

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ - ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ
ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ
ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΕΚΚΕΝΤΡΗ ΑΣΚΗΣΗ

Γκουτζουρέλας Νικόλαος

Λάρισα 2012

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ
ΣΠΙΡΟΥΛΙΝΑΣ ΣΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ
ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΕΚΚΕΝΤΡΗ ΑΣΚΗΣΗ**

**EFFECT OF EXERCISE AND SPIROULINA'S
ADMINISTRATION IN OXIDATIVE STRESS MARKERS
AFTER ECCENTRIC EXERCISE**

Τριμελής επιτροπή:

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Στάγκος Δημήτριος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

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

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Περίληψη	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1. Ελεύθερες ρίζες	7
1.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών	7
1.3. Επιδράσεις ελευθέρων ριζών	9
1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	12
1.5. Οξειδωτικό στρές	15
1.6. Άσκηση και οξειδωτικό στρές	16
1.7. Πηγές παραγωγής ROS κατά την άσκηση	18
1.8. Σπιρουλίνα	20
1.9. Χορήγηση εκχυλισμάτων και άσκηση	21
ΣΚΟΠΟΣ	25
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
2.1. Ισοκινητικό πρωτόκολλο άσκησης	26
2.2. Στατιστική ανάλυση	27
2.3. Μέθοδοι	27
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
A. Ηρεμία	30
3.A.1. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα	30
3.A.2. Μηλονική διαλδεύδη	31
3.A.3. Πρωτεϊνικά καρβονύλια	32
B. Άσκηση	33
3.B.1 . Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα	33
3.B.2. Πρωτεϊνικά καρβονύλια	34
3.B.3. Μηλονική διαλδεύδη	35

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	36
5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	43
5.1. Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν	43
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Η επίδραση της χορήγησης σπιρουλίνας στη TAC	30
Διάγραμμα 2. Η επίδραση της χορήγησης σπιρουλίνας στη MDA	31
Διάγραμμα 3. Η επίδραση της χορήγησης σπιρουλίνας στα πρωτεϊνικά καρβονύλια	32
Διάγραμμα 4. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης σπιρουλίνας στη TAC.	33
Διάγραμμα 5. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης σπιρουλίνας στη MDA.	34
Διάγραμμα 6. Η επίδραση της χορήγησης σπιρουλίνας στα πρωτεϊνικά καρβονύλια	35

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΣΕΛΙΔΑ

Εικόνα 1. Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.	9
Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες	15

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτες έχουν δείξει ότι η έντονη έκκεντρη άσκηση οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών με αποτέλεσμα να προκαλείται οξειδωτικό στρες στον οργανισμό. Η αιτία της αύξησης των ελευθέρων ριζών είναι αποτέλεσμα της εμφάνισης φλεγμονής λόγω της μυϊκής καταστροφής. Σκοπός, λοιπόν, της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της επίδρασης ενός διατροφικού συμπληρώματος πλούσιο σε συστατικά με αντιοξειδωτική δράση, στο οξειδωτικό στρες ανθρώπων που έκαναν έκκεντρη άσκηση καθώς και στα επίπεδα οξειδωτικού στρες χωρίς να έχουν πραγματοποιήσει άσκηση. Οι εθελοντές έκαναν έκκεντρη άσκηση που αποτελούνταν από 5 σετ των 15 μέγιστων επαναλήψεων σε ένα ισοκινητικό μηχάνημα (CYBEX) και οι δείκτες που μετρήθηκαν ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), ο προσδιορισμός μηλονικής διαλδεϋδης (MDA) ως δείκτης λιπιδικής υπεροξειδωσης και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ως δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών στο πλάσμα του αίματος μετά από την άσκηση και τη χορήγηση της σπιρουλίνας. Βρέθηκε ότι η άσκηση προκάλεσε οξειδωτικό στρες καθώς και ότι η χορήγηση σπιρουλίνας δεν βελτίωσε τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες. Συμπερασματικά, η έκκεντρη άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες. Όμως η σπιρουλίνα δεν μπορεί να βελτιώσει τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες ατόμων που έχουν πραγματοποιήσει έκκεντρη άσκηση σε μια δόση που συχνά χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία. Περαιτέρω, λοιπόν, μελέτες χρειάζονται για τον καθορισμό της κατάλληλης ποσότητας χορήγησης τέτοιου είδους προϊόντων που περιέχουν αντιοξειδωτικά στη διατροφή αθλούμενων ή όχι ανθρώπων.

ABSTRACT

Studies have shown that intense eccentric exercise leads to increased production of free radicals leading to oxidative stress induced in the body. The cause of the increase of free radicals is the result of inflammation due to muscle damage. The aim, therefore, of this work was to study the effect of a dietary supplement with ingredients rich in antioxidants, in oxidative stress in people who did eccentric exercise and in oxidative stress levels in those who did not exercise. The volunteers did eccentric exercise consisted of 5 sets of 15 maximum repetitions at a isokinetic machine (CYBEX) and the indicators measured were the total antioxidant capacity (TAC), malonic dialdehyde determination (MDA) as an indicator of lipid peroxidation and protein carbonyls as a marker of protein oxidation in blood plasma after exercise and administration of spirulina. The result was that exercise induced oxidative stress and that the administration of spirulina did not improve oxidative stress levels. In conclusion, eccentric exercise causes oxidative stress. Though Spirulina cannot improve levels of oxidative stress in people who have made eccentric exercise, at a dose often used in the literature. Further, therefore, studies are needed to be done in order to determine the appropriate amount of dose for such products that contain antioxidants in the diet of people that either exercise or not.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικά είδη οξυγόνου

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Jenkins, 1988). Αυτό μπορεί να γίνει είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή στοιβάδα (Mylonas & Kouretas, 1999). Τα μόρια αυτά είναι ιδιαίτερα ασταθή κι έτσι μπορούν να αντιδρούν με άλλα μόρια οξειδώνοντάς τα. Η αντίδραση αυτή γίνεται με σκοπό να συμπληρωθεί η εξωτερική στιβάδα των ελεύθερων ριζών. Στον οργανισμό οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με διάφορα βιομόρια επηρεάζοντας τη φυσιολογική δράση τους.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μια ετερογενής ομάδα μορίων. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου με ένα πρωτόνιο κι ένα ηλεκτρόνιο. Στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) που προέρχονται από το οξυγόνο, οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο. Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέρθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles & Jacob, 2002). Στον οργανισμό οι ρίζες που συναντιούνται συνηθέστερα είναι οι ROS. Στις δραστικές μορφές οξυγόνου ανήκουν οι ρίζες σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), υδροξυλίου (OH^{\cdot}), υπεροξειδίου (RO_2^{\cdot}), αλκοξειδίου (RO^{\cdot}), υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot}) και οι μη ρίζες υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2), υποχλωριώδες υξύ ($HOCl$), υποβρωμιώδες οξύ ($HOBr$), όζον (O_3) και μονήρες οξυγόνο (1O_2).

1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν είτε από ενδογενείς είτε από εξωγενείς πηγές.

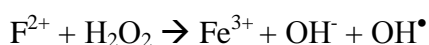
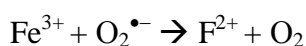
Ενδογενείς πηγές

Η μεγαλύτερη ποσότητα ελευθέρων ριζών παράγεται ενδογενώς κατά τη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης που πραγματοποιείται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Di Meo & Venditti, 2001). Ο μηχανισμός παραγωγής

τους βασίζεται στο γεγονός ότι κατά την παραγωγή του ATP πολλά ηλεκτρόνια μπορούν να διαφύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων. Επειδή το οξυγόνο είναι αυτό που καταναλώνεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση οι περισσότερες δραστικές ουσίες είναι ROS.

Η αναγωγή της NADH-ουβικινόνης και η αναγωγή της ουβικινόνης-κυτόχρωμα c είναι γνωστές θέσεις παραγωγής $O_2^{\cdot-}$ και H_2O_2 (Chance et al., 1979). Το H_2O_2 δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και το $FADH_2$ στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει $O_2^{\cdot-}$ (Chance et al., 1979). Το $O_2^{\cdot-}$ ανάγεται σε H_2O_2 από τη μιτοχονδριακή υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD).

Μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο $O_2^{\cdot-}$ και στο H_2O_2 δημιουργείται OH^{\cdot} .



Εκτός από τις ROS στα μιτοχόνδρια μπορεί να παραχθεί και μονοξείδιο του αζώτου από τη συνθάση του NO. Πέρα από τα μιτοχόνδρια, μια άλλη πηγή ROS και κυρίως H_2O_2 αποτελούν τα υπεροξειδισώματα. Τα υπεροξειδισώματα είναι μικρά μεμβρανικά οργανίδια που περιέχουν οξειδωτικά ένζυμα για τη διάσπαση διαφόρων ουσιών επικίνδυνων για το κύτταρο. Σε κάποια κύτταρα και κυρίως στα ηπατικά, μπορούν να παραχθούν ελεύθερες ρίζες κατά τις αντιδράσεις του συστήματος του κυτοχρώματος P-450. Τα κυτοχρώματα παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών με κύριο μηχανισμό τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.

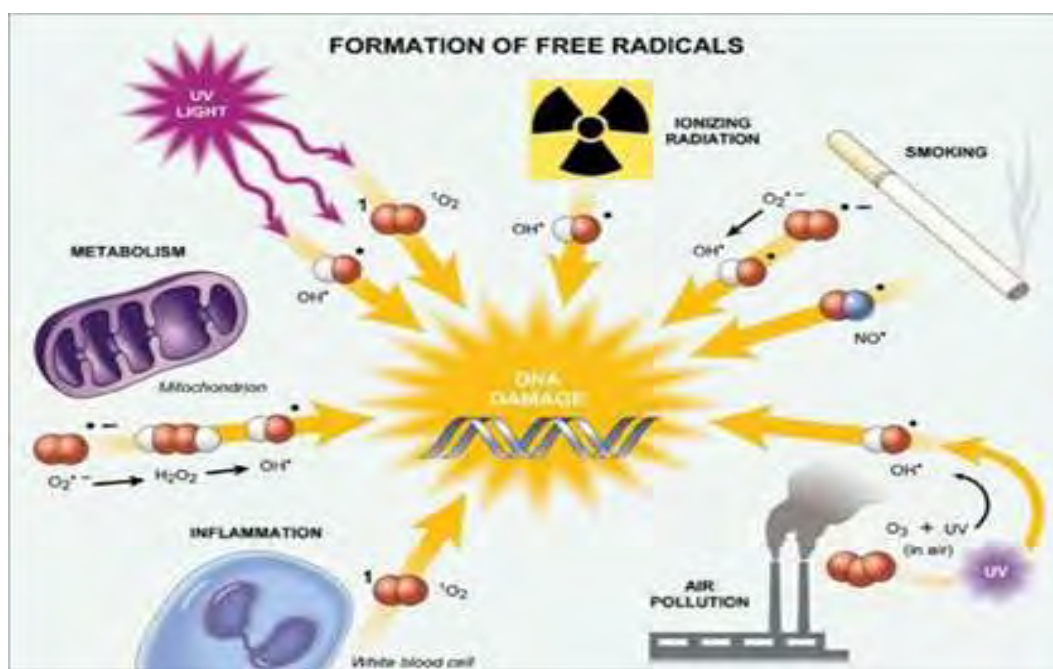


Η αιμοσφαιρίνη είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά οξυγόνου στα κύτταρα με σκοπό αυτό να συμμετάσχει στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας. Κατά τη διάρκεια, όμως, έντονης άσκησης οι απαιτήσεις για οξυγόνο είναι μεγάλες. Σε τέτοιες συνθήκες, ωστόσο, η αιμοσφαιρίνη μπορεί να αυτοοξειδωθεί και να οδηγήσει σε

παραγωγή ROS (Ames et al., 1981; Thomas, 2000) και συγκεκριμένα $O_2^{\bullet-}$ (Cooper et al., 2002). Το ίδιο μπορεί να συμβεί και με τη μυοσφαιρίνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2 (Brandley et al., 1993). Επίσης, οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορούν να αποτελέσουν πηγή ελεύθερων ριζών, όπως και τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα.

Εξωγενείς πηγές

Εδώ περιλαμβάνονται διάφοροι και ετερογενείς παράγοντες όπως είναι το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου, η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και τα βιομηχανικά απόβλητα. Πολλά φάρμακα, επίσης, ευθύνονται για την παραγωγή ελευθέρων ριζών αλλά και άλλες ξеноβιοτικές ουσίες όπως τοξίνες, εντομοκτόνα και το αλκοόλ. Η διατροφή μπορεί επίσης να παίζει σημαντικό ρόλο (Ames, 1981; (Halliwell & Gutteridge 1998).



Εικόνα 1. Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

1.3 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Θετικές

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν συνδεθεί κυρίως με τις βλάβες που δημιουργούν στον οργανισμό. Όμως έχειδειχθεί ότι εμπλέκονται και σε φυσιολογικές διαδικασίες. Πολλές από αυτές και ειδικά οι ROS παίζουν ρόλο στη δράση του ανοσοποιητικού

συστήματος απέναντι στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Jenkins, 1988). Αυτό συμβαίνει και κατά τη διάρκεια της φλεγμονής που μπορεί να εμφανιστεί για διάφορους λόγους όπως μετά από έντονη άσκηση που προκαλεί μυϊκό τραυματισμό (Malm, 2001). Οι ελεύθερες ρίζες πολλές φορές έχουν ρόλο σηματοδοτικών μορίων και συμμετέχουν στη διακυτταρική επικοινωνία (Reid, 2001), τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την απόπτωση, τη μυϊκή συστολή και την έκφραση γονιδίων (Ji et al., 1999). Αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγής ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

Αρνητικές

Η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών εμπλέκεται στη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Halliwell & Gutteridge, 1998), τη μυϊκή καταστροφή (Nikolaidis et al., 2008) και την κόπωση (Betters et al., 2004). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το 2%-5% του μοριακού οξυγόνου (O₂) που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια σκελετικών μυών οδηγεί στην παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου στην ηρεμία (Sjodin et al., 1990). Εντούτοις, πιο πρόσφατα έχει δείχτεί ότι η διαρροή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια του καρδιακού μυός κυμαίνεται από 0,4% ως 0,8% (Hansford et al., 1997) ή ακόμα και σε 0,15% στο σκελετικό μυ (St-Pierre et al., 2002). Επιπλέον, όταν τα μιτοχόνδρια εργάζονται έντονα για την παραγωγή ATP από το ADP, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της άσκησης, το ποσό οξυγόνου που μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες μειώνεται περίπου στο ένα δέκατο του ποσοστού που παρατηρείται κατά την ηρεμία (Vina et al., 2000). Οι ελεύθερες ρίζες, επίσης, οξειδώνουν διάφορα βιομόρια όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, τις πρωτεΐνες και το DNA. Έχουν ακόμα συσχετιστεί και με διάφορες ασθένειες όπως του Parkinson, του Alzheimer, την κατάθλιψη και τη γήρανση (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Λιπίδια

Όσον αφορά τα λιπίδια, είναι ευαίσθητα σε οξείδωση. Καθώς όλες οι μεμβράνες, κυτταρικές και κυτταρικών οργανιδίων, αποτελούνται από λιπίδια μπορούν να υποστούν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Εδώ κυρίως προσβάλλονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ως δομικά συστατικά των μεμβρανών. Η οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου ROO[•], συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεΰδης (MDA). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητάς τους. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneany, 2001).

Πρωτεΐνες

Οι δομικές πρωτεΐνες μπορούν να οξειδωθούν από τις ROS με αποτέλεσμα να τροποποιηθεί η δομή και η λειτουργία τους. Αποτέλεσμα της οξείδωσής τους είναι η δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων, που συχνά χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού στρες. Η καταστροφή των πρωτεϊνών έχει σημαντικές κυτταρικές επιπτώσεις, όπως απώλεια ενζυμικής λειτουργίας. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσοσώματα. Τα καρβονύλια μεγάλου μοριακού βάρους, όμως, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται δημιουργώντας συσσωματώματα (Levine, 2002).

DNA

Το DNA είναι γενικά ένα σταθερό μόριο αλλά οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να το βλάψουν. Οι βλάβες που μπορούν να προκληθούν είναι τροποποιήσεις στις βάσεις, θραύσεις στο DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στην εξόζη αλλά και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Όλα αυτά έχουν σαν αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων που μπορούν να οδηγήσουν σε καρκινογένεση (Radak et al., 1999).

1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

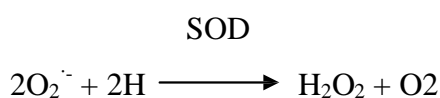
Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να οριστεί κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με ένα προς οξείδωση υπόστρωμα μπορεί να καθυστερήσει ή να αναστείλει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Halliwell & Gutteridge, 1998). Οι μηχανισμοί δράσης των αντιοξειδωτικών μπορεί να είναι ενζυμικοί ή μη ενζυμικοί. Χαρακτηριστικά τους είναι ότι μπορούν να εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών, να μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά στοιχεία και να βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

A) Ενζυμικοί μηχανισμοί

Εδώ περιλαμβάνονται ενδογενή ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Από τα σημαντικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα που καταλύει την αντίδραση μετατροπής του $O_2^{\cdot -}$ σε H_2O_2 , όπως φαίνεται παρακάτω:



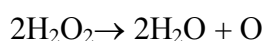
Το $O_2^{\cdot -}$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την

κυτταροπλασματική SOD, ή οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα.

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση βρίσκεται στα υπεροξειδιοσώματα. Αυτά παίζουν ρόλο στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας H₂O₂ (Antunes et al., 2002). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H₂O₂ σε H₂O και O₂.

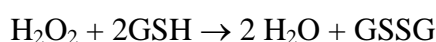
CAT



Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο. Όπως και η καταλάση, έτσι και η GPX καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H₂O₂ σε H₂O και O₂ χρησιμοποιώντας την ανηγμένη γλουταθειόνη. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η γλουταθειόνη οξειδώνεται (Antunes et al., 2002).

GPX



Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει την αναγωγή της GSSG σε GSH κι έτσι διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSSG:GSH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η GR χρησιμοποιεί σα συνένζυμο το φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD). Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο μεταφέρει τα ηλεκτρόνια του στη δισουλφιδική γέφυρα που συνδέει δύο μόρια οξειδωμένης γλουταθειόνης. Έτσι σχηματίζονται δυο σουλφυδρυλομάδες και δύο μόρια GSH.

B) Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

Εδώ περιλαμβάνονται μόρια με αντιοξειδωτικές ιδιότητες όπως η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, η β-καροτίνη, το ουρικό οξύ, η γλουταθειόνη, το συνένζυμο Q-10 και το σελήνιο.

Βιταμίνη E

Είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες τοκοφερόλες. Η πιο δραστική αλλά και πιο άφθονη είναι η α-τοκοφερόλη. Βρίσκεται στην κυττοπλασματική αλλά και τη μιτοχονδριακή μεμβράνη και προστατεύει τα λιπίδια από την υπεροξειδωση, που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, προστατεύει από την οξειδωση την βιταμίνη A (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C αποτελεί μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Είναι πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο και μπορεί να εξουδετερώνει άμεσα τις ROS (Halliwell & Gutteridge, 1998).

B-καροτίνη

Είναι λιποδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Μπορεί να μετατραπεί σε βιταμίνη A. Πιστεύεται ότι και αυτή μπορεί να αδρανοποιήσει τις ελεύθερες ρίζες και να περιορίσει την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Παίζει ρόλο στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος και αλληλεπιδρά με τις βιταμίνες C, E και ο σελήνιο (Halliwell & Gutteridge, 1998) .

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών. Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser, 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και τα προστατεύει από τις ROS.

Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα σημαντικό ενδογενές αντιοξειδωτικό. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, κυστεΐνη και γλυκίνη. Είναι υδατοδιαλυτό μόριο και παίζει καθοριστικό ρόλο στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μπορεί να ανακυκλώνεται διαρκώς από την οξειδωμένη προς την ανηγμένη μορφή και το αντίστροφο. Η ανηγμένη μορφή είναι αυτή που έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς συμμετέχει σε αντιδράσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Συνένζυμο Q10

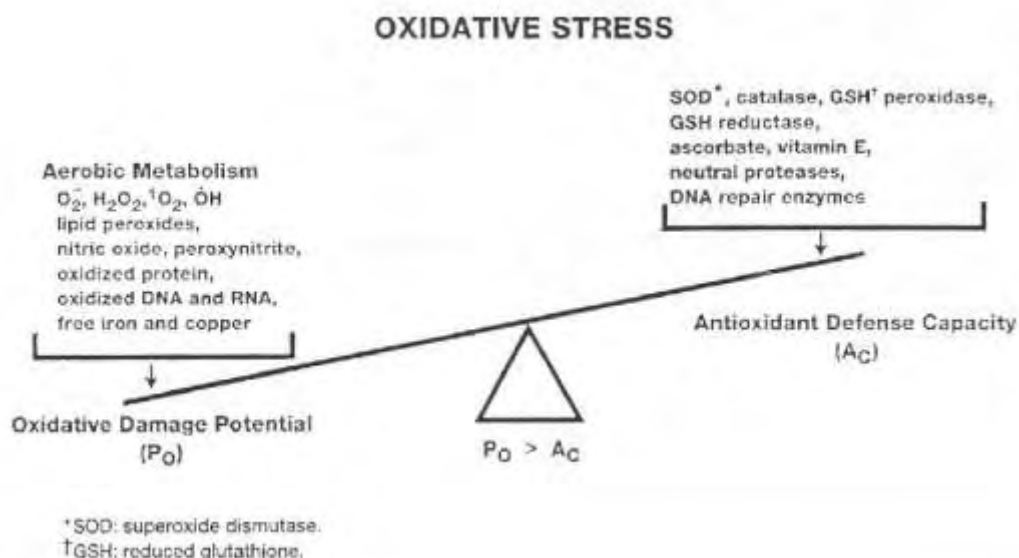
Το συνένζυμο Q10 αποτελεί βασικό συστατικό των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης κατά την παραγωγή ATP. Έχει επίσης ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και βοηθά στην αναγέννηση της α-τοκοφερόλης (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως συμπράγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.5 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι μία διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών-αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων (Sies, 1991).



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Εμφάνιση οξειδωτικού στρες μπορεί να προκύψει εξαιτίας τόσο εξωγενών

όσο και ενδογενών παραγόντων.

A) Εξωγενείς παράγοντες:

- Ξενοβιοτικές ουσίες
- Παθογόνα βακτήρια και ιοί
- Όζον και υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου
- Ακτινοβολία
- Διατροφή
- Κάπνισμα
- Φάρμακα

B) Ενδογενείς παράγοντες:

- Ένζυμα, όπως οξειδάση της ξανθίνης
- Αερόβιος μεταβολισμός μιτοχονδρίων
- Λευκοκύτταρα

Το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες σε όλα τα βιολογικά μακρομόρια όπως DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια. Μπορεί ακόμη να προκαλέσει κυτταρικό θάνατο.

1.6 Άσκηση και οξειδωτικό στρες

Η άσκηση γενικά έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στη βελτίωση της ποιότητας της ζωής, στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης ασθενειών όπως καρδιοπαθειών, διαβήτη και καρκίνου αλλά και στη βελτίωση της λειτουργίