ΑΘΗΝΑ ΙΟΥΝΙΟΣ 2014

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής Π.Μ.Σ.

Εφαρμοσμένης Διαιτολογίας- Διατροφής





Μεταπτυχιακή Διατριβή

Κάρτσωνας Θεόδωρος

“ Σελήνιο-Σεληνοπρωτεΐνες και ασκησιογενής μυϊκή βλάβη. Ποιός ο ρόλος του συμπληρώματος colostrum.”

Τριμελής επιτροπή

Νομικός Τζώρτζης	Αντωνοπούλου Σμαραγδή	Κάβουρας Σταύρος
Επίκουρος Καθηγητής	Καθηγήτρια	Επίκουρος Καθηγητής

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου σε όλους όσους με βοήθησαν να ολοκληρώσω τη παρούσα μεταπτυχιακής μου διατριβή.

Συγκεκριμένα, θα ήθελα να ευχαριστήσω:

- Τον επίκουρο καθηγητή βιοχημείας κ. Τζώρτζη Νομικό, επιβλέποντα της εργασίας μου για την υπεύθυνη και ουσιαστική του καθοδήγησή σε όλα τα στάδια της εργασίας, αλλά κυρίως γιατί μου δίδαξε στην πράξη πώς να βρίσκω λύσεις απέναντι σε σημαντικά εμπόδια.
- Ως μέλη της τριμελούς επιτροπής μου την καθηγήτρια Βιοχημείας κα. Αντωνοπούλου Σμαραγδή και επίκουρο καθηγητή κ. Κάβουρα Σταύρο.
- Την κα Φραγκοπούλου Ελισάβετ, τις υποψήφιες διδάκτορες κα Βλαχογιάννη Ιωάννα, κα Μικελίδη Νατάσσα και για την βοήθεια όποτε αυτή χρειάστηκε κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης.
- Επιπλέον τον κ. Κωτσή Ιωάννη για την διάθεση της πληθώρας των ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και εργοφυσιολογικών δεδομένων καθώς και για τις καθοριστικές συμβουλές του όσον αφορά στο εργοφυσιολογικό μέρος της έρευνας.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες 2
Συμβολισμοί 6
Περίληψη 8
1.Θεωρητικό μέρος 11
1.1 Ασκησιογενής Μυϊκή βλάβη και καθυστερημένος μυϊκός πόνος. 11
1.2 Είδος άσκησης που προάγει την ασκησιογενή μυϊκή βλάβη. 11
1.3 Δείκτες μυϊκής βλάβης. 12
1.4 Φλεγμονώδης απάντηση. 14
1.5 Απαντήσεις στην συστηματική κυκλοφορία. 14
1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν ΑΜΒ και φλεγμονώδη απόκριση 15
2. Σελήνιο – Σεληνοπρωτεΐνες - Βιολογικοί Ρόλοι. 16
2.1 Βιολογικός ρόλος. 17
2.2 Συστάσεις πρόσληψης σεληνίου 18
2.3 Απορρόφηση και μεταφορά. 18
2.4 Απέκκριση. 20
2.5 Προσδιορισμός επιπέδων σεληνίου 20
2.6 Τοξικότητα στοιχείου 20
2.7 Έλλειψη στοιχείου 21
3. Βιολογικοί ρόλοι σεληνοπρωτεΐνών. 21
3.1.1 Gpx1 22
3.1.2 Gpx 2 22
3.1.3 Gpx3 23
3.1.4 Gpx4 23
3.2 Αποιωδιονάσες ιωδοθυρονίνης (DIOS) 24
3.3 Αναγωγάσες θειοredοξίνης TRs 25
3.4 Σεληνοπρωτεΐνη P 25
4.0 Πρωτόγαλα (Colostrum) 26
4.1 Σύσταση πρωτογάλατος 27
4.1.1 Ανοσολογικοί παράγοντες 27
4.1.2 Ανοσολογικό φάσμα 28
4.1.3. Αντιοξειδωτικά: 28
4.1.4.Βιταμίνες ως μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά 29

4.1.5. Ιχνοστοιχεία , Se,Zn,Cu 29
4.1.6 Αυξητικοί Παράγοντες 30
5. Βόειο πρωτόγαλα και άσκηση 31
6. ΣΚΟΠΟΣ: 33
6.1 : ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ 34
6.1.1 1ο Ερευνητικό πρωτόκολλο – Επίδραση χορήγησης colostrum στα επίπεδα λιποειδικών μεσολαβητών έπειτα από πρόκληση ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης 34
6.1.2. 20 Ερευνητικό πρωτόκολλο – Επίδραση χορήγησης διαφορετικών μορφών colostrum σε βιοχημικούς δείκτες. 36
6.1.3. Το συμπλήρωμα πρωτογάλακτος της εταιρείας LR Health and Beauty Systems 38
6.1.4. Πρωτόκολλο Loughborough Intermittent Shuttle Test (LIST) 40
6.2. Μέθοδοι και εργαλεία εκτίμησης των αποτελεσμάτων 40
6.4 Στατιστική ανάλυση 49
7.Αποτελέσματα 50
7.1 1ο πρωτόκολλο – Ασκησιογενής μυϊκή βλάβη 50
7.1.1 Ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά 50
7.1.2 Πιθανά στατιστικά σημαντικές Συσχετίσεις μεταξύ σεληνοπρωτεϊνών Gpx1 και Gpx3 με ανθρωπομετρικά, βιοχημικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά. 51
7.1.3 Επίδραση των αρχικών επιπέδων των GPXs στις μεταβολές δεικτών AMB μετά από το πρωτόκολλο LIST. 52
7.1.4 Συσχέτιση των μεταβολών στα επίπεδα δραστικότητας των GPXs με τις μεταβολές σε δείκτες AMB. 53
7.1.5 Επίδραση του πρωτοκόλλου LIST στα επίπεδα δραστικότητας των GPXs πριν τη παρέμβαση. .. 55
7.1.6 Διαφορές στα χαρακτηριστικά των δύο ομάδων παρέμβασης κατά την έναρξη της παρέμβασης. 57
7.1.7 Επίδραση της παρέμβασης στα επίπεδα Gpx1, Gpx3 στην ομάδα Placebo και ομάδα BC (παρέμβασης). 58
7.2.1 Δεύτερο πρωτόκολλο (KINETICS) – Επίδραση διαφορετικών μορφών και δόσεων BC στην τυχόν μεταβολή των σεληνοπρωτεϊνών Gpx1-Gpx3. 63
7.2.2 Σύγκριση ανθρωπομετρικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών μεταξύ των ομάδων πριν την παρέμβαση 64
7.2.3 Συσχέτιση βασικών ανθρωπομετρικών και βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών με δραστικότητα των σεληνοπρωτεϊνών Gpx3 και Gpx1. 65
7.2.4 Σύγκριση της επίδρασης των παρεμβάσεων με BC στα επίπεδα της Gpx3. 66
8. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ 68
Συζήτηση 71

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 74

Συμβολισμοί

ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
AUC	Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη
BC	Βόειο πρωτόγαλα
BCGF	Αυξητικός παράγοντας βόειου πρωτογάλακτος
BMI	Δείκτης μάζας σώματος
BSA	Βόεια αλβουμίνη ορού
CA III	Ανθρακική ανυδράση
CAT	Καταλάση
CK ή CPK	Κρεατινική κινάση
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
DOMS	Καθυστερημένος μυϊκός πόνος
EGF	Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας
FABP	Πρωτεΐνες σύνδεσης λιπαρών οξέων
GPX	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GSH	Ανηγμένη γλουταθειόνη
GSSG	Οξειδωμένη γλουταθειόνη
HBC	Υπερ-ανοσολογικό πρωτόγαλα

HMB	β-υδροξύ-β-μεθυλοβουτυρικό οξύ
ICAM	Ενδοκυττάριο μόριο προσκόλλησης στα κύτταρα
IFN	Ιντερφερόνη
Ig	Ανοσοσφαιρίνη
IGF	Ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας
IL	Ιντερλευκίνη
LIST	Πρωτόκολλο Loughborough Intermittent Shuttle Test
LP	Λακτοϋπεροξειδάση
LPS	Λιποπολυσακχαρίδια
MPV	Μέσος όγκος αιμοπεταλίων

Results: On the first protocol, there is an incremental trend of Gpx1's activity comparing the BL και follow up group .This took place in time phases of 2h and 24h in the bovine colostrum group that ($p<0.5$). On the second research protocol, the interventions did not significantly affect any of the Gpxs activity indexes. The only significant negative correlation ($p<0.1$) was between the Gpx3 and the MPV. Mean platelet volume is factor that has correlated with a significant degree of probability for platelet depended artery blood clotting.

Conclusion: Only after exercise stimulation, potential augment of Gpx1 activity after bovine colostrum administration (BC) 3,2gr/d for 6 weeks. On the second research protocol none of the interventions in any dosage or type of (BC) significantly affected any of the activates of the tested selenoenzymes.

1.Θεωρητικό μέρος

1.1 Ασκησιογενής Μυϊκή βλάβη και καθυστερημένος μυϊκός πόνος.

Η ασκησιογενής μυϊκή βλάβη (ΑΜΒ) και ο καθυστερημένος μυϊκός πόνος. (ΚΜΠ) έχουν σημαντική συσχέτιση. Αν και συνήθως ο ΚΜΠ χρησιμοποιείτε για την εκτίμηση της έκτασης της ΑΜΒ με καλά αποτελέσματα επιπλέον δείκτες απαιτούνται για ακριβέστερο προσδιορισμό της μυϊκής βλάβης αν για οποιονδήποτε λόγω αυτό είναι αναγκαίο. Οι μυϊκοί τραυματισμοί βαθμονομούνται ανάλογα με την έκταση τους σε 3 βασικές κατηγορίες. Η 1^{ου} βαθμού μυϊκή βλάβη χαρακτηρίζεται από μικρής έκτασης τομές ή ρήξης και τραυματισμούς των μυϊκών ινών. Η 2^{ου} βαθμού σε μερική ρήξη του μυός και η 3^{ου} βαθμού σε ολική ρήξη του μυός. Η ΑΜΒ ανήκει στην 1^{ου} βαθμού μυϊκή βλάβη και συνοδεύεται από ΚΜΠ 6-12 ημέρες μετά την άσκηση. Ελαφριά ενόχληση και πόνος κατά την ψηλάφηση του μυός και δυσκαμψία είναι τα συνήθη συμπτώματα που κορυφώνονται 48-72 ώρες μετά.[1].Απουσία πόνου και συμπτωμάτων επέρχεται 5-7 μέρες μετά [2].

1.2 Είδος άσκησης που προάγει την ασκησιογενή μυϊκή βλάβη.

Η ισομετρική άσκηση μπορεί να επιφέρει ΑΜΒ αλλά σε σχετικά περιορισμένο βαθμό συγκριτικά με την έκκεντρη άσκηση. Ένας πιθανός μηχανικός λόγος για τον οποίο η έκκεντρη άσκηση επιφέρει ΑΜΒ σε μεγαλύτερο βαθμό, είναι το γεγονός του ότι κατά την έκκεντρη άσκηση (κατέβασμα βαρών ή τρέξιμο σε κατηφορική κλίση) οι μύες επιμηκύνονται προσπαθώντας να υπερνικήσουν την δύναμη η οποία τους εφαρμόζεται χωρίς όμως να το καταφέρνουν [2]. Για το ίδιο φορτίο οι μύες φαίνεται να εμπλέκουν περισσότερες κινητικές μονάδες κατά την σύσπαση τους παρά την βράχυνσή τους. Επομένως η υπόθεση είναι πως λιγότερες κινητικές μονάδες καλούνται να υπερνικήσουν το ίδιο φορτίο με αποτέλεσμα περισσότερο φορτίο ανά κινητική μονάδα [2].

Φαινόμενα προσαρμογής στην ΑΜΒ και συνεπώς στον ΚΜΠ παρατηρούνται μετά από ερεθίσματα επαναλαμβανόμενης συχνότητας που επιφέρει η προπόνηση έκκεντρης ή ομόκεντρης άσκησης .Τα φαινόμενα προσαρμογής στην κάθε είδους άσκηση παύουν σταδιακά να υφίστανται με την διακοπή της αντίστοιχης προπόνησης [2].

Κατά την ΑΜΒ οι βλάβες στα μυϊκά κύτταρα λαμβάνουν χώρα στο σαρκοπλασματικό δίκτυο την κυτταρική μεμβράνη καθώς και στο σαρκόπλασμα. Η επιμήκυνση των σαρκομεριών κατά την έκκεντρη συστολή καθιστά τα ασθενέστερα από αυτά , ανίκανα στο να επικαλύψουν νημάτια ακτίνης –μυοσίνης κατά την χάλαση του μυός. Ως αποτέλεσμα τα ασθενή αυτά σαρκομέρια με υπερδιάταξη εμφανίζουν μυϊκές βλάβες (ΑΜΒ) καθώς συνεχίζονται οι μυϊκές συστολές. Η βλάβη

εντοπίζεται στην σαρκόπλασμα, το σαρκοπλάσματικό δίκτυο και την κυτταρική μεμβράνη. Λόγω της ρήξης της κυτταρικής μεμβράνης ,ποσότητα πρωτεϊνών μεταφέρεται στην συστηματική κυκλοφορία. Η υψηλή συγκέντρωση Ca ++ στο σαρκοπλασματικό δίκτυο και τον εξωκυττάριο χώρο σηματοδοτεί πρωτεολυτικά μεταβολικά μονοπάτια [2]. Η παθοφυσιολογική κατάσταση της φλεγμονής επέρχεται πρώτα με ουδετερόφιλα και έπειτα από 24 ώρες μακροφάγα κύτταρα οδηγούνται από την κυκλοφορία στην περιοχή ώστε να καταβολίσουν τα κατεστραμμένα σαρκομέρια με πιθανή συνεργιστική δράση στην πρόκληση ΚΜΠ. Εξαιτίας του μηχανισμού φλεγμονής η οσμωτική πίεση τοπικά αυξάνεται ενώ οι ενεργοποιημένοι λόγω κατάστασης αισθητικοί νευρώνες αυξάνουν την αίσθηση του πόνου [4][3].

1.3 Δείκτες μυϊκής βλάβης.

Το οίδημα , ο πόνος, η δυσκαμψία και η δυσκολία εκτέλεσης έργου αποτελούν ενδείξεις ΑΜΒ. Η κορύφωσή κάθε συμπτώματος ποικίλει από 24-72 ώρες για τον πόνο και την ευερεθιστότητα έως στις 3 ημέρες για το οίδημα και το εύρος κίνησης. Η μυϊκή δύναμη εμφανίζει σημαντική μείωση αμέσως μετά την άσκηση και για τις 2 επόμενες ημέρες. Επαναφορά του μυός και απουσία συμπτωμάτων συνήθως εμφανίζεται 5-7 ημέρες μετά την άσκηση και ανάλογα την έκταση της ΑΜΒ [5][6].

Επιπλέον δείκτες μετρήσιμοι στο πλάσμα μετρώνται προς προσδιορισμό ΑΜΒ καθώς η αυξημένη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης μετά από ΑΜΒ αυξάνεται επιτρέποντας σε ένζυμα και πρωτεΐνες να οδηγηθούν στην συστηματική κυκλοφορία [7].

Κινάση της φωσφοκρεατίνης (CK): Παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στον ενεργειακό μεταβολισμό κατά την άσκηση καθώς μετατρέπει την κρεατίνη και το ATP σε φωσφοκρεατίνη και ADP. Εμφανίζεται με τρεις ισομορφές στο σαρκόπλασμα και δύο στα μιτοχόνδρια. Παράγοντες που συσχετίζονται θετικά με την παρουσία της στο πλάσμα μετασκησιακά είναι η διάρκεια της άσκησης ,η ένταση της καθώς και η φύση της άσκησης. Πλειομετρικές ασκήσεις φαίνεται να προκαλούν πιο εκτεταμένη ΑΜΒ συνεπώς και αυξημένες τιμές CK στο πλάσμα.

Με την προσαρμογή στην άσκηση παρουσιάζονται μειωμένα επίπεδα CK στους προπονημένους συγκριτικά με τους μη προπονημένους σε ανάλογα προπονητικά ερεθίσματα μετασκησιακά [7].

Αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέως (LDH): Απαντάται σε 5 ισομορφές και είναι το ένζυμο που καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση μετατροπής του πυροσταφυλικού οξέος σε γαλακτικό ενώ παράλληλα μετατρέπεται το NAD σε NADH. Η ένταση και η διάρκεια της άσκησης φαίνεται και εδώ να επηρεάζουν σημαντικά τις τιμές της LDH στο πλάσμα.

Αλδολάση: Η αλδολάση είναι το ένζυμο που καταλύει την μετατροπή της 1,6-διφωσφωρικής φρουκτόζης σε 3-φωσφορική γλυκεριναλδεϋδη και φωσφορική διυδροξυ-ακετόνη, αντίδραση της κύριας γλυκολυτικής πορείας [7].

Αμινοτρανσφεράση του ασπαραγινικού οξέως (AST): η AST είναι το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση μετατροπής του ασπαραγινικού με το α-κετογλυταρικό σε οξαλοξικό και γλουταμινικό οξύ, αντίδραση που παρέχει ενέργεια στο κύτταρο και λαμβάνει χώρα μεταξύ κυτταροπλάσματος και το μιτοχονδρίου [7].

Μυοσφαιρίνη: Πρωτεΐνη μεταφορέας οξυγόνου από τα τριχοειδή αγγεία στο εσωτερικό του κυττάρου. Αυξημένη παρουσία στο αίμα σηματοδοτεί μυϊκή βλάβη.

Τροπονίνη: Πρωτεΐνη που ρυθμίζει μυϊκή συστολή. Εμπλέκεται στην σύνδεση μυοσίνης και ακτίνης μέσω της σύνδεσης με το ασβέστιο. Σημαντική συσχέτιση παρουσίας τροπονίνης στο πλάσμα μετά από άσκηση με υψηλή ένταση παρά με άσκηση χαμηλής ή μέτριας.

Ανθρακική ανυδράση (CA III): Σημαντικός δείκτης μυϊκής βλάβης καθώς υποδεικνύει κυτταρικές βλάβες στους μυς και όχι στην καρδιά. Ταχύτερες αυξομειώσεις ενζύμου στο πλάσμα από αλδολάση, CK, AST, και LDH [7].

Πίνακας 1.1 Αξιολόγηση δεικτών AMB

Δείκτης	Πληροφόρηση βλάβης	Δυσκολία μέτρησης	Αξιοπιστία	Σχόλιο
Βιοψία	Τοπική	Υψηλή	Υψηλή	Ο καλύτερος δείκτης
Δύναμη	Τοπική	Χαμηλή	Μέτρια	
Πόνος	Κεντρική	Χαμηλή	Μέτρια – Υψηλή	Υψηλή υποκειμενικότητα
Ευαισθησία	Τοπική	Χαμηλή	Μέτρια	Υψηλή υποκειμενικότητα
Δυσκαμψία	Τοπική	Χαμηλή	Μέτρια – Υψηλή	
Οίδημα	Τοπική	Χαμηλή	Μέτρια – Υψηλή	
Κρεατινική κινάση (CK)	Κεντρική	Χαμηλή	Χαμηλή	Υψηλή διακύμανση μεταξύ ατόμων αλλά και στο ίδιο άτομο
Γαλακτική Αφυδρογονάση (LDH)	Κεντρική	Χαμηλή	Χαμηλή	-//-
Γλουταμινική οξαλοξική τρανσαμινάση (GOT)	Κεντρική	Χαμηλή	Χαμηλή	-//-

[5]

1.4 Φλεγμονώδης απάντηση.

Μόλις 4 ώρες μετά την εγκατάσταση μυϊκής βλάβης ουδετερόφιλα κύτταρα κατευθύνονται στην περιοχή της βλάβης τοπικά και παραμένουν εκεί για περίπου 24 ώρες. Μετά το 24ωρο μακροφάγα κάνουν την εμφάνιση τους με παραμονή τοπικά στην περιοχή που φθάνει και τις 14 ημέρες. Ο ρόλος των κυττάρων αυτών είναι η απομάκρυνση του κατεστραμμένου ιστού μέσω απελευθέρωσης δραστικών μορφών αζώτου και οξυγόνου και κυτταροκίνες (IL-1 και TNF-a). Η απάντηση που αναπτύσσεται μετά την ΑΜΒ θα λέγαμε ότι έχει προ-φλεγμονώδη χαρακτήρα [3].

1.5 Απαντήσεις στην συστηματική κυκλοφορία.

