφού οι αθλούμενοι εμφάνισαν αύξηση κατά 37,53% και οι μη-αθλούμενη κατά 4,51%. Ωστόσο, και στις υπόλοιπες χρονικές στιγμές (24 και 48 ώρες) ενώ οι αθλούμενοι παρουσίασαν αύξηση, οι μη-αθλούμενοι παρουσίασαν μείωση των επιπέδων GSH (πίνακας 9).

## ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΖΥΜΟΥ ΚΑΤΑΛΑΣΗΣ

Στην μελέτη της δραστηριότητας της καταλάσης δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μετά την εξέταση των συμμετεχόντων σαν ενιαία ομάδα καθώς και μετά το διαχωρισμό. Τα στοιχεία αυτά είναι εμφανή στα παρακάτω διαγράμματα και πίνακες.

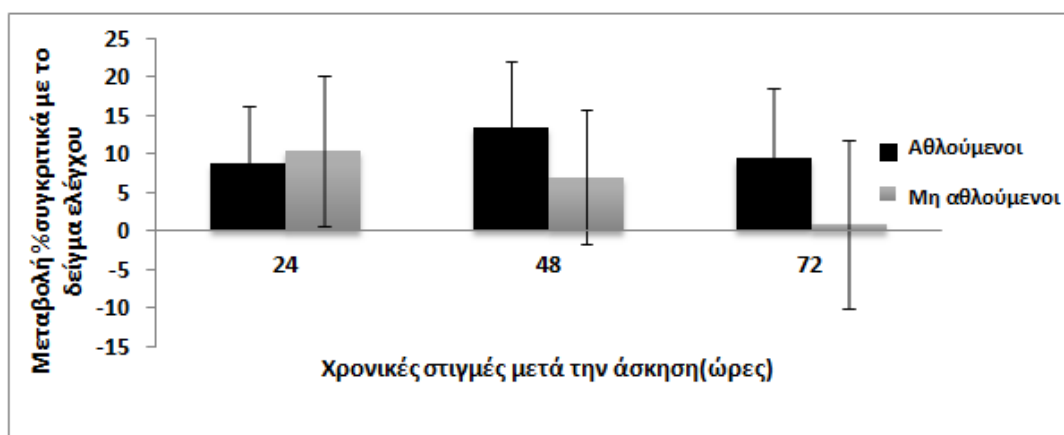


Διάγραμμα 9: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη CAT στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

	% μεταβολή 24 ώρες μετά	% μεταβολή 48 ώρες μετά	% μεταβολή 72 ώρες μετά
CAT (U/mg Hb)	9,49 ± 5,21	10,35 ± 5,25	5,11 ± 6,11

Πίνακας 10: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη CAT (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

Μετά τον διαχωρισμό λήφθηκαν τα ακόλουθα αποτελέσματα:



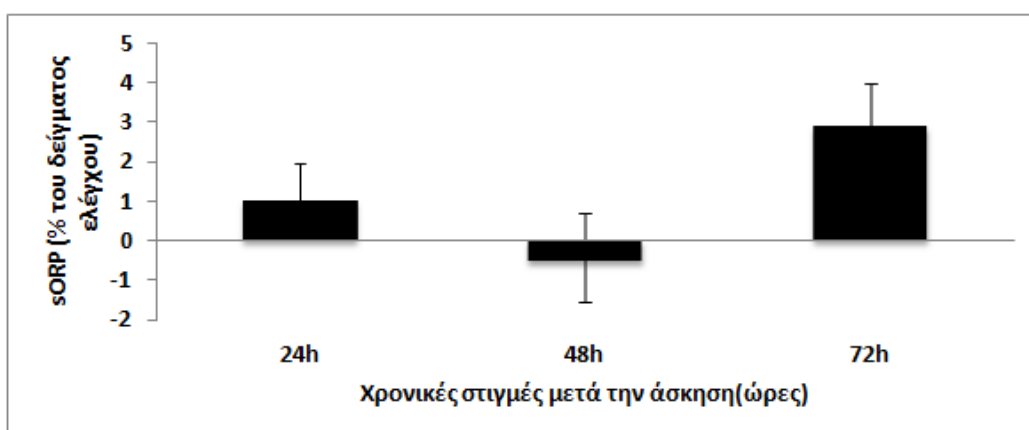
Διάγραμμα 10: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη CAT στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου μετά από διαχωρισμό

	% μεταβολή 24 ώρες μετά	% μεταβολή 48 ώρες μετά	% μεταβολή 72 ώρες μετά
<b>αθλούμενοι</b>	8,64 ± 7,69	13,39 ± 8,79	9,29 ± 8,21
<b>μη αθλούμενοι</b>	10,41 ± 9,72	7,00 ± 7,54	0,93 ± 8,88

Πίνακας 11: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη CAT (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

### Static ORP (sORP)

Στο δείκτη στατικού οξειδοαναγωγικού δυναμικού (sORP), δεν παρατηρούμε στατιστικά σημαντικές μεταβολές σε καμία από τις χρονικές στιγμές μετά την άσκηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όταν οι εθελοντές εξετάστηκαν ως σύνολο (διάγραμμα 11 και πίνακας 12).

