

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΦΥΤΙΚΟΥ  
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΣΤΑΦΥΛΙ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ  
ΣΤΟ ΓΑΣΤΡΟΚΝΗΜΙΟ ΜΥ ΚΑΙ ΤΟ ΗΠΑΡ ΕΠΙΜΥΩΝ**

**ΧΡΟΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΣΤΑΓΚΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΛΙΑΔΑΚΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ

**ΛΑΡΙΣΑ 2010**

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ****ΣΕΛΙΔΑ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1. Ελεύθερες ρίζες	6
1.2. Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	7
1.3. Βιολογικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών	8
1.3.1. Θετικές επιδράσεις	8
1.3.2. Αρνητικές επιδράσεις	9
1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	10
1.4.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά	11
1.4.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά	12
1.5. Οξειδωτικό στρες	14
1.6. Οξειδωτικό Στρες και Άσκηση	16
1.7. Χορήγηση εκχυλισμάτων πριν την άσκηση στον άνθρωπο και σε πειραματόζωα	18
Σκοπός	21
2. Υλικά και μέθοδοι	22
2.1. Δείγμα	22
2.2. Χορήγηση εκχυλίσματος	22
2.3. Εξοικείωση κολύμβησης	22
2.4. Πρωτόκολλο κολύμβησης	23
2.5. Θανάτωση, λήψη δειγμάτων και ομογενοποίηση	23
2.6. Δείκτες οξειδωτικού στρες που μετρήθηκαν	23
2.7. Στατιστική ανάλυση	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	26
3.1 Γαστροκνήμιος μυς	26
3.1.1. Καταλάση	26

3.1.2. Ανηγγμένη γλουταθειόνη (GSH)	27
3.1.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)	27
3.1.4. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	28
3.1.5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια	28
3.1.6. Οξειδάση της ξανθίνης	29
3.2. Ήπαρ	30
3.2.1. Καταλάση	30
3.2.2. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)	30
3.2.3. Ανηγγμένη γλουταθειόνη (GSH)	31
3.2.4. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	32
3.2.5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια	33
3.2.6. Οξειδάση της ξανθίνης	33
3.3. Απόδοση	34
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35
5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	38
5.1. Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες	38
5.2. Σύσταση του εκχυλίσματος που χορηγήθηκε	42
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1:</b> Περιπτώσεις οξειδωτικού στρες: α) λόγω αύξησης των ελευθέρων ριζών και β) λόγω μείωσης της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.	15
--	----

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ****ΣΕΛΙΔΑ**

<b>Διάγραμμα 1.</b> Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη δραστικότητα της καταλάσης στο γαστροκνήμιο μυ	26
<b>Διάγραμμα 2.</b> Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης στο γαστροκνήμιο μυ	27
<b>Διάγραμμα 3.</b> Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο γαστροκνήμιο μυ	27
<b>Διάγραμμα 4.</b> Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των TBARS στο γαστροκνήμιο μυ	28
<b>Διάγραμμα 5.</b> Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο γαστροκνήμιο μυ	28
<b>Διάγραμμα 6.</b> Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο γαστροκνήμιο μυ	29
<b>Διάγραμμα 7.</b> Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη δραστικότητα της καταλάσης στο ήπαρ	30
<b>Διάγραμμα 8.</b> Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο ήπαρ	30
<b>Διάγραμμα 9.</b> Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης στο ήπαρ.	31
<b>Διάγραμμα 10.</b> Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των TBARS στο ήπαρ	32
<b>Διάγραμμα 11.</b> Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο ήπαρ	33
<b>Διάγραμμα 12.</b> Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο ήπαρ	33

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η άσκηση προκαλεί αύξηση παραγωγής ελευθέρων ριζών και οξειδωτικό στρες. Επίσης, από προηγούμενη εργασία μας βρέθηκε ότι η αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης προκαλεί μείωση της απόδοσης και οξειδωτικό στρες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης ενός εκχυλίσματος σταφυλιού, που αναστέλλει *in vitro* τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στην αθλητική απόδοση και σε δείκτες οξειδωτικού στρες στο γαστροκνήμιο μυ και στο ήπαρ επιμύων. Οι προς μέτρηση ιστοί λήφθηκαν χειρουργικά πριν και μετά την άσκηση και μετρήθηκαν η δραστηριότητα της καταλάσης (CAT) και της οξειδάσης της ξανθίνης, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (PC) ως δείκτης πρωτεϊνικής οξείδωσης και η συγκέντρωση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) ως δείκτης της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Στο γαστροκνήμιο μυ βρέθηκε ότι προκλήθηκε οξειδωτικό στρες μετά την άσκηση τόσο στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός όπως φάνηκε από την αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS όσο και στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε εκχύλισμα, όπως φάνηκε από την αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης. Παρόμοια, στο ήπαρ βρέθηκε οξειδωτικό στρες μετά την άσκηση τόσο στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός όπως φάνηκε από την αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και την πτώση της συγκέντρωσης της GSH, όσο και στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε εκχύλισμα, όπως φάνηκε από την αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS. Συμπερασματικά, μία συχνά χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση φυτικού εκχυλίσματος προκαλεί οξειδωτικό στρες *in vivo* αλλά περαιτέρω μελέτη απαιτείται για τον καθορισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης χορήγησης τέτοιου είδους αντιοξειδωτικών στη διατροφή.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι πλέον γεγονός ότι η άσκηση συμβάλλει στη βελτιστοποίηση του τρόπου ζωής και της υγείας. Ωστόσο, η έντονη και εξαντλητική άσκηση μπορεί να έχει αντίθετες επιπτώσεις ως αποτέλεσμα της αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών, όπως δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Schneider & Tiidus, 2007), μυϊκός κάματος (Betteres et al., 2004) και μυϊκή καταστροφή (Nikolaidis et al., 2006) οδηγώντας σε μία κατάσταση γνωστή ως οξειδωτικό στρες. Οι ελεύθερες ρίζες αναπτύσσονται ενδογενώς στον οργανισμό σε ένα σύνολο μεταβολικών διαδικασιών (π.χ. μεταβολισμός των κατεχολαμινών, κυτταρική αναπνοή) και αυξάνονται από εξωτερικούς παράγοντες αλλά έχει παρατηρηθεί ότι έχουν και συμμετοχή σε φυσιολογικές διαδικασίες, όπως στη μεταγωγή σήματος (Ji, 2007) και τη γονιδιακή έκφραση (Ji et al., 2006).

### *1.1. Ελεύθερες ρίζες*

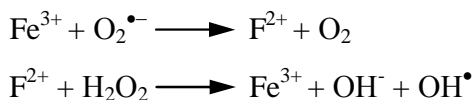
Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια, άτομα ή ιόντα που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα και υπάρχουν ελεύθερα (Halliwell & Gutteridge, 1998). Η διαμόρφωσή τους αυτή είναι πολύ ασταθής και τις κάνει ιδιαίτερα δραστικές. Μπορούν έτσι εύκολα να οξειδώσουν και να βλάψουν ζωτικά βιολογικά μόρια όπως λίπη, πρωτεΐνες και το DNA με σκοπό να συμπληρωθεί η εξωτερική τους στιβάδα. Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες είναι ή προέρχονται από δραστικά είδη οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) ή δραστικά είδη αζώτου (reactive nitrogen species, RNS). Τα δραστικά είδη οξυγόνου περιλαμβάνουν όχι μόνο είναι ρίζες, όπως το ανιόν υπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ) και το ανιόν υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ) αλλά και μερικά προϊόντα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ). Ο όρος δραστικά είδη αζώτου περιλαμβάνει τις ρίζες αζώτου όπως το μονοξείδιο του αζώτου ( $NO^{\bullet}$ ) και τις μη ρίζες αζώτου όπως η ρίζα του  $ONOO^-$ .

## 1.2. Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Οι πηγές παραγωγής των ελευθέρων ριζών μπορούν να διαχωριστούν σε ενδογενείς και εξωγενείς.

### *Ενδογενείς πηγές*

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδογενής πηγή ελευθέρων ριζών. Η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης χρησιμοποιεί τα ηλεκτρόνια της αναπνευστικής αλυσίδας για την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ), το οποίο στη συνέχεια μπορεί να αναχθεί προς σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), αντίδραση την οποία καταλύει η υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD) (Halliwell & Gutteridge, 1998). Μια ρίζα υδροξυλίου προκύπτει σύμφωνα με τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, συνήθως σιδήρου, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση.



Η δραστηριότητα της παραγόμενης ρίζας υδροξυλίου είναι εξαιρετικά υψηλή (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Μια άλλη πηγή παραγωγής ROS είναι η φλεγμονώδης αντίδραση. Αν και η σημασία της είναι μεγάλη κατά την απομάκρυνση ορισμένων υπολειμμάτων βακτηρίων η ιικών πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση κάποιας μόλυνσης, απελευθερώνονται ROS μεταξύ των οποίων  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$  και υποχλωριώδες οξύ (HOCl) και άλλα οξειδωτικά, από τα ουδετερόφιλα και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν βλάβες (Meydani et al., 1992).

Επίσης, ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμοσφαιρίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ). Τέλος, το σύστημα του κυτοχρώματος P450 είναι μια σημαντική πηγή παραγωγής ROS (Yu, 1994). Το NADPH ή NADPH οξειδώνονται παράγοντας  $O_2^{\bullet-}$ , το οποίο οξειδώνει το υπόστρωμα του ενζύμου συμμετέχοντας στο μεταβολισμό διαφόρων ξενοβιοτικών ουσιών.

#### *Εξωγενείς πηγές*

Οι κυριότεροι εξωτερικοί παράγοντες που αυξάνουν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών είναι το άγχος, η περιβαλλοντική ρύπανση (μόλυνση νερού, αέρα, τροφής), η ηλιακή (υπεριώδης) ακτινοβολία και διαφόρων τύπων ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η βαριά σωματική άσκηση, το κάπνισμα, η κακή διατροφή, οι ασθένειες, τα φάρμακα, το αλκοόλ και άλλες τοξικές ουσίες.

### **1.3. Βιολογικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών**

Όπως προαναφέρθηκε, οι ελεύθερες ρίζες έχουν αρνητικές επιδράσεις στον οργανισμό όμως είναι και απαραίτητες για ορισμένες βασικές λειτουργίες.

#### **1.3.1. Θετικές επιδράσεις**

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών στον οργανισμό αποτελεί μια φυσιολογική βιολογική διαδικασία, η οποία είναι σημαντική κατά τη διακυτταρική μεταγωγή σήματος (Reid, 2001). Παρουσία φλεγμονής σε κάποιο ιστό οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν στην αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος ενισχύοντας την καταστροφή των αντιγόνων κατά τη διαδικασία της φαγοκύτωσης (Fehrenbach et al., 2001). Συμπληρωματικά, οι ROS παίρνουν μέρος σε διαδικασίες όπως ο σχηματισμός του DNA, του RNA, ορισμένων πρωτεϊνών καθώς και στη μυϊκή συστολή. Αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη μυϊκή συστολή ενώ ελάττωσή της οδηγεί σε μειωμένη μυϊκή συστολή (Reid, 2001).



### **1.3.2. Αρνητικές επιδράσεις**

Η χημική αστάθεια που παρουσιάζουν οι ελεύθερες ρίζες τις κάνει ικανές για αντίδραση με όλα σχεδόν τα βιομόρια. Έτσι, μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση τόσο DNA, όσο πρωτεϊνών και λιπιδίων.

#### *Οξείδωση DNA*

Το DNA είναι από τους πιο σημαντικούς στόχους των ελευθέρων ριζών. Μπορούν να προκαλέσουν διάσπαση των αλυσίδων, αλλαγές σε αζωτούχες βάσεις και βλάβες στους μηχανισμούς επιδιόρθωσής του με αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων και καταστροφή του DNA και των χρωμοσωμάτων (Radak et al., 1999; Dizdaroglu et al., 2002).