Τα δεδομένα που συλλέγονται μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας για την τυχόν ΑΜΒ λαμβάνονται ευκολότερα συγκριτικά με τις ιστολογικές εξετάσεις όπως η μυϊκή βιοψία καθώς είναι λιγότερο παρεμβατικές και αποδεκτές από τους εθελοντές που παίρνουν μέρος σε έρευνες. Τα στοιχεία επίσης που υπάρχουν διαθέσιμα προς σύγκριση και μετέπειτα εξαγωγή συμπερασμάτων είναι πολυπληθέστερα όσο αφορά τις μελέτες που εξετάζουν την συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση. Γενικά κατά τις πλειομετρικές ασκήσεις όπως τρέξιμο σε αρνητική κλίση ή ασκήσεις που εμπλέκουν μεγάλες μυϊκές ομάδες στην άσκηση εμφανίζονται περισσότερα ουδετερόφιλα στην κυκλοφορία του αίματος σε σχέση με ασκήσεις που εμπλέκουν μικρότερες μυϊκές ομάδες. Επινεφρίνη και κορτιζόλη αποτελούν ορμόνες του στρες που εκκρίνονται κατά την έντονη άσκηση και ειδικά όταν αυτή εμπλέκει πολλές και μεγάλες μυϊκές ομάδες. Η αύξηση των ουδετερόφιλων στο πλάσμα επάγεται από τις ορμόνες αυτές. Επιπλέον η ΑΜΒ τροποποιεί την έκφραση των υποδοχέων των ουδετερόφιλων και των μονοκύτταρων στην επιφάνεια των κυττάρων επιτρέποντας την είσοδο στο εσωτερικό του κυττάρων. Η κυκλοφορία αντιφλεγμονωδών παραγόντων IL-1ra, IL-10 και διαλυτών υποδοχέων TNF-α εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα στην κυκλοφορία ως απόκριση σε έκκεντρη άσκηση, εν αντιθέσει με τους προφλεγμονώδεις παράγοντες IL-1β και TNF-α που ταυτόχρονα φαίνεται να είναι σταθεροποιημένοι στην κυκλοφορία ενώ στους μύες παρουσιάζουν αυξημένες τιμές. Η μειωμένη παρουσία προ-φλεγμονωδών παραγόντων στην κυκλοφορία οφείλεται από την δράση της IL-6. Η δράση της είναι μάλλον έμμεση ολοκληρώνεται παράλληλα με την ενεργοποίηση άλλων αντιφλεγμονωδών παραγόντων όπως IL-1ra, IL-10, υποδοχείς TNF-α και κορτιζόλη [3].

τοπικά σε επιλεγμένα όργανα και ιστούς. Η DIO2 εκφράζεται σε ΚΝΣ, βλεννογόνους και μύες ενώ η DIO3 σε μήτρα καθώς και σε ήπαρ και εγκέφαλο νεογνών [55].

3.3 Αναγωγάσες θειορεδοξίνης TRs

Οι αναγωγάσες της θειορεδοξίνης είναι οξειδοαναγωγικοί παράγοντες που ως βασικό ρόλο έχουν την ρύθμιση και προστασία των κυττάρων απέναντι στο οξειδωτικό στρες.[57]. Οι τρείς αυτές αναγωγάσες συναντώνται στο κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια και τους όρχεις ως TrxR1,TrxR2 και TGR/TRXr3 αντίστοιχα [58].

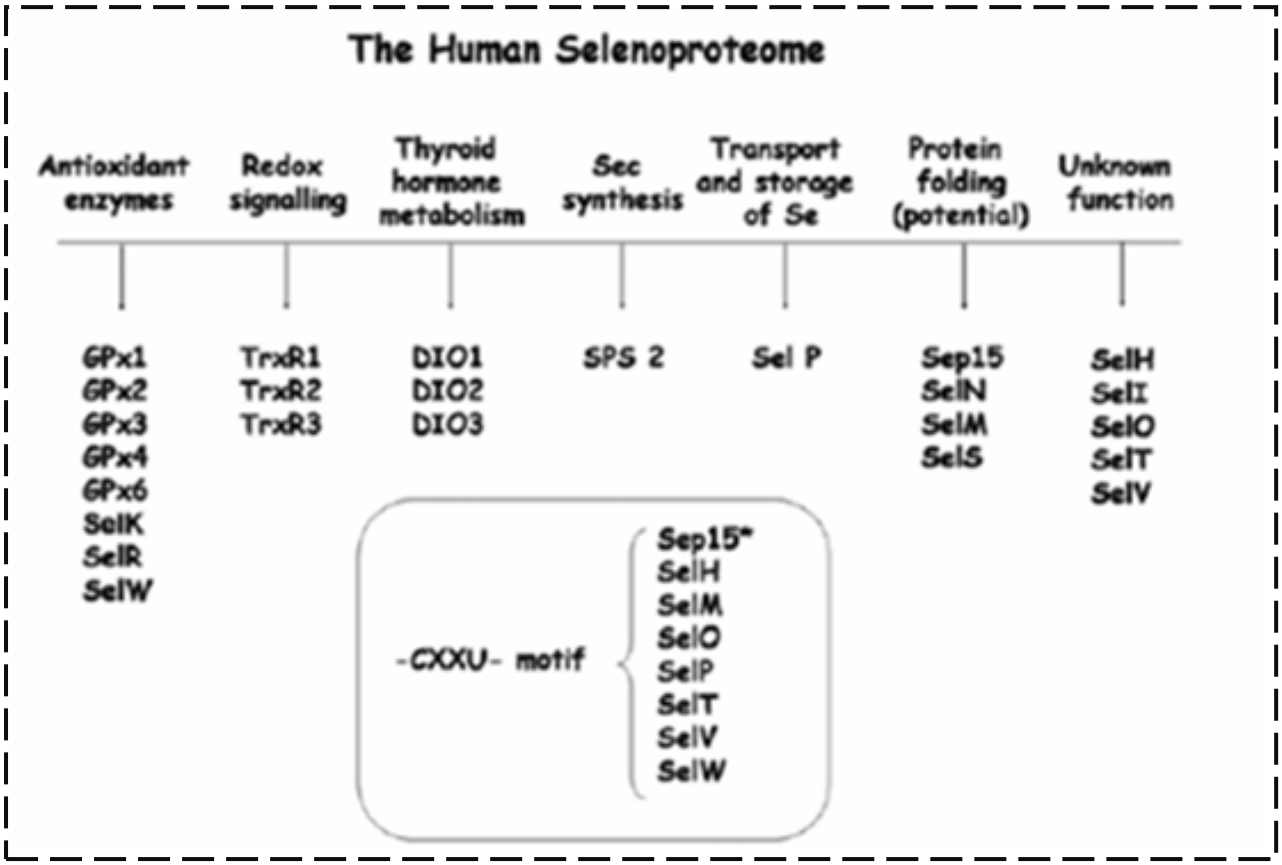
Το σύστημα αυτό της θειορεδοξίνης απαρτίζεται από τις αναγωγάσες της θειορεδοξίνης την πρωτεΐνη θειορεδοξίνη που είναι μία πρωτεΐνη με οξειδοαναγωγικές ιδιότητες και που εμπλέκεται και προάγει την κυτταρική ανάπτυξη σε φυσιολογικά αλλά και καρκινικά κύτταρα καθώς επίσης και το NADPH ως συμπαράγοντα και δότη ηλεκτρονίων [57][58].

3.4 Σεληνοπρωτεΐνη P

Η σεληνοπρωτεΐνη P είναι μία γλυκοπρωτείνη με 362 αμινοξέα και μοριακό βάρος 5 Kda [59]. και βρίσκεται στον εξωκυττάριο χώρο. Στην σεληνοπρωτεΐνη P εντοπίζονται έως και 10 κατάλοιπα σεληνοκυστείνης. Σε κατάσταση ανεπάρκειας Se η πρωτεΐνη δύναται να συντεθεί και με λιγότερα κατάλοιπα σεληνοκυστείνης [60][61].

Η σύνθεση της σεληνοπρωτεΐνης P λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ και δευτερευόντως σε καρδιά και νεφρούς και πνεύμονες. Σε περιπτώσεις παθολογίας του ήπατος πολλές φορές εμφανίζονται και χαμηλά επίπεδα SelP.Η SelP περιέχει το 40% του σεληνίου του πλάσματος ενώ από αυτό το ποσό σεληνίου παρέχεται και το ανάλογο προς σύνθεση Gpx3 στο ήπαρ [60][61].

Η SelP εκτός της αντιοξειδωτικής δράσης φάνηκε και βιβλιογραφικά να ασκεί αυτή την δράση ιδιαίτερα στα επιθηλιακά κύτταρα καθώς και τις LDLs. Καθώς η SelP αποτελεί σημαντικό ποσοστό του σεληνίου στον οργανισμό μπορεί και να αποτελέσει και δείκτη ο οποίος φαίνεται να μειώνεται όταν η εξωγενής χορήγηση σεληνίου (διατροφικά) μειώνεται για περιβαλλοντολογικούς κυρίως λόγους.



Σχήμα 3.3 Ανθρώπινο σεληνοπρωτέομα [49].

4.0 Πρωτόγαλα (Colostrum)

Τα βασικά χαρακτηριστικά της σύστασης του πρωτογάλακτος ή πύαρ (colostrum) όπως η αυξημένη συγκέντρωση σε πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες, μικροθρεπτικά στοιχεία, ανοσολογικούς και αυξητικούς παράγοντες το κάνουν ιδανική τροφή για το έμβρυο κατά τις πρώτες ημέρες ζωής μετά την γέννηση του. ’Άλλωστε η παραγωγή από την μητέρα διαρκεί για λίγες ημέρες έως ότου αντικατασταθεί από το μητρικό γάλα. Τα αντισώματα, οι ανοσοσφαιρίνες αντιμικροβιακά συστήματα σε συνδυασμό με την παρουσία μακρο και μικροθρεπτικών συστατικών θα προάγουν την ανάπτυξη πολλαπλών συστημάτων του νεογνού και κυρίως του ανοσοποιητικού συστήματος του [35][36].Η συμπληρωματική χορήγηση πρωτογάλακτος στους ανθρώπους φαίνεται να είναι ευεργετική τόσο στην αθλητική απόδοση όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Το βόειο πρωτόγαλα όντας πανομοιότυπο με το ανθρώπινο και καθώς είναι το μοναδικό που μπορεί να συλλέγει σε μεγάλες ποσότητες αναλογικά με το ανθρώπινο, είναι η επικρατέστερη μορφή που μπορεί να διατίθεται για συμπληρωματική χορήγηση.

Πιν.3.1 Διαφορές σύνθεσης σε βασικά συστατικά στην σύνθεση μεταξύ βόειου και ανθρώπινου Πρωτογάλακτος [35].

Συστατικά	**Ανθρώπινο Πρωτόγαλα**	**Βόειο Πρωτόγαλα**
Νερό	87%	78%
Υδατάνθρακες	5,5%	3,1%
Λιπαρά	2.9%	3,6%
Πρωτεΐνη	4,1%	14,3%
IgG	0,21 mg/mL	77mg/mL
IgM	0,92 mg/mL	4,9 mg/mL
Λακτοφερίνη	++	+
Λυσοζύμη	+++++	+
Γαλακτοϋπεροξειδάση	+	+
Αυξητικοί παράγοντες	++++	++

4.1 Σύσταση πρωτογάλατος

4.1.1 Ανοσολογικοί παράγοντες

Τα ανοσολογικά χαρακτηριστικά της σύστασης του πρωτογάλακτος στα οποία αναφορικά εμπεριέχονται, πολλά αντισώματα για μικρόβια όπως σταφυλόκοκκο και E.coli, ποικιλία αντιμικροβιακών πρωτεϊνών και πεπτιδίων καθώς και ανοσοσφαιρίνες εξασφαλίζουν στο νεογνό παθητική ανοσία. Αυτά αποτελούν σημεία που καθιστούν το πρωτόγαλα απαραίτητη τροφή για το ανώριμο ανοσοποιητικό του νεογνού.

Ανοσοσφαιρίνες –Igs

Οι ανοσοσφαιρίνες IgA,IgG,και IgM έχουν διαφορετική συγκέντρωση στο ανθρώπινο πλάσμα, στο γάλα και στο πρωτόγαλα. Οι IgG1 και IgG2 αποτελούν τις υποκατηγορίες της ανοσοσφαιρίνης της IgG και αποτελούν την κύρια ανοσοσφαιρίνη στο βόειο πρωτόγαλα. Αντιθέτως ή IgA αποτελεί την κυρίως ανοσοσφαιρίνη στο ανθρώπινο πρωτόγαλα. Οι ανοσοσφαιρίνες λαμβάνουν δράση με κύριο χαρακτηριστικό την ανοσοποίηση. Διασφαλίζουν παθητική ανοσία στο νεογνό καθώς η διαπερατότητα του εντέρου του επιτρέπει την απορρόφηση τους. Η παρουσία τους στο πρωτόγαλα προέρχεται είτε από το πλάσμα μέσω των μαστικών αδένων (IgG1) είτε από έκκριση τους από τα επιθηλιακά κύτταρα των μαστικών αδένων.IgG2,IgA και IgM [37].

4.1.2 Ανοσολογικό φάσμα

Λυσοζύμη

Είναι ενζυμο το οποίο καταστρέφει ιούς και βακτήρια υδρολύοντας τις κυτταρικές μεμβράνες. Έχει ανθεκτικότητα σε χαμηλό ph.

Λακτοφερίνη

Η λακτοφερίνη βρίσκεται σε μεγαλύτερες ποσότητες στο ανθρώπινο πρωτόγαλα από ότι στο βόειο. Βασική της ιδιότητα είναι η καταπολέμηση των βακτηρίων, μυκήτων και γενικότερα έχει ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες .Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στην υψηλή σιδηροδεσμευτική της ικανότητα η οποία στερεί τα αναγκαία ποσά σιδήρου από τα μικρόβια, προς ανάπτυξη αυτών [39].

Επιπλέον μπορεί να λειτουργήσει και αντιοξειδωτικά μειώνοντας την οξείδωση των λιπαρών οξέων. Η δέσμευση των μορίων σιδήρου από την λακτοφερίνη που προκύπτουν μετά την κυτταρική καταστροφή όπως για παράδειγμα κατά την εξέλιξη μίας φλεγμονής, μειώνουν την οξειδωτική επίδραση αυτών των μορίων στα λιπαρά οξέα και τα κύτταρα [40].

Λακταλβουμίνες-Καζεΐνη

Πρωτεΐνες με κύρια δράση έναντι των ιών ευρέου φάσματος. Αποτελεσματικότητα σε Gram- και Gram- βακτήρια [41].

Ολιγοσακχαρίτες

Δρουν ως ανταγωνιστές των υποδοχέων στους οποίους συνήθως συνδέονται συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Επιπλέον προάγουν την ανάπτυξη της εντερικής χλωρίδας ως προβιοτικά.

4.1.3. Αντιοξειδωτικά:

Λακτουπεροξειδάση (LP):

Η LP είναι μια υπεροξειδάση και ονομάσθηκε έτσι λόγω της παρουσίας της στο γάλα και στο πρωτόγαλα. Έχει αντικαρκινική ,αντιβακτηριακή και αντιϊκή δράση. Ο μηχανισμός δράσης της βασίζεται στο ότι καταλύει την οξείδωση μορίων που περιέχουν θειοκυανιούχα ανιόντα (SCN^-)και οδηγεί την παραγωγή προϊόντων με έντονη αντιμικροβιακή δράση. Η οξείδωση του SCN^- προς

παραγωγή αντιμικροβιακών προϊόντων ξεκινά μετά από την παραγωγή H_2O_2 από τα λευκά αιμοσφαίρια [42]

Καταλάση (CAT)

Δραστικότατο αντιοξειδωτικό ένζυμο με δυνατότητα καταστροφής ελευθέρων ριζών και ειδικά H_20_2.

Υπεροξειδική Δισμουτάση (SOD)

Κύριος ρόλος του αντιοξειδωτικού αυτού παράγοντα είναι η προστασία των κυττάρων από το H_2O_2 και H^+ (υπερυπεροξειδικου ανιόντος). Υπάρχει σε τρείς μορφές SOD1, SOD2 και SOD3 όπου υπάρχουν αντίστοιχα στο κυτταρόπλασμα, τα μιτοχόνδρια και στον εξωκυττάριο χώρο.

4.1.4.Βιταμίνες ως μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά

Οι βιταμίνες A,C,E λαμβάνονται εξωγενώς και παρουσιάζουν αντιοξειδωτική δράση. Η βιταμίνη Α πέρα πολλών ιδιοτήτων έχει και ανοσοπροστατευτική δράση. Η παρουσία της στο πρωτόγαλα είναι κυρίως ως β- καροτένιο και μετά από μερικές εβδομάδες ως κύριο καροτενοειδές στο πρωτόγαλα επικρατεί η λουτεϊνη. Η παρουσία της πιθανολογείτε ότι προετοιμάζει το νεογνό για την επικείμενη έκθεση της όρασης του στο φώς δρώντας αντιοξειδωτικά στο αμφιβληστροειδή χιτώνα. Η βιταμίνη C στο πρωτόγαλα ως αντιοξειδωτικός παράγοντας φαίνεται να έχει συγγενή δράση με την βιταμίνη Ε καθώς ως δότης ηλεκτρονίων στην βιταμίνη Ε λειτουργεί αντιοξειδωτικά στην κυτταρική μεμβράνη. Η παρουσία της στο ανθρώπινο πρωτόγαλα είναι έως και διπλάσια σε σχέση με το βόειο.

4.1.5. Ιχνοστοιχεία , Se,Zn,Cu

Το σελήνιο στο πρωτόγαλα βρίσκεται κυρίως με την μορφή σεληνοπρωτεΐνών και αμινοξέων με προσδεδεμένο το Se η σύνθεση και η έκκριση των μορίων που φέρουν σελήνιο πραγματοποιείτε από τους μαστικούς αδένες. Η παρουσία τον μορίων αυτών στο πρωτόγαλα ξεκινά από υψηλές συγκεντρώσεις που σταδιακά μειώνονται. Ό ψευδάργυρος και ο χαλκός παίζουν βασικό ρόλο σε ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα καθώς επίσης εμφανίζουν ανεξάρτητη αντιοξειδωτική δράση. Τα επίπεδα τους αντίστοιχα στο πρωτόγαλα κυμαίνονται στα 63 μmol/L και 19 μmol/L.Τα επίπεδα και των δύο ιχνοστοιχείων μειώνονται κατά την διάρκεια θηλασμού. Επιπλέον το πρωτόγαλα είναι πλούσιο σε παράγοντες που προάγουν την αξιοποίηση και σύνθεση παραγόντων όπως η κυστείνη (πρόδρομη ουσία και συστατικό της γλουταθειόνης), την σερουλοπλαμίνη (μεταφορέας χαλκού) και κολοστρινίνη (πολυπεπτίδιο πλούσιο σε προλίνη).

4.1.6 Αυξητικοί Παράγοντες

Κατηγορία ουσιών με την μορφή ορμονών ή πρωτεϊνών που κυρία ιδιότητα της είναι η μετάδοση σήματος στα κύτταρα με στόχο την κυτταρική ανάπτυξη, διαίρεση και πολλαπλασιασμό.

Ινσουλινομιμιτικοί αυξητικοί παράγοντες

Η συγκέντρωση τους είναι μεγαλύτερη στο βόειο από ότι στο ανθρώπινο πρωτόγαλα με συγκεντρώσεις 500 mg/L και 18 mg/L αντίστοιχα. Έχουν αναβολική δράση και κυρίως μέσω της προαγωγής της αναβολικής δράσης της αυξητικής ορμόνης. Ό IGF II βρίσκεται σε σημαντικά μικρότερες συγκεντρώσεις στο βόειο πρωτόγαλα από ότι ο IGF I. .Η αντοχή τους τόσο στην αυξημένη θερμότητα όσο και σε όξινα περιβάλλοντα τους επιτρέπει να παραμένουν δραστικά ακόμη και μετά από επεξεργασία [41].

Αυξητική ορμόνη (GH)

Η GH παρούσα στο βόειο και ανθρώπινο πρωτόγαλα έχει σαφείς αναβολικές δράσεις σε πολλαπλά συστήματα του οργανισμού. Πιθανολογείτε ότι οι περισσότερες δράσεις της πραγματοποιούνται μέσω της απελευθέρωσης της IGF-I και δευτερευόντως ότι έχει πιθανή επίδραση απευθείας στον μηχανισμό της κυτταρικής μίτωσης. Σημαντικότατη η συμβολή της για ανάπτυξη του εντέρου την ,αύξηση της μυϊκής μάζας, επιμετάλλωση οστών, αύξηση πρωτεϊνοσύνθεσης λιπόλυση, αύξηση γλυκο-νεογένεσης και ωρίμανσης ανοσοποιητικού συστήματος και πολλαπλών οργάνων.

Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF)

Ο EGF είναι ένα πεπτίδιο με μεγαλύτερη συγκέντρωση στο ανθρώπινο πρωτόγαλα 200 mg/L.Έχει αναβολική δράση όντας παράγοντας που επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και διαίρεση. Στα νεογνά παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εντέρου που είναι ακόμη ανώριμο. Επιπλέον, παρεμποδίζει την βακτηριδιακή διασπορά μέσα στον οργανισμό.

TGF-a Τροποποιητικοί αυξητικοί παράγοντες

Ο TGF α είναι πρωτεΐνη παρούσα και στο γάλα αλλά και στο πρωτόγαλα. Προστατεύει τον εντερικό βλεννογόνο καθώς και την λειτουργικότητα του επιθηλίου.

TGF-b

Ο ρόλος του TGF-β διαφέρει ουσιαστικά σε σχέση με τον TGF-α καθώς αυτός λειτουργεί περιοριστικά σε ότι αφορά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο βασικός του ρόλος είναι η προσέλκυση ουδετερόφιλων κυττάρων σε περιοχές φλεγμονής ή βλάβης. Επίσης κινητοποιεί υγιή επιθηλιακά κύτταρα σε περιοχές με βλάβη προς αποκατάσταση [41].