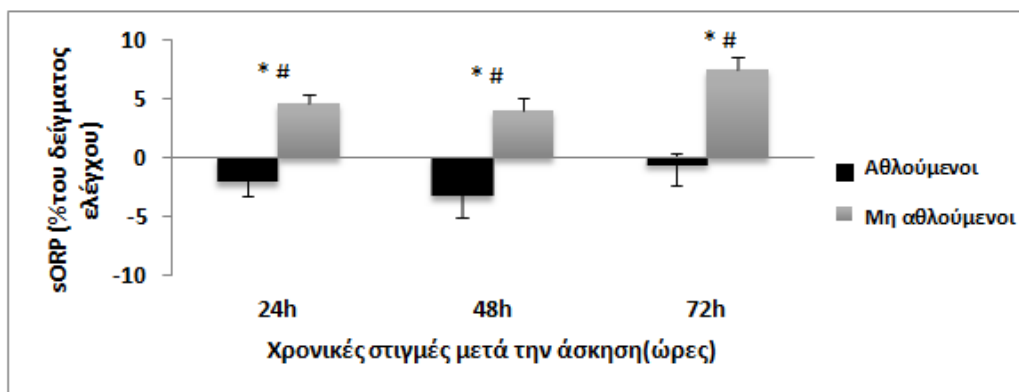


Διάγραμμα 11: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη sORP στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

	% μεταβολή 24 ώρες μετά	% μεταβολή 48 ώρες μετά	% μεταβολή 72 ώρες μετά
<b>sORP</b>	1,01 ± 0,93	-0,53 ± 1,21	2,86 ± 1,09

Πίνακας 12: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη sORP (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

Όμως μετά τον διαχωρισμό σε αθλούμενους και μη αθλούμενους, λήφθηκε η ακόλουθη εικόνα:



Διάγραμμα 12: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη sORP στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου μετά από διαχωρισμό.

(\*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα ελέγχου

(#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες

	% μεταβολή 24 ώρες μετά	% μεταβολή 48 ώρες μετά	% μεταβολή 72 ώρες μετά
αθλούμενοι	-2,11 ± 0,79	-3,31 ± 1,11	-0,64 ± 1,14
μη αθλούμενοι	4,65 ± 1,12	4,00 ± 1,64	7,45 ± 1,67

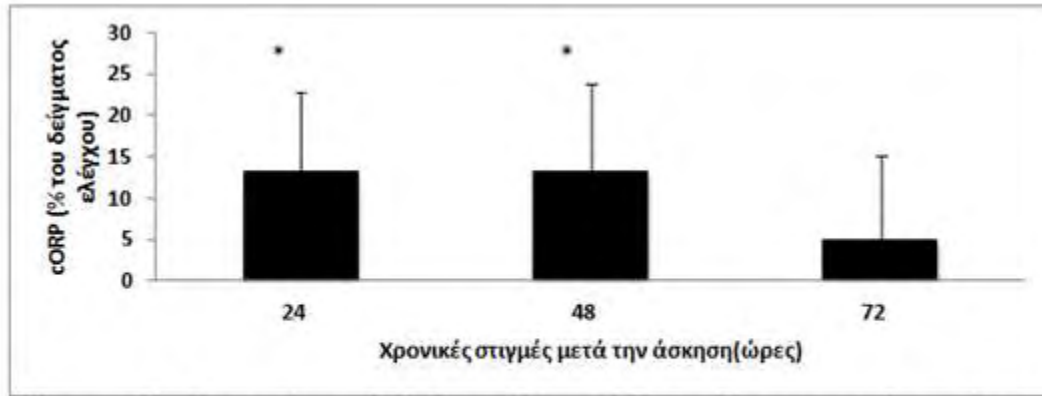
Πίνακας 13: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη sORP (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

Σημειώθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ και των τριών χρονικών στιγμών μετά την άσκηση μεταξύ των δύο ομάδων, με τους μη αθλούμενους να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση σε σχέση με το δείγμα ελέγχου στις 24, 48 και 72 ώρες κατά 4,65%, 4,00% και 7,45% αντίστοιχα (διάγραμμα 12, πίνακας 13).

### Capacity ORP (cORP)

Στο δείκτη cORP παρατηρούνται σημαντικές αυξήσεις των επιπέδων κατά 13,21% και 13,19% στις 24 και 48 ώρες αντίστοιχα. (διάγραμμα 13, πίνακας 14).





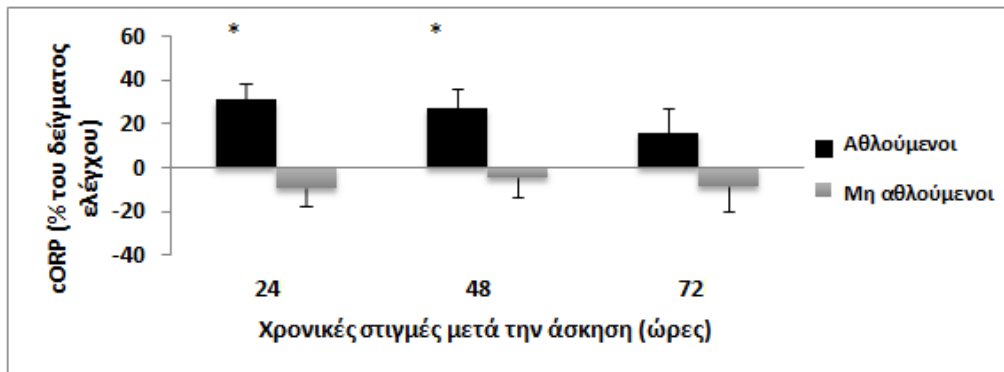
Διάγραμμα 13: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη cORP στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

(\*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα ελέγχου

	% μεταβολή 24 ώρες μετά	% μεταβολή 48 ώρες μετά	% μεταβολή 72 ώρες μετά
cORP	13,21 ± 9,55	13,19 ± 10,69	4,99 ± 10,09

Πίνακας 14: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη cORP (μέση τιμή ± SEM) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.