#### *Οξείδωση λιπιδίων*

Η λιπιδική υπεροξείδωση έχει τρία στάδια: έναρξη, διάδοση και τερματισμό. Αρχικά, παρατηρείται η αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια και το σχηματισμό μιας αλκυλορίζας (-CH<sup>•</sup>-). Η παρουσία ενός διπλού δεσμού γειτονικά της ομάδας μεθυλενίου εξασθενεί τον δεσμό μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και άνθρακα έτσι ώστε να μπορεί να αποσπαστεί εύκολα από το μόριο. Μετά την απόσπαση του υδρογόνου το λιπαρό οξύ διατηρεί ένα ηλεκτρόνιο και σταθεροποιείται με επαναδιευθέτηση της μοριακής δομής για να σχηματίσει ένα συζυγές διένιο. Όταν το οξυγόνο είναι σε επαρκή ποσότητα στο περιβάλλον, το λιπαρό οξύ θα αντιδράσει με αυτό για να σχηματίσει λιποϋπεροξειδικές ρίζες (ROO<sup>•</sup>) κατά τη διάρκεια της φάσης της διάδοσης. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες (ROO<sup>•</sup>) είναι ικανές να αποσπάσουν κι άλλο άτομο υδρογόνου από ένα γειτονικό λιπαρό οξύ, το οποίο οδηγεί ξανά σε παραγωγή ριζών λιπαρών οξέων που υποβάλλονται στις ίδιες διαδικασίες (επαναδιευθέτηση και αλληλεπίδραση με οξυγόνο). Με τον τρόπο αυτό οι ROO<sup>•</sup> προωθούν τη διάδοση της λιπιδικής υπεροξείδωσης σε άλλα λιπαρά οξέα (Halliwell & Gutteridge, 1998; Clarkson & Thompson, 2000).

### *Οξείδωση πρωτεϊνών*

Η πρωτεϊνική οξείδωση μπορεί να επηρεάσει την τριτοταγή δομή και λειτουργία των πρωτεϊνών έχοντας σαν αποτέλεσμα απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας όπως και θρυμματισμό των αμινοξέων των πρωτεϊνών (Radak et al., 1999). Η πρωτεϊνική οξείδωση μπορεί να προκληθεί από φλεγμονή, άσκηση ή ισχαιμία-επαναιμάτωση. Τα λυσοσώματα και το πρωτεόσωμα είναι οι κύριοι αποικοδομητές των οξειδωμένων πρωτεϊνών όμως τα πρωτεϊνικά καρβονύλια που παράγονται από την πρωτεϊνική οξείδωση δεν εισέρχονται σε αυτή τη διαδικασία με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους σε συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους (Levine, 2002).

### *Μυϊκός κάματος*

Για τη φυσιολογική λειτουργία του μυός απαιτείται ένας μικρός αριθμός ελευθέρων ριζών (Reid, 2001). Όμως, κατά την άσκηση παρατηρούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών στο μυ, οι οποίες σχετίζονται με το μυϊκό κάματο (Cooper et al., 2002). Οι ROS επιδρώντας στο μιτοχονδριακό DNA των μυϊκών κυττάρων προκαλούν μυϊκό κάματο μειώνοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων και ATP κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας (Reid et al., 1992). Η μεταβολή της συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών επηρεάζει την οξειδοαναγωγική ισορροπία στο εσωτερικό του μυός και λόγω της ευαισθησίας των συσταλών πρωτεϊνών του μυός, της ακτίνης και της μυοσίνης σε αυτήν προκαλούνται μεταβολές στον τρόπο της της μυϊκής σύσπασης (Goldfarb, 1999). Οι ROS προκαλούν ενδοκυτταρική αύξηση των ιόντων  $Ca^{++}$  και απενεργοποίηση ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών ενζύμων στα μυϊκά κύτταρα, γεγονότα που συμβάλλουν στην εμφάνιση του μυϊκού κάματος.

#### ***1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί***

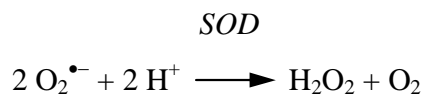
Αντιοξειδωτικό θεωρείται κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το υπόστρωμά της καθυστερεί ή αναστέλλει σημαντικά την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος (Halliwell & Gutteridge, 1998). Η δράση τους στηρίζεται στην παρεμπόδιση του σχηματισμού ελευθέρων ριζών, στη μετατροπή των ελευθέρων ριζών σε λιγότερο δραστικά μόρια και στην επιδιόρθωση των βλαβών

που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Τα αντιοξειδωτικά του οργανισμού ανάλογα με τη χημική τους φύση μπορούν να καταταχθούν σε ενζυμικά και μη ενζυμικά.

#### *1.4.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά*

##### **Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)**

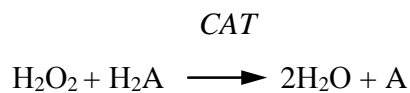
Η SOD αποτελεί την κύρια άμυνα έναντι των ριζών σουπεροξειδίου και του οξειδωτικού στρες (Mylonas & Kouretas, 1999). Η SOD καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδικού ανιόντος σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και σε οξυγόνο σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Σε όλα τα κύτταρα κατά την ηρεμία, το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου από τα μιτοχόνδρια  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD) ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers & Lennon, 2000). Στα μυϊκά κύτταρα το 65-85% της δραστηριότητας της SOD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Cu-Zn SOD) (Das et al., 1997).

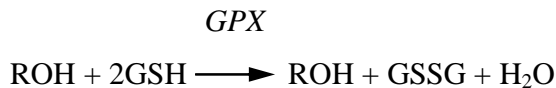
##### *Καταλάση (CAT)*

Η καταλάση εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα και διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) σε νερό ( $\text{H}_2\text{O}$ ) και μοριακό οξυγόνο ( $\text{O}_2$ ) σύμφωνα με την αντίδραση:



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

Πρόκειται για ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα καθώς και στο εξωτερικό του κυττάρου. Η GPX καταλύει τη μετατροπή των υπεροξειδίων σε νερό οξειδώνοντας την GSH στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) σύμφωνα με την αντίδραση:



Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η καταλάση (CAT) έχουν την ίδια δράση ενάντια στο υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η GPX είναι περισσότερο αποτελεσματική σε υψηλές συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών, ενώ η CAT δρα αποτελεσματικότερα σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου (Antunes et al., 2002).

#### **1.4.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά**

##### *Βιταμίνη E (τοκοφερόλη)*

Πρόκειται για μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, η οποία έχει αρκετές ισομορφές γνωστές ως τοκοφερόλες. Βρίσκεται σε αφθονία στις μεμβράνες των κυττάρων και των μιτοχονδρίων, οι οποίες είναι πλούσιες σε λιπίδια και έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση προστατεύοντας τις μεμβράνες από την λιπιδική υπεροξείδωση (Halliwell & Gutteridge, 1998).

##### *Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)*

Είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη, η οποία δρα τόσο στο εξωκυττάριο υγρό όσο και στο κυτταρόπλασμα. Στα υγρά των ιστών η βιταμίνη C έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες, ενώ στο εσωτερικό των κυττάρων ενισχύει τη δράση της βιταμίνης E και της GSH αναγεννώντας τις ενεργές τους μορφές μετά την αλληλεπίδραση τους με τις ROS (Finaud et al., 2006; Evans, 2000).

##### *Βιταμίνη A (ρετινόλη) και β-καροτένιο*

Η βιταμίνη A είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη. Το β-καροτένιο εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μετατρέπεται σε βιταμίνη A όταν απαιτείται από τις ανάγκες του οργανισμού. Το β-καροτένιο πιστεύεται ότι αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες και περιορίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Το β-καροτένιο και η βιταμίνη A δρουν σε συνεργασία με τις βιταμίνες E και C ενάντια στις ελεύθερες ρίζες, αν κι έχουν μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα από αυτές (Livrea et al., 1995).

### *Φλαβονοειδή*

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες οι οποίες σχηματίζονται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και μηλονικό οξύ (Willcox et al., 2002). Έχει βρεθεί ότι καταστέλλουν τη δράση προοξειδωτικών ενζύμων *in vitro* ενώ έχουν επίσης την ικανότητα να απενεργοποιούν ορισμένες ελεύθερες ρίζες (Finaud et al., 2006).

### *Γλουταθειόνη*

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπίδιο, το οποίο περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα και αποτελεί ένα σημαντικό διαλυτό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της συνεχούς και κυκλικής μετάπτωσης της από μία ανηγμένη (GSH) σε μία οξειδωμένη μορφή (GSSG) και το αντίθετο. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια και αποτελεί το κυριότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό στα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Δρα ως υπόστρωμα της GPX κι έτσι συμμετέχει στην αναστολή της παραγωγής των ROS. Εξουδετερώνει και απευθείας τις ελεύθερες ρίζες ενώ παράλληλα ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών E και C (May et al., 1996). Σε καταστάσεις που υπάρχουν μειωμένες ποσότητες GSH, αυτές μπορούν να εξισορροπηθούν με συμπληρώματα βιταμινών E και C, γεγονός το οποίο δείχνει ότι τα παραπάνω αντιοξειδωτικά έχουν τους ίδιους στόχους.

### *Ουρικό οξύ*

Πρόκειται για το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο. Η άσκηση οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Στη συνέχεια διαχέεται στο εσωτερικό των μυών και λειτουργεί προστατευτικά απέναντι στην προκαλούμενη από ROS οξείδωσή τους (Hellsten et al., 1998). Έτσι, προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες και το DNA από το οξειδωτικό στρες (Wayner et al., 1987).

### *Συνένζυμο Q10*

Είναι ένα μόριο, το οποίο βρίσκεται στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων, παίρνει μέρος στις λειτουργίες της αναπνευστικής αλυσίδας και είναι απαραίτητο για τη σύνθεση

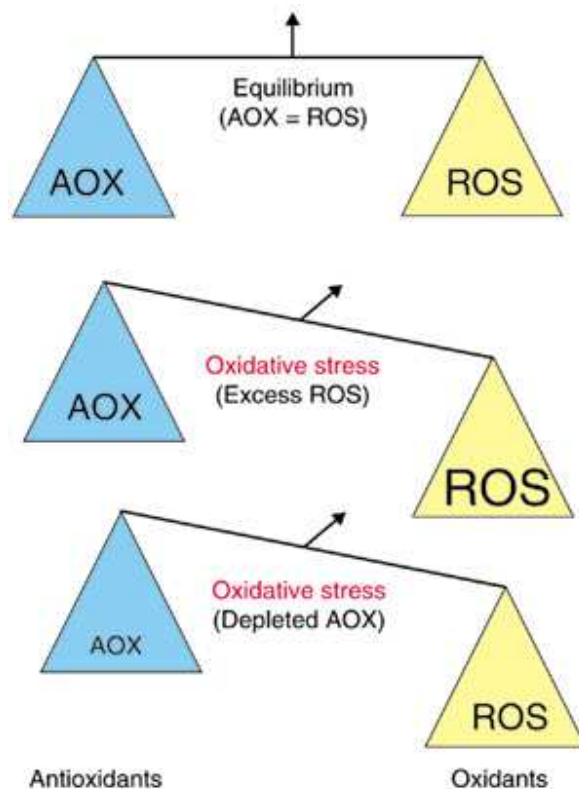
του ATP. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, ενώ παράλληλα είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση ενός άλλου πολύ ισχυρού λιπόφιλου αντιοξειδωτικού, της α-τοκοφερόλης (Siemieniuk et al., 2005).

#### *Άλλα αντιοξειδωτικά*

Διάφορες άλλες πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη και η φερριτίνη έχουν αντιοξειδωτική δράση έναντι των ROS. Η φερριτίνη παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων του καθώς η υψηλή συγκέντρωσή του έχει προοξειδωτικές συνέπειες μέσω της αντίδρασης Fenton. Επίσης, ιχνοστοιχεία όπως χαλκός, ψευδάργυρος, σίδηρος, σελήνιο και μαγγάνιο εμπλέκονται σε αντιοξειδωτικές λειτουργίες ως συνεργιστικοί παράγοντες των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Powers et al., 2004).

#### **1.5. Οξειδωτικό στρες**

Ως οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού υπέρ των πρώτων, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων (Halliwell & Gutteridge, 1998). Αυτή η διαταραχή μπορεί να οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε σε μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών λόγω κάποιων μεταλλάξεων, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν τη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Cu/Zn-SOD, CAT ή GPX). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες. Στις εξωγενείς πηγές συγκαταλέγονται η περιβαλλοντική ρύπανση (μόλυνση νερού, αέρα, τροφής), η ακτινοβολία (ηλιακή, ηλεκτρομαγνητική), η βαριά σωματική άσκηση καθώς και το κάπνισμα, η κατανάλωση αλκοόλ, η κακή διατροφή, η λήψη φαρμάκων και τοξικές ουσίες. Στις ενδογενείς πηγές ανήκουν έζυμα που παράγουν ελεύθερες ρίζες (π.χ. οξειδάση της ξανθίνης που μετατρέπει την ξανθίνη σε ουρικό οξύ) καθώς επίσης και την άσκηση, το ψυχολογικό στρες, τη φλεγμονή, τον καρκίνο και τον κυτταρικό θάνατο. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες δρουν συχνά πολύ γρήγορα και πολλές φορές η δράση τους είναι αθροιστική ή τουλάχιστον συνεργιστική.