5. Βόειο πρωτόγαλα και άσκηση

Η σύσταση του πρωτογάλατος καθότι εμπεριέχει μεγάλη ποικιλία από ανοσολογικούς και αναβολικούς παράγοντες, αποτελεί ένα εκτενές πεδίο προς διερεύνηση. Η εξωγενής χορήγηση βόειου πρωτογάλατος (BC) καθώς και η συσχέτιση αυτής με παραμέτρους όπως αθλητική αποκατάσταση, μυϊκή ανάπτυξη και γενικότερα αθλητική απόδοση είναι κάτι το οποίο έχει αρχίσει να ερευνάται συστηματικότερα. Σε έρευνα που μελέτησε την επίδραση κατανάλωσης BC και την συσχέτιση αυτής με το οξειδωτικό στρες σε πειραματόζωα φάνηκαν ενδιαφέροντα στοιχεία, κυρίως ως προς αντιοξειδωτικούς και οξειδωτικούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, ανάμεσα στις 4 ομάδες που εξετάστηκαν με πρώτη την ομάδα να είναι ελέγχου, την δεύτερη ομάδα λήψης μόνο BC,την τρίτη ομάδα λήψης BC και συμμετοχή σε 30 min τρέξιμο/day και τέταρτη ομάδα άσκησης μόνο βρέθηκε, αύξηση πρωτεϊνικού περιεχομένου και στις ομάδες που εκτέθηκαν σε άσκηση και ιδιαίτερα σε αυτή που έλαβε και BC. Η λιπιδική υπεροξειδάση φάνηκε να μειώνεται στατιστικά σημαντικά στις ομάδες που έλαβαν το BC ενώ παρουσίασε αύξηση στην ομάδα της άσκησης. Όσο αφορά την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) τα αποτελέσματα ήταν ακριβώς αντίθετα λόγω και του ότι αποτελεί αντιοξειδωτικό παράγοντα συγκριτικά με την λιπιδική υπεροξειδάση. Επιπλέον, το συνολικό αντιοξειδωτικό προφίλ του μυός στις ομάδες λήψης BC με ή χωρίς άσκηση φάνηκε αυξημένο ενώ στην ομάδα της άσκησης χωρίς BC ελαφρά μειωμένο [43]. Σε έρευνα με παρέμβαση 8 εβδομάδων (BC) φάνηκε αυξημένη απόδοση στην ταχύτητα αθλητών χόκεϋ στα επαναλαμβανόμενα σπριντ. Αλλαγές σε σωματομετρικά χαρακτηριστικά και απόδοση σε επιτόπιο άλμα δεν φάνηκε να υπάρχουν[44]. Σε άλλες μελέτες στις οποίες φάνηκαν αντικρουόμενα αποτελέσματα όσο αφορά την επίδραση του BC στην αθλητική απόδοση η αιτία πιθανολογείτε πως ήταν η διαφορά στα προπονητικά πρωτόκολλα. Στην έρευνα που φάνηκε ευεργετική επίδραση στην απόδοση των ποδηλατών η άσκηση ήταν υπομέγιστη και με διάρκεια <2h ενώ στις μελέτες που δεν φάνηκαν ευεργετικές επιδράσεις του BC στην απόδοση αθλητών αντοχής η διάρκεια ήταν <40min.[45] Μετά την ανασκόπηση του 2002 και τις παραπάνω μελέτες, το 2006 μια ακόμη μελέτη πάνω σε ποδηλάτες υψηλού επιπέδου έδειξε ενδιαφέρον εύρημα. Το πρωτόκολλο αποτελούταν από 40km/day για 5 ημέρες με υψηλή ένταση. Στην ομάδα ελέγχου φάνηκε μείωση στο αναερόβιο κατώφλι κατά 14% ενώ στην ομάδα λήψης BC δεν φάνηκε κάποια μείωση [46].Όσο αφορά την επίδραση του BC στην

πρωτεινοσύνθεση, σε μελέτη το 2005 φάνηκε κάποια επίδραση στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών. Παρατηρήθηκε αύξηση στην πρωτεινοσύνθεσης και αυξημένα επίπεδα αμινοξέων, χωρίς όμως αυτό να μεταφράζεται και σε αύξηση μυϊκής δύναμης. Το προπονητικό επίπεδο των ελίτ αθλητών πιθανότατα είναι περιοριστικός παράγοντας, καθότι αυτοί οι αθλητές βρίσκονται πολύ κοντά στα γεννητικά τους όρια [47].

Όσο αφορά την συσχέτιση του BC με την πιθανή μεταβολή στην ανοσολογική ικανότητα των αθλητών τα δεδομένα δείχνουν ότι στην περίπτωση κολυμβητών φάνηκε μείωση στην συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού χωρίς να φανεί αντίστοιχα κάποια αύξηση στις ανοσοσφαιρίνες ορού. Σε αντίστοιχη έρευνα με μαραθωνοδρόμους οι Igs ανοσοσφαιρίνες φάνηκαν να έχουν αυξηθεί στατιστικά σημαντικά.[48].Θετικές επιδράσεις στην απόδοση, αποκατάσταση, και αντιοξειδωτική ικανότητα του BC κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες και προπονητικά ερεθίσματα φαίνετε να υπάρχουν. Επιπλέον μελέτες χρειάζεται να πραγματοποιηθούν προκειμένω να διεξαχθούν συμπεράσματα και σαφέστερες συσχετίσεις.

6. ΣΚΟΠΟΣ:

Αθλήματα με χαρακτηριστικό την μετατόπιση του σωματικού βάρους κάτω από συνθήκες υψηλής έντασης και ταχύτητας συνήθως εκθέτουν πολλαπλά συστήματα του οργανισμού σε ακραία ερεθίσματα. Τόσο οι ασκησιογενείς μυϊκές βλάβες όσο και το ασκησιογενές στρες λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικό μέτρο ανάλογα την ένταση της περιόδου, το υπόβαθρο του αθλητή αλλά και από επιπλέον περιβαλλοντικούς και μη παράγοντες. Το ενδογενές αντιοξειδωτικό δυναμικό του αθλητή, όπως κυρίως εκφράζεται από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης αλλά και στα κλινικά συμπτώματα που επακολουθούν μέσω της ρύθμισης του οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων. Το βόειο πρωτόγαλα είναι ένα συμπλήρωμα στο οποίο έχουν προσδιορισθεί από την βιβλιογραφία παράγοντες ανοσολογικοί, αντιοξειδωτικοί ,αυξητικοί και αντιφλεγμονώδεις. το οποίο έχει δείξει τροποποιήσεις στο οξειδωτικό στρες και στα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού μετά από άσκηση σε πειραματόζωα. Κάτω από αυτό το πρίσμα στόχοι της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί:

- Κατά πόσο η δραστικότητα των αντιοξειδωτικών σεληνοπρωτεΐνών Gpx3 (σεληνοπρωτεΐνη ορού) και Gpx1 (σεληνοπρωτεΐνη λευκοκυττάρων) διαφοροποιείται ύστερα από πρωτόκολλο που προσομοιάζει κανονικό αγώνα ποδοσφαίρου σε ποδοσφαιριστές χαμηλών Εθνικών κατηγοριών.
- Κατά πόσο η χορήγηση βόειου πρωτογάλακτος επηρεάζει τις μεταβολές της δραστικότητας ύστερα από το πρωτόκολλο άσκησης.
- Κατά πόσο η χορήγησης διαφορετικών ποσοτήτων και μορφών colostrum μπορεί να επηρεάσει τη δραστικότητα των ενζύμων

6.1 : ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Πρωτόκολλα παρέμβασης

6.1.1 1ο Ερευνητικό πρωτόκολλο – Επίδραση χορήγησης colostrum στα επίπεδα λιποειδικών μεσολαβητών έπειτα από πρόκληση ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης

Το δείγμα της έρευνας αποτελούν νέοι ενήλικες αθλητές ποδοσφαίρου:

1. Ενεργά μέλη ομάδας που συμμετέχει σε πρωτάθλημα Ά τοπικής κατηγορίας στο νομό Αττικής
2. Φοιτητές από το Τ.Ε.Φ.Α.Α Αθηνών, οι οποίοι είναι ενεργά μέλη ομάδων που συμμετέχουν σε πρωταθλήματα Β΄ και Γ΄ εθνικής κατηγορίας καθώς και σε τοπικά πρωταθλήματα του Νομού Αττικής.

Οι προϋποθέσεις για την συμμετοχή τους στην μελέτη ήταν:

i Να μην αντιμετωπίζουν κάποιο ορθοπεδικό πρόβλημα, τραυματισμό, κάποια ασθένεια, λοίμωξη, ή φλεγμονή τις δύο τελευταίες εβδομάδες πριν την έναρξη της έρευνας,

ii Να συμμετέχουν κανονικά στις καθημερινές τους προπονήσεις

Επίσης από όλους τους δοκιμαζόμενους ζητήθηκε κατά την διάρκεια της συμμετοχής τους στην έρευνα, να αποφύγουν να χρησιμοποιήσουν οποιοδήποτε αντιφλεγμονώδες ή αναλγητικό φάρμακο. Επιπλέον, σε όλους τους συμμετέχοντες δόθηκαν οδηγίες σχετικά με την διατήρηση των διατροφικών τους συνήθειών κατά το χρονικό διάστημα της συμμετοχής τους στην έρευνα.

Οι εθελοντές που ήρθαν στο εργαστήριο την πρώτη φορά υποβληθήκαν σε αξιολόγηση:

1. ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών
2. σύστασης σώματος
3. μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου
4. μέγιστης ισομετρικής δύναμης (ΜΙΔ).

1η μέτρηση (εβδομάδα μηδέν – 0w): Μια εβδομάδα μετά τις προκαταρτικές μετρήσεις οι εθελοντές ήρθαν στο εργαστήριο για δεύτερη φορά κατά την οποία:

1. Παραλήφθηκε αίμα για βιοχημικές και αιματολογικές εξετάσεις
2. Σάλιο για βιοχημικές εξετάσεις
3. Έγινε μέτρηση της ΜΙΔ
4. Έγινε μέτρηση της σύστασης σώματος με απορροφησιομετρία διπλοενεργειακών φωτονίων (Dual Energy X-Ray Absorptiometry, DXA)

Μετά τις μετρήσεις αυτές οι δοκιμαζόμενοι υποβλήθηκαν στη δοκιμασία (Loughborough Intermittent Shuttle Test, LIST), η οποία προσομοιάζει έναν αγώνα ποδοσφαίρου και ακόλουθα υποβλήθηκαν σε αξιολόγηση της ΜΙΔ και σε αιματολογική εξέταση σε 5 μεταγενέστερες χρονικές στιγμές:

1. Στις 2 ώρες
2. Στις 6 ώρες
3. Στις 24 ώρες
4. Στις 48 ώρες
5. Στις 72 ώρες

Σε αυτό το στάδιο οι εθελοντές χωρίστηκαν τυχαιοποιημένα σε δύο ομάδες. Κάθε ομάδα έλαβε:

Ομάδα Α: Εικονικό σκεύασμα (εμπορικά διαθέσιμη πρωτεΐνη ορού γάλακτος, 3,2g/d)

Ομάδα Β: Συμπλήρωμα BC (Colostrum Compact) σε μορφή χαπιού της εταιρείας LR Health and Beauty Systems (8 χάπια των 400 mg BC ημερησίως, δηλαδή 3,2 g/ημέρα. Το σχήμα θα είναι 3 χάπια το πρωί, τρία το μεσημέρι και δύο το βράδυ με τα κύρια γεύματα).

2η μέτρηση (3ης εβδομάδας – 3w): Στις 3 εβδομάδες προσήλθαν στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο για:

1. Συλλογή αίματος
2. Συλλογή σάλιου
3. DXA

3η μέτρηση(6ης εβδομάδας – 6w): Στη συνέχεια για τις επόμενες 3 εβδομάδες θα συνέχισαν την συμπληρωματική χορήγηση με Β.Π και μετά το πέρας 3 εβδομάδων (σύνολο 6 εβδομάδες) οι εθελοντές ήρθαν στο εργαστήριο για τρίτη φορά κατά την οποία:

1. Παραλήφθηκε αίμα για βιοχημικές και αιματολογικές εξετάσεις
2. Σάλιο για βιοχημικές εξετάσεις
3. Έγινε μέτρηση της ΜΙΔ
4. Έγινε μέτρηση της σύστασης σώματος με απορροφησιομετρία διπλοενεργειακών φωτονίων (Dual Energy X-Ray Absorptiometry, DXA)

Μετά από την χορήγηση των 6 εβδομάδων, στους εθελοντές επαναλήφθηκε όλη η διαδικασία του πρωτοκόλλου LIST όπως και την πρώτη φορά και επαναλήφθηκαν οι μετρήσεις στις 2, 24, 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση. Μέχρι και την τελευταία αιμοληψία οι εθελοντές συνέχισαν να καταναλώνουν το σκεύασμα.

Το πρώτο πρωτόκολο LIST κωδικοποιήθηκε ως BL και το δεύτερο πρωτόκολλο LIST ως FL.

6.1.2. 2ο Ερευνητικό πρωτόκολλο – Επίδραση χορήγησης διαφορετικών μορφών colostrum σε βιοχημικούς δείκτες.

Το δείγμα της έρευνας αποτέλεσαν, οι εθελοντές του πρώτου πρωτοκόλλου καθώς και αθλούμενοι (κυρίως αθλητές) παρόμοιας προπονητικής κατάστασης με αυτούς του 1^{ου} πρωτοκόλλου.

Οι προϋποθέσεις για την συμμετοχή τους στην μελέτη ήταν:

i Να μην αντιμετωπίζουν κάποιο ορθοπεδικό πρόβλημα, τραυματισμό, κάποια ασθένεια, λοίμωξη, ή φλεγμονή τις δύο τελευταίες εβδομάδες πριν την έναρξη της έρευνας,

ii Να συμμετέχουν κανονικά στις καθημερινές τους προπονήσεις

Επίσης από όλους τους δοκιμαζόμενους ζητήθηκε κατά την διάρκεια της συμμετοχής τους στην έρευνα, να αποφύγουν να χρησιμοποιήσουν οποιοδήποτε αντιφλεγμονώδες ή αναλγητικό φάρμακο. Επιπλέον, σε όλους τους συμμετέχοντες δόθηκαν οδηγίες σχετικά με την διατήρηση των διατροφικών τους συνήθειών κατά το χρονικό διάστημα της συμμετοχής τους στην έρευνα.

Οι εθελοντές που ήρθαν στο εργαστήριο την πρώτη φορά υποβληθήκαν σε αξιολόγηση:

1. ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών

2. σύστασης σώματος

1. Παραλήφθηκε αίμα για βιοχημικές και αιματολογικές εξετάσεις

2. Έγινε μέτρηση της σύστασης σώματος με απορροφησιομετρία διπλοενεργειακών φωτονίων (Dual Energy X-Ray Absorptiometry, DXA

Σε αυτό το στάδιο οι εθελοντές χωρίστηκαν τυχαιοποιημένα σε πέντε ομάδες. Κάθε ομάδα έλαβε:

Ομάδα Α: Εικονικό σκεύασμα (εμπορικά διαθέσιμη πρωτεΐνη ορού γάλακτος, 3,2g/d)

Ομάδα Β: Συμπλήρωμα ΒΠ (Colostrum Compact) σε μορφή χαπιού της εταιρείας LR Health and Beauty Systems (8 χάπια των 400 mg BC ημερησίως, δηλαδή 3,2 g/ημέρα). Το σχήμα ήταν 3 χάπια το πρωί, τρία το μεσημέρι και δύο το βράδυ με τα κύρια γεύματα.

Ομάδα Γ: Εικονικό σκεύασμα (εμπορικά διαθέσιμη πρωτεΐνη ορού γάλακτος, 2 χάπια των 400 mg πρωτείνης ημερησίως, δηλαδή 0,8 g/ημέρα)

Ομάδα Δ: Συμπλήρωμα ΒΠ (Colostrum Compact) σε μορφή χαπιού της εταιρείας LR Health and Beauty Systems (2 χάπια των 400 mg BC ημερησίως, δηλαδή 0,8g/ημέρα)

Ομάδα Ε: Υγρό ΒΠ (Colostrum Direct), της ίδιας εταιρείας, συνολική ποσότητας 8 ml/ημέρα σε δοσολογικό σχήμα 4 ml με το πρωινό και 4 ml με το βραδυνό γεύμα.

Μετά από 3 και 6 εβδομάδες χορήγησης οι εθελοντές προσήλθαν ξανά στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο για να επαναλάβουν τις ίδιες μετρήσεις όπως και παραπάνω.

6.1.3. Το συμπλήρωμα πρωτογάλακτος της εταιρείας LR Health and Beauty Systems

Για τις ανάγκες της παρούσας μελέτης in vitro παρούσα χρησιμοποιήθηκε το βόειο πρωτόγαλα της εταιρείας LR Health and Beauty Systems (http://www.lrworld.com/lrweb/index.php?id=984). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η μορφή χαπιού Colostrum Compact και η υγρή μορφή, Colostrum Direct. Ως placebo χρησιμοποιήθηκε η πρωτείνη ορού γάλακτος enerZONA whey protein 90%.

Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται η σύσταση των σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη, όπως αυτή παρουσιάζεται στις διατροφικές ετικέτες των εμπορικών συσκευασιών

Πίνακας 6.1: Αναγραφόμενη σύσταση των σκευασμάτων σε ενέργεια και μακροθρεπτικά συστατικά

Σύσταση	**Σκεύασμα**		
	Colostrum Compact	**Colostrum Direct**	**EnerZona whey protein 90%**
Ενέργεια (kcal/100g)	367	37	395
Πρωτείνες (g/100g)	65	5,6	90
Υδατάνθρακες (g/ 100g)	14	3,6	1
Λιπίδια (g/100g)	5,8	<0,1	0,5

*Για το Colostrum Compact δεν αναφέρεται η σύσταση σε ενέργεια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες.

*Για το Colostrum Direct οι μονάδες μετρήσεις είναι kcal/100ml για την ενέργεια και g/100ml για τις πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και τα λιπίδια. Ωστόσο, καθώς ύστερα από μετρήσεις καταλήξαμε ότι 1ml σκευάσματος σε υγρή μορφή= 1g μπορούν να χρησιμοποιούνται οι μονάδες kcal/100g και g/ 100g αντίστοιχα.

Επιπλέον για το σκεύασμα High protein "No way" της Focusextreme αναγράφεται η λεπτομερής σύσταση στα περιεχόμενα αμινοξέα, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 6.2: Αναγραφόμενη σύσταση σε αμινοξέα

Σύσταση σε αμινοξέα	**Ποσότητα (g/100g)**
L-aspartic acid	11,2
L-threonine	7,2
L-serine	4,6
L-glutamic acid	14,2
L-glutamine	5,56
L-proline	6,5
L-glucine	1,7
L-alanine	5,0
L-valine	6,2
L-methionne	2,0
L-cysteine	2,2
L-isoleukine	7,0
L-leukine	10,6
L-tyrocine	2,8
L-phenylalanine	3,0
L-lysine	9,6
L-hystidine	1,7
L-arginine	1,9
L-tryptophan	1,7

6.1.4. Πρωτόκολλο Loughborough Intermittent Shuttle Test (LIST)

Οι δοκιμαζόμενοι τρέχουν ανάμεσα σε 2 γραμμές οι οποίες απέχουν μεταξύ τους 20m. Η ταχύτητα του δοκιμαζόμενου αλλάζει συνεχώς και αντιστοιχεί σε συγκεκριμένα ποσοστά της VO_{2max} των αθλητών και οι οποίες υπαγορεύονται από ηχητικό σήμα από ειδικά διαμορφωμένο πρόγραμμα υπολογιστή. Πιο συγκεκριμένα οι περίοδοι άσκησης έχουν ως εξής:

1. 3 x 20 m περπάτημα
2. 1 x 20 m σπριντ (μέγιστη ταχύτητα)
3. 4 sec αποκατάσταση
4. 3 x 20 m σε ταχύτητα που αντιστοιχεί στο 55% VO2max
5. 3 x 20 m σε ταχύτητα που αντιστοιχεί στο το 95% VO2max

Αυτό το μοτίβο ακολουθείται για διαστήματα 15min τα οποία ακολουθούνται από αντίστοιχα 3λεπτα διαστήματα ανάπαυσης. Η συνολική χρονική διάρκεια του τεστ θα είναι 90min. Το πρωτόκολλο LIST θα γίνει στο Δημοτικό Γήπεδο Καλλιθέας ύστερα από έγγραφη αίτηση προς το Δήμο για τη χρήση του.

6.2. Μέθοδοι και εργαλεία εκτίμησης των αποτελεσμάτων

2.2.1. Ανθρωπομετρία

Το σωματικό βάρος των εθελοντών μετρήθηκε με τα εσώρουχα και χωρίς υποδήματα, σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας (Seca, Αμβούργο, Γερμανία) και με ακρίβεια 0,1kg. Το ύψος μετρήθηκε με τη χρήση εντοιχισμένου αναστημόμετρου (Seca, Αμβούργο, Γερμανία) και με ακρίβεια 0,5cm. Οι μετρήσεις αυτές έγιναν εις διπλούν. Επίσης υπολογίστηκε ο μέσος όρος του βάρους και του ύψους κάθε εθελοντή, από όπου και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο ΔΜΣ ως το πηλίκο του βάρους (σε kg) προς το τετράγωνο του ύψους (σε m).