Μετά τον διαχωρισμό σε αθλούμενους και μη αθλούμενους, λήφθηκε η ακόλουθη εικόνα:



Διάγραμμα 14: Ποσοστιαία μεταβολή (%) του δείκτη cORP στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με το δείγμα ελέγχου μετά από διαχωρισμό.

(\*) στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το δείγμα ελέγχου

(#) στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες

	<b>% μεταβολή 24 ώρες μετά</b>	<b>% μεταβολή 48 ώρες μετά</b>	<b>% μεταβολή 72 ώρες μετά</b>
<b>αθλούμενοι</b>	30,59± 7,02	27,15 ± 7,55	15,84 ± 9,18
<b>μη αθλούμενοι</b>	-9,31 ± 7,41	-4,87 ± 8,11	-8,57 ± 11,28

*Πίνακας 15: Ποσοστό μεταβολής % του δείκτη cORP (μέση τιμή ± SEM) αθλούμενων και μη σε σχέση με το δείγμα ελέγχου.*

Παρατηρούμε ότι οι αθλούμενοι στις 24 και 48 ώρες μετά την άσκηση παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση του cORP σε σχέση με το δείγμα ελέγχου σε ποσοστά 30,59% και 27,15 %, αντίστοιχα. Παράλληλα τις ίδιες χρονικές στιγμές τα επίπεδα των μη-αθλούμενων μειώνονται και παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δυο ομάδες υποδηλώνοντας ένα εντονότερο αναγωγικό περιβάλλον στους μη-αθλούμενους μετά την έκκεντρη άσκηση (διάγραμμα 14, πίνακας 15).

#### 4. Συζήτηση

Υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη άσκησης με την κάθε μορφή άσκησης να ακολουθείται από διαφορετικές μυϊκές συσπάσεις. Οι συσπάσεις αυτές διαχωρίζονται σε ισομετρικές, ομόκεντρες και έκκεντρες και συμπεριλαμβάνονται σε όλες σχεδόν τις μορφές άσκησης (Jamurtas et al., 2012). Πιο συγκεκριμένα, η έκκεντρη συστολή συμβαίνει όταν ο μυς επιμηκύνεται προσπαθώντας να υπερνικήσει μια εξωτερική αντίσταση. Αξιοσημείωτο είναι ότι στην έκκεντρη άσκηση παρατηρείται η μεγαλύτερη μυϊκή καταστροφή και φλεγμονή που διαφέρει από άτομο σε άτομο (Jamurtas et al., 2012).

Οι ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται από διάφορες πηγές μετά την άσκηση (Powers et al., 2008). Κατά τη διάρκεια της μυϊκής συστολής παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση του οξυγόνου, η μεγαλύτερη ποσότητα του οποίου χρησιμοποιείται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (ETC) και ανάγεται σε νερό (Barbieri et al., 2012; Vasilaki et al., 2013), όμως εκτιμάται ότι περίπου 0,1-1% του οξυγόνου μετατρέπεται σε  $O_2^-$  (Sakellariou et al., 2014).

Παρά το γεγονός ότι η έκκεντρη άσκηση σχετίζεται με μεγάλη μυϊκή καταστροφή, πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι τα άτομα εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στο οξειδοαναγωγικό τους προφίλ μετά την πραγματοποίηση τέτοιου είδους άσκησης (Brentano et al., 2011; Stagos et al., 2015). Έρευνες επικεντρώνονται στις προσαρμογές που αναπτύσσουν άνθρωποι που ασκούνται τακτικά (Steinbacher et al., 2015; Radak et al., 2001; Hedayatpour et al., 2015), οδηγώντας στο σχεδιασμό της συγκεκριμένης μελέτης. Αρχικός στόχος ήταν η εξέταση των οξειδωτικών βλαβών που προκλήθηκαν από την προκληθείσα αντίδραση φλεγμονής μετά την άσκηση και στη συνέχεια η σύγκριση της προόδου της αποθεραπείας μεταξύ αθλούμενων και μη αθλούμενων ατόμων.