**Εικόνα 1:** Πάνω, ισορροπία. Στη μέση, οξειδωτικό στρες λόγω αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών. Κάτω, οξειδωτικό στρες λόγω μειωμένης δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

#### *Επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες*

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε όλα τα μακρομόρια όπως DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια καθώς και κυτταρικό θάνατο. Οι πρωτεΐνες μπορεί να υποστούν αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή και γενικότερα άμεση και έμμεση καταστροφή. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής σχετίζονται συνήθως με την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών. Όσον αφορά το DNA, οι τροποποιήσεις των βάσεων, οι θραύσεις των αλυσίδων του, οι καταστροφές στο σάκχαρο της δεοξυριβόζης και οι βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσής του είναι μερικές επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες, που μπορεί να οδηγήσουν στον εκφυλισμό του. Στον κυτταρικό θάνατο το κύτταρο φτάνει είτε μέσω της νέκρωσης είτε μέσω της απόπτωσης. Κατά τη νέκρωση το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται απελευθερώνοντας το περιεχόμενό

του στο περιβάλλον επηρεάζοντας τα γειτονικά κύτταρα. Το περιεχόμενό του μπορεί να περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά μόρια όπως η καταλάση και η GSH και προοξειδωτικά όπως ιόντα χαλκού και σιδήρου. Στην απόπτωση τα κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και δεν προκαλούν βλάβες στα γειτονικά κύτταρα.

### ***1.6. Οξειδωτικό Στρες και Άσκηση***

Η άσκηση έχει δειχθεί ότι συμβάλλει στη βελτίωση της ποιότητας της ζωής, μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών και βελτιώνοντας τη λειτουργία του μυϊκού συστήματος (Halliwell & Gutteridge, 1998). Όμως, μελέτες έχουν δείξει ότι η άσκηση προκαλεί αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, η οποία οδηγεί σε διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων προκαλώντας οξειδωτικό στρες (Azzi et al., 2004). Η ποσότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση είναι άμεσα εξαρτώμενη από την ένταση της άσκησης. Όταν η άσκηση είναι εξαντλητική τα επίπεδα ελευθέρων ριζών που παράγονται είναι πολύ υψηλά με αποτέλεσμα η αντιοξειδωτική άμυνα των ιστών να μην μπορεί να τα εξουδετερώσει (Palmer et al., 2003). Ωστόσο, η άσκηση σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες με δυο τρόπους. Από τη μια πλευρά αυξάνει το οξειδωτικό στρες και από την άλλη προκαλεί προσαρμογές που φαίνεται να έχουν προστατευτικές, αντιοξειδωτικές επιδράσεις (Møller et al., 1996).

Σε προηγούμενες εργασίες έχει παρατηρηθεί ότι η άσκηση σχετίζεται με την αύξηση του οξειδωτικού στρες (Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξάνονται στο πλάσμα και το γαστροκνήμιο μυ μετά από εξαντλητική άσκηση (Alessio et al., 2000; Gomez-Cabrera et al., 2005; Stadtman & Levine, 2000; You et al., 2005). Η άσκηση αυξάνει και τη λιπιδική υπεροξειδωση στο πλάσμα και το σκελετικό μυ, όπως έχει αναφερθεί και στο παρελθόν (Ajmani et al., 2003; Alessio et al., 2000; You et al., 2005). Τέλος, ο λόγος GSH/GSSG φαίνεται να μειώνεται μετά από άσκηση (ποδηλασία) στον άνθρωπο (Aguilo et al., 2005). Επιπλέον, έχει αναφερθεί αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια του οξειδωτικού στρες μετά από εξαντλητική αερόβια άσκηση η οποία περιελάμβανε τρέξιμο, κολύμπι ή ποδηλασία (Alessio, 1993; Vasankari et al., 1997; Liu et al., 1999; Mastaloudis et al., 2001; Palmer et al., 2003; Ashton et al., 1998; Child et al.,



1998; Lovlin et al., 1987). Στον αντίποδα, αυτή η αύξηση του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό επηρεάζει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού λόγω της ανάγκης του να αντιμετωπίσει το αυξανόμενο οξειδωτικό στρες (Ramel et al., 2004; Alessio et al., 2000).

#### *Παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση*

Κατά την άσκηση έχουμε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών λόγω ενίσχυσης συγκεκριμένων μηχανισμών παραγωγής αυτών. Αυτοί μπορεί να είναι:

#### *Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων*

Στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων το μοριακό οξυγόνο ανάγεται σε νερό. Αυτή η ροή ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό  $O_2^{\bullet-}$ . Κατά τον Ji (1999), ο μεταβολικός ρυθμός στους σκελετικούς μύες κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνεται μέχρι και 100 φορές σε σχέση με τα επίπεδα ηρεμίας ενώ η συνολική πρόσληψη οξυγόνου γίνεται 20 φορές μεγαλύτερη. Έτσι, μπορούμε να καταλάβουμε ότι έχουμε μια σημαντική αύξηση παραγωγής ελευθέρων ριζών (Niess, 2005).

#### *Φλεγμονώδης αντίδραση*

Η έντονη άσκηση, η οποία προκαλεί μυϊκή καταστροφή έχει σαν αποτέλεσμα την έκκριση λυσοζύμης και  $O_2^{\bullet-}$  από τα πολυμορφοουδετερόφιλα τα οποία είναι η ομάδα κυττάρων που συμμετέχουν στη φλεγμονώδη αντίδραση. Έτσι, κατά την προκαλούμενη από την άσκηση ενεργοποίηση και δράση των πολυμορφοουδετερόφιλων έχουμε παραγωγή αυξημένων ελευθέρων ριζών, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την πρόκληση οξειδωτικού στρες (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). Επίσης, η φλεγμονώδης αντίδραση ευνοεί την αποδέσμευση του σιδήρου από τη μυοσφαιρίνη των μυϊκών ινών και την αιμοσφαιρίνη των ερυθροκυττάρων ενισχύοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Cooper et al., 2002; Niess, 2005).

### Οξειδάση της ξανθίνης

Κατά την εξαντλητική άσκηση προκαλείται το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, το οποίο ενεργοποιεί το μονοπάτι της οξειδάσης της ξανθίνης. Η αφυδρογονάση της ξανθίνης οξειδώνεται προς οξειδάση της ξανθίνης. Μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η δράση του ενζύμου αυτού οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα  $O_2^{\bullet-}$  και  $H_2O_2$  (McCord & Fridovich, 1968) καθώς χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο ως αποδέκτη ηλεκτρονίων. Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα οξειδάσης της ξανθίνης και υποξανθίνης τόσο στο πλάσμα όσο και σε ιστούς μετά από αναερόβια άσκηση (Radak et al., 1996; Vina et al., 2000).

### Υπεροξειδιοσώματα

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι οργανίδια που οξειδώνουν τα λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα είναι η κύρια πηγή ενέργειας για το μυοκάρδιο και το σκελετικό μυ κατά την άσκηση και κατά τη διάσπασή τους στα υπεροξειδιοσώματα ελευθερώνονται ROS (Ji, 1999).

### 1.7. Χορήγηση εκχυλισμάτων πριν την άσκηση στον άνθρωπο και σε πειραματόζωα

Σε μελέτη που έγινε σε ανθρώπους (ομάδα κωπηλατών), χορηγήθηκε εκχύλισμα από το φυτό *Rhodiola rosea*, που ζει στις ψυχρές περιοχές της γης, όπως αρκτική, βουνά της κεντρικής Ασίας, Άλπεις, και Σκανδιναβία, 2 φορές την ημέρα σε δόσεις των 100mg εκχυλίσματος για 4 εβδομάδες (Skarpanka-Stejnborn et al., 2009), με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί αυξημένη TAC στο πλάσμα καθώς και μειωμένη δράση της SOD στα ερυθροκύτταρα έως και 24 ώρες μετά την άσκηση, ενώ σε χορήγηση εκχυλίσματος *Cynara scolymus L.* (αγγινάρας) 3 φορές την ημέρα για 5 εβδομάδες σε δόσεις των 400mg παρατηρήθηκε απίση αύξηση της TAC στο πλάσμα αλλά δεν περιόρισε την οξειδωτική καταστροφή των ερυθροκυττάρων, που είχε προκληθεί λόγω της προπόνησης των αθλητών (Skarpanka-Stejnborn et al., 2008). Σε άλλο πείραμα έγινε χορήγηση πολυσακχαριτών από το *Lycium Barbarum*, ένα φυτό της νοτιοανατολικής Ευρώπης και της Ασίας γνωστό και ως κινέζικο μούρο, σε 32 αρσενικούς επίμυες σε πρόγραμμα άσκησης 30 ημερών. Τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένα επίπεδα μηλονικής διαλδεΐδης,

μειωμένη δράση της κρεατινικής κινάσης και αυξημένα επίπεδα γλυκογόνου σε σκελετικό μυ των επιμύων (Niu et al., 2008).

Σε παρόμοιο πείραμα έγινε χορήγηση από το στόμα εκχυλίσματος σκόρδου σε δόση 2,86g/kg 30 min πριν από άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο που γινόταν για 5 μέρες την εβδομάδα επί 4 εβδομάδες με αποτέλεσμα σημαντική μείωση επιπέδων SOD στο πλάσμα και ενίσχυση της φυσικής δύναμης και αντοχής (Morihara et al., 2006). Σε άλλη μελέτη χορηγήθηκε εκχύλισμα *Panax Ginseng*, φυτό το οποίο φυτρώνει κυρίως στην Κίνα και την Κορέα, για 8 εβδομάδες σε επίμυες σε δόσεις των 2g τρεις φορές τη μέρα. Ακολούθησε άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο μέχρι εξάντλησης. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση μαλοναλδεΐδης, αύξηση των επιπέδων καταλάσης και αύξηση SOD στο αίμα 10 και 30min μετά την άσκηση καθώς και αύξηση της απόδοσης (Kim et al., 2005). Επίσης, μετά από χορήγηση εκχυλίσματος *Panax ginseng* από το στόμα για 3 μήνες σε διάφορες δόσεις, οι επίμυες έκαναν άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο και τα αποτελέσματα έδειξαν δοσοεξαρτώμενη μείωση των TBARS, αύξηση επιπέδων SOD και αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας σε ηπατικό επίπεδο (Voces et al., 1999).

Άλλο πείραμα, στο οποίο χορηγήθηκαν φύλλα *Eucommia ulmoides*, ενός μικρού δέντρου στην Κίνα που καλλιεργείται ιδιαίτερα για τους φλοιούς τους που έχουν ιδιαίτερη αξία στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική, σε επίμυες, την 29η μέρα έγινε άσκηση αντοχής σε δαπεδοεργόμετρο σε κλίση 7° και 24 ώρες μετά λήφθηκαν μύες και όργανα. Οι μετρήσεις οι οποίες έγιναν έδειξαν αρκετά αυξημένη δράση γαλακτικής δεϋδρογονάσης, μείωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέως στον υποκνημίδιο μυ και αύξηση της αντοχής (Li et al., 1999). Σε άλλη μελέτη χορηγήθηκε εκχύλισμα *Prunus mume*, γνωστό και ως ιαπωνικό βερίκοκο, σε επίμυες σε συγκεντρώσεις 1.5%, 0.9% και 0.3% για 4 εβδομάδες και τα δείγματα λήφθηκαν αμέσως και 30min μετά την άσκηση. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε μείωση της δράσης της γαλακτικής δεϋδρογονάσης σε σκελετικό μυ και αύξηση των ηπατικών και μυικών συγκεντρώσεων γλυκογόνου στα ζώα, που θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση (Kim et al., 2008). Σε πείραμα, στο οποίο έγινε χορήγηση από το στόμα εκχυλίσματος πολυσακχαριτών από *Euphorbia kansui*, που χρησιμοποιείται ως παραδοσιακό φάρμακο στην Κίνα, σε επίμυες, που υποβλήθηκαν σε εξαντλητική κολύμβηση παρατηρήθηκε μείωση της μηλονικής

διαλδεύδης, αύξηση της δράσης SOD σε σκελετικό μυ και μείωση της κόπωσης (Yu et al., 2006).