6.2.2. Σύσταση σώματος

Η σύσταση του σώματος σε άλιπη και λιπώδη μάζα προσδιορίστηκε περίπου 1 εβδομάδα πριν από την έναρξη της μελέτης για κάθε εθελοντή ξεχωριστά, με τη μέθοδο της απορροφησιομετρίας ακτινών Χ διπλής ενέργειας (dual-energy X-ray absorptiometry, DXA), χρησιμοποιώντας τον σαρωτή σώματος (model DPX, Lunar Corp., Madison, WI, software version 3.6), ο οποίος βρίσκεται στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Η ανάλυση του

ολικού σώματος έγινε σε μέτρια ταχύτητα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πριν τη διαδικασία της σάρωσης οι εθελοντές αφαίρεσαν τα μεταλλικά αντικείμενα που έφεραν, ώστε να μην επηρεαστεί η μέτρηση. Ο προσδιορισμός της λιπώδους και άλιπης μάζας σώματος καθώς και της οστικής πυκνότητας έγινε με κατάλληλο λογισμικό πρόγραμμα που προτείνει ο κατασκευαστής (version 4.6). Ο συνολικός χρόνος σάρωσης έχει διάρκεια περίπου 20 min. Οι εθελοντές θα προσήλθαν για τη μέτρηση αυτή χωρίς να έχουν καταναλώσει φαγητό ή ποτό κατά τις προηγούμενες 3 ώρες.

6.2.3. Υπολογισμός Μέγιστης Πρόσληψης Οξυγόνου

Η μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου των εθελοντών αξιολογήθηκε με τεστ αυξανόμενης έντασης σε δαπεδοεργόμετρο. Μετά από προθέρμανση λίγων λεπτών, ο κάθε δοκιμαζόμενος ακολούθησε ένα πρωτόκολλο αυξανόμενης έντασης και παράλληλα μετρήθηκε η πρόσληψη οξυγόνου (Sensormedics, Vmax229, Yorba Linda CA), η μέγιστη καρδιακή του συχνότητα καθώς και η καρδιακή του συχνότητα σε κάθε στάδιο. Η κλίση του δαπεδοεργόμετρου ρυθμίστηκε σε κλίση 1% (φυσικό χόρτο ή πλαστικό χόρτο), ξεκινώντας από τα 8km/h και στη συνέχεια αυξήθηκε κατά 1km/h κάθε 2min ώσπου να παρατηρηθεί σταθεροποίηση (plateau) στο ρυθμό πρόσληψης οξυγόνου ή να εξαντληθεί ο δοκιμαζόμενος. Από την μετρηθείσα VO_{2max} υπολογίστηκε η ταχύτητα που αντιστοιχεί στο 55 και 95% της VO_{2max}. Μετά από την μέτρηση οι δοκιμαζόμενοι δοκίμασαν το LIST για 30min για εξοικείωση.

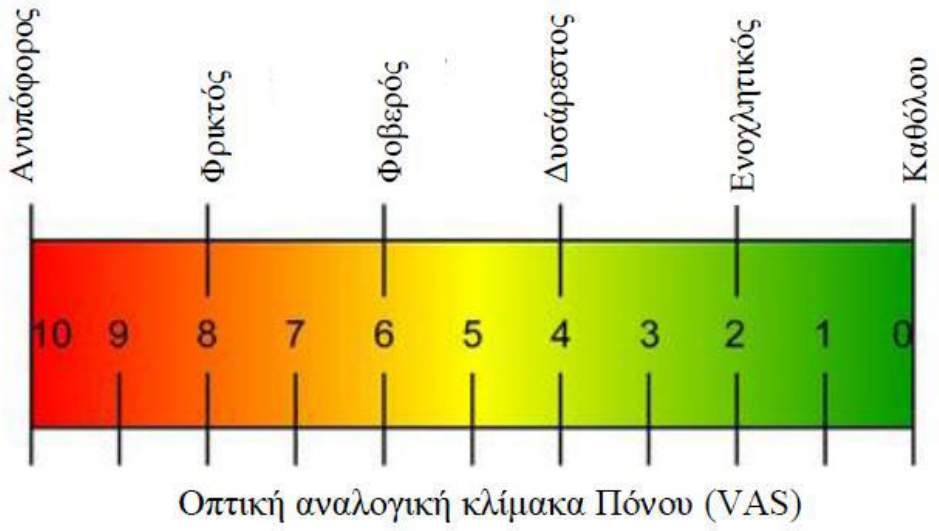
6.2.4. Προσδιορισμός μυϊκής δύναμης

Η μέτρηση της μέγιστης ισομετρικής ροπής, πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια του ισομετρικού δυναμόμετρου (BIODEX). Ωστόσο, πρέπει να προστεθεί πως η κάθε ισομετρική αξιολόγηση επαναλαμβάνεται 3 φορές (συνολικά 3 προσπάθειες), και για τους μετέπειτα υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε η μέγιστη τιμή ροπής εκ των τριών προσπαθειών. Μεταξύ των διαδοχικών προσπαθειών, παρέχεται στον δοκιμαζόμενο χρόνος ξεκούρασης 2 λεπτών. Η μέτρηση ΜΙΔ θα γίνει στο εργαστήριο Εργοφυσιολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

6.2.5. Αντίληψη καθυστερημένου μυϊκού πόνου

Για την αξιολόγηση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου χρησιμοποιήθηκε μία οπτική αναλογική κλίμακα (Visual Analog Scale – VAS) (υποκειμενικής αξιολόγησης του πόνου) 10 σημείων, η οποία συνίσταται από μία ευθεία γραμμή μήκους 10 εκατοστών όπου, η μία της άκρη αντιστοιχεί στην ένδειξη «καθόλου πόνος» και η άλλη της στην ένδειξη «ανυπόφορος πόνος» (σχήμα) (105).

Οι δοκιμαζόμενοι καλούνταν να αξιολογήσουν το επίπεδο του πόνου σημειώνοντας το σημείο της κλίμακας που καλύτερα αντανακλούσε τον πόνο που αισθανόταν, όταν ο ερευνητής ψηλαφούσε την περιοχή των μυών: τετρακέφαλου, δικεφάλου, προσαγωγών, απαγωγών και γαστροκνήμιου. Η κλίμακα αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε ανάλογες έρευνες και έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί έγκυρη και αξιόπιστη κλίμακα (αριθμητική) για την αξιολόγηση του πόνου σε κλινικές ή πειραματικές συνθήκες. Παρέχει δε την δυνατότητα παραμετρικής στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων.



Σχήμα 6.1: Παράδειγμα απεικόνισης οπτικής αναλογικής κλίμακας αξιολόγησης του πόνου

6.2.6. Αιμοληψίες

Όλες οι αιμοληψίες έγιναν σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο του Εργαστηρίου Διατροφής και Κλινικής Διαιτολογίας από έμπειρο προσωπικό που ανήκει στο ίδιο εργαστήριο παρουσία γιατρού. Πριν από κάθε αιμοληψία προηγήθηκε ένα 12ώρο νηστείας.

Σε κάθε αιμοληψία ελήφθησαν συνολικά 23 mL αίματος. Από αυτά τα 10 mL χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση ορού (vacutainers ορού), τα 2 mL για τη γενική αίματος (vacutainers με αντιπηκτικό EDTA), τα 6 mL για απομόνωση πλάσματος και ερυθροκυττάρων (vacutainers με αντιπηκτικό EDTA) και τα υπόλοιπα 5 mL για την απομόνωση λευκοκυττάρων.

6.2.7. Απομόνωση ορού και πλάσματος από το αίμα

Όργανα

Φυγόκεντρος (Avanti 30 centrifuge, Beckman)

Αναλυτική πορεία

Δέκα (10) mL αίματος λήφθηκαν σε σωλήνες αιμοληψίας κενού των 10 mL και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 1500 x g για 10 min σε θερμοκρασία 20 ^{o}C και παραλήφθηκε το υπερκείμενο, που αποτελεί τον ορό. Το υπερκείμενο μοιράστηκε σε σωλήνες τύπου eppendorfs και φυλάχθηκε στους - 80 ^{o}C.

Για την παραλαβή του πλάσματος έξι (6) mL αίματος λήφθηκαν σε σωλήνες αιμοληψίας κενού με αντιπηκτικό EDTA. Οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν στα 1500 x g για 10 min σε θερμοκρασία 20 ^{o}C και παραλήφθηκε το υπερκείμενο, που αποτελεί τον πλάσμα. Το υπερκείμενο μοιράστηκε σε σωλήνες τύπου eppendorfs και φυλάχθηκε στους - 80 ^{o}C.

6.2.8. Παραλαβή και ομογενοποίηση λευκοκυττάρων

Όργανα

- ✓ Φυγόκεντρος (Avanti 30 centrifuge, Beckman)
- ✓ Ομογενοποιητής υπερήχων (Bandelin Sonoplus sonicator GM 2070, Germany)

Διαλύματα

- ✓ Δεξτράνη 3% διαλυμένη σε φυσιολογικό ορό (NaCl 0,15 M)
- ✓ Διάλυμα λύσης ερυθροκυττάρων (lysis buffer): 155 mM NH4Cl, 10 mM KHCO3 και 0,1 mM EDTA
- ✓ Διάλυμα αναδιάλυσης Tris (50 mM-pH 7,4)
- ✓ Φυσιολογικός ορός (NaCl 0,15 M)
- ✓ HCl 1N

Αναλυτική πορεία

Σε ηπαρηνισμένους σωλήνες των 10 mL προστέθηκαν 5 mL αίματος. Προστέθηκαν 1,7 mL διαλύματος δεξτράνης 3% διαλυμένης σε NaCl 0,15 M σε θερμοκρασία δωματίου και έγινε ήπια ανάδευση. Το μείγμα αφέθηκε για καταβύθιση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 h. Λήφθηκε το υπερκείμενο (leykocyte rich plasma- LRP) και φυγοκεντρήθηκε στα 500 x g για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε με απόχυση και το ίζημα αναμείχθηκε με 5 mL διαλύματος λύσης και αφέθηκε για 5 min. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 300 x g για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα των κυττάρων

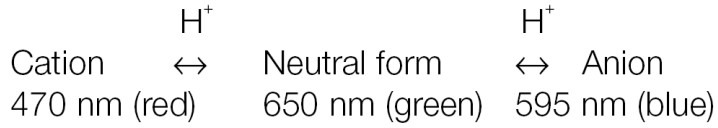
αναδιασπάρθηκε σε 1 mL Tris 50mM pH 7,4. Ακολούθησε κατεργασία με υπέρηχους (sonicator) για 10 sec (x 4) (υπό ψύξη) με μεσοδιάστημα 30 sec για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση του ομογενοποιήματος (μέση ισχύς 30- 40%). Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στα 500 x g για 10 min στους 4 ^{o}C, λήφθηκε το υπερκείμενο και μοιράστηκε σε σωλήνες τύπου eppendorf και φυλάχθηκε στους - 80 ^{o}C.

6.2.9 Προσδιορισμός πρωτεΐνης σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων με τη μέθοδο Bradford

Αρχή μεθόδου

Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 η οποία απαντά σε 3 μορφές: την κατιονική (κόκκινο χρώμα και μέγιστη απορρόφηση στα 465nm), την ουδέτερη (πράσινο χρώμα και μέγιστη απορρόφηση στα 650nm) και την ανιονική (μπλε χρώμα και μέγιστη απορρόφηση στα 595nm).

Εικόνα 1: Οι 3 μορφές της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 και οι αντίστοιχες απορροφήσεις



Η μέθοδος βασίζεται στην αύξηση της απορρόφησης που συμβαίνει όταν η χρωστική συνδέεται με την πρωτεΐνη σε όξινο περιβάλλον. Δυνάμεις Van der Waals και υδρόφοβες δυνάμεις αναπτύσσονται μεταξύ της χρωστικής και των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα η χρωστική αποκτά 2 πρωτόνια και μετατρέπεται από κόκκινη σε μπλε. Η χρωματική αλλαγή που παρατηρείται οφείλεται στην παρουσία κάποιων βασικών αμινοξέων στις πρωτεΐνες όπως η αργινίνη, η λυσίνη και η ιστιδίνη.

Διαλύματα

- Πρότυπο διάλυμα BSA (Bovine Serum Albumin) - 100 μg/mL
- Αντιδραστήριο Bradford - Αραίωση διαλύματος Bradford με νερό 1:5 (1ml Bradford + 4ml H_2O)

Αναλυτική πορεία

1) Το working διάλυμα BSA υφίσταται διαδοχικές αραιώσεις για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Όλες οι αραιώσεις γίνονται μέσα στα plates.

Πίνακας 2: Αραιώσεις working διαλύματος BSA

Διάλυμα	**Ποσότητα BSA (μg)**	**Ποσότητα H_2O (μg)**	**Τελική ποσότητα BSA (μg/ml)**
Τυφλό	-	200	0
S1	2	198	0,2
S2	5	195	0,5
S3	10	190	1
S4	15	185	1,5
S5	20	180	2,0
S6	25	175	2,5
S7	30	170	3,0

2) Στα δείγματά πραγματοποιείται αραίωση 1:10 σε τελικό όγκο 100 μl (10μl δείγματος + 90μl H_2O) μέσα σε eppendorfs.
3) Από κάθε αραιωμένο δείγμα μεταφέρονται 2-10μl στο plate, γίνεται συμπλήρωση ως τα 200μl με νερό και καλή ανάδευση.
4) Σε κάθε πηγάδι γίνεται προσθήκη 50μl αντιδραστηρίου Bradford, καλή ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5) Φωτομέτρηση στα 595nm.
6)

<u>Υπολογισμοί</u>

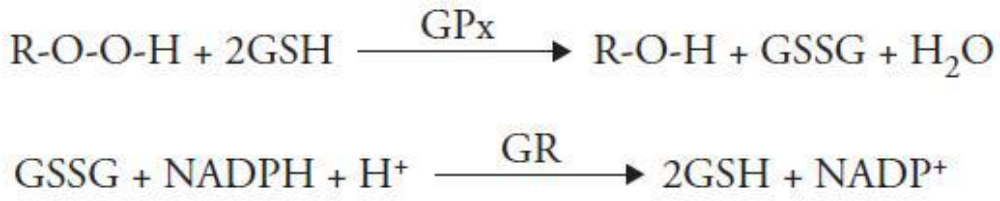
Με βάση την ποσότητα της BSA και την απορρόφηση κατασκευάζουμε την πρότυπη καμπύλη BSA. Από την εξίσωση που μας δίνει η πρότυπη καμπύλη υπολογίζουμε την ποσότητα πρωτεΐνης

6.3.1. Προσδιορισμός της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης πλάσματος

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) καταλύει την αναγωγή των υδρουπεροξειδίων, συμπεριλαμβανομένων και των υπεροξειδίων του υδρογόνου, με τη βοήθεια της ανηγμένης γλουταθειόνης και έτσι λειτουργεί ως προστατευτικός μηχανισμός ενάντια στην οξειδωτική καταστροφή των κυττάρων. Το ένζυμο χρησιμοποιεί την γλουταθειόνη ως το μοναδικό δότη ηλεκτρονίων προκειμένου να αναγεννηθεί η ανηγμένη μορφή της σεληνοκυστεΐνης.

Στο συγκεκριμένο πείραμα η δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) μετρήθηκε έμμεσα μέσω μιας συζευγμένης αντίδρασης με την αναγωγάση της γλουταθειόνης (Glutathione Reductase, GR). Η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), που παράγεται ύστερα από την αναγωγή των υδρουπεροξειδίων από την GPx, μετατρέπεται ξανά στην ανηγμένη της μορφή από την αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR) και το NADPH, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Σχήμα 6.2 : Αντίδραση αναγωγής υδρουπεροξειδίων και αναγέννησης της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH: ανηγμένη γλουταθειόνη, GSSG: οξειδωμένη γλουταθειόνη, NADPH: β- νικοτιναμιδο αδενινο φωσφορικό δινουκλεοτίδιο, ανηγμένη μορφή, NADP+: β-νικοτιναμιδο αδενινο φωσφορικό δινουκλεοτίδιο, οξειδωμένη μορφή)

Η οξείδωση του NADPH σε NADP+ συνοδεύεται από μία μείωση στην απορρόφηση στα 340nm. Υπό συνθήκες όπου η δραστικότητα της GPx μειώνεται, ο ρυθμός της μείωσης της απορρόφησης στα 340nm είναι ανάλογος της δραστικότητας της GPx στο δείγμα. (63)

6.3.2. Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Sodium Phosphate Buffer, PBS) 50 mM με EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid) 0.4 mM, pH 7.0 **(PBS/EDTA)** : διαλύθηκαν 0,5999 g NaH_2PO4 και 0,0166 g EDTA σε 100 mL απεσταγμένο νερό. Το pH ρυθμίστηκε με την χρήση NaOH 1M

Διάλυμα νατραζιδίου (NaN_3) 1 mM σε PBS 50 mM/EDTA 0.4 mM/pH 7.0 **(PBS/Sodium azide)**: διαλύθηκαν 0,0032 g NaN3 σε 50 mL PBS/EDTA

Διάλυμα αναγωγάσης της γλουταθειόνης 100 U/mL **(GR)**: Αραίωση stock διαλύματος αναγωγάσης με παγωμένο απεσταγμένο νερό. Παρασκευάζεται αμέσως πριν το πείραμα.

Διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης 200 mM **(GSH)**: 0,0615 g GSH σε 1 mL απεσταγμένο νερό

Διάλυμα H_2O2 0.042% **(H2O2)**: 14 μL διαλύματος H_2O_2 30% και 9986 μL απεσταγμένο νερό.

Διάλυμα NADPH: 1 mg NADPH σε 100 μL PBS/EDTA

6.3.3. ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Λίγο πριν το πείραμα παρασκευάστηκαν τα διαλύματα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H2O2).Το μίγμα αντίδρασης παρασκευάστηκε σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Αντιδραστήριο	**Ποσότητα**
PBS/Sodium azide	**9200 μL**
GR	**100 μL**
GSH	**50 μL**
NADPH	**1 mg**

Το διάλυμα διατηείται στους 25 ^oC.

Η αντίδραση γίνεται σε μικροπλακίδια σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Τυφλό	**Δείγμα**
Μίγμα αντίδρασης	200 μL	200 μL
Φυσιολογικός ορός	50 μL	
Ορός		50
	Ανάμιξη με το tip και παραμονή 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.	
Διάλυμα H_2O_2	5 μL	5 μL
	Μέτρηση Α στα 340 nm για 7 min ανά 1 min με τη χρήση φωτομέτρου μικροπλακιδίων τύπου ELISA στους 25 ^oC	

Ο υπολογισμός της δραστικότητας έγινε σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

Units/mL παρασκευάσματος = (ΔA/min, sample – ΔA/min, blank) x 2 x 0,255 / (5,60 x 0,05)

όπου:

[2]: Τα 2 μmoles της GSH που παράγονται για κάθε μmole NADPH που οξειδώνεται

[0,255]: Ο τελικός όγκος του assay σε mL

[5,60] : ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του NADPH στα 340 nm και για όγκο 0,255 mL (μήκος οπτικής διαδρομής: 0,9 cm)

[0,05] : Ο όγκος του διαλύματος της GPX που χρησιμοποιείται στο προσδιορισμό [57]

[Ορισμός Unit]: Ένα unit είναι η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει την οξείδωση από το H2O2 1,0 μmole ανηγμένης γλουταθειόνης σε οξειδωμένη γλουταθειόνη ανά λεπτό σε ph=7,0 στους 25 oC.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΩΝ (GPX1)

Η μέτρηση της δραστικότητα της GPX1 σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων γίνεται ακριβώς όπως και της GPX3 με τη διαφορά ότι ως δείγμα χρησιμοποείται ομογενοποίημα λευκοκυττάρων ποσότητας 20-50 μg σε πρωτείνη. Υπολογίζεται η δραστικότητα του ενζύμου σε U/ml και στη συνέχεια διαιρώντας με τα συγκέντρωση του ομογενοποιήματος σε πρωτείνης σε mg/ml υπολογίζεται η ειδική δραστικότητα του ενζύμου σε U/mg.

6.4 Στατιστική ανάλυση

Η κανονικότητα των συνεχών μεταβλητών εξετάστηκε με εφαρμογή του ελέγχου Kolmogorov-Smirnov. Όλες οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± SD (standard deviation, τυπική απόκλιση). Οι συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών έγιναν με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson r. Για τη μελέτη της επίδρασης του χρόνου της παρέμβασης, καθώς και του είδους της παρέμβασης στις μεταβολές των μετρούμενων παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε η απλή συσχετισμένη ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Εξαιτίας των πολλαπλών συγκρίσεων χρησιμοποιήθηκε η διόρθωση κατά Bonferroni, προκειμένου να γίνει διόρθωση του σφάλματος τύπου Ι ώστε να προσεγγίζει το επίπεδο σημαντικότητας που έχει οριστεί για τους στατιστικούς ελέγχους αυτής της μελέτης. Όλες οι αναφερόμενες τιμές πιθανοτήτων (p) βασίζονται σε αμφίπλευρους ελέγχους και συγκρίνονται στο επίπεδο σημαντικότητας του 5%. Για όλους τους στατιστικούς υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS έκδοση 18.0 (Statistical Package for social sciences, SPSS Inc., Chicago, Illinois, U.S.A.).