Αρχικά, εκτιμήθηκε ο μυϊκός πόνος, καθώς στην έκκεντρη άσκηση παρατηρείται η μεγαλύτερη καθυστέρηση στην εκδήλωση του μυϊκού πόνου (Delayed Onset Muscle Soreness-DOMS) (Jamurtas et al., 2012). Τα DOMS αποτελούν το βασικό αίτιο μειωμένης απόδοσης κατά την εκτέλεση της άσκησης, συμπεριλαμβανομένης της μυϊκής δύναμης και της εμβέλειας κίνησης ανεξάρτητα από το αθλητικό ιστορικό (Mckune et al., 2012; Serinken et al., 2013). Στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα των DOMS στους «αθλούμενους» κυμάνθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα από εκείνα των «μη-αθλούμενων», όπως αυτά φαίνονται στον πίνακα 1. Σημειώνεται ότι ο

μεγαλύτερος μυϊκός πόνος παρατηρήθηκε στις 48 ώρες μετά την έκκεντρη άσκηση και στις δύο ομάδες (πίνακας 1), κάτι που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία, καθώς αναφέρεται ότι η κορύφωση του πόνου σημειώνεται 24-48 ώρες μετά την άσκηση (Hilbert et al., 2003). Η αύξηση στο DOMS δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή, ωστόσο οφείλεται συνολικά στις βιοχημικές αλλαγές που προκύπτουν μετά τη μυϊκή βλάβη και όχι σε κάποιο μεμονωμένο βιολογικό γεγονός (Kim et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα, ο τραυματισμός του μυός προκαλεί φλεγμονώδη απόκριση, μια παθοφυσιολογική κατάσταση, αλλάζοντας την ομοιόσταση του κυττάρου, στοχεύοντας στην αποκατάσταση του μυός (Fatouros et al., 2010).

Έπειτα επικεντρωθήκαμε στον προσδιορισμό δεικτών οξειδοαναγωγής παραγόμενων μετά από έκθεση των βιομορίων σε ROS. Ξεκινώντας με την υπεροξειδωση λιπιδίων την οποία μετρούμε από τον σχηματισμό συμπλόκου μαλονοαλδεΐδης με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) παρατηρήθηκαν μεταβολές στο σύνολο των ατόμων στις 48 ώρες μετά την άσκηση και ειδικότερα αύξηση κατά 22,15% (διάγραμμα 1, πίνακας 2) αλλά και μεταξύ των εξεταζόμενων υπόομάδων και στις 24 και 48 ώρες. Αναλυτικότερα, στην κατηγορία των μη-αθλούμενων σημειώθηκε σημαντική αύξηση 24 και 48 ώρες κατά 24,61% και 32,33% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, αντίστοιχα (διάγραμμα 2, πίνακας 3) και στις 48 ώρες παρατηρήθηκε σημαντικά στατιστική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες, με τους μη-αθλούμενους να έχουν υψηλότερα επίπεδα TBARS. Τα δεδομένα αυτά είναι ενδεικτικά του έντονου οξειδωτικού περιβάλλοντος στους μύες όλων των συμμετεχόντων μετά από έκκεντρη άσκηση, επιβεβαιώνοντας ότι αυτό το είδος άσκησης αυξάνει την παραγωγή και την συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών. Παλαιότερη μελέτη του εργαστηρίου μας σημείωσε, επίσης, αύξηση των TBARS, μετά από συμμετοχή των εθελοντών σε μαραθώνιο βουνού που περιλαμβάνει έκκεντρα κομμάτια (Stagos et al, 2015). Οι υψηλές συγκεντρώσεις TBARS στο πλάσμα των συμμετεχόντων προκαλούνται από υπεροξειδωση λιπιδίων, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών και από προκαλούμενη βλάβη των κυτταρικών μεμβρανών των μυών από οξυγόνο (Hilbert et al., 2005).

Περνώντας στην καρβονυλίωση πρωτεϊνών (CARB), στο σύνολο των ατόμων δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά σε καμία χρονική στιγμή σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, ωστόσο μετά το διαχωρισμό των ατόμων σε ομάδες παρατηρήθηκε μια αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών από τους αθλούμενους τις ημέρες μετά την άσκηση, κάτι που φαίνεται από τα μειωμένα επίπεδα CARB. Πιο

συγκεκριμένα, παρατηρούμε μια στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων στις 48 και 72 ώρες σε σχέση με το δείγμα ελέγχου κατά 21,68% και 19,08%, αντίστοιχα. Επίσης, στις ίδιες χρονικές στιγμές παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες (διάγραμμα 4, πίνακας 5).

Γενικά, η επαγωγή της οξειδωσης πρωτεϊνών έπειτα από έκκεντρη άσκηση σχετίζεται με εισβολή των φαγοκυττάρων στον κατεστραμμένο ιστό, κάτι που συνήθως συμβαίνει αρκετές ώρες μετά την άσκηση και παράγει σημαντική ποσότητα ROS μέσω πολλαπλών μηχανισμών (Goldfarb et al., 2005). Έτσι, η παραγωγή ROS συνδυαστικά με την αύξηση πρόσληψης οξυγόνου κατά τη διάρκεια της άσκησης οδηγεί σε οξείδωση πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων και θρυμματισμό πολυπεπτιδίων, αφού τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε οξείδωση καταλυόμενη από μέταλλα (Radak et al., 2001).