Χορήγηση εκχυλίσματος *Pterodon emarginatus*, ενός φυτού της νότιας Βραζιλίας, σε δοσολογία 498mg/kg πριν και μετά από οξεία άσκηση έδειξε μείωση της μηλονικής διαλδεύδης στον πρόσθιο κνημιαίο μυ, τον εγκέφαλο και το ήπαρ των επιμύων (Paula et al., 2005) ενώ χορήγηση από το στόμα εκχυλίσματος *Panax Ginseng* σε επίμυες για 3 μήνες σε δόσεις 3, 10, 100 και 500mg/kg πριν την άσκηση έριξε τα επίπεδα μηλονικής διαλδεύδης και μείωσε τη δράση της κιτρικής συνθάσης στον υποκνημίδιο και τον μακρύ εκτείνοντα τους δακτύλους σκελετικούς μύες (Voces et al., 2004). Τέλος, μελέτη στην οποία έγινε χορήγηση *Rhodiola rosea* για 2-4 εβδομάδες σε επίμυες και ακολούθησε κολύμβηση για 90min με 5% επιπρόσθετο βάρος παρατηρήθηκε αύξηση της δράσης της κιτρικής συνθάσης και αύξηση των επιπέδων γλυκογόνου στο ήπαρ με αποτέλεσμα αυξημένο χρόνο κολύμβησης (Lee et al., 2009) καθώς επίσης και χορήγηση *Panax ginseng G115* σε επίμυες σε δοσολογία 50mg/kg και ταυτόχρονη άσκηση σε 4 ομάδες για 12 εβδομάδες δεν έδειξε κάποια διαφορά στη γαλακτική δεϋδρογονάση (Ferrando et al., 1999).

Φαίνεται, λοιπόν, ότι υπάρχουν στη βιβλιογραφία εργασίες, οι οποίες έχουν ασχοληθεί με τη χορήγηση διάφορων φυτικών εκχυλισμάτων στον άνθρωπο και σε πειραματόζωα πριν την άσκηση. Τα αποτελέσματα δεν ήταν πάντα προς την ίδια κατεύθυνση διότι άλλοτε τα εκχυλίσματα είχαν προοξειδωτική και άλλοτε αντιοξειδωτική δράση.

## Σκοπός

Σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης στο οξειδωτικό στρες και την αθλητική απόδοση (Veskoukis et al., 2008). Κατά τη διάρκεια της άσκησης, η οξειδάση της ξανθίνης είναι το κύριο ένζυμο παραγωγής ελευθέρων ριζών (Gomez-Cabrera et al., 2005). Έτσι, μελετήσαμε την επίδραση της αλλοπουρινόλης, ενός γνωστού αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης σε επίμυες, σε συνδυασμό με την εφαρμογή πρωτοκόλλου κολύμβησης μέχρι εξάντλησης. Από άλλες μελέτες έχει βρεθεί ότι η χορήγηση αλλοπουρινόλης αναστέλλει τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης, η οποία αυξάνεται με την άσκηση τόσο στους επίμυες μετά από τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο (Gomez-Cabrera et al., 2005; Koyama et al., 1999) όσο και στον άνθρωπο μετά από το μαραθώνιο (Gomez-Cabrera et al., 2006) και ποδηλασία (Gomez-Cabrera et al., 2003).

Η αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης στις εργασίες αυτές προκάλεσε ελάττωση του παραγόμενου από την άσκηση οξειδωτικού στρες, ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην απόδοση. Αντίθετα, τα αποτελέσματα του εργαστηρίου μας έδειξαν ότι η αναστολή της δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης από την χορηγούμενη αλλοπουρινόλη προκάλεσε οξειδωτικό στρες στο πλάσμα, τα ερυθροκύτταρα και το γαστροκνήμιο μυ συνοδευόμενη από μία μεγάλη πτώση της απόδοσης σε ποσοστό 35% (Veskoukis et al., 2008).

Έτσι, σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετήσουμε τις επιδράσεις της χορήγησης ενός φυτικού εκχυλίσματος στο οξειδωτικό στρες και την απόδοση σε επίμυες. Το εκχύλισμα σταφυλιού μπατίκι Τυρνάβου, που χορηγήθηκε έχει βρεθεί από προηγούμενες μελέτες μας ότι έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες ενώ αναστέλλει και τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης *in vitro* (Spanou et al., 2010 under review). Αυτή είναι η πρώτη *in vivo* μελέτη φυτικού εκχυλίσματος στο εργαστήριό μας και εξετάστηκε αν μία συχνά χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση φυτικού εκχυλίσματος θα μπορούσε να χορηγηθεί μελλοντικά στη διατροφή.

## **2. Υλικά και μέθοδοι**

### **2.1. Δείγμα**

Για τη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν 40 ένηβοι αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar, ηλικίας 9 εβδομάδων και βάρους  $285 \pm 5$  g (mean  $\pm$  SEM). Οι επίμυες διαβιούσαν σε ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες με δωδεκάωρο κύκλο φωτός - σκότους και σταθερή θερμοκρασία 20°C. Τροφή και νερό παρέχονταν ελεύθερα. Χωρίστηκαν τυχαία σε 4 ομάδες των 10 και τοποθετήθηκαν σε κλουβιά ανά τρία. Ο διαχωρισμός τους έγινε στις εξής ομάδες:

- Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός, δεν έκαναν άσκηση και θανατώθηκαν 1h μετά τη χορήγηση.
- Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός, έκαναν άσκηση 1h μετά και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση.
- Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε εκχύλισμα σταφυλιού, δεν έκαναν άσκηση και θανατώθηκαν 1h μετά τη χορήγηση.
- Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε εκχύλισμα σταφυλιού, έκαναν άσκηση 1h μετά και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση.

### **2.2. Χορήγηση εκχυλίσματος**

Το εκχύλισμα από σταφύλι χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε μία δόση των  $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  σωματικού βάρους 1h πριν την άσκηση. Η πολυφαινολική σύσταση του εκχυλίσματος παρατίθεται στο παράρτημα.

### **2.3. Εξοικείωση των επιμύων με την κολύμβηση**

Με την άφιξή τους στο χώρο του πειράματος οι επίμυες αφέθηκαν για 7 ημέρες ώστε να εγκλιματιστούν. Έπειτα ξεκίνησε η εξοικείωσή τους με την κολύμβηση για μια περίοδο 5 ημερών πριν την εφαρμογή του πειραματικού πρωτοκόλλου. Την πρώτη ημέρα οι επίμυες παρέμειναν στο νερό για 10min χωρίς πρόσθετο βάρος στη βάση της ουράς τους. Τη δεύτερη και την τρίτη ημέρα οι επίμυες ασκήθηκαν για 10min με εφαρμογή βάρους ίσου με το 1% του σωματικού τους βάρους ενώ την τέταρτη και την πέμπτη μέρα το βάρος αυξήθηκε στο 2% του σωματικού τους βάρους. Έπειτα, οι επίμυες

ξεκουράστηκαν για 3 ημέρες στα κλουβιά τους πριν την εφαρμογή του πειραματικού πρωτοκόλλου.

#### **2.4. Πρωτόκολλο κολύμβησης**

Οι επίμυες κολύμπησαν μέχρι εξάντλησης, ο καθένας ξεχωριστά, σε κυλινδρική δεξαμενή (διάμετρος 1,0m, βάθος 0,7m) και με το νερό σε θερμοκρασία 33-36°C. Στη βάση της ουράς τους τοποθετήθηκε φορτίο ίσο με 4% του σωματικού τους βάρους, ώστε να κάνουν συνεχή άσκηση. Οι επίμυες θεωρήθηκε ότι έφταναν στην εξάντληση όταν δεν μπορούσαν να διατηρήσουν τη μύτη τους έξω από το νερό. Η άσκηση επιλέχθηκε να είναι μέχρι εξάντλησης διότι το προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες εξαρτάται από την έντασή της (Leaf et al., 1997). Το πρωτόκολλο κολύμβησης επιλέχθηκε έναντι άσκησης σε δαπεδοεργόμετρο διότι προκαλεί μικρότερη μυϊκή καταστροφή (Duarte et al., 1994) με αποτέλεσμα η όποια αύξηση παραγωγής ελευθέρων ριζών να αποδοθεί στην άσκηση και όχι στη μυϊκή καταστροφή.

#### **2.5. Θανάτωση, λήψη δειγμάτων και ομογενοποίηση**

Οι επίμυες θανατώθηκαν με αποκεφαλισμό αφού πρώτα εκτέθηκαν σε αιθέρα. Τα δείγματα του γαστροκνήμιου μυός και του ήπατος αφαιρέθηκαν χειρουργικά και τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο. Η ομογενοποίηση έγινε με γουδί και γουδοχέρι. Ο ιστός ομογενοποιήθηκε σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα PBS pH 7,4 που περιέχει 138mM NaCl, 2,7mM KCL και 1mM EDTA καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών: Απροτινίνη (10mg/mL), λιουπεπτίνη (1mg/mL) και PMSF (9mg/mL).

#### **2.6. Δείκτες οξειδωτικού στρες που μετρήθηκαν**

Μετρήθηκαν η δραστικότητα της καταλάσης και της οξειδάσης της ξανθίνης, η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) στο γαστροκνήμιο μυ και το ήπαρ.

Η δραστικότητα της καταλάσης μετρήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Aebi, (1984). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο ρυθμό διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου από το ένζυμο.

Η δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης μετρήθηκε σύμφωνα με τους Prajda & Weber, (1975). Η δραστικότητα του ενζύμου υπολογίστηκε με βάση το ρυθμό σχηματισμού ουρικού οξέος λόγω της οξείδωσης της ξανθίνης από το ένζυμο.

Η GSH υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Reddy et al. (2004) και ως γνωστόν παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό φαρμάκων καθώς και σε άλλες σημαντικές διαδικασίες όπως η απομάκρυνση των ξενοβιοτικών, η διατήρηση των επιπέδων των θειολικών ομάδων των πρωτεϊνών και η αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της GSH βασίζεται στην αντίδρασή της με το αντιδραστήριο DTNB προς παραγωγή GSSG και 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκού οξέος, το οποίο είναι έγχρωμο προϊόν.

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, που υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Patsoukis et al. (2004), είναι προϊόντα της οξειδωτικής καταστροφής των πρωτεϊνών. Πιο συγκεκριμένα, όταν οι πρωτεΐνες οξειδώνονται σχηματίζουν σταθερά μόρια με καρβονυλικές ομάδες στις αλυσίδες των Pro, Arg, Lys and Thr. Η καρβονυλίωση οδηγεί στην απώλεια της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών. Η ανίχνευσή τους γίνεται με την πρόσδεση των καρβονυλομάδων σε ένα έγχρωμο μόριο, το DNPB, το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί φωτομετρικά.

Όσον αφορά τα TBARS, ο υπολογισμός έγινε σύμφωνα με τους Keles et al. (2001). Η δράση των ελευθέρων ριζών στα λιπίδια των μεμβρανών έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό λιπιδικών υπεροξειδίων, τα οποία όταν αποσυντίθενται οδηγούν στο σχηματισμό της μηλονικής διαλδεύδης (MDA). Τα TBARS αναφέρονται στη δέσμευση της MDA από το θειοβαρβιτουρικό οξύ σε αναλογία 1:2.

Τέλος, ο υπολογισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszewska & Bartosz, (2002). Είναι ένας δείκτης συνολικής εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των ιστών και αναφέρεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών συστατικών των ιστών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Η TAC υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη ρίζα DPPH, που παρουσία ενός δότη υδρογόνων, η ρίζα DPPH• μετατρέπεται στην αντίστοιχη υδραζίνη.