7.Αποτελέσματα

7.1 1^{ο} πρωτόκολλο – Ασκησιογενής μυϊκή βλάβη

7.1.1 Ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά

Στον πίνακα 7.1 παρουσιάζονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των βασικών ανθρωπομετρικών – σωματομετρικών και βιοχημικών παραμέτρων όλων των εθελοντών που συμμετείχαν στο 1^{ο} πρωτόκολλο της παρούσας μελέτης πριν την έναρξη της παρέμβασης.

Πίνακας 7.1 :Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά δείγματος

Μεταβλητές	**Μέσος όρος**
Ηλικία (έτη)	20,3 ± 2,1
Υψος (m)	1,79 ± 7
Βάρος (kgr)	75 ± 6,6
B.M.I. (kg/m^2)	23,5 ± 1,9
VO2max (ml/kgr/min)	51,5 ± 2,5
Χρόνος άσκησης/εβδομάδα (min)	379 ± 143
Χρόνος άσκησης με αντιστάσεις/εβδομάδα (min)	137 ± 84
Λευκοκύτταρα (10^3/μL)	5,85 ± 1,37
Ερυθροκύτταρα (10^3/μL)	5,17 ± 0,55
Αιμοσφαιρίνη g/dL	14,7 ± 1,14
Αιματοκρίτης (%)	40,6 ± 2,9
Αιμοπετάλια (10^3/μL)	224 ± 35,5
Δραστικότητα κρεατινικής κινάσης (CK)	158 ± 75
Δραστικότητα γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH)	335 ± 145

7.1.2 Πιθανά στατιστικά σημαντικές Συσχετίσεις μεταξύ σεληνοπρωτεϊνών Gpx1 και Gpx3 με ανθρωπομετρικά, βιοχημικά, κλινικά και εργαστηριακά χαρακτηριστικά.

Αρχικά, αναζητήθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των δραστικοτήτων των GPXs και βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών, κλινικών και εργαστηριακών χαρακτηριστικών πριν το πρωτόκολλο (LIST) σε χρόνο 0h. Η ανάλυση συσχετίσεων κατά Pearson έδωσε τις παρακάτω σημαντικές συσχετίσεις

Πίνακας 7.2 : Σημαντικές συσχετίσεις των GPXs με βασικά χαρακτηριστικά των εθελοντών πριν τη παρέμβαση

	Gpx1	**Gpx3**
WBC (Αριθμός λευκοκυττάρων)	r = - 0,497	
	p=0,06	
TBARS_O	r = 0,569	
	p = 0,027	
Ht_0 Αιματοκρίτης		r = ,507
		p = 0,77

- Η ανάλυση συσχετίσεων κατά Pearson έδειξε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της Gpx1 και του δείκτη υπεροξείδωσης λιπιδίων. (TBARS_O)

- Οριακά στατιστικά σημαντική φάνηκε η αρνητική σχέση μεταξύ αριθμού λευκοκυττάρων και της δραστικότηταw της Gpx1.

7.1.3 Επίδραση των αρχικών επιπέδων των GPXs στις μεταβολές δεικτών AMB μετά από το πρωτόκολλο LIST.

Πίνακας 7.3α : Σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ αρχικών επιπέδων GPX1 και μεταβολών δεικτών AMB μετά από LIST

	Gpx1
VAS_QU_48h **Αίσθηση πόνου τετρακέφαλου 48h**	r = -,520 p= ,056
VAS_QU_AUC **Αίσθηση πόνου τετρακέφαλου (συνολική μεταβολή αίσθησης πόνου.**	r =-,478 p= ,084
LDH_PERC_2h **Perc → ποσοστό μεταβολής**	r = ,582 p= ,023
TBARS_AUC **Συνολική μεταβολή παραμέτρου**	r =-,608 p = ,016
TBARS PERC_2h **Perc → ποσοστό μεταβολής**	r = -,551 P =,033
TBARS_PERC_24 **Perc → ποσοστό μεταβολής**	r =-,453 p= ,090
TBARS_PERC_48h **Perc → ποσοστό μεταβολής**	r =-,604 P = ,017

Πίνακας 7.3β Δείκτες ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης (AMB) και συσχέτιση με Gpx3

	Gpx3
CK_PERC_2 **Perc → ποσοστό μεταβολής**	r =,685 p=,010
CK_PERC_24 **Perc → ποσοστό μεταβολής**	r = ,642 p= ,018
CK_PERC_48 **Perc → ποσοστό μεταβολής**	r = ,578 p= ,038
VAS_QU_48 **QU→ Αίσθηση πόνου τετρακέφαλος μηριαίος**	r =-,052 p = ,063
VAS_AD_2 **AD→ Αίσθηση πόνου Προσαγωγός μύς**	r =,745 P = ,003
VAS_AD_24 **AD→ Αίσθηση πόνου Προσαγωγός μύς**	r = ,0608 p= ,028
VAS_AD_AUC **Αίσθηση πόνου προσαγωγου (συνολική μεταβολή αίσθησης πόνου.**	r =,017 p =,023

- Σε ότι αφορά τον παραπάνω πίνακα 7.3α διακρίνεται η στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση της Gpx1 με την αίσθηση πόνου και την συνολική μεταβολή της αίσθησης πόνου μετά το πρωτόκολλο του LIST.

- Επιπλέον για την ίδια σεληνοπρωτεΐνη διακρίνουμε από τον ίδιο πίνακα στατιστικά αρνητική συσχέτιση με την απόλυτη καθώς και την ποσοστιαία μεταβολή του δείκτη υπεροξείδωσης λιπιδίων σε διαφόρους χρόνους.

- Στον πίνακα 7.3β όπου και αναγράφονται οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ Gpx 3 και δεικτών ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης (AMB) παρατηρείτε στατιστικά θετική συσχέτιση μεταξύ της Gpx3 και του ποσοστού μεταβολής της CK (κρεατινικής κινάσης) σε διάφορους χρόνους.

- Σε ότι αφορά την αίσθηση πόνου η Gpx3 συσχετίζεται θετικά με την μεταβολή και την συνολική μεταβολή αίσθησης πόνου σε ποικίλα σημεία του σώματος

7.1.4 Συσχέτιση των μεταβολών στα επίπεδα δραστικότητας των GPXs με τις μεταβολές σε δείκτες AMB.

Στη συνέχεια των αναλύσεων μας πραγματοποιήθηκε έλεγχος για πιθανές συσχετίσεις των μεταβολών στα επίπεδα δραστικότητας των GPXs στις διάφορες χρονικές στιγμές μετά το LIST (πριν την έναρξη της παρέμβασης) με τις αντίστοιχες μεταβολές που σημειώθηκαν σε δείκτες AMB τις ίδιες χρονικές στιγμές. Οι μεταβολές των διαφόρων μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν εκφράζονται ως % μεταβολή στις 2, 24, 48 και 72 ώρες μετά το LIST. Για την εύρεση στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων έγινε χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson. Τα αποτελέσματα του ελέγχου παρουσιάζονται στο Πίνακα 7.4, στα οποία περιλαμβάνονται μόνο οι συσχετίσεις που παρουσίασαν στατιστική σημαντικότητα ($p<0,05$), καθώς και αυτές που εμφάνισαν οριακή στατιστική σημαντικότητα ($p<0,08$).

Πίνακας 7.4 **Συσχετίσεις σε ποσοστιαίες μεταβολές παραμέτρων (AMB)**

	GPX3 %_2h
VAS_BL_2 **Αίσθηση πόνου τετρακέφαλου 48h**	**r = -,630**
	p= ,021
VAS_AD_2 **Αίσθηση πόνου τετρακέφαλου (συνολική μεταβολή αίσθησης πόνου.**	**r = -,511**
	p= ,074
VAS_AB_2	**r = -,505**
	p= ,079

	GPX3 %_24h
AVTQ_%_24h **Ποσοστιαία μεταβολή Μέσης ροπής τετρακέφαλου**	**r = ,630**
	p= ,021
SQUAT_24h **Επιτόπιο άλμα από στάση**	**r = ,648**
	p= ,017

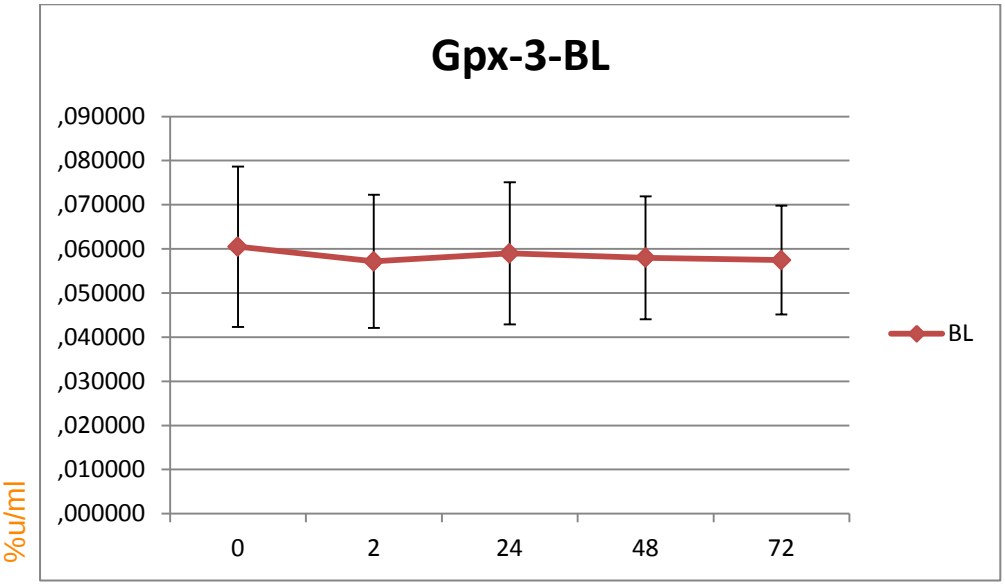
	GPX1 %_2h
LDH_%_2h	**r = -,552**
	p= ,041

	GPX1 %_24h
VAS_BI_24 **Αίσθηση πόνου δικεφάλου μυός 24h**	**r = -,670**
	p= ,012

- Βάση του πίνακα 7.4 οι στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις που προκύπτουν καταδεικνύουν μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ποσοστιαίας μεταβολής αίσθησης πόνου σε διάφορα σημεία και της δραστικότητας της η ποσοστιαίας μεταβολής της Gpx3 στην χρονική φάση 2h μετά το πέρας του πρωτοκόλλου LIST.
- Επιπλέον για την ίδια ποσοστιαία μεταβολή της σεληνοπρωτεΐνης παρατηρούμε θετική στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ποσοστιαία μεταβολή της μέσης ροπής τετρακέφαλου μυός και του επιτόπιου άλματος από στάση.
- Την ίδια αρνητική συσχέτιση φαίνεται να έχει και η Gpx1 με τον πόνο στις 24h μετά το τέλος του LIST.
- Επιπλέον η ποσοστιαία μεταβολή της Gpx1 εμφανίζει και αρνητική σχέση με την ποσοστιαία μεταβολή της LDH στις 2 ώρες.

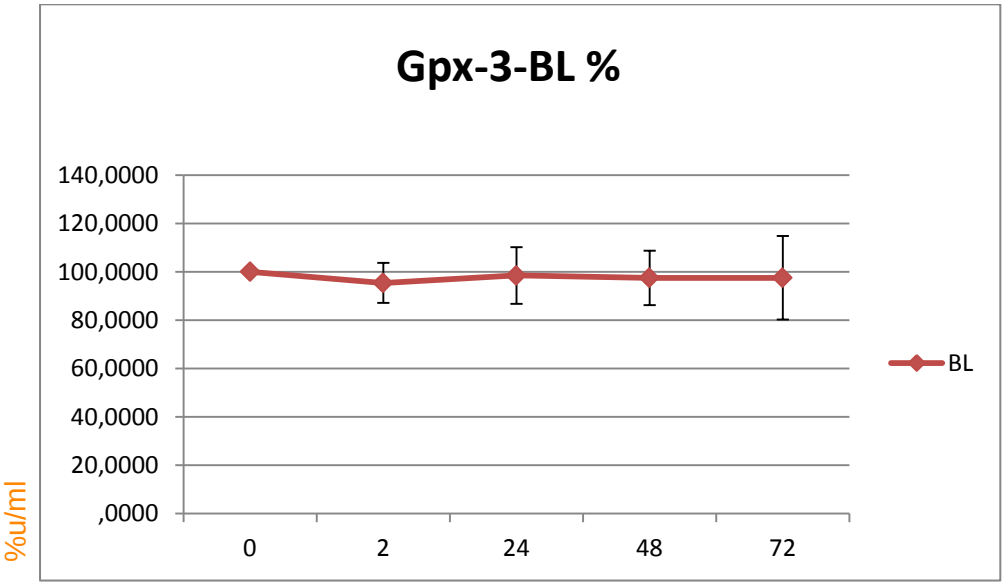
7.1.5 Επίδραση του πρωτοκόλλου LIST στα επίπεδα δραστικότητας των GPXs πριν τη παρέμβαση.

Με σκοπό τη διερεύνηση της επίδρασης της άσκησης στα επίπεδα δραστικότητας των GPXs, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κινητικής των δραστικοτήτων τους μετά το LIST στις 2, 24, 48 και 72 ώρες. Τα αποτελέσματα δίνονται και σε απόλυτες τιμές και σε % μεταβολές στα σχήματα



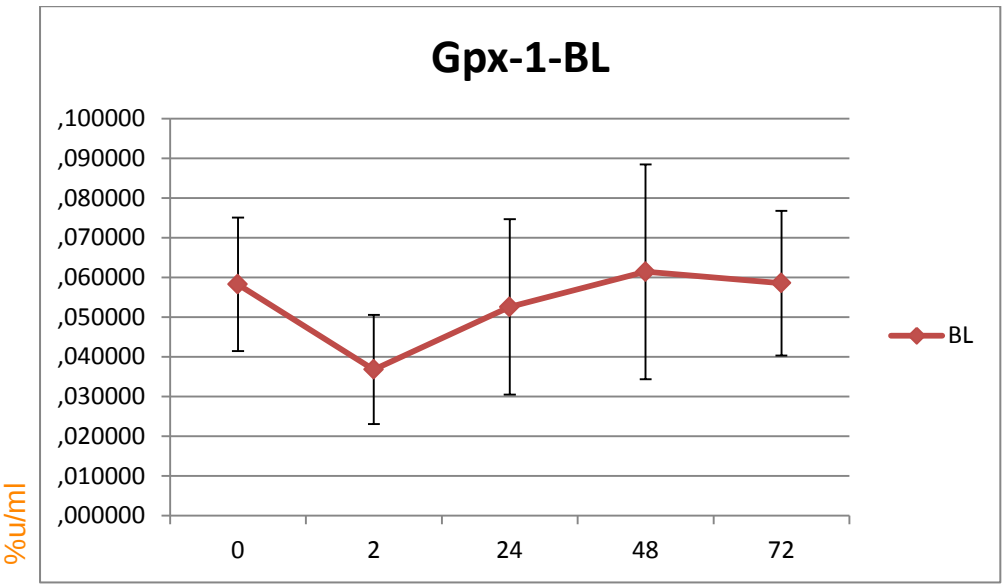
Σχήμα 7.5: Επίδραση πρωτόκολλου LIST στην δραστικότητας της Gpx3 (απόλυτες τιμές)

Στο επόμενο σχήμα γίνεται η ίδια σύγκριση με την διαφορά ότι τα επίπεδα Gpx3 στις 2, 24, 48 και 72 ώρες εκφράζονται ως ποσοστό μεταβολής σε σχέση με τα επίπεδα Gpx3 στις 0 (μηδέν) ώρες.

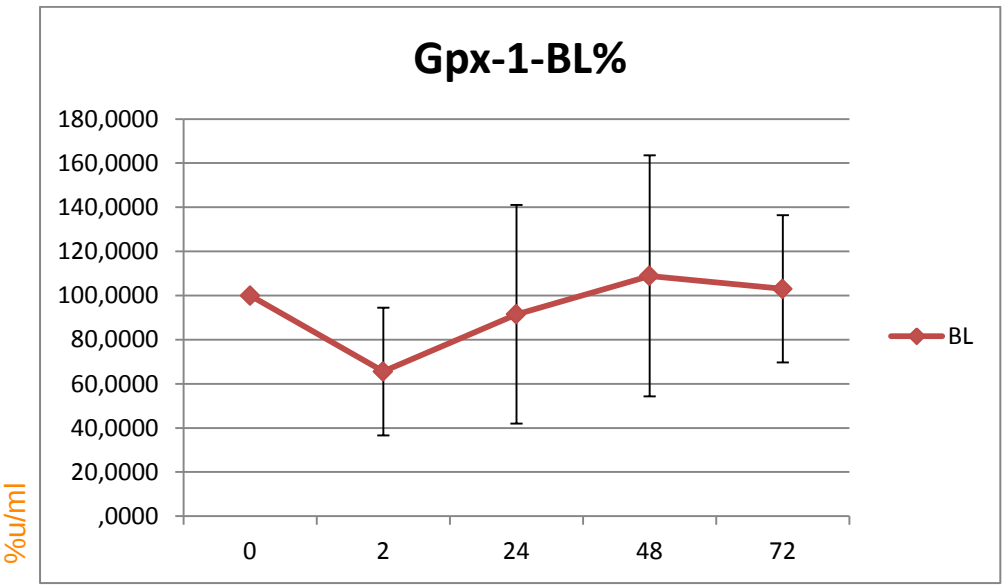


Σχήμα 7.6: Επίδραση πρωτόκολλου LIST στην δραστικότητας της Gpx3 (% μεταβολές)

- Τα παραπάνω σχήματα 7.5 και 7.6 που αφορούν την μεταβολή της δραστικότητας της Gpx3 σε απόλυτη και ποσοστιαία τιμή αντίστοιχα μετά από το πρωτόκολλο LIST δείχνουν μία οριακά στατιστικά σημαντική ($p<0,08$) ελαφριά τάση μείωσης της δραστικότητας στις 2ώρες.



Σχήμα 7.7: Επίδραση πρωτόκολλου LIST στην δραστικότητας της Gpx1 (απόλυτες τιμές)



Σχήμα 7.8: Επίδραση πρωτόκολλου LIST στην δραστικότητας της Gpx1 (% μεταβολές)

- Στα παραπάνω σχήματα 7.7 και 7.8 που αφορούν την μεταβολή της δραστικότητας της Gpx3 σε απόλυτη και ποσοστιαία τιμή αντίστοιχα μετά από το πρωτόκολλο LIST φαίνεται πως υπάρχει στατιστικά σημαντική ($p<0,05$). τάση μείωσης της δραστικότητας κατά 35% στις 2ώρες.

7.1.6 Διαφορές στα χαρακτηριστικά των δύο ομάδων παρέμβασης κατά την έναρξη της παρέμβασης.

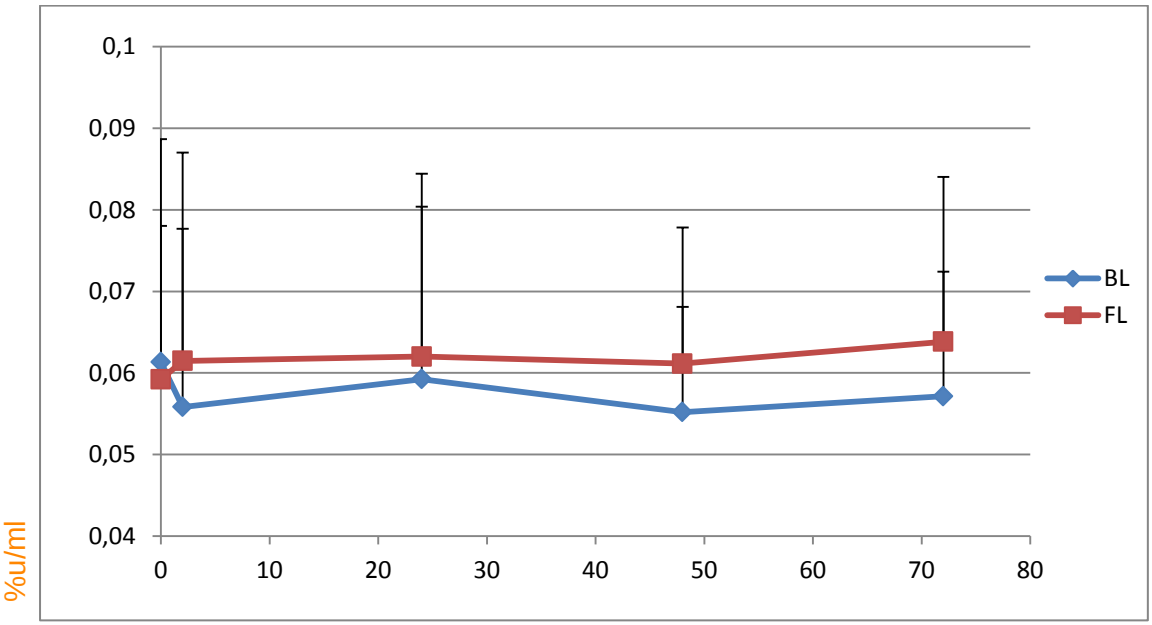
Οι εθελοντές της μελέτης μετά την ολοκλήρωση της πρώτης δοκιμασίας LIST (baseline) χωρίστηκαν τυχαία στις δύο ομάδες παρέμβασης: ομάδα Placebo, όπου χορηγήθηκε πρωτεΐνη ορού γάλακτος και ομάδα Colostum. Πριν την έναρξη της παρέμβασης πραγματοποιήθηκε έλεγχος (T-test) για να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποια διαφορά σε ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των δύο ομάδων, τα αποτελέσματα του οποίου παρουσιάζονται στο Πίνακα.7.9. Σύμφωνα με τα δεδομένα αυτού του πίνακα, οι δύο ομάδες εμφανίστηκαν εξομοιωμένες, καθώς δε παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά σε οποιοδήποτε από τα χαρακτηριστικά που συμπεριλήφθησαν στον έλεγχο, υποδεικνύοντας έτσι μια ομοιογένεια μεταξύ των υποκειμένων στις δύο ομάδες πριν την έναρξη της παρέμβασης.