Όμως, τα αποτελέσματα αυτά δε συμφωνούν πλήρως με δεδομένα προηγούμενης εργασίας του εργαστηρίου μας και μιας άλλης, όπου στην καρβονυλίωση των πρωτεϊνών δεν παρουσιάστηκε σημαντική μεταβολή σε κανένα χρονικό σημείο έπειτα από έκκεντρη άσκηση (Stagos et al., 2015; Margaritelis et al., 2014). Η υπόθεσή μας στηρίχθηκε στην υψηλότερη οξείδωση πρωτεϊνών που παρουσιάστηκε στους "μη-αθλούμενους", καθώς και στη σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, που επηρέασαν τελικά την ανάλυση ολόκληρης της ομάδας. Τα αποτελέσματα αυτά συγκρίθηκαν με μια άλλη εργασία που διεξήχθη από μια Αμερικανική επιστημονική ομάδα, τα αποτελέσματα της οποίας έδειξαν αύξηση των επιπέδων CARB των αθλούμενων γυναικών (μη συνηθισμένων σε άσκηση αντίστασης) μετά από έκκεντρη άσκηση (Goldfarb et al., 2005). Λαμβάνοντας υπόψη ότι στο πείραμά μας η πλειοψηφία των αθλούμενων ήταν συνηθισμένοι στην άσκηση με αντίσταση φαίνεται ότι ο τύπος άσκησης επηρεάζει το εύρος των μυϊκών βλαβών και την επικείμενη καρβονυλίωση των πρωτεϊνών.

Οι υποθέσεις μας ενισχύθηκαν κατόπιν ανάλυσης των δεικτών ORP που μετρήθηκαν με το Διαγνωστικό Σύστημα RedoxSYS. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα sORP σε μη αθλούμενους βρέθηκαν αυξημένα στατιστικά σημαντικά σε όλα τα χρονικά σημεία σε σύγκριση με πριν την άσκηση, αλλά και διαφορετικά σε σύγκριση με τους αθλούμενους, δείχνοντας επαγωγή οξειδωτικού στρες στην ομάδα τους. Αναλυτικότερα, στη συνολική σύγκριση δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, αλλά μετά το διαχωρισμό παρατηρήθηκε σημαντικά στατιστική διαφορά και στις τρεις χρονικές στιγμές μετά

την άσκηση μεταξύ των δύο ομάδων, ενώ οι μη-αθλούμενοι παρουσίασαν σημαντικά στατιστική αύξηση σε σχέση με το δείγμα ελέγχου στις 24, 48 και 72 ώρες κατά 4,65%, 4% και 7,45%, αντίστοιχα (διάγραμμα 12, πίνακας 13). Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου δείχθηκε ότι αυτός ο δείκτης αυξήθηκε και συσχετίστηκε με επαγωγή οξειδωτικού στρες μετά από επίπονη και έντονη άσκηση (Stagos et al., 2015; Spanidis et al., 2017; Stagos et al., 2014).

Η ανάλυση του cORP ήταν σύμφωνη με το sORP, αφού τα αντιοξειδωτικά αποθέματα του πλάσματος των αθλούμενων βρίσκονται σε υψηλότερα επίπεδα σε αντίθεση με αυτά των μη αθλούμενων. Ειδικότερα, παρατηρούνται σημαντικές αυξήσεις κατά 13,21% και 13,19% στις 24 και 48 ώρες αντίστοιχα (διάγραμμα 13, πίνακας 14). Μετά το διαχωρισμό σε αθλούμενους και μη-αθλούμενους παρατηρήσαμε ότι στις 24 και 48 ώρες μετά την άσκηση οι αθλούμενοι παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική αύξηση του cORP σε σχέση με το δείγμα ελέγχου σε ποσοστά 30,59% και 27,15%, αντίστοιχα, με τα επίπεδα των μη-αθλούμενων σε αυτές τις χρονικές στιγμές να μειώνονται και να παρατηρούνται σημαντικά στατιστικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες, υποδηλώνοντας ένα εντονότερο αναγωγικό περιβάλλον στους μη-αθλούμενους μετά από έκκεντρη άσκηση (διάγραμμα 14, πίνακας 15). Τα αυξημένα επίπεδα ROS που δημιουργούνται μετά από άσκηση είναι το σημαντικό ερέθισμα για την προσαρμογή των μυϊκών κυττάρων στη χρόνια άσκηση (Radak et al., 2013) οδηγώντας στην ευρεία παραγωγή ή ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών ενζύμων ή πρωτεϊνών υπεύθυνων για την αποτελεσματική αντιμετώπιση των ROS. Αντίθετα, οι μη-αθλούμενοι είναι ευάλωτοι στην παραγωγή ROS μετά τον τραυματισμό των μυών και τη φλεγμονώδη απόκριση, κάτι που επιβεβαιώνεται από τα υψηλά επίπεδα sORP και τα χαμηλότερα cORP μετά την άσκηση.

Όσον αφορά το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, τα ευρήματα στα επίπεδα GSH ήταν σημαντικά, επιβεβαιώνοντας έτσι τους ισχυρισμούς μας, καθώς η GSH κυμάνθηκε σε υψηλότερα επίπεδα σε αθλούμενα άτομα σε όλα τα εξεταζόμενα χρονικά σημεία και ειδικά στις 48 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, στα επίπεδα της GSH παρατηρήθηκε σημαντικά στατιστική αύξηση στο σύνολο των ατόμων, στις 48 ώρες σε σχέση με το δείγμα ελέγχου κατά 22,14%. Μετά το διαχωρισμό στις δύο ομάδες, οι αθλούμενοι παρουσίασαν πολύ μεγαλύτερη αύξηση στα επίπεδα της GSH σε σχέση με τους μη αθλούμενους, ειδικότερα στις 24 ώρες. Ταυτόχρονα, τα επίπεδα GSH για τους αθλούμενους ήταν αυξημένα στις 24 και 48 ώρες μετά την άσκηση κατά 25,60% και