Τα πρωτόκολα των δεικτών οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στο παράρτημα. Οι μετρήσεις έγιναν φασματοφωτομετρικά και εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ανά mg πρωτεΐνης. Η ολική πρωτεΐνη υπολογίστηκε



σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

### **2.7. Στατιστική ανάλυση**

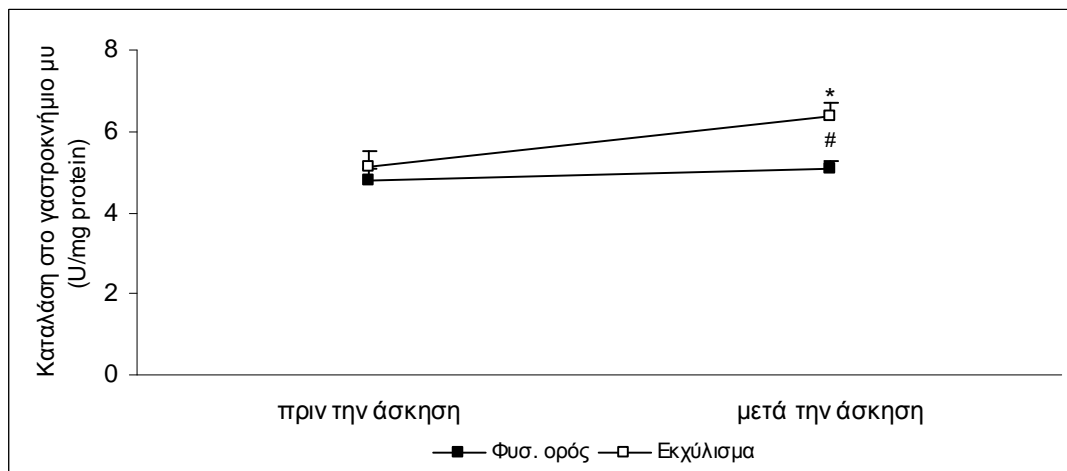
Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (παρέμβαση  $\times$  χρόνος) (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν με bonferroni t-test. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο  $P < 0,05$ . Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$ SEM.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Γαστροκνήμιος μυς

##### 3.1.1. Καταλάση

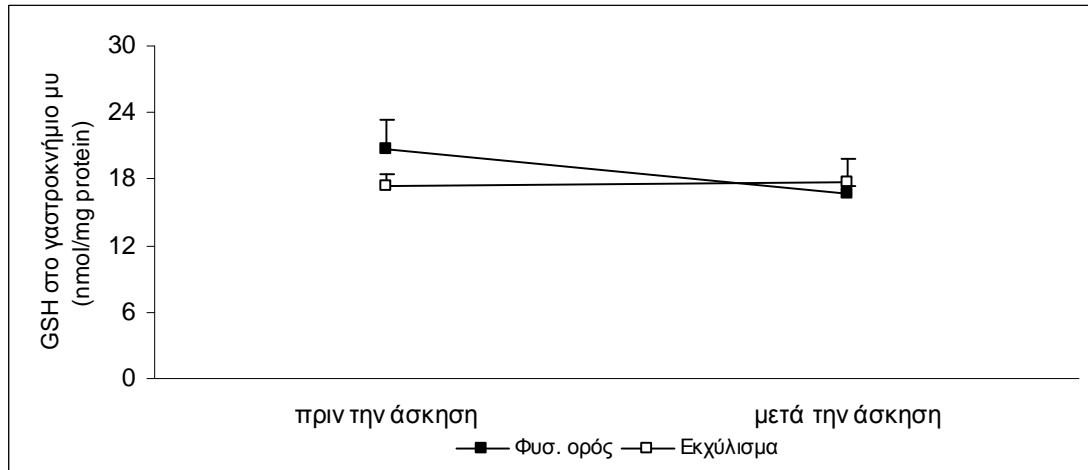
Παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της παρέμβασης και του χρόνου. Τα επίπεδα της καταλάσης αυξήθηκαν μετά την άσκηση στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα σε σχέση με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός.



**Διάγραμμα 1.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη δραστηριότητα της καταλάσης στο γαστροκνήμιο μυ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0.05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0.05$ ).

### 3.1.2. Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)

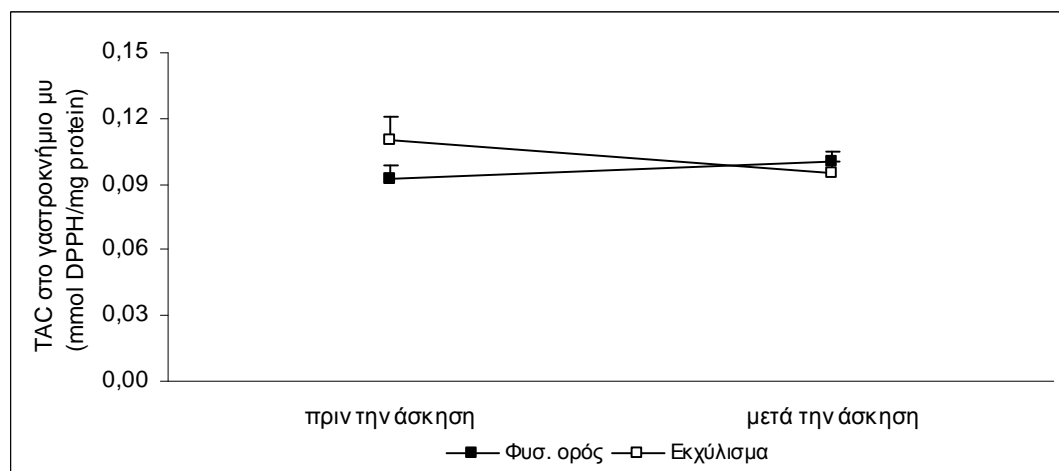
Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση.



**Διάγραμμα 2.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης στο γαστροκνήμιο μυ.

### 3.1.3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

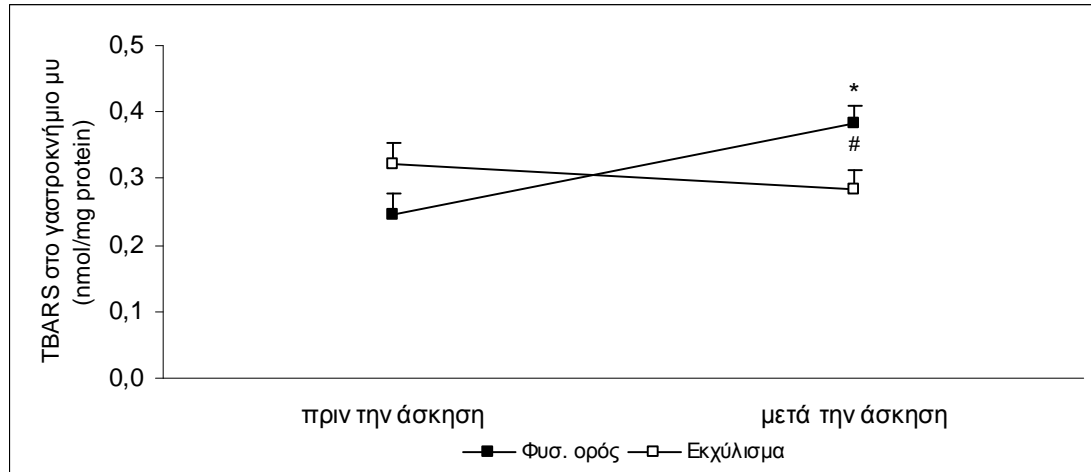
Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση.



**Διάγραμμα 3.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο γαστροκνήμιο μυ.

### 3.1.4. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

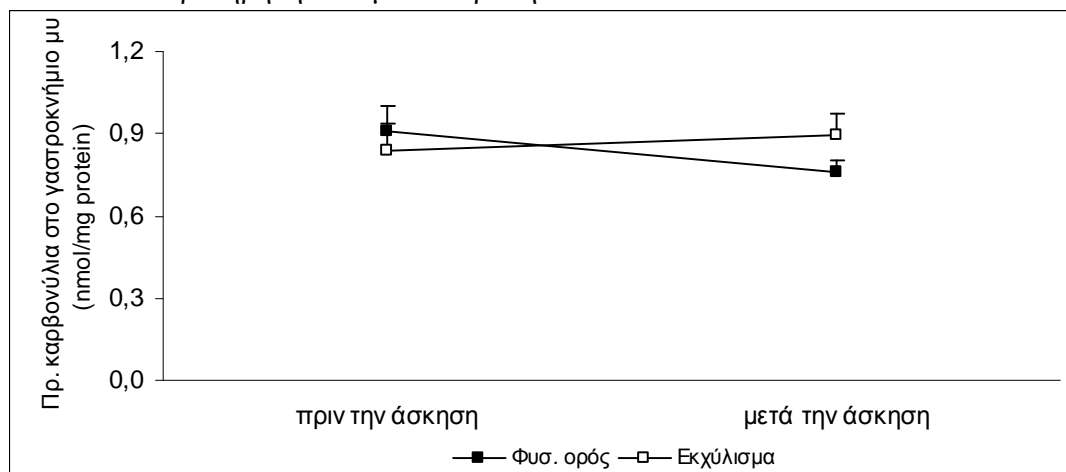
Παρατηρήθηκε επίδραση του συνδυασμού χρόνου και παρέμβασης. Η συγκέντρωση των TBARS αυξήθηκε μετά την άσκηση στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός.



**Διάγραμμα 4.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των TBARS στο γαστροκνήμιο μυ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0.05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0.05$ ).

### 3.1.5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια

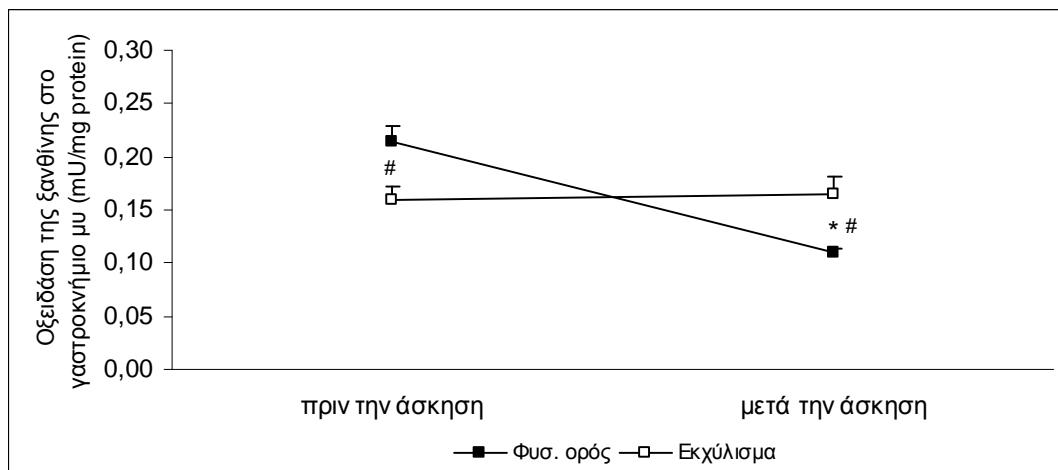
Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση.



**Διάγραμμα 5.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο γαστροκνήμιο μυ.

### 3.1.6. Οξειδάση της ξανθίνης

Παρατηρήθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και επίδραση του συνδυασμού χρόνου και παρέμβασης. Η χορήγηση εκχυλίσματος πριν την άσκηση μείωσε τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης ενώ στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας μετά την άσκηση σε σχέση με την τιμή πριν την άσκηση.

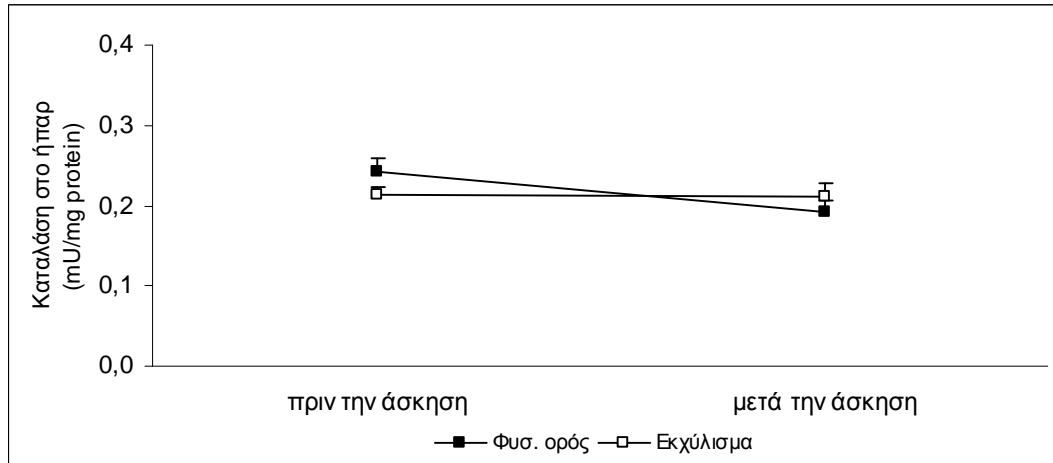


**Διάγραμμα 6.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο γαστροκνήμιο μμ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0.05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0.05$ ).