Πίνακας 7.9.: Σύγκριση χαρακτηριστικών μεταξύ των δύο ομάδων πριν την παρέμβαση.

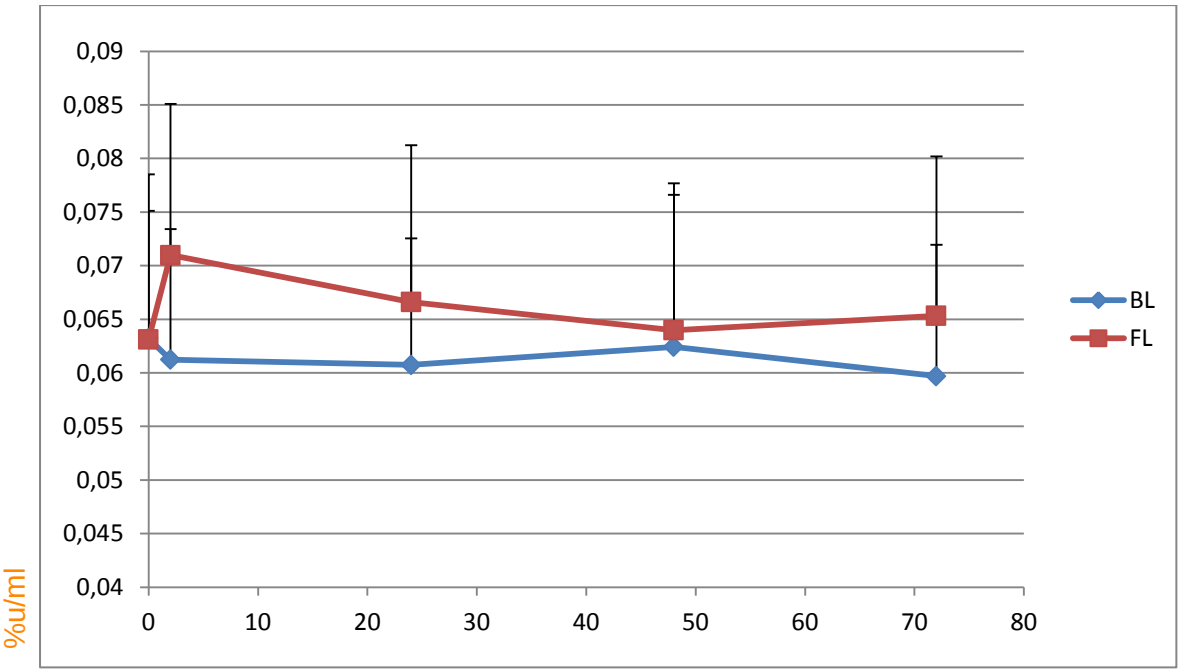
Μεταβλητές	Ομάδα PLACEBO (N=4)	Ομάδα COLOSTRUM (N=7)	P-value
Ηλικία (έτη)	20 ± 2	21 ±2	0,531
Ύψος (m)	1,77 ± 0,5	1,79 ± 0,8	0,558
Βάρος (kgr)	72,2 ± 5,1	74,5 ± 6,1	0,464
B.M.I. (kg/m2)	23,0 ± 0,4	23,2 ± 1,8	0,692
VO2MAX (L/min)	51,8 ± 2,7	51,3 ± 2,4	0,583
Χρόνος προπόνησης/εβδομάδα (min)	394 ± 171	372 ± 174	0,829
Χρόνος προπόνησης με αντιστάσεις/εβδομάδα (min)	120 ± 84	157 ± 93	0,662
Λευκοκύτταρα (10^3/μL)	6,46 ± 1,86	5,61 ± 1,2	0,393
Ερυθροκύτταρα (10^3/μL)	5,11 ± 0,64	5,16 ± 0,49	0,893
Αιμοσφαιρίνη (gr/dL)	14,58 ± 0,91	14,96 ± 1,33	0,544
Αιματοκρίτης (%)	40,52 ± 3,	40,87 ± 3,	0,855
Αιμοπετάλια (10^3/μL)	222 ± 36	226 ± 29	0,856
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων (fL)	8,87 ± 0,85	8,38 ± 0,46	0,435
Μέση ροπή τετρακεφάλου/ βάρος (100nm/kg)	363 ± 34	405 ± 88	0,288
CK	132,2 ± 60,6	152,3 ± 74,5	0,607
LDH	355,7 ± 78,4	276,2 ± 75,9	0,108
TBARS (μM)	1,48 ± 0,49	1,29 ± 0,44	0,501

7.1.7 Επίδραση της παρέμβασης στα επίπεδα Gpx1, Gpx3 στην ομάδα Placebo και ομάδα BC (παρέμβασης).

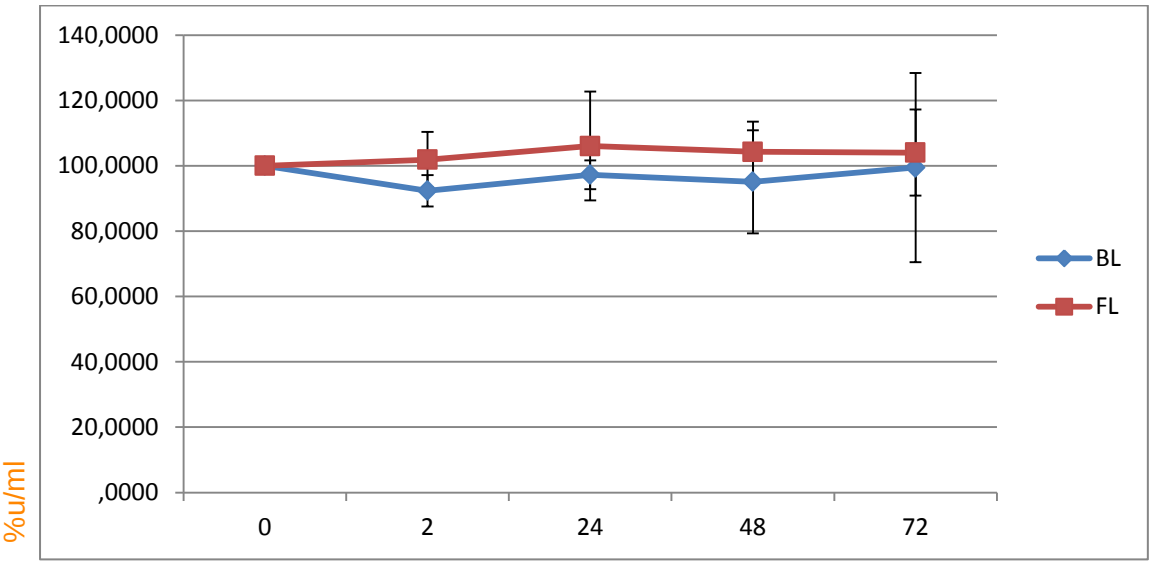
Στο παρακάτω σχήματα παρουσιάζεται η σύγκριση της μεταβολής των δραστικοτήτων της σεληνοπρωτεΐνης Gpx3 στην ομάδα Placebo και ακολούθως με επόμενο σχήμα την ομάδα παρέμβασης για ευκολότερη σύγκριση. Με BL (BASELINE) συμβολίζεται η σειρά μετρήσεων πριν την παρέμβαση και με FL (FOLLOW UP) η σειρά μετρήσεων μετά την παρέμβαση. Υπενθυμίζεται ότι κάθε σειρά περιλαμβάνει μετρήσεις στις 0, 2, 24 ,48 και 72 ώρες. Σε κάθε σειρά μετρήσεων η έναρξη του πρωτοκόλλου έγινε αμέσως μετά την αιμοληψία στις 0h.Μετά το τέλος του LIST έγιναν οι υπόλοιπες 4 αιμοληψίες στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα. Επίσης υπενθυμίζεται ότι οι εθελοντές της ομάδας Placebo λάμβαναν καθημερινά για έξι εβδομάδες (χρονικό διάστημα ανάμεσα στα δύο πρωτόκολλα LIST) 3,2γρ πρωτεϊνών ορού γάλακτος.



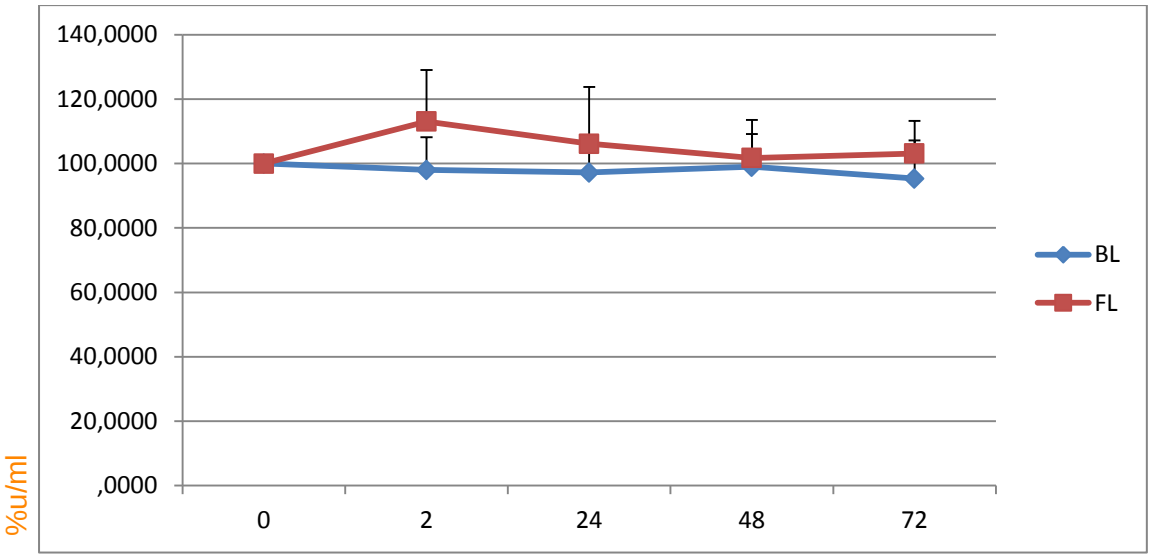
Σχήμα 7.9: : Επίδραση της χορήγησης placebo στην μεταβολή δραστικότητας της Gpx3,πριν και μετά την παρέμβαση.



Σχήμα 7.10: Επίδραση της χορήγησης BC στη δραστικότητας της Gpx3,πριν και μετά την παρέμβαση.

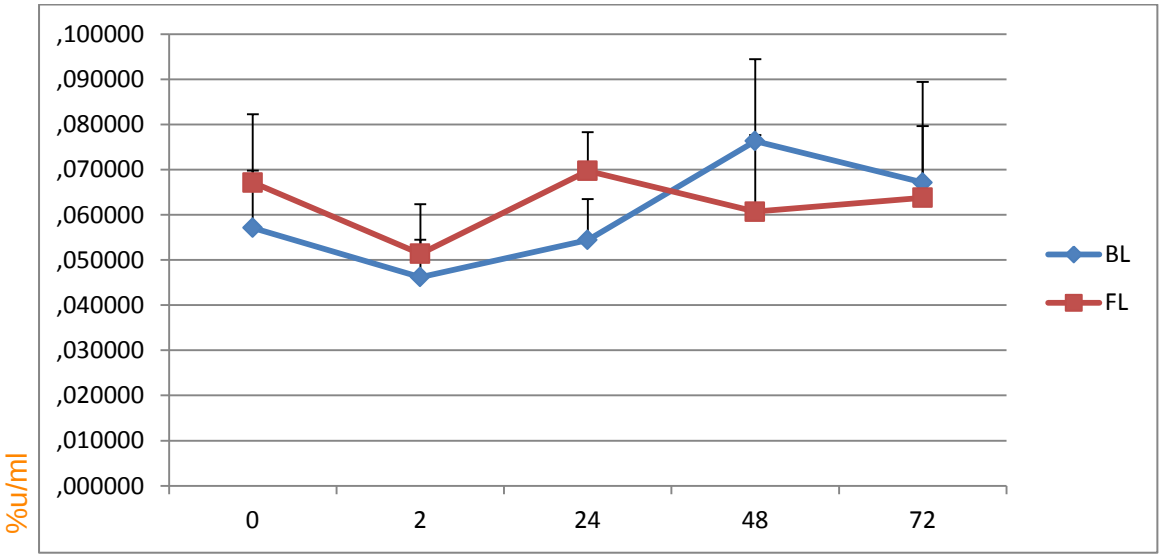


Σχήμα 7.11: Επίδραση Placebo στην μεταβολή δραστικότητας της Gpx3,πριν και μετά την παρέμβαση εκφρασμένη ως ποσοστιαία μεταβολή.

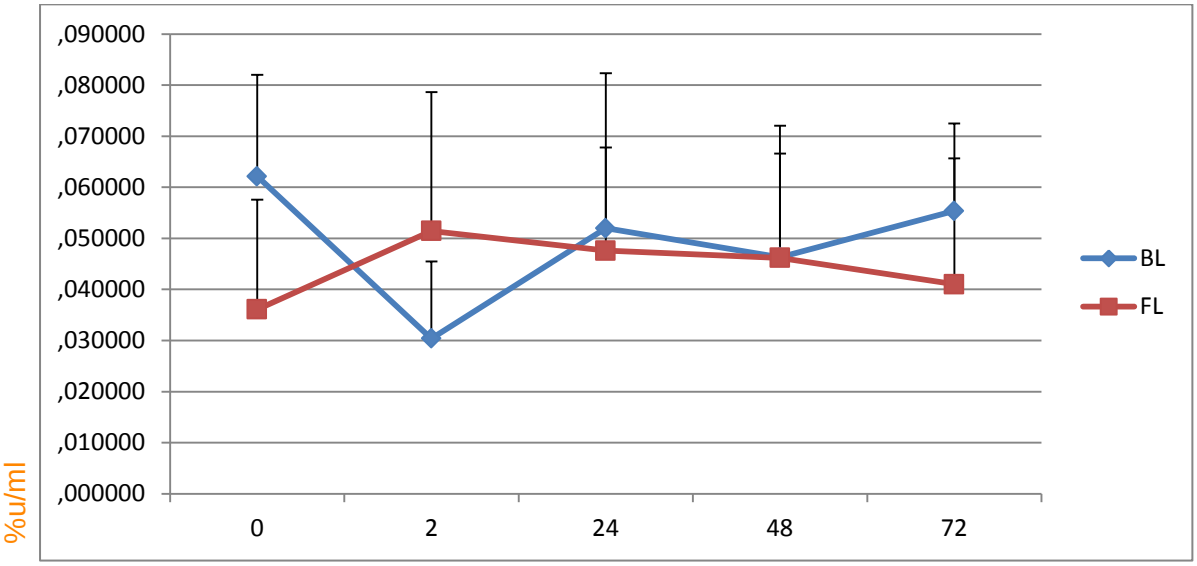


Σχήμα 7.12: Επίδραση BC στην μεταβολή δραστικότητας της Gpx3,πριν και μετά την παρέμβαση εκφρασμένη ως ποσοστιαία μεταβολή.

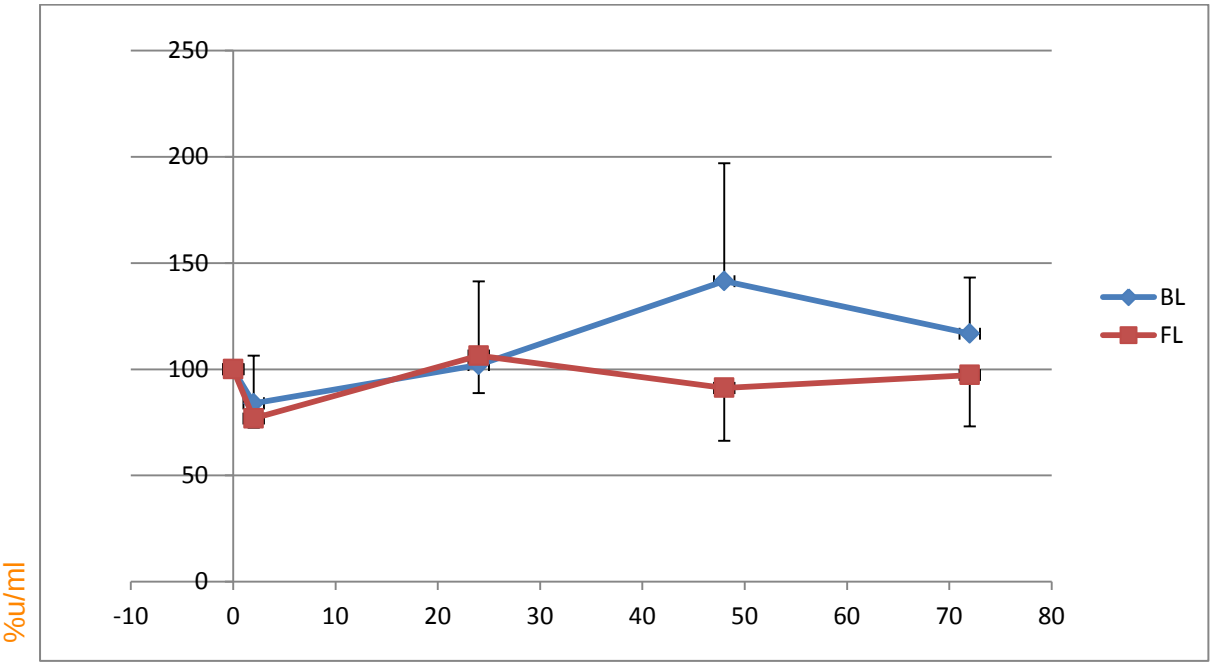
Στους πίνακες 7.9-7.12 παρουσιάζεται η μεταβολή της δραστικότητας της Gpx3 μετά από την επανάληψη του LIST .Συγκρίνοντας τις δύο ομάδες placebo και colostrum υπάρχει μια οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά στην τάση αύξησης στην χρονική φάση των 2 ωρών ($p<0,08$) της ποσοστιαίας μεταβολής δραστικότητας της Gpx3 ανάμεσα στις δύο ομάδες.



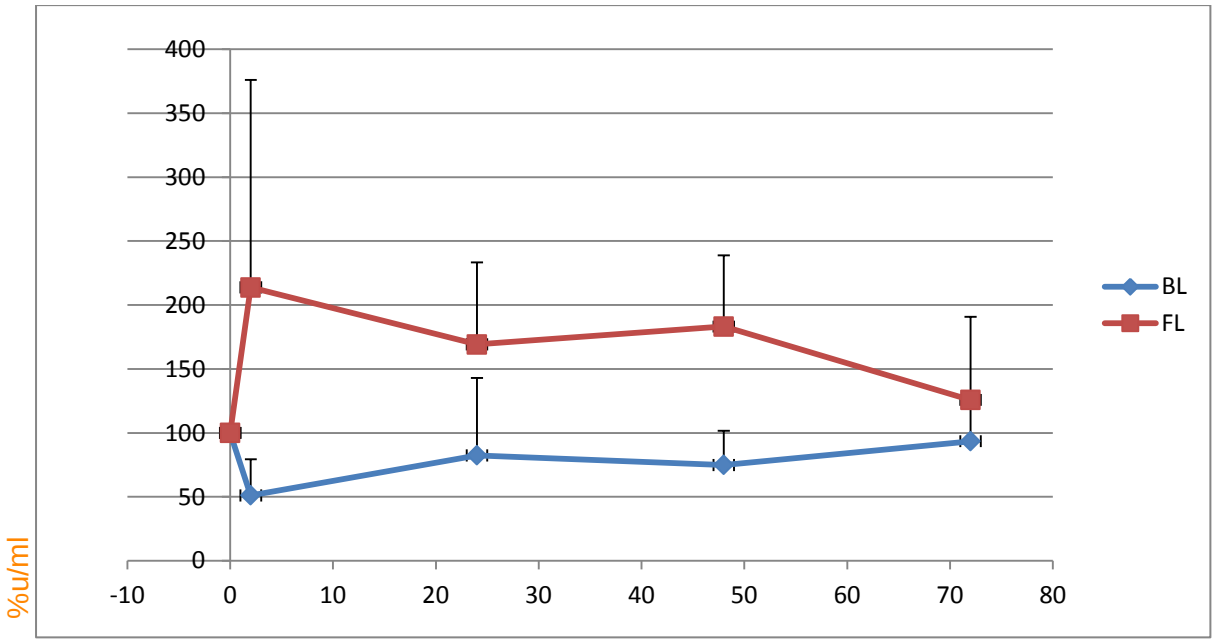
Σχήμα 7.13: **Επίδραση Placebo** στην μεταβολή δραστικότητας της Gpx1 Πριν και μετά την παρέμβαση.