37,53%, αντίστοιχα. Στο διάγραμμα 8 διακρίνεται η μεγάλη διαφορά στην απόκριση των αθλούμενων και των μη-αθλούμενων στην άσκηση. Πιο συγκεκριμένα, στις 48 ώρες μετά την άσκηση υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ των μεταβολών των αθλούμενων και των μη αθλούμενων, με τους πρώτους να παρουσιάζουν αύξηση κατά 37,53% και τους δεύτερους μια ανεπαίσθητη αύξηση κατά 4,51%. Ωστόσο, και στις 24 και στις 48 ώρες, ενώ οι αθλούμενοι παρουσίασαν αύξηση, οι μη-αθλούμενοι παρουσίασαν μείωση των επιπέδων GSH (πίνακας 9).

Η GSH είναι η πιο άφθονη θειόλη (Smith et al., 1996) έχοντας βασικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα του μυός μετά από άσκηση διατηρώντας την οξειδοαναγωγική κατάσταση και εξουδετερώνοντας τις ελεύθερες ρίζες, οι οποίες παράγονται κατά τη διάρκεια της απόκρισης της φλεγμονής (Fatouros et al., 2010). Έτσι, αναμέναμε μείωση των επιπέδων GSH μετά την έκκεντρη άσκηση, όπως συνέβη και σε παρόμοιες μελέτες (Margaritelis et al., 2014). Ειδικότερα, μια συνεχόμενη περίοδος έκθεσης σε εξαντλητική άσκηση μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση ROS αδυνατώντας να ρυθμιστούν από ενδογενή αντιοξειδωτικά, όπως η GSH, ειδικά σε μη-αθλούμενους ανθρώπους. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι οι αθλούμενοι έχουν αναπτύξει προσαρμοστικές αντιδράσεις στην άσκηση. Γενικά, είναι γνωστό ότι η τακτική άσκηση μπορεί σταδιακά να αυξήσει το επίπεδο προσαρμογής με την επανειλημμένη ενεργοποίηση αντιοξειδωτικών γονιδίων και πρωτεϊνών, οδηγώντας σε υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, άρα και σε αποτελεσματικότερη θεραπεία των παραγόμενων ROS (Radak et al., 2001). Οι αποκρίσεις αυτές προκαλούνται από την ενεργοποιημένη πρωτεϊνική κινάση μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMPK), από τους παράγοντες μεταγραφής NF-KB, μαζί με την p38 MAPK, μέλη της οικογένειας του μεταγραφικού παράγοντα FoxO, και από τον μεταγραφικό παράγοντα nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2), τα οποία ενεργοποιούνται σε χαμηλά επίπεδα ROS, και επομένως ετά από τακτικές περιόδους άσκησης (Steinbacher et al., 2015; Dodd et al., 2010; Derbre et al., 2012; Kröller-Schön et al., 2012). Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα που σχετίζονται με την GSH, η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και η συνθετάση της GSH αποτελούν προϊόντα της ενεργοποίησης των παραπάνω παραγόντων (Espinoza-Diez et al., 2015), εξηγώντας ικανοποιητικά την αύξηση της GSH στους αθλούμενους συμμετέχοντες.

Η TAC, που αναφέρεται στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος δεν παρουσίασε καμία σημαντική μεταβολή των τιμών. Τόσο όταν οι εθελοντές εξετάστηκαν ως ενιαία ομάδα σε σχέση με το δείγμα ελέγχου, όσο και μετά τον



διαχωρισμό τους στις ομάδες αθλούμενων και μη-αθλούμενων. Κάτι τέτοιο μπορεί να εξηγηθεί από την διαφορετικότητα της συμπεριφοράς του κάθε εξεταζόμενου απέναντι στο οξειδωτικό στρες.

Τέλος, η δραστηριότητα του ενζύμου καταλάση δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές διαφορές, ούτε μετά την εξέταση των εθελοντών σαν ενιαία ομάδα, ούτε μετά την διάκριση που πραγματοποιήσαμε σε αθλούμενους και μη (διαγράμματα 9 και 10). Η δράση του ενζύμου δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή, ενώ παράλληλα χαρακτηριστική και σε αυτή την περίπτωση είναι η ποικιλομορφία που παρατηρήθηκε μεταξύ των συμμετεχόντων.

Συνοψίζοντας, σε αυτή τη μελέτη έγινε μια προσπάθεια για κατηγοριοποίηση των συμμετεχόντων με σημείο αναφοράς το αθλητικό ιστορικό του κάθε ατόμου. Τα αποτελέσματα που λάβαμε επιβεβαίωσαν την υπόθεση μας, αφού παρατηρήθηκε ότι η έκθεση ορισμένων ατόμων σε κάποιου είδους άσκηση έχει ως απόρροια ο οργανισμός να αναπτύσσει προσαρμογές, αντιμετωπίζοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών και ερμηνεύοντας την ποικιλομορφία που παρατηρήθηκε στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των εξεταζόμενων ατόμων. Επομένως, είναι φανερό πως το αθλητικό ιστορικό του καθενός αποτελεί μία πιθανή αιτία για τις μεγάλες διαφορές μεταξύ των ατόμων στην απόκριση στο οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή που προκαλείται μετά από έκκεντρη άσκηση. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι το σύστημα RedoxSYS είναι αξιόπιστο για την εκτίμηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης μετά από άσκηση που προκαλεί μυϊκή καταστροφή. Ωστόσο, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν περισσότερες μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα ανωτέρω ευρήματα.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 84(1), 1-7.
- Antunes, F., Han, D., & Cadenas, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H(2)O(2) detoxification in in vivo conditions. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(9), 1260–1267.
- 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.
- Armstrong, R. B. (1990). Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc*, 22(4), 429-435
- Barbieri E, Sestili P. *Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Signaling*. 2012.
- Berg J, Tymoczko J, Stryer L (2010). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- 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.
- Brantley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, Singleton EW, Olson JS (1993). The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 268(10), 6995-7010.

- Chance B., Sies H and Boveris A.: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605,1979.
- Cheeseman, K. H., & Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481–493.
- 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), 615-621.
- 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.
- 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.
- 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.
- Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107, 1198–1205.
- Derbre F, Ferrando B, Gomez-Cabrera MC, et al. Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol prevents skeletal muscle atrophy: role of p38 MAPKinase and E3 ubiquitin ligases. *PLoS One* 2012;7(10):e46668.
- Dodd SL, Gagnon BJ, Senf SM, Hain BA, Judge AR. Ros-mediated activation of NF-kappaB and Foxo during muscle disuse. *Muscle Nerve* 2010;41(1):110–3.
- Dotan, Y., Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 200–227.
- Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, Ordonez-Llanos J, Marrugat J (2003). Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis* 167, 327–334.
- Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol* 2015;6:183–97.
- Fatouros IG, Kouretas D. Exercise, Oxidative Stress, and Inflammation. *Exerc Physiol From a Cell to an Integr Approach* 2010;75:245.
- Finaud J, Lac G, Filaire E (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med* 36(4), 327-358.
- Friden, J. (1984). Muscle soreness after exercise: implications of morphological changes. *Int J Sports Med*, 5(2), 57-66.
- Goldfarb, A. H., Bloomer, R. J., & McKenzie, M. J. (2005). Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 37(2), 234-239.
- Green, H. J., & Fraser, I. G. (1988). Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 20(1), 55–59.
- Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Vincent, S., Sergent, O., ... Gratas-Delamarche, A. (2003). Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 89(1), 14–20. <http://doi.org/10.1007/s00421-002-0767-1>
- Halliwell B, Gutteridge J (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. (2015). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications.
- Halliwell B and Gutteridge JMC, "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview", in Parker L, Glazer AN, Methods in Enzyme bgy 186, 1990. Inal M, Akyuz F, Turgut A, et al. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33(4):564-7.
- Halliwell B and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
- 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.
- Halliwell, Barry (Mar 2015) Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. *In: eLS*.
- Harris C. and Hansen J. M., "Oxidative stress, thiols, and redox profiles," *Methods in molecular biology*, vol. 889, pp. 325-346, 2012.
- Hedayatpour N, Falla D. Physiological and Neural Adaptations to Eccentric Exercise: Mechanisms and Considerations for Training. *Biomed Res Int* 2015;2015:193741.
- Hilbert JE, Sforzo GA, Swensen T. The effects of massage on delayed onset muscle soreness. *Br J Sports Med* 2003;37(1):72–5.
- Hulbert AJ. On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *J Theor Biol* 2005;234(2):277–88.
- 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), 564-7.
- Jamurtas T, Fatouros I. *Eccentric Exercise, Muscle Damage and Oxidative Stress*. 2012.
- Jamurtas, A. Z., Fatouros, J. G., Buckenmeyer, P. J., Kokkinidis, E., Taxildaris, K., Kambas, A., et al. (2000). Effects of plyometric exercise on muscle soreness and creatine kinase levels and its comparison to eccentric and concentric exercise. *J Strength Cond Res*, 14, 68-74.

- Janaszewska, A., & Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 62(3), 231–236.
- Jenkins, R. R. (1988). Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)*, 5(3), 156–170.
- J. Kim and J. Lee, “A review of nutritional intervention on delayed onset muscle soreness. Part I,” *Journal of Exercise Rehabilitation*, vol.10,no.6,pp.349–356, 2014.
- Keles, M. S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., & Akcay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 28(2), 141–143.
- Kim J, Lee J. A review of nutritional intervention on delayed onset muscle soreness. Part I. *J Exerc Rehabil* 2014;10(6):349–56.
- Krölller-Schön S, Jansen T, Hauptmann F, et al.  $\alpha$ 1AMP activated protein kinase mediates the vascular protective effects of exercise. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32(7):10.1161/ATVBAHA.111.243980.
- Kuby, Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne (2007). *Ανοσολογία, εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης*.
- 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.
- 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.
- Levine, R.L., 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free radical biology and medicine*, 32(9), pp.790-796.
- 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.
- Margaritelis, N. V, Kyparos, A., Paschalis, V., Theodorou, A. A., Panayiotou, G., Zafeiridis, A., ... Vrabas, I. S. (2014). Reductive stress after exercise: The issue of redox individuality. *Redox Biology*, 2, 520–528.
- McBride JM. Kraemer W J (1999). Free Radicals, Exercise, and Antioxidants (Vol. 13, pp. 175-183): National Strength and Conditioning Association.
- Mckune A, Semple S, Peters-Futre E. *Acute Exercise-Induced Muscle Injury*. 2012.
- 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.
- Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG., Koutedakis Y, Papassotiropoulos I, Kouretas D (2007). Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 39, 1107-1113.
- Mougiou Vassilis C. (2008). *Βιοχημεία της Άσκησης*, εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- Mylonas C and Kouretas D: Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13: 295–309, 1999.
- [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
- Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D (2006). Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc* 38, 1443-1450.
- Nikolaidis MG, Kyparos A, Hadziioannou M, Panou N, Samaras L, Jamurtas AZ and Kouretas D: Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Appl Physiol Nutr Metab = Physiol Appl Nutr Metab* 32: 197–205, 2007.
- Nikolaidis M.G., Jamurtas A.Z., Paschalis V., Fatouros I.G, Koutedakis Y., and Kouretas D., “The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations,” *SportsMedicine*, vol.38 , no.7 , pp.579–606, 2008.
- 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.
- Paschalis, V., Koutedakis, Y., Jamurtas, A. Z., Mougiou, 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.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N. T., Georgiou, C. D., Angelatou, F., & Matsokis, N. A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylentetrazol-induced epileptic seizure. *Neuroscience Letters*, 357(2), 83–86.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 4(2), 89–96.
- Powers SK and Jackson MJ: Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88: 1243–1276, 2008.
- Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M, Nyakas C, Goto S (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 27(1-2), 69-74.
- Radak Z, Taylor AW, Ohno H, Goto S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exerc Immunol Rev* 2001;7:90–107.

- Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal* 2013;18(10):1208–46.
- Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. (2004) Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J. Tuberc.* 51, 213–218.
- Robinson, J.M., 2008. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and Cell Biology*, 130(2), pp.281-297.
- Salaway J. G. *Medical Biochemistry at a Glance*, 2006.
- Sakellariou GK, Jackson MJ, Vasilaki A. Redefining the major contributors to superoxide production in contracting skeletal muscle. The role of NAD(P)H oxidases. *Free Radic Res* 2014;48(1):12–29.
- Sautin, Y. Y., & Johnson, R. J. (2008). Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 27(6), 608–619.
- Saxton, J. M., Donnelly, A. E., & Roper, H. P. (1994). Indices of free-radical-mediated damage following maximum voluntary eccentric and concentric muscular work. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*, 68(3), 189-193.
- Serinken MA, Gencoglu C, Kayatekin BM. The effect of eccentric exercise-induced delayed-onset muscle soreness on positioning sense and shooting percentage in wheelchair basketball players. *Balkan Med J* 2013;30(4):382–6.
- 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.
- 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.
- Smith C V, Jones DP, Guenther TM, Lash LH, Lauterburg BH. Compartmentation of glutathione: implications for the study of toxicity and disease. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;140(1):1–12.
- Spanidis, Y., Goutzourelas, N., Stagos, D., Kolyva, A. S., Gogos, C. A., Bar-Or, D., & Kouretas, D. (2015). Assessment of Oxidative Stress in Septic and Obese Patients Using Markers of Oxidation-reduction Potential. *In Vivo (Athens, Greece)*, 29(5), 595–600.
- Spanidis Y, Stagos D, Orfanou M, et al. Variations in Oxidative Stress Levels in 3 Days Follow-up in Ultramarathon Mountain Race Athletes. *J strength Cond Res* 2017;31(3):582–94
- 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.
- Stagos, D., Goutzourelas, N., Ntontou, A.-M., Kafantaris, I., Deli, C. K., Poullos, A., ... Kouretas, D. (2015). Assessment of eccentric exercise-induced oxidative stress using oxidation-reduction potential markers. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 204615.
- Stauber, W. T. (1989). Eccentric action of muscles: physiology, injury, and adaptation. *Exerc Sport Sci Rev*, 17, 157-185.
- Steinbacher P, Eckl P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. *Biomolecules* 2015;5(2):356–77.
- Svensson, M. B., Ekblom, B., Cotgreave, I. A., Norman, B., Sjoberg, B., Ekblom, O., ... Sjodin, A. (2002). Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiologica Scandinavica*, 176(1), 43–56.
- Szweda, P.A., Friguet, B. & Szweda, L.I., 2002. Proteolysis, free radicals, and aging. *Free radicals biology & medicine*, 33(1), pp.29-36.
- Vasilaki A, Jackson MJ. Role of reactive oxygen species in the defective regeneration seen in aging muscle. *Free Radic Biol Med* 2013;65:317–23.
- Veskoukis, A. S., Nikolaidis, M. G., Kyparos, A., Kokkinos, D., Nepka, C., Barbanis, S., & Kouretas, D. (2008). Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition et Metabolisme*, 33(6), 1140–1154.
- Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J (2000). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50, 271–277.
- Warren, G. L., Lowe, D. A., & Armstrong, R. B. (1999). Measurement tools used in the study of eccentric contraction-induced injury. *Sports Med*, 27(1), 43-59.
- Yiannakopoulou E. (2009). Oxidative stress – antioxidant mechanisms: Clinical implications. *Archives of Hellenic Medicine* 2009, 26(1):23-35.
- Young, I. S., & McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(Pt 2), 358–362.