### 3.2. Ήπαρ

#### 3.2.1. Καταλάση

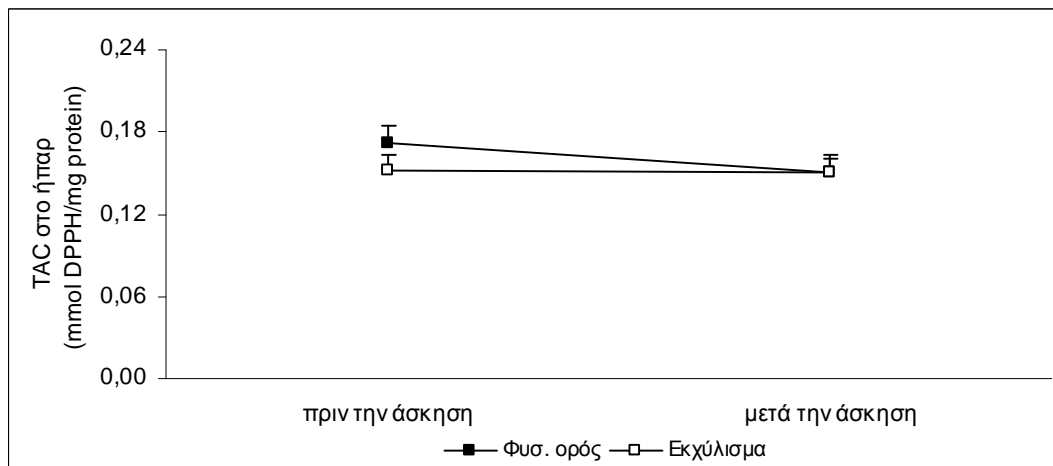
Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση.



**Διάγραμμα 7.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη δραστηριότητα της καταλάσης στο ήπαρ.

#### 3.2.2. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

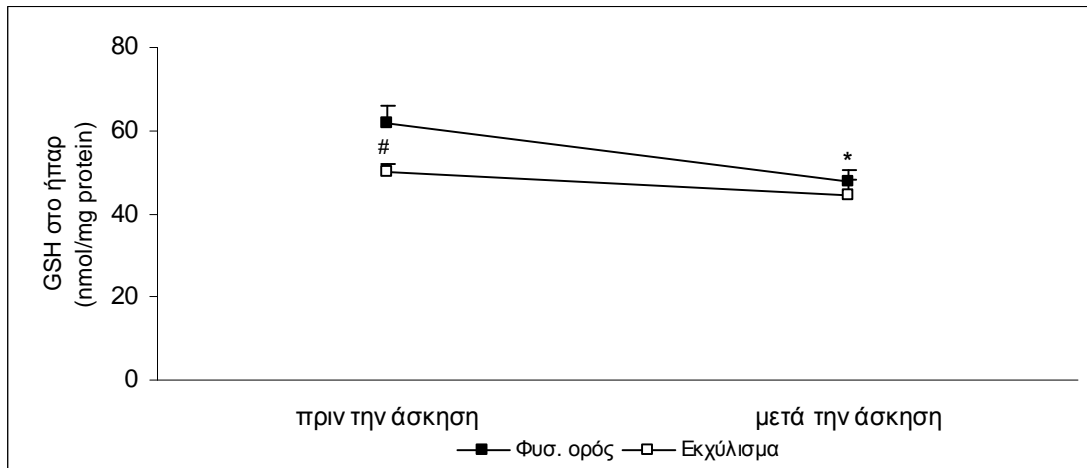
Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση.



**Διάγραμμα 8.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο ήπαρ.

### 3.2.3. Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)

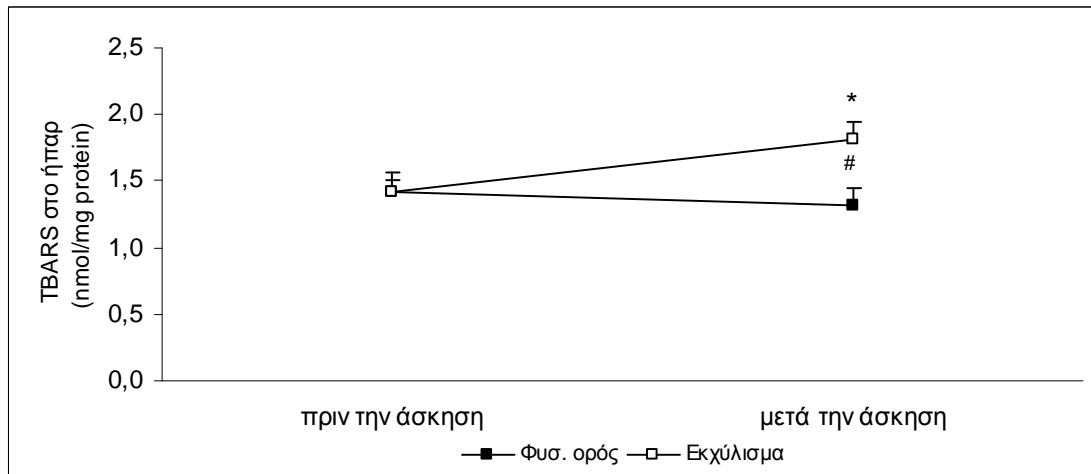
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και του χρόνου. Η χορήγηση εκχυλίσματος μείωσε τη συγκέντρωση της GSH πριν την άσκηση ενώ μετά την άσκηση παρατηρήθηκε μείωση της GSH στην ομάδα, που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός.



**Διάγραμμα 9.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης στο ήπαρ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0.05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα στην ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0.05$ ).

### 3.2.4. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και επίδραση του συνδυασμού παρέμβασης και χρόνου. Μετά την άσκηση παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS στην ομάδα που χορηγήθηκε το εκχύλισμα σε σχέση με την αρχική τιμή αλλά και σε σχέση με την ομάδα χορήγησης του φυσιολογικού ορού.

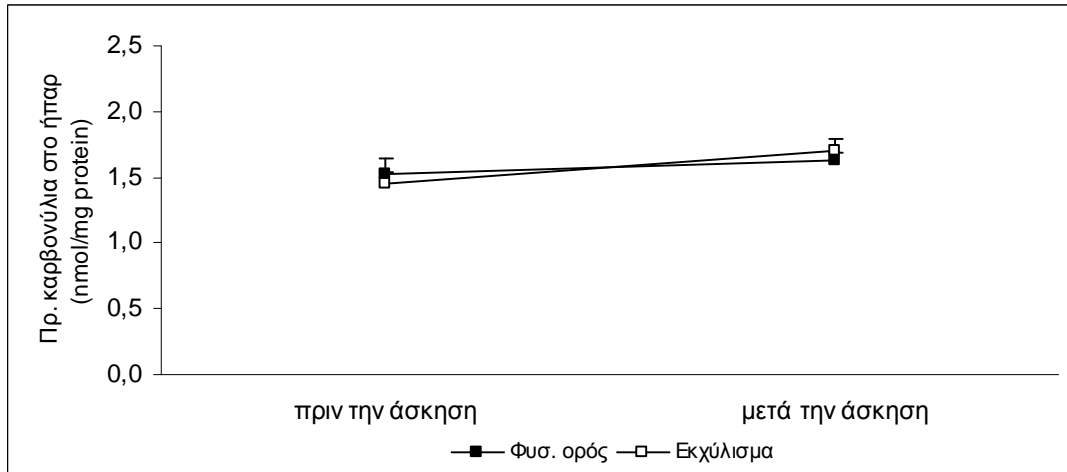


**Διάγραμμα 10.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των TBARS στο ήπαρ. \* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0.05$ ). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ( $P < 0.05$ ).



### 3.2.5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια

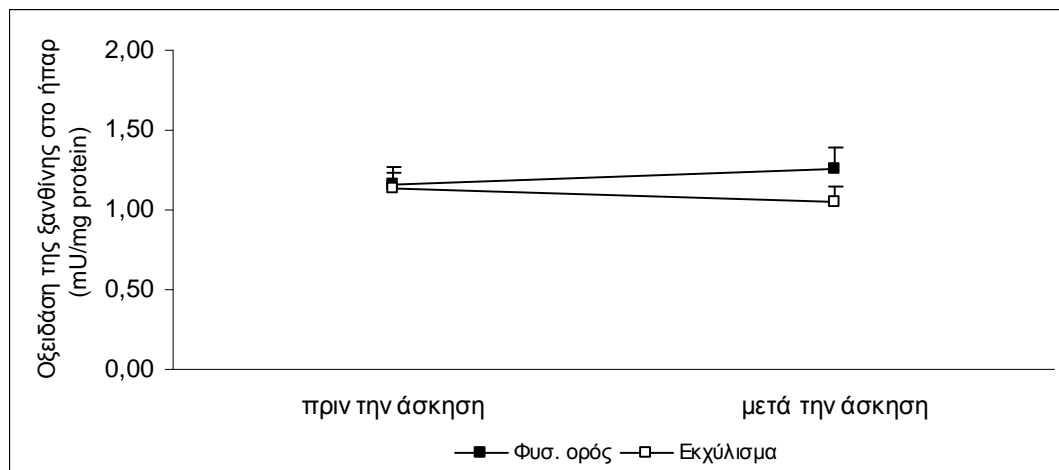
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η άσκηση αύξησε τη συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανεξάρτητα από τη χορήγηση εκχυλίσματος ή φυσιολογικού ορού.



**Διάγραμμα 11.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο ήπαρ.

### 3.2.6. Οξειδάση της ξανθίνης

Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση.



**Διάγραμμα 12.** Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο ήπαρ.

### **3.3. Απόδοση**

Η απόδοση μελετήθηκε σε 20 επίμνες, 10 από τους οποίους πήραν φυσιολογικό ορό και 10 το εκχύλισμα. Το εκχύλισμα δεν επηρέασε την απόδοση καθώς ο χρόνος εξάντλησης ήταν  $46,1 \pm 2,0\text{min}$  και  $45,1 \pm 1,4\text{min}$ , αντίστοιχα.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης ενός αντιοξειδωτικού εκχυλίσματος από σταφύλι σε επίμυες στο οξειδωτικό στρες και την απόδοση. Παρατηρήθηκε ότι η εξαντλητική άσκηση προκάλεσε οξειδωτικό στρες τόσο στο γαστροκνήμιο μυ καθώς είχαμε αύξηση της συγκέντρωσης των TBARS, όσο και στο ήπαρ, όπου παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με ταυτόχρονη πτώση της συγκέντρωσης της GSH. Διάφοροι τύποι άσκησης έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς σε μελέτες που έχουν γίνει για την επίδραση της άσκησης στο οξειδωτικό στρες. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της κολύμβησης καθώς προκαλεί περιορισμένο μυϊκό τραυματισμό με αποτέλεσμα να μην υπάρχει αλλοίωση των μετρήσεων των δεικτών του οξειδωτικού στρες.

Σε διάφορες εργασίες στη βιβλιογραφία βρέθηκε ότι η άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι δρομείς μαραθωνίου παρουσίασαν αύξηση των επιπέδων μαλοναλδεϋδης (MDA) έπειτα από εξαντλητική άσκηση (Gomez-Cabrera et al., 2006) καθώς επίσης και μετά από εξαντλητική κολύμβηση βρέθηκε αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης και μείωση της συγκέντρωσης της GSH (Inal et al., 2001). Άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο αύξησε τη συγκέντρωση των TBARS, την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, την καταλάση και τη GSH (Vider et al., 2001) ενώ σε τριαθλητές βρέθηκε μειωμένη η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC). Σε επίμυες παρατηρήθηκε αύξηση του οξειδωτικού στρες στο ήπαρ μετά από άσκηση (Lang et al., 1987; Bejma et al., 2000) καθώς βρέθηκε αύξηση της MDA, ενώ σε επίμυες μετά από κολύμβηση διαπιστώθηκε αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης στον καρδιακό μυ (Terblanche, 2000).

Σε πολλές εργασίες έχει μελετηθεί η δράση φυτικών εκχυλισμάτων στο οξειδωτικό στρες σε συνδυασμό με την άσκηση. Έτσι, σε μελέτες στις οποίες έγινε χορήγηση εκχυλίσματος *Rhodiola rosea* για 2-4 εβδομάδες σε επίμυες και ακολούθησε κολύμβηση για 90' με 5% επιπρόσθετο σωματικό βάρος παρατηρήθηκε αύξηση της δράσης της κιτρικής συνθάσης και αύξηση των επιπέδων γλυκογόνου στο ήπαρ με αποτέλεσμα αυξημένο χρόνο κολύμβησης (Lee et al., 2009) ενώ η χορήγηση *Panax ginseng* σε δοσολογία 50 mg/kg και ταυτόχρονη άσκηση σε 4 ομάδες επιμύων για 12

εβδομάδες δεν έδειξε κάποια διαφορά στη γαλακτική δεϋδρογονάση (Ferrando et al., 1999). Σε μελέτη που έγινε σε ανθρώπους (ομάδα κωπηλατών) χορηγήθηκε εκχύλισμα *Rhodiola rosea* 2 φορές την ημέρα σε δόσεις των 100mg εκχυλίσματος για 4 εβδομάδες (Skarpanska-Stejnborn et al., 2009) με αποτέλεσμα να παρατηρηθεί αυξημένη TAC και μειωμένη δράση της SOD έως και 24 ώρες μετά την άσκηση. Επίσης, μετά από χορήγηση εκχυλίσματος αγκινάρας 3 φορές την ημέρα σε δόσεις των 400mg εκχυλίσματος για 5 εβδομάδες παρατηρήθηκε αυξημένη TAC (Skarpanska-Stejnborn et al., 2008). Σε άλλο πείραμα έγινε χορήγηση πολυσακχαριτών *L. Barbarum* σε 32 αρσενικούς επίμυες σε πρόγραμμα άσκησης 30 ημερών (Niu et al., 2008). Τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένα επίπεδα MDA, μειωμένη δράση της κρεατινικής κινάσης και αυξημένα επίπεδα γλυκογόνου. Σε παρόμοιο πείραμα έγινε χορήγηση εκχυλίσματος σκόρδου στοματικά 30' πριν την άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο 5 μέρες την εβδομάδα επί 4 εβδομάδες σε δόσεις των 2.86 g/kg με αποτέλεσμα σημαντική μείωση επιπέδων SOD αλλά και ενίσχυση της φυσικής δύναμης και αντοχής (Moriyama et al., 2006). Σε άλλη μελέτη χορηγήθηκε εκχύλισμα *Panax Ginseng* για 8 εβδομάδες σε επίμυες σε δόσεις των 2 g 3 φορές τη μέρα. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της MDA, αύξηση των επιπέδων καταλάσης καθώς επίσης αύξηση της SOD και αύξηση της αντοχής (Kim et al., 2005), ενώ σε παρόμοιο πείραμα χορηγήθηκε εκχύλισμα *Panax ginseng* για 3 μήνες στοματικά σε διάφορες δόσεις και τα αποτελέσματα έδειξαν δόσοεξαρτώμενη μείωση των TBARS, αύξηση των επιπέδων της SOD και αύξηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο ήπαρ (Voces et al., 1999). Άλλο πείραμα, στο οποίο χορηγήθηκαν σε επίμυες φύλλα *Eucommia ulmoides*, την 29η μέρα έγινε άσκηση αντοχής σε δαπεδοεργόμετρο και 24 ώρες μετά λήφθηκαν μυς και όργανα και βρέθηκε αρκετά αυξημένη δράση της γαλακτικής δεϋδρογονάσης, μείωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέως και αύξηση της αντοχής (Li et al., 1999). Μελέτη στην οποία χορηγήθηκε σε επίμυες εκχύλισμα *Prunus mume* σε συγκεντρώσεις 1.5%, 0.9% και 0.3% για 4 εβδομάδες και θανατώθηκαν αμέσως μετά και 30' μετά την άσκηση βρέθηκε μείωση της δράσης της γαλακτικής δεϋδρογονάσης και αύξηση των ηπατικών και μυϊκών συγκεντρώσεων γλυκογόνου στα ζώα που θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση (Kim et al., 2008). Σε πείραμα στο οποίο έγινε στοματική χορήγηση εκχυλίσματος πολυσακχαριτών από *Euphorbia kansui* σε επίμυες και εξαντλητική

κολύμβηση παρατηρήθηκε μείωση της MDA, αύξηση της δράσης SOD και μείωση της κόπωσης (Yu et al., 2006). Χορήγηση εκχυλίσματος από *Pterodon emarginatus* σε δοσολογία 498 mg/kg έδειξε μείωση της MDA (Paula et al., 2005) ενώ στοματική χορήγηση εκχυλίσματος *Panax Ginseng* σε επίμυες για 3 μήνες σε δόσεις 3, 10, 100 και 500mg/kg έριξε τα επίπεδα μαλοναλδεΐδης και μείωσε τη δράση της κιτρικής συνθάσης (Voces et al., 2004).

Συμπερασματικά, με τη χορήγηση του εκχυλίσματος από σταφύλι της ποικιλίας μπατίκι Τυρνάβου πριν την άσκηση σε μία συγκέντρωση που χρησιμοποιείται συχνά μελέτες εκχυλισμάτων προκλήθηκε οξειδωτικό στρες τόσο στο γαστροκνήμιο μυ και το ήπαρ επιμύων. Αν και το συγκεκριμένο εκχύλισμα έχει μελετηθεί *in vitro* και έχει βρεθεί ότι έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση στη συγκέντρωση που χορηγήθηκε έδρασε προοξειδωτικά. Ωστόσο, δεν επηρεάστηκε η απόδοση των επιμύων συγκριτικά με τη μεγάλη μείωση που παρατηρήθηκε με τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στις λιγότερο δριμείες επιδράσεις του εκχυλίσματος *in vivo* και στη μικρότερη αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης σε σύγκριση με την αλοπουρινόλη. Έτσι, η δράση ενός αντιοξειδωτικού εξαρτάται από τη συγκέντρωσή του και το σύστημα που μελετάται

## 5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### 5.1. Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες

#### *Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)*

Ο υπολογισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszewska and Bartosz (2002). Σαράντα  $\mu\text{L}$  ιστού, αραιωμένα 1/10 τόσο για το γαστροκνήμιο μύ όσο και για το ήπαρ, προστέθηκαν σε 460 $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος 10mM (pH 7.4) και 500 $\mu\text{L}$  της ελεύθερης ρίζας DPPH και τα δείγματα επώαστηκαν στο σκοτάδι για 60min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 20.000g και μετρήθηκε η απορρόφησή τους 520nm.

Υπολογισμοί

$\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL ιστού} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) * 50 * 25 * 3 * 10] / 1000$

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

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

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 25 διότι η αραιώση του δείγματος στην κυβελίδα είναι 1/25 (1000  $\mu\text{L}$  / 40  $\mu\text{L}$  δείγματος = 25).

δ) Πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι κατά την ομογενοποίηση ο ιστός αραιώθηκε 1/3.

ε) Πολλαπλασιάζουμε με 10 επειδή το δείγμα αραιώνεται 1/10 κατά τη μέτρηση

στ) Διαιρούμε με το 1000 για να μετατρέψουμε τα L του δείγματος σε mL.

Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο:

$\text{mmol DPPH} / \text{mg total prot.}$

#### *Καταλάση*

Η δραστικότητα της καταλάσης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον Aebi (1984). Συνοπτικά, 40 $\mu\text{L}$  ιστού, αραιωμένου 1/2 για το γαστροκνήμιο μύ και 1/20 για το ήπαρ προστέθηκαν σε 2955 $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 7.4) και τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C για 10min. Πέντε  $\mu\text{L}$  υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% προστέθηκαν και η μεταβολή της απορρόφησης στα 240nm μετρήθηκε για 130sec.

### Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg total protein) =  $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample per min}} / 40) * (75 * 1000 * 3 * 2) / \text{Conc. Protein (mg/mL)}$  για το γαστροκνήμιο μν ενώ για το ήπαρ η δραστικότητα της καταλάσης (U/mg total protein) =  $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample per min}} / 40) * (75 * 1000 * 3 * 20) / \text{Conc. Protein (mg/mL)}$ .

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 75 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000μL) με τον όγκο του δείγματος (40μL) (3000/40=75). Πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν 1/3 και με 2 λαμβάνοντας υπόψη την 1/2 αραίωση του δείγματος κατά τη μέτρηση για το γαστροκνήμιο μν, αντίστοιχα με 20 για το ήπαρ λόγω της αραίωσης 1/20. Η απορρόφηση του τυφλού είναι μηδενική και γι' αυτό δε χρειάζεται να μετρηθεί.

### ***Πρωτεϊνικά καρβονύλια***

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Patsoukis et al. (2004). Πενήντα μL TCA 20% προστέθηκαν σε 50μL ιστού, αραιωμένου 1/2 τόσο για το γαστροκνήμιο μν όσο και για το ήπαρ, το μίγμα επώαστηκε στον πάγο για 15min και φυγοκεντρήθηκε στα 15.000g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και 500μL DNPH 10mM (διαλυμένης σε 2.5N HCL) για το δείγμα ή 500μL 2.5N HCL για το τυφλό, προστέθηκαν στο ίζημα. Τα δείγματα επώαστηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1h με ενδιάμεση ανακίνηση κάθε 15min και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, προστέθηκαν 1000μL TCA 10% και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, προστέθηκαν 1000μL μίγματος αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα (1/1) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5min στους 4°C. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε δύο ακόμη φορές. Το υπερκείμενο κατόπιν απομακρύνθηκε, προστέθηκαν 1000μL ουρίας 5M (pH 2.3), τα δείγματα επώαστηκαν στους 37°C για 5min, φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 5min στους 4°C και καταγράφηκε η απορρόφηση στα 375nm.

### Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = Absδείγματος – Abstυφλού / 0.022 \* 1000/50 \* 3 \* 2 τόσο στο γαστροκνήμιο μν όσο και στο ήπαρ .

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM · cm<sup>-1</sup>. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000μL στην κυψελίδα / 50μL δείγματος). Πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν 1/3 και με 2 λαμβάνοντας υπόψη την 1/2 αραίωση του δείγματος κατά τη μέτρηση.

Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο:

Συγκέντρωση πρ. καρβονυλίων: nmol/mg total prot.

### **Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)**

Για τα TBARS, ο υπολογισμός έγινε σύμφωνα με τους Keles et al. (2001). Πενήντα μL ιστού, αραιωμένου 1/2 για το γαστροκνήμιο μν και 1/5 για το ήπαρ αναμίχθηκαν με 500μL TCA 35% και 500μL Tris-HCl 200mM (pH 7.4) και επώαστηκαν για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Χίλια μL διαλύματος Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M και 55mM θειοβαρβιτουρικού οξέος προστέθηκαν και τα δείγματα επώαστηκαν σε υδατόλουτρο στους 95°C για 45min. Ακολούθως, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στον πάγο για 5min και προστέθηκαν 1000μL από TCA 70%. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 3min και η απορρόφηση του υπερκείμενου μετρήθηκε στα 530nm.

### Υπολογισμοί

Συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,156 \* 31\* 3 \* 2 για το γαστροκνήμιο μν και η συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,156 \* 62\* 3 \* 5 για το ήπαρ.

Όπου το 31 και 62 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100μL) με τον όγκο του δείγματος (100μL) (3100 / 100 = 31 και 3100 / 50 = 62). Το 0,156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10<sup>-6</sup> με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L το μmol/L. Πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν 1/3 και με 2 λαμβάνοντας υπόψη την 1/2 αραίωση του δείγματος κατά τη μέτρηση, αντίστοιχα με 5 για τον υπολογισμό στο ήπαρ λόγω της 1/5 αραίωσης.



Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο:

Συγκέντρωση TBARS: nmol/mg total prot.

### ***Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)***

Πριν τη μέτρηση της GSH έπρεπε να κάνουμε την απαραίτητη προετοιμασία των δειγμάτων. Έτσι, 100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5% και φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000g για 5 min στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο erpendorf. Η GSH υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Reddy et al. (2004). Είκοσι μL ιστού, αραιωμένου 1/2 για το γαστροκνήμιο μυ και 1/5 για το ήπαρ αναμείχθηκαν με 660μL ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 8.0) και 330μL DTNB. Τα δείγματα επώαστηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45min και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 412nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση της GSH (mmol/L ή μmol/mL) =  $(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}} / 13.6) * 3 * 2 * 50.5$  για το γαστροκνήμιο μυ και η συγκέντρωση της GSH (mmol/L ή μmol/mL) =  $(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}} / 13.6) * 3 * 2 * 5 * 50.5$  για το ήπαρ.

Όπου 50,5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο στην κυψελίδα (1010μL) με τον όγκο του ιστού (20μL) ( $1010 / 20 = 50.5$ ), πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραιώση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν 1/3 και πολλαπλασιάζουμε με 2 λαμβάνοντας υπόψη την 1/2 αραιώση του δείγματος κατά τη μέτρηση. Το 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB. Στον υπολογισμό για το ήπαρ ισχύουν τα ίδια με μόνη διαφορά τον πολλαπλασιασμό με 5 λόγω της αραιώσης 1/5 του αρχικού ιστού και πολλαπλασιάζουμε με 2 για να λάβουμε υπόψη την αραιώση του δείγματος με TCA 5 %.

Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο:

Συγκέντρωση GSH: μmol/mg total prot.

### ***Οξειδάση της ξανθίνης***

Η δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Prajda & Weber (1975). Τόσο για τη μέτρηση στο γαστροκνήμιο μυ όσο για το ήπαρ

προστέθηκαν 20μL ομογενοποιημένου ιστού σε 430μL 33mM ρυθμιστικού διαλύματος (pH 7.5) και 50μL ξανθίνης 1.7mM και η αντίδραση διακόπηκε προσθέτοντας 50μL 100% TCA. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 10,000g για 15 min και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 293nm. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε, ωστόσο το TCA προστέθηκε αφού το δείγμα επωάστηκε για 20min στους 37°C. Η ίδια φυγοκέντρωση ακολούθησε και η απορρόφηση του δείγματος μετρήθηκε στα 293nm. Η δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης υπολογίστηκε αφαιρώντας τη δραστηριότητα του πρώτου δείγματος από το δεύτερο.

#### Υπολογισμοί

Δραστηριότητα οξειδάσης της ξανθίνης (U/mL) = (Abssample 20 min - Abssample 0 min / 20 / 12.2) \* 27,5 \* 3) (U is μmol/min).

Όπου 12,2 (mmol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του ουρικού οξέος στα 293nm, 27,5 είναι ο συντελεστής αραίωσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο στην κυψελίδα (550μL) με τον όγκο του ιστού (20μL) ( $550 / 20 = 27,5$ ). Πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν 1/3 και διαιρούμε με 20 για τον υπολογισμό της δραστηριότητας του ενζύμου σε ένα λεπτό.

Abssample 20 min - Abssample 0 min είναι η μεταβολή της απορρόφησης του δείγματος στα 20 λεπτά της αντίδρασης

Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο:

Δραστηριότητα οξειδάσης της ξανθίνης (U/mg total prot.)

## 5.2. Σύσταση του εκχυλίσματος που χορηγήθηκε.

**Πίνακας.** Σύσταση του εκχυλίσματος από το σταφύλι μπατίκι Τυρνάβου.

<b>Πολυφαινόλες</b>	<b>mg/g εκχυλίσματος</b>
Κατεχίνη	10,87
Γαλλικό οξύ	4,58
Καφταρικό οξύ	1,20
Προανθοκυανιδίνη B1	0,96
Κερκετίνη	0,35
Καφεϊκό οξύ	0,24
Καιμπφερόλη	0,03
TPC	648

TPC: Ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο  
(mg γαλλικού οξέος/g εκχυλίσματος).

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
2. Ajmani, R.S., Fleg. J.L., Demehin, A.A., Wright, J.G., O'Connor, F., Heim, J.M., Tarien, E., and Rifkind, J.M. Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 2003; 28: 29-40.
3. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25 (2): 218-24.
4. Alessio HM. Lipid peroxidation in healthy and diseased models: Influence of different types of exercise. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise.* Amsterdam: Elsevier Science, 2000; 115–127.
5. Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (9): 1260-7.
6. Ashton T, Rowlands CC, Jones E, et al. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol* 1998; 77(6): 498-502.
7. Azzi A, Davies KJA, Kelly F. (2004). Free radical biology – terminology and critical thinking. *FEEBS Letters* 558: 3-6.
8. Betters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, et al. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am.J.Respir.Crit Care Med* 2004; 170:1179-1184.
9. Bejma J, Ramires P, Ji LL. (2000). Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiol Scand* 169(4): 343-51.
10. Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL et al (1998). Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc* 30(11):1603-7.
11. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 2000; 72 (S): 637-46

12. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2002; 30 (2): 280-5.
13. Das KC, Lewis-Molock Y, White CW. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 713-26.
14. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (11): 1102-15.
15. Duarte JA, Carvalho F, Bastos ML, Soares JM, Appell HJ. Do invading leucocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1994; 68: 48-53.
16. Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72 (S): 647-52.
17. Fehrenbach E, Northoff H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev* 2001; 7: 66-89.
18. Ferrando A, Vila L, Voces JA, Cabral AC, Alvarez AI, Prieto JG. Effects of a standardized Panax ginseng extract on the skeletal muscle of the rat: a comparative study in animals at rest and under exercise. *Planta Med.* 1999; Apr;65(3):239-44.
19. Finaud J, Lac Gerard, Filaire E. Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training. *Sports Med* 2006; 36 (4): 327-358.
20. Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL, Vina J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 567:113-120; 2005.
21. Gomez-Cabrera MC, Martinez A, Santangelo G, Pallardo FV, Sastre J Vina J. Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr* 96 Suppl 1:S31-33; 2006.
22. Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV, Sastre J, Vina J, Garcia-del-Moral L. Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA* 289:2503-2504; 2003.
23. Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20(2): 55-9.
24. Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications.

24. Hellsten Y, Sjodin B, Richter EA, et al. Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am J Physiol* 1998; 274:
25. Inal M, Akyuz F, Turgut A, et al. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33(4):564-7.
26. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest.* 2002 62: 231-236.
27. Ji LL. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:283-292.
28. Ji, L.L. 2007. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol.* 42: 582-593.
29. Ji, L.L., Gomez-Cabrera, M.C., and Vina, J. 2006. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci.*1067: 425-435.
30. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci.* 2001; 28: 141-143.
31. Kim S, Park SH, Lee HN, Park T. Prunus mume extract ameliorates exercise-induced fatigue in trained rats. *J Med Food.* 2008; 11(3):460-8.
32. Kim SH, Park KS, Chang MJ, Sung JH. Effects of Panax ginseng extract on exercise-induced oxidative stress. *J Sports Med Phys Fitness.* 2005 Jun;45(2):178-82
33. Koyama K, Kaya M, Ishigaki T, Tsujita J, Hori S, Seino T, Kasugai A. Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80:28-33; 1999.
34. Lang JK, Gohil K, Packer L, Burk R.F. (1987). Selenium deficiency, endurance exercise capacity, and antioxidant status in rats. *J Appl Physiol* 63(6): 2532-5.
35. Leaf, DA, Kleinman MT, Hamilton M, and Barstow TJ. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med. Sci. Sports Exerc.*1997;29(8):1036-9.
36. Lee FT, Kuo TY, Liou SY, Chien CT. Chronic Rhodiola rosea extract supplementation enforces exhaustive swimming tolerance *Am J Chin Med* 2009; 37(3):557-72.

37. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem*. 2001 Jun;8(7): 829-38.
38. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (9): 790-6.
39. Li Y, Koike K, Che Q, Yamaguchi M, Takahashi S. Changes in lactate dehydrogenase and 3-hydroxyacetyl-CoA dehydrogenase activities in rat skeletal muscle by the administration of *Eucommia ulmoides* OLIVER leaf with spontaneous running-training. *Biol Pharm Bull* 1999; 22(9):941-6.
40. Liu ML, Bergholm R, Makimattila S, Lahdenpera S, Valkonen M, Hilden H, et al. A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *Am J Physiol* 1999; 276:E1083–E1091.
41. Livrea MA, Tesoriere L, Bongiorno A, et al. Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. *Free Radic Biol Med* 1995; 18 (3): 401-9
42. Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, and Belcastro AN. 1987. Are indices of free radical damage related to exercise intensity? *Eur. J. Appl. Physiol. Occup.Physiol.* 1987; 56(3):313-6.
43. Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radical Biology and Medicine* 2001; 31: 911-922.
44. May JM, Qu Z, Whitesell RR, et al. Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med* 1996; 20 (4): 543-51.
45. McCord, JM, and Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1968. 243: 5753-5760.
46. Meydani M, Evans W, Handelman G, Fielding RA, Meydani SN, Fiatarone MA, Blumberg JB, Cannon JG (1992). Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci* 669:363-364.
47. Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis, Y, Papassotiriou I, Kouretas D. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 39:1107-1113; 2007.

48. Morihara N, Ushijima M, Kashimoto N, Sumioka I, Nishihama T, Hayama M, Takeda H. Aged garlic extract ameliorates physical fatigue. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(5):962-6.
49. Møller P, Wallin H, Knudsen LE. (1996). Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-Biological Instructions* 102: 17-36.
50. Mylonas C, and Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*. 13: 295-309.
51. Niess A. (2005). Generation and disposal of reactive oxygen and nitrogen species, in F.C. Mooren and K. Volker (Eds). *Molecular and Cellular Exercise Physiology*. CHAMPAIGN, IL: Human Kinetics, pp. 179-197.
52. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 38: 1443-1450.
53. Niu AJ, Wu JM, Yu DH, Wang R. Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides on oxidative damage in skeletal muscle of exhaustive exercise rats. *Int J Biol Macromol*. 2008 Jun 1;42(5):447-9.
54. Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Morrow JD. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol*. 2003; 89: 100-107.
55. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett*. 2004; 357: 83-86.
56. Paula FB, Gouvêa CM, Alfredo PP, Salgado I. Protective action of a hexane crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. *BMC Complement Altern Med* 2005; 17:5-17.
57. Powers SK, Deruisseau KC, Quindry J, Hamilton KL. Dietary antioxidants and exercise. *Journal of Sports Sciences* 2004; 22, 81-94
58. Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 2000; 58: 1025-33.



59. Prajda N, Weber G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett.* 1975; 59: 245-249.
60. Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, and Ohno, H. (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol* 72: 189-194.
61. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (1-2): 69-74.
62. Ramel A, Wagner KH, Elmadfa I. Plasma antioxidants and lipid oxidation after submaximal resistance exercise in men. *Eur J Nutr* 2004; 43: 2-6
63. Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc.* 2004; 213-218.
64. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, et al. Reactive oxygen in skeletal muscle I: intracellular oxidant kinetics and fatigue in- vitro. *J Appl Physiol* 1992; 73 (5): 1797-804.
65. Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001; 90: 724-31.
66. Schneider BS, Tiidus PM. Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? *Sports Med* 2007; 37:837-856.
67. Siemieniuk E, Skrzydlewska E. (2005). Coenzyme Q10: its biosynthesis and biological significance in animal organisms and in humans. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 59: 150-159.
68. Skarpanska-Stejnborn A, Pilaczynska-Szczesniak L, Basta P, Deskur-Smielecka E. The influence of supplementation with *Rhodiola rosea* L. extract on selected redox parameters in professional rowers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2009; 19(2):186-99.
69. Skarpanska-Stejnborn A, Pilaczynska-Szczesniak L, Basta P, Deskur-Smielecka E, Horoszkiewicz-Hassan M. The influence of supplementation with artichoke (*Cynara scolymus* L.) extract on selected redox parameters in rowers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2008; 18(3):313-27.

70. Spanou C, Veskokouk AS, Stagos D, Liadaki , Skaltsounis AL, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D. Effects of grape extracts on activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. *Eur J Nutr* 2010, submitted.
71. Stadtman, E.R., and Levine, R.L. Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000; 899: 191-208.
72. Terblanche SE (2000). The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. *Cell Biol Int* 23(11): 749-53.
73. Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, et al. Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defences. *Free Radic Biol Med* 1997; 22(3): 509-13.
74. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, et al. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 408-19.
75. Veskokouk AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, Kouretas D. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008; 33: 1140-54.
76. Willcox JK, Catignani GL, Roberts LJ. Dietary flavonoids fail to suppress F2-isoprostane formation in-vivo. *Free Radic Biol Med* 2002; 34 (7): 795-9.
77. Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50:271-277; 2000.
78. Voces J, Alvarez AI, Vila L, Ferrando A, Cabral de Oliveira C, Prieto JG. Effects of administration of the standardized Panax ginseng extract G115 on hepatic antioxidant function after exhaustive exercise. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1999; 123(2):175-84.
79. Voces J, Cabral de Oliveira AC, Prieto JG, Vila L, Perez AC, Duarte ID, Alvarez AI. Ginseng administration protects skeletal muscle from oxidative stress induced by acute exercise in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2004 Dec;37(12):1863-71.
80. You, T., Goldfarb, A.H., Bloomer, R.J., Nguyen, L., Sha, X., and McKenzie, M.J. Oxidative stress response in normal and antioxidant supplemented rats to a downhill run: changes in blood and skeletal muscles. *Can. J. Appl. Physiol.* 2005; 30: 677-689.

81. Yu BP (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162.
82. Yu F, Lu S, Yu F, Feng S, McGuire PM, Li R, Wang R. Protective effects of polysaccharide from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) on the swimming exercise-induced oxidative stress in mice. *Can J Physiol Pharmacol*. 2006 Oct;84(10):1071-9.