Σχήμα 7.14: **Επίδραση BC** στην μεταβολή δραστικότητας της Gpx1 πριν και μετά την παρέμβαση.



Σχήμα 7.15: **Επίδραση Placebo** στην μεταβολή δραστικότητας της Gpx1 Πριν και μετά την παρέμβαση εκφρασμένη ως ποσοστιαία μεταβολή.



Σχήμα 7.16: **Επίδραση BC** στην μεταβολή δραστικότητας της Gpx1,πριν και μετά την παρέμβαση εκφρασμένη ως ποσοστιαία μεταβολή**.**

Στους πίνακες 7.13-7.16 παρουσιάζεται η μεταβολή της δραστικότητας της Gpx1 μετά από την επανάληψη του LIST .Συγκρίνοντας τις δύο ομάδες placebo και colostrum υπάρχει μια στατιστικά σημαντική διαφορά στην τάση αύξησης στην χρονική φάση των 2 ωρών ($p<0,05$) της ποσοστιαίας μεταβολής δραστικότητας της Gpx3 ανάμεσα στις δύο ομάδες.

7.2.1 Δεύτερο πρωτόκολλο (KINETICS) – Επίδραση διαφορετικών μορφών και δόσεων BC στην τυχόν μεταβολή των σεληνοπρωτεϊνών Gpx1-Gpx3.

Υπενθυμίζεται ότι σε αυτό το μέρος της έρευνας δεν χρησιμοποιήθηκε πρωτόκολλο πρόκλησης ασκησιογενούς βλάβης όπως προηγουμένως (LIST). Εδώ διερευνήθηκε η επίδραση της χορήγησης διαφορετικών μορφών και δόσεων BC στην τυχόν μεταβολή της δραστικότητας των σεληνοπρωτεϊνών Gpx3 και Gpx1. Με την έναρξη της χορήγησης οι εθελοντές χωρίστηκαν σε 5 ομάδες και οι εθελοντές της κάθε ομάδας λάμβανε καθημερινά για 6 εβδομάδες κάποια μορφή BC ή placebo (πρωτεΐνη ορού γάλακτος). Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα σε τρεις χρονικές στιγμές, στην αρχή της παρέμβασης (0w), ενδιάμεσα στις τρεις εβδομάδες (3w) και στο τέλος της παρέμβασης, δηλαδή στις έξι εβδομάδες (6w). Οι πέντε ομάδες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

	ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	Χορήγηση καθημερινώς για 6 εβδομάδες
ΟΜΑΔΑ Α - PLACEBO	WP 3,2	3,2γρ πρωτεΐνης ορού γάλακτος
ΟΜΑΔΑ Β - COLOSTRUM	BC 3,2	3,2γρ βόειου πρωτογάλακτος
ΟΜΑΔΑ Γ- PLACEBO	WP 0,8	0,8γρ πρωτεΐνης ορού γάλακτος
ΟΜΑΔΑ - COLOSTRUM	BC 0,8	0,8γρ βόειου πρωτογάλακτος
ΟΜΑΔΑ Ε - COLOSTRUM	BCL 8	8ml πρωτογάλακτος σε υγρή μορφή

Πίνακας 7.17: Περιγραφή ομάδων του 2^{ου} πρωτοκόλλου της μελέτης

7.2.2 Σύγκριση ανθρωπομετρικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών μεταξύ των ομάδων πριν την παρέμβαση

Πριν την έναρξη της παρέμβασης έγινε έλεγχος (T–Test) για να διαπιστωθεί εάν υπάρχει κάποια διαφορά σε ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των πέντε ομάδων. Οι ομάδες εμφανίστηκαν εξομοιωμένες καθώς δεν φάνηκε καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά σε οποιοδήποτε από τα χαρακτηριστικά τα οποία συμπεριλήφθηκαν στον έλεγχο. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου.

Πίνακας 7.19: Σύγκριση χαρακτηριστικών μεταξύ των δύο ομάδων πριν την παρέμβαση

	WP 3,6	**BC 3,6**	**WP 0,8**	**BC 0,8**	**BCL 8**	**Pvalue**
Ηλικία(έτη)	19,6 ± 1,9	20,7 ± 2,3	26 ± 6,9	21,8 ± 4	23 ± 6,5	,183
Ύψος (m)	1,78 ± 0,05	1,79 ± 0,08	1,76 ± 0,04	1,795 ± 0,04	1,78 ± 0,1	,898
Βάρος(kgr)	73,5 ± 5,6	74,55 ± 6,1	74,83 ± 4,5	81,16 ± 10,9	76,65 ± 13,3	,477
BMI (kgr/m^2)	23,08 ±0,47	23,47 ±1,25	26,2 ±1,55	25,92 ±2,88	23,71 ±2,31	,188
Περίμετρος μέσης (cm)	80 ± 2,1	81 ±2,1	81,33 ±5,2	90,25 ±8,2	82,91 ±7,4	,144
Περίμετρος ισχύων (cm)	92,5 ±3	98 ±3	97±4	103 ± 7	99 ± 6	,387
WHR	0,86 ± 0,03	0,82 ± 0,03	0,82 ± 0,12	0,89 ± 0,02	0,81 ± 0,02	,375
Συστολική πίεση(mm Hg)	118 ±17	127 ±14	129 ±5	129 ±9	130 ±6	,405
Διαστολική πίεση (mm Hg)	63 ±14	72 ± 7	73 ± 10	74 ± 8	68 ± 9	,441
Λευκοκύτταρα ($10^3/\mu L$)	6,41 ± 1,6	5,61±1,19	6,58 ±0,98	5,78 ±1,26	5,41 ±1,06	,347
Λεμφοκύτταρα ($10^3/\mu L$)	2,55 ± 0,81	2,01±0,38	2,41 ±0,43	1,95 ±0,29	1,97 ±0,36	,066
Αιμοσφαιρίνη (gr/dL)	14,33 ± 1,01	14,95 ± 1,32	14,6 ± 0,61	14,86 ± 0,89	15,08 ± 0,9	,657
	40 ± 3	40 ± 3	40 ± 1	41 ± 2	41 ± 2	,829

Αιματοκρίτης						
Αιμοπετάλια (10^3/μL)	232 ± 40	226 ± 30	228 ± 49	210 ± 39	227 ± 45	,853
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων	8,9 ± 0,69	8,38 ± 0,46	8,6 ± 0,76	8,54 ± 0,79	8,33 ± 0,6	,709
TBARS (μM)	1,52 ±0,44	1,29±0,44	1,23 ±0,3	1,5 ±0,21	1,58 ±0,33	,273
LAGTIME (min)	69 ±26	57±31	40 ±6	47 ±15	45 ±9	,110
Δραστικότητα GPX3	0,06 ±0,02	0,06±0,01	0,06 ± 0,005	0,06 ±0,009	0,06 ±0,008	,874

7.2.3 Συσχέτιση βασικών ανθρωπομετρικών και βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών με δραστικότητα των σεληνοπρωτεϊνών Gpx3 και Gpx1.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται ο έλεγχος που έγινε για πιθανές συσχετίσεις μεταξύ βασικών ανθρωπομετρικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών και των επιπέδων Gpx3 και Gpx1 των εθελοντών πριν την παρέμβαση (0W). Για τον έλεγχο χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής Pearson.

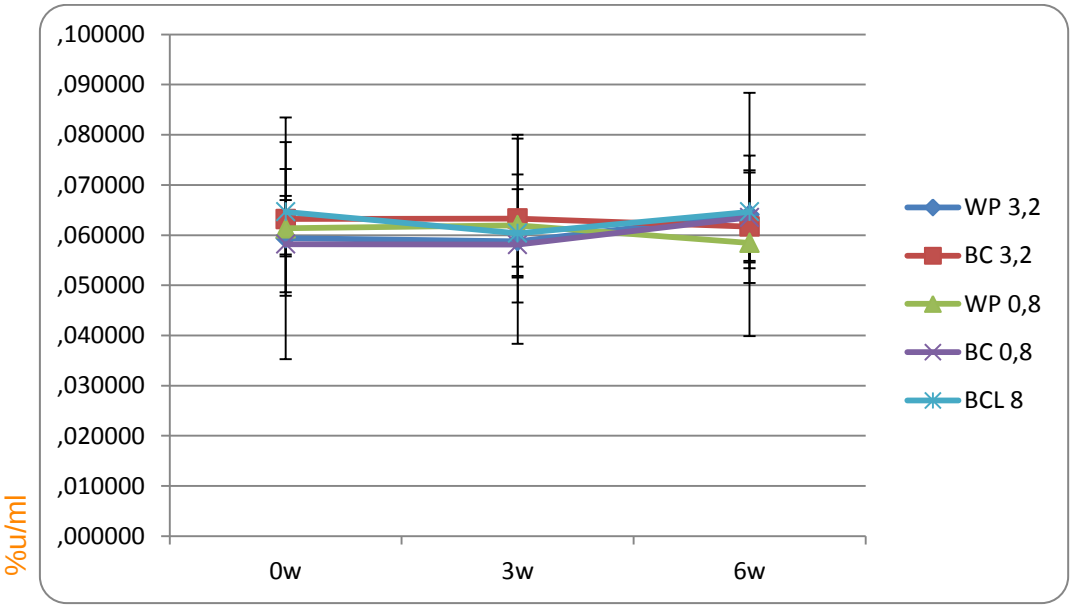
Πίνακας 7.20:

Gpx-3 0_wks	
MPV_0	r = -,540
	p =,002

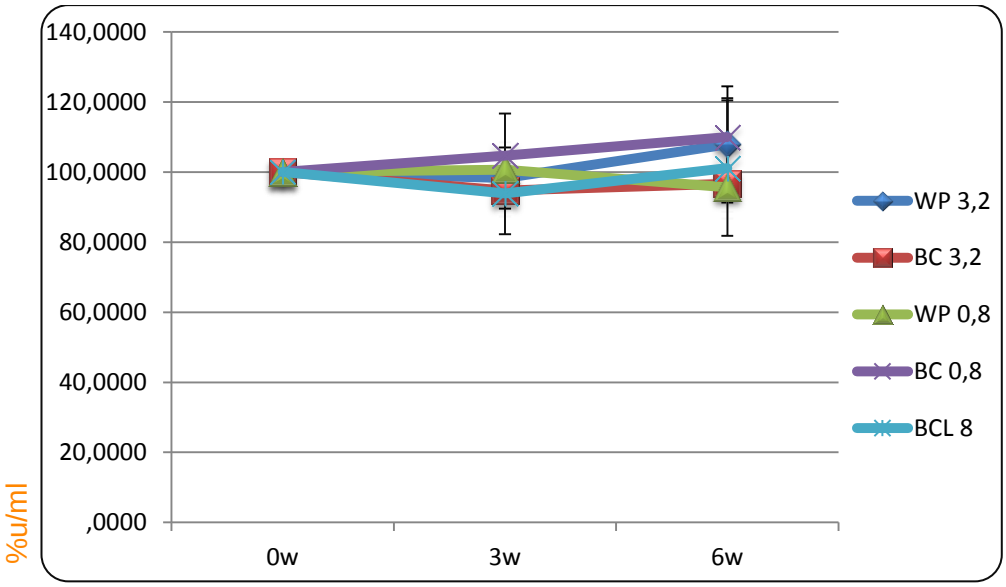
Στον πίνακα 7.20 παρουσιάζεται πώς από τον στατιστικό έλεγχο προέκυψε στατιστικός σημαντική συσχέτιση μόνο μεταξύ επιπέδων Gpx3 και MPV (Μέσος όγκος αιμοπεταλίων) σε χρονική στιγμή 0h πριν την παρέμβαση.

7.2.4 Σύγκριση της επίδρασης των παρεμβάσεων με BC στα επίπεδα της Gpx3.

Σε αυτό το σημείο γίνεται η παρουσίαση της κινητικής των Gpxs για κάθε ομάδα παρέμβασης σε κοινό διάγραμμα ώστε να καταστεί δυνατή η άμεση σύγκριση. Υπενθυμίζεται ότι η κινητική προέκυψε από τον προσδιορισμό της Gpx3 σε τρεις διαφορετικές στιγμές για κάθε ομάδα. Στην αρχή (0w), κατά την διάρκεια (3w) και στο τέλος της παρέμβασης (6w)



Σχήμα 7.21: Κοινή παρουσίαση της κινητικής της Gpx3 σε κάθε ομάδα παρέμβασης



Σχήμα 7.22: Κοινή παρουσίαση της κινητικής της Gpx3 σε κάθε ομάδα παρέμβαση εκφρασμένη ως ποσοστό μεταβολής.

- Καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν προκύπτει στην μεταβολή της δραστικότητας της Gpx1 συγκρίνοντας οποιαδήποτε δοσολογία ή μορφή του βοείου πρωτογάλακτος μεταξύ των εθελοντών.

8. ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Είναι ευρέως γνωστό πως οι επαγγελματίες αθλητές ομαδικών αθλημάτων όπως το ποδόσφαιρο εκτίθενται σε ένα μεγάλο εύρος ακησιογενών ερεθισμάτων τα οποία από την φύση τους ενέχουν εκτός από θεμιτές προσαρμογόνες επιδράσεις και αρνητικές οι οποίες συνήθως μειώνουν βραχυπρόθεσμα την απόδοση. Η ΑΜΒ και ο ΚΜΠ είναι τέτοια φαινόμενα που μειώνουν την απόδοση ανάλογα με την έκταση τους. Παρατεταμένη εμφάνιση των φαινομένων ή σύμπτωση αυτών με ένα αθλητικό γεγονός είναι ανεπιθύμητο συμβάν καθότι κοστίζει στην αθλητική απόδοση[7]. Ειδικότερα αθλητές μετά από τραυματισμό ή γενικότερη αποχή από τις προπονήσεις για οποιοδήποτε λόγο βιώνουν εντονότερα αυτά τα φαινόμενα με αποτέλεσμα την τυχόν μειωμένη αθλητική απόδοση όταν αυτή χρειάζεται ή δυσκολία προσαρμογής στα επαναλαμβανόμενα προπονητικά πρωτόκολλα ή αθλητικές υποχρεώσεις όταν αυτά πυκνώνουν. Επιπλέον η φύση του αθλήματος εμπεριέχει και ασκήσεις με βάρη που συνεισφέρουν ως ερέθισμα και αυτά στην εμφάνιση του φαινομένου [64]. Επιπλέον συγκεκριμένες πρακτικές ή παρεμβάσεις οι οποίες θα μπορούσαν να επιτύχουν μείωση ή ακόμα και απομάκρυνση των φαινομένων του ΚΜΠ και ΑΜΒ με άμεσο όφελος στην απόδοση σε ένα άθλημα δημοφιλές όπως το ποδόσφαιρο θα τύγχαναν ιδιαίτερης αποδοχής και προσοχής.

Πρωτόκολλο πρόκλησης ΑΜΒ

Προκειμένω να προκληθεί μία αντικειμενικά μετρήσιμης έκτασης ΑΜΒ και κατ επέκταση καθυστερημένο μυϊκό πόνο επιλέχθηκε το πρωτόκολλο Loughborouhg Intermittent Shuttle Test (LIST).Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο είναι μία προσομοίωση ποδοσφαιρικού αγώνα το οποίο ως πλεονέκτημα έχει το ότι αποτελεί ένα ερέθισμα με πολύ καλή επανάληψημότητα και σταθερότητα όσο αφορά της συνθήκες υπό τις οποίες πραγματοποιείτε. Διαφορές άξιες αναφοράς μεταξύ του LIST και πραγματικών αγώνων ποδοσφαίρου υπό πραγματικές συνθήκες δεν έχουν προκύψει [65]. Τυχόν υιοθέτηση της ιδέας του να συγκρίνει κάποιος τις επιδράσεις δύο διαφορετικών αγώνων ποδοσφαίρου στο κατά πόσο επηρεάζουν την εγκατάσταση των φαινομένων του ΚΜΠ και ΑΜΒ θα είχε σημαντικές αποκλίσεις και τελικά περιορισμούς όσο αφορά στην διεξαγωγή συμπερασμάτων.

Δείγμα μελέτης

Ως δείγμα της μελέτης επιλέχθηκαν 17 αθλητές ποδοσφαίρου Β΄ και Γ΄ εθνικής κατηγορίας καθώς και τοπικών πρωταθλημάτων. Η κατηγορία των αθλητών αυτών όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως εκτίθεται σε ιδιαίτερες συνθήκες που ευνοούν την εγκατάσταση ΑΜΒ και ΚΜΠ. Το δείγμα των αθλητών σε ότι άφορα σωματομετρικά ή κλινικά, βιοχημικά και τυχόν παθολογικά χαρακτηριστικά είχε ομοιογενές προφίλ και δεν παρουσίασε κάποιο περιορισμό ως προς τα να γίνει κάποια προσαρμογή όσο αφορά κάποια τυχόν ακραία τιμή από το υπόλοιπο δείγμα.

Συσχετίσεις κλινικών, βιοχημικών και εργομετρικών παραμέτρων με δραστικότητες Gpx1 και Gpx3.

Πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου LIST φάνηκε μία στατιστικά σημαντικά αρνητική συσχέτιση μεταξύ αριθμού λευκοκύτταρων και δραστικότητας της Gpx1 που όμως σταμάτησε να είναι σημαντική όταν διορθώθηκε ως προς τα έτη προπόνησης. Επιπλέον φάνηκε να υπάρχει θετική στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης TBARS και δραστικότητας Gpx1, Πιθανότατα το αυξημένο οξειδωτικό στρες όπου βρέθηκε μέσω των αυξημένων TBARS να επάγει την αύξηση της δραστικότητας της Gpx1.

Συσχέτιση αρχικών επιπέδων Gpx1 και Gpx3 σε δείκτες ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης (ΑΜΒ) μετά την παρέμβαση του LIST σε διάφορους χρόνους 0,2,24,48,72h

Εδώ φάνηκαν κάποιες στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις καθώς και κάποιες οριακά σημαντικές ειδικότερα στην περίοδο 2 -24 και 48h. Η αίσθηση πόνου σε διάφορους μύες, ο δείκτης λιπιδικής υπεροξείδωσης καθώς και η CK ορού φάνηκαν να μεταβάλλονται αναμενόμενα παράλληλα με την δραστικότητα των Gpxs καθότι στις συγκεκριμένες χρονικές περιόδους εγκαθίσταται εκτεταμένο οξειδωτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα διορθώνοντας ως προς τα έτη προπόνησης δεν χάνεται η συσχέτιση της Gpx1 με την συνολική μεταβολή TBARS_AUC .Αυτή η αντίστροφη σχέση εδώ πιθανότατα οφείλεται στο ότι σε άτομα με αυξημένο αντιοξειδωτικό δυναμικό το οξειδωτικό στρες περιορίζεται ή ότι σε άτομα με αυξημένο οξειδωτικό στρες καταναλώνεται ποσότητα Gpx 1 προς εξουδετέρωση αυτού. Επιπλέον θετική συσχέτιση βρέθηκε και μεταξύ CK και Gpx3. Πιθανότατα η καταστροφή μυϊκών κυττάρων που έχει και ως επακόλουθο την αύξηση της CK επάγει την αύξηση της δραστικότητας της Gpx3.Οσο αφορά τα εργομετρικά φάνηκε και μία σχέση που δείχνει πως η μείωση της μέγιστης ροπής τετρακέφαλου συσχετίζεται θετικά με την αύξηση της δραστικότητας της Gpx3.

Σε αυτή την μελέτη δεν φάνηκε κάποια στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των ετών προπόνησης και της δραστικότητας Gpx3. Σε κάποιες μελέτες που εξέτασαν αθλούμενους και όχι ελίτ αθλητές

βρέθηκε αυξημένη δραστικότητα στις GPx1 και GPx3 συγκριτικά με τους συμμετέχοντες που είχαν καθιστική ζωή [70][71]. άλλες μελέτες βρήκαν αντίθετα αποτελέσματα χωρίς να μπορούμε να καταλήξουμε σε κάποιο σαφές συμπέρασμα. [72][73]. Η γενικότερη όμως θεωρία στηρίζεται στο ότι η αυξημένη δραστικότητα των σεληνοπρωτεΐνών είναι ένας μηχανισμός ο οποίος πιθανόν προσαρμόζεται στο τυχόν αυξημένο ασκησιογενές στρες προκειμένω να αντισταθμίσει τις επιζήμιες οξειδωτικές επιδράσεις του. Όσο αφορά το σελήνιο και την άσκηση δεν έχει φανεί μέχρι τώρα κάποιου τύπου συσχέτιση.

Επίδραση πρωτοκόλλου List στις δραστικότητες των σεληνοπρωτεΐνών Gpx 1 και Gpx 3

Στις 2 ώρες μετά την λήξη του LIST έχουμε στατιστικά σημαντική μείωση της δραστικότητας της Gpx1 και Gpx3.Μετά από στατιστική ανάλυση ANOVA φάνηκε κατά μέσο όρο μείωση στις 2 h 5-35%.Το φαινόμενο πιθανότητα εξηγείτε από το ότι στο πρώτο 2h κατά το οποίο και έχουμε έκθεση σε αυξημένο οξειδωτικό στρες σημαντικές ποσότητες σεληνοπρωτεΐνών καταναλώνονται και μέσω της ποσοτικής μείωσης παρατηρούμε και μειωμένη δραστικότητα κατά την συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Στην συνέχεια η επαναφορά των επιπέδων δραστικότητας βασίζεται στην ταχεία επανασύνθεση των Gpxs μέσω ομοιοστατικού μηχανισμού (upregulation).

Επίδραση της παρέμβασης στα επίπεδα Gpx1, Gpx3 στην ομάδα Placebo και ομάδα BC (παρέμβασης).

Η παρέμβαση με χορήγηση 3,2 gr BC /day φαίνεται να ασκεί επίδραση επάγοντας μία τάση αύξησης της δραστικότητας των Gpx1 και Gpx3 μετά την παρέμβαση του LIST,δηλαδή μετά από ασκησιογενές ερέθισμα. Την ίδια τάση παρατηρούμε και στην % μεταβολή των δραστικοτήτων. Αξίζει να σημειωθεί πως διαφορά στην δραστικότητα των σεληνοπρωτεΐνών απουσία ασκησιογενούς ερεθίσματος δεν φάνηκε να υπάρχει, το δεδομένο αυτό θα αναφερθεί πιο κάτω στο δεύτερο πρωτόκολλο.

Δεύτερο πρωτόκολλο kinetics

Ο MPV μέσος όγκος αιμοπεταλίων φάνηκε να έχει μια στατιστικά σημαντικά αρνητική συσχέτιση με την δραστικότητα της Gpx3. Η ανασταλτική δράση που επιφέρει η Gpx3 σε ότι αφορά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων πραγματοποιείται μέσω των S-νιτροσοθειόλών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της αναγωγής των λιπιδικών υπεροξειδίων σε λιπαρές αλκοόλες. Με αυτό τον τρόπο αποτρέπεται η παραγωγή λιπιδικών υπεροξυ- ριζών που αδρανοποιούν το NO μέσω σχηματισμού υπεροξυνιτρωδών. Η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα των NO στο πλάσμα μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένα επίπεδα των ROS και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, μηχανισμός που μπορεί να οδηγήσει σε υπερθρομβωτική κατάσταση και μια πιο ισχυρή ανταπόκριση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Πιο απλά όταν η δραστικότητα της Gpx3 είναι χαμηλή το NO προσδένεται σε ROS και απομακρύνεται δίχως να ασκεί την επίδραση που θα έπρεπε στον μηχανισμό ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων αποτρέποντας την θρομβοτική ιδιότητα τους. Η GPx3 ρυθμίζει τον αιμοπεταλιο-εξαρτώμενο σχηματισμό θρόμβου μηχανισμός που βασίζεται στο ότι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια είναι πλούσιες πηγές δραστικών μορφών οξυγόνου. Αυξημένη δραστικότητα της GPx3 επιδρά στην μείωση του μέσου όγκου αιμοπεταλίων γιατί δεν επιτρέπεται η ενεργοποίηση και διόγκωση των αιμοπεταλίων από τις ελεύθερες ρίζες. Αντιθέτως χαμηλή δραστικότητα GPx3 οδηγεί σε αυξημένο μέσο όγκο αιμοπεταλίων λόγω του ότι τα αιμοπετάλια είναι πιο ενεργοποιημένα από τις ελεύθερες ρίζες που κυκλοφορούν με αποτέλεσμα να συσσωματώνονται [67].

Συζήτηση

Βόειο πρωτόγαλα και άσκηση.

Συγκρίνοντας άλλες μελέτες που χρησιμοποίησαν BC στην προσπάθεια του να προσδιορίσουν τυχόν επιδράσεις στην αποκατάσταση και γενικότερα αθλητική απόδοση χρησιμοποιήθηκαν αρκετά μεγαλύτερες δόσεις (10-100γρ/ημέρα).[74,46] συγκριτικά με την παρούσα μελέτη. (3,2γρ BC). Ενδείξεις όσο αφορά την επίδραση του στην απόδοση φαίνεται να υπάρχουν σε πρωτόκολλα που φτάνουν τουλάχιστον τις 8 εβδομάδες καθημερινής χορήγησης βόειου πρωτογάλακτος. Σε μικρότερα διαστήματα μερικών εβδομάδων όπως 2-3 φαίνεται να υπάρχουν επιδράσεις μόνο στο ανοσολογικό προφίλ για συγκεκριμένες βιοχημικούς παραμέτρους.[75]

Σε αυτή την μελέτη εξασθένηση της μείωσης του ύψους του άλματος από ημικάθισμα στους αθλητές που έλαβαν BC και αντίστοιχη επίδραση στην μείωση μέγιστη ισομετρικής ροπής τετρακέφαλου μηριαίου είναι ασθενείς ενδείξεις που μπορούν να αποτελέσουν ένδειξη για περαιτέρω διερεύνηση με μεγαλύτερο δείγμα.

Επιπλέον σε αυτή την μελέτη και παρατηρώντας τα αποτελέσματα του πρώτου πρωτοκόλλου παρατηρούμε μία τάση αύξησης της % μεταβολής της δραστικότητας των σεληνοπρωτεΐνών Gpx1και Gpx3 στην ομάδα που έλαβε την συμπληρωματική χορήγηση βόειου πρωτογάλακτος μετά

από την έκθεση στο πρωτόκολλο LIST.Ενώ όταν επαναλήφθηκε στο δεύτερο πρωτόκολλο που δεν είχαμε πρωτόκολλο πρόκλησης ασκησιογενούς μυϊκής βλάβης δεν υπήρξε καμία μεταβολή στην δραστικότητα των ίδιων σεληνοπρωτεΐνών. Το γεγονός αυτό πιθανώς καταδεικνύει πως η συμπληρωματική χορήγηση colostrum 3,2 gr/day για 6 εβδομάδες πιθανώς προκαλεί κάποια θετική επίδραση στην αύξηση της δραστικότητας των Gpx1και Gpx3 μετά από πρόκληση AMB δηλαδή μετά από ασκησιογενές ερέθισμα και όχι χωρίς αυτό. Η ερμηνεία του φαινομένου είναι αρκετά δύσκολη και πιθανότατα βασίζεται στην φύση των βιοδραστικών συστατικών του βόειου πρωτογάλακτος που όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό αποτελούνται από αυξητικούς παράγοντες, ανοσολογικούς καθώς και αντιοξειδωτικούς. Ερμηνείες για το πως επιτυγχάνεται αυτό, όπως για παράδειγμα το ότι αυξητικοί παράγοντες αποκαθιστούν τα σαρκομέρια γρηγορότερα περιορίζοντας το φαινόμενο της μειωμένης αθλητικής απόδοσης είναι δύσκολο να διαπιστωθούν και χρειάζονται μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα και συγκεκριμένη στόχευση προκειμένω να προσδιορισθούν οι πιθανοί μηχανισμού που μπορεί να επάγονται από την εξωγενή χορήγηση βόειου πρωτογάλακτος σε αθλητές που εκτίθενται σε έντονα ασκησιογενή ερεθίσματα.

Περιορισμοί μελέτης

Δυσκολία προσδιορισμού της έκτασης του επαγόμενου από άσκηση οξειδωτικού στρες στα μυϊκά κύτταρα καθώς η διαπερατότητα των μεμβρανών, ο χρόνος ημιζωής των ROS επηρεάζουν σημαντικά την επίδραση που θα έχουν τελικά αυτές οι ROS σε κυτταρικό επίπεδο στον μυ. Επιπλέον διάφορα υποστρώματα μέσα στα μυϊκά κύτταρα μπορεί να αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες επηρεάζοντας και αυτά την επίδραση γενικότερα. Συμπερασματικά το οξειδωτικό στρες στο πλάσμα μπορεί να διαφέρει σημαντικά από αυτό στον μυ για τους παραπάνω λόγους.

- Προσδιορισμός έκτασης του φαινομένου της αιμόλυσης στους αθλητές λόγω της μηχανικής καταπόνησης. Διερρηγμένα ερυθροκύτταρα πιθανώς να επηρέασαν το αντιοξειδωτικό προφίλ του ορού επηρεάζοντας τον προσδιορισμό της δραστικότητας της Gpx3.Επιπλέον το αίμα αποτελεί ένα ανοιχτό σύστημα οξειδοαναγωγικής ισορροπίας με πολλούς παράγοντες να μπορούν να το επηρεάσουν, όπως βιταμίνες, χολερυθρίνη, ουρία και άλλους οξειδωτικούς ή αντιοξειδωτικούς παράγοντες
- Επιπλέον δεν έγινε έλεγχος για διαφορές του βαθμού αφυδάτωσης των εθελοντών κατά τις διαφορετικές χρονικές στιγμές των αιμοληψιών και ενδεχομένως να επηρεάζονται τα αποτελέσματα.
- Μικρό δείγμα εθελοντών.
- Αρχική πρόβλεψη χορήγησης του BC στην μελέτη ήταν η διάρκειας να φτάνει τις 8 εβδομάδες. Πρακτικά λόγω μειωμένης δυνατότητας για συμμόρφωση από το δείγμα η

περίοδος περιορίστηκε στις 6 εβδομάδες.

- Αντίθετα στην παρούσα έρευνα προτιμήθηκε η αιμοληψία από την μυϊκή βιοψία ως μία πιο ήπια παρέμβαση καθώς θεωρήθηκε αδύνατη η λήψη μυϊκού ιστού πέντε φορές μέσα σε τρεις μέρες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Howatson G, Van Someren KA. The prevention and treatment of exercise-induced muscle damage. Sports Medicine. 2008;38(6):483–503.

2. Close GL, Ashton T, McArdle A, MacLaren DPM. The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 2005 Jan 12;142(3):257–66.

3. Peake J, Nosaka K, Suzuki K. Characterization of inflammatory responses to eccentric exercise in humans. Exercise immunology review. 2005;11:64–85.

4. Morgan DL, Allen DG .Early events in stretch-induced muscle damage.
J Appl Physiol. 1999 Dec;87(6):2007-15. Review

5. Brancaccio P, Lippi G, Maffuli N. Biochemical markers of
muscular damage Clin Chem Lab Med. 2010 Jun;48(6):757-67. Review.

6. Cleak MJ, Eston RG. Muscle soreness, swelling, stiffness and strength loss after intense eccentric exercise. British Journal of Sports Medicine. 1992;26(4):267–72.

7. Brancaccio P, Lippi G, Maffulli N. Biochemical markers of muscular damage. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2010;48(6):757–67.

8. Dedrick ME, Clarkson PM. The effects of eccentric exercise on motor performance in young and older women. Eur J Appl Physiol Occup Physiol. 1990;60(3):183-6.

9. Close GL, Ashton T, Mcardle A, Maclaren DP. The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury .Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2005 Nov;142(3):257-66. Epub 2005 Sep 8. Review.

10. Manfredi TG, Fielding RA, O'reilly KP, Meredith CN, Leehy, Evans WJ. Plasma creatine kinase activity and exerciseinduced muscle damage in older men. Med Sci Sports Exerc. 1991 Sep;23(9):1028-34.

11. Proske U, Morgan DL. Muscle damage from eccentric exercise: mechanism, mechanical signs, adaptation and clinical applications. J Physiol. 2001 Dec 1;537(Pt 2):333-45. Review.

12. Hickner RC, Mehta PM, Dyck D, Devita P, Houmard JA, Koves T, Byrd P. Relationship between fat-to-fat-free mass ratio and decrements in leg strength after downhill running. J Appl Physiol. 2001 Apr;90(4):1334-41.

13. Burk RF, Levander OA: Modern nutrition in health and disease, 9th edn.
Baltimore: Williams & Wilkins; 1999.

14. Cone JE., Proc Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety., Natl Acad Sci U S A. 1976 Aug;73(8):2659-63.

15. Forstrom JW., Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine, Biochemistry. 1978 Jun 27; 17(13):2639-44.

16. Yang GQ., The role of selenium in Keshan disease. Adv Nutr Res 1984, 6:203-31.

17. Alissa E. The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease a review of the evidence. Med Sci Monit, 2003; 9(1) RA9-18

18. Cone JE, Del Rio RM, Davis JN, Stadtman TC: Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. Proc Natl Acad Sci U S A 1976, 73(8):2659-2663.

19. Beckett GJ, Arthur JR: Selenium and endocrine systems. J Endocrinol 2005, 184(3):455-465.

20. National Academies Institute of Medicine: Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Recommended Intakes for Individuals. Available at: http://www.iom.edu/Object.File /Master/21/372/0.pdf

21. McAdam PA, Lewis SA: Absorption of selenite and L-selenomethionine in healthy young men, using a 74Se tracer. Fed Proc 1985, 44:1671.

22. Combs GF, Combs SB: The role of selenium in nutrition. Orlando: Academic Press; 1986.

23. Forbes RM, Erdman JW, Jr.: Bioavailability of trace mineral elements. Annu Rev Nutr 1983, 3:213-221.

24. Burk RF, Hill KE: Regulation of selenoproteins. Annu Rev Nutr 1993, 13:65-81.

25. Groff JL, Gropper SS, Hunt SM: Advanced nutrition and human metabolism. Minneapolis: West Publishing Company; 1995.

26. Evenson JK, Sunde RA: Selenium incorporation into selenoproteins in the Se-adequate and Se-deficient rat. Proc Soc Exp Biol Med 1988, 187(2):169-180.

27. Robinson JR, Robinson MF, Levander OA, Thomson CD: Urinary excretion of selenium by New Zealand and North American human subjects on differing intakes. Am J Clin Nutr 1985, 41(5):1023-1031.

28. Alfthan G, Neve J: Reference values for serum selenium in various are as evaluated according to the TRACY protocol. J Trace Elem Med Biol 1996, 10(2):77-87.

29. Combs GF, Jr.: Selenium in global food systems. Br J Nutr 2001, 85(5):517-547.

30. Daniels LA, Gibson RA, Simmer KN: Indicators of selenium status in Australian infants. J Paediatr Child Health 2000, 36(4):370-374.

31. Labat L, Dehon B, Lhermitte M: Rapid and simple determination of selenium in blood serum by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Anal Bioanal Chem 2003, 376(2):270-273.

32. Neve J: Methods in determination of selenium states. J Trace Elem Electrolytes Health Dis 1991, 5(1):1-17.

33. Goldhaber SB: Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. Regul Toxicol Pharmacol 2003, 38(2):232-242.

34. Ge K, Yang G: The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. Am J Clin Nutr 1993, 57(2 Suppl):259S-263S.

35. Solomons NW. Modulation of the immune system and the response against pathogens with bovine colostrum concentrates. European Journal of Clinical Nutrition. 2002;56(SUPPL. 3):S24–S28.

36. Kaushik S, Trivedi SS, Jain A, Bhattacharjee J. Unusual changes in colostrum composition in lactating Indian women having medical complications during pregnancy - A pilot study. Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2002;17(2):68–73.

37. Gapper LW, Copestake DE, Otter DE, Indyk HE. Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. Anal Bioanal Chem. 2007 Sep;389(1):93-109. Epub 2007 Jun 20

38. Thapa BR. Health factors in colostrum. Indian Journal of Pediatrics. 2005;72(7):579–81.

39. Van Hooijdonk ACM, Kussendrager KD, Steijns JM. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. British Journal of Nutrition. 2000;84(SUPPL. 1):S127–S134.

40. Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT. Immune components of bovine colostrum and milk.J Anim Sci. 2009 Apr;87(13 Suppl):3-9. Epub 2008 Oct 24. Review.

41. Playford RJ, Macdonald CE, Johnson WS.Colostrum and milkderived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. Am J Clin Nutr. 2000 Jul;72(1):5-14. Review.

42. Kussendrager KD, Van Hooijdonk ACM. Lactoperoxidase: Physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. British Journal of Nutrition. 2000;84(SUPPL. 1):S19–S25.

43. Appukutty M, Radhakrishnan AK, Ramasamy K, Ramasamy R, Abdul Majeed AB, Ismail MN, et al. Colostrum supplementation protects against exercise - induced oxidative stress in the skeletal muscle in mice. 2012. p. 649.

44. Hofman Z, Smeets R, Verlaan G, Lugt RVD, Verstappen PA. The effect of bovine colostrum supplementation on exercise performance in elite field hockey players. International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism. 2002;12(4):461–9.

45. Buckley JD. Bovine colostrum: Does it improve athletic performance? Nutrition. 2002 Sep;18(9):776-7

46. Shing CM, Jenkins DG, Stevenson L, Coombes JS The influence of bovine colostrum supplementation on exercise performance in highly trained cyclists.Br J Sports Med. 2006 Sep;40(9):797-801. Epub 2006 Jul 6

47. Mero A, Nykanen T, Keinanen O, Knuutinen J, Lahtik, Alen M, Rasi S, LeppaluotoJ.Protein metabolism and strength performance after bovine colostrum supplementation. Amino Acids. 2005 May;28(3):327-35. Epub 2005 Mar 25

48. Shing CM, Peake J, Suzuki K, Okutsu M, Pereira R, Stevenson L, Jenkins DG, Coombes JS Effects of bovine colostrum supplementation on immune variables in highly trained cyclists. Appl Physiol. 2007 Mar;102(3):1113-22. Epub 2006 Nov 9.

49. Papp LV. From selenium to selenoproteins synthesis, identity, and their role in human health. Antioxid Redox Signal 2007, 9775-06.

50. Arthur JR. The glutathione peroxidases. Cell Mol Life Sci 2000, 57.1825–35

51. Bjornstedt M., The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human peroxidase. J. Biol. Chem. 269: 29382–29384, 1994

52. Yamamoto Y., Nagata Y., Plasma glutathione peroxidase reduces phosphatidylcholine hydroperoxide. Biochem. Biophys. Res. Comm. 193: 133–138, 1993

53. Whitin JC., Plasma glutathione peroxidase and its relationship to renal proximal tubule function. Mol. Genet. Metab. 65: 238–245, 1998

54. Avissar N., Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione 50peroxidase. Am J Physiol 1994, 266:367–75.

55. Papp LV. From selenium to selenoproteins synthesis, identity, and their role in human health. Antioxid Redox Signal 2007, 9775-06.

56. Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Kohrle J. Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. Biochem Biophys Res Commun 1990, 173.1143-9.

57. Tapiero H. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. Biomed Pharmacother. 2003, 571.34-44.

58. Arnér ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur J Biochem. 2000, 267:6102-9.

59. Moschos MP. Selenoprotein P. Cell Mol. Life Sci.2000, 57:1836-45.

60. Whitin JC., Bhamre S., Tham DM., and Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells Am J Physiol 2002, 283:20–8.

61. Maser RL, Magenheimer BS, and Calvet JP. Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion J Biol Chem 1994,269: 27066-73.

62. Rayman MP. Selenoproteins and human health: Insights from epidemiological data Biochimica et Biophysica Acta 2009, 1790:1533–40. Review

63. http://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/703102

64. Fatouros IG, Chatzinikolaou A, Douroudos II, Nikolaidis MG, Kyparos A, Margonis K, et al. Time-course of changes in oxidative stress and antioxidant status responses following a soccer game. Journal of Strength and Conditioning Research. 2010;24(12):3278–86

65. Magalhães J, Rebelo A, Oliveira E, Silva JR, Marques F, Ascensão A. Impact of Loughborough Intermittent Shuttle Test versus soccer match on physiological, biochemical and neuromuscular parameters. European Journal of Applied Physiology. 2010;108(1):39–48.

66. Jin RC, Mahoney CE, Coleman Anderson L, Ottaviano F, Croce K, Leopold JA, Zhang YY, Tang SS, Handy DE, Loscalzo J. Glutathione peroxidase-3 deficiency promotes platelet-dependent thrombosis in vivo. Circulation. 2011 May 10;123(18):1963-73. Epub 2011 Apr 25.

67. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. Circ Res. 2001 Apr 27;88(8):756-62.

68. Thomson CD. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. Eur J Clin Nutr. 2004 Mar;58(3):391-402.

69. Patching SG, Gardiner PH. Recent developments in selenium metabolism and chemical speciation: a review. J Trace Elem Med Biol. 1999 Dec;13(4):193-214.

70. Rousseau AS, Margaritis I, Arnaud J, Faure H, Roussel AM. Physical activity alters antioxidant status in exercising elderly subjects. J Nutr Biochem. 2006 Jul;17(7):463-70.

71. Alshammari E, Shafi S, Nurmi-Lawton J, Taylor A, Lanham-New S, Ferns G. Altered antioxidant and trace-element status in adolescent female gymnasts. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 2010 Aug;20(4):291-8.

72. Arnaud J, Bertrais S, Roussel AM, Arnault N, Ruffieux D, Favier A, Berthelin S, Estaquio C, Galan P, Czernichow S, Hercberg S. Serum selenium determinants in French adults: the SU.VI.M.AX study. Br J Nutr. 2006 Feb;95(2):313-20.

73. Rundle A, Richards C, Tang D, Perera F. Lack of association between physical activity in smokers and plasma glutathione peroxidase levels. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008 Apr;17(4):1004-6.

74. Mero A, Miikkulainen H, Riski J, Pakkanen R, Aalto J, Takala T. Effects of bovine colostrum supplementation on serum IGF-I, IgG, hormone, and saliva IgA during training. Journal of Applied Physiology. 1997;83(4):1144–51

75. Kelly GS. Bovine Colostrums: A Review of Clinical Uses. Alternative Medicine Review. 2003;8(4):378–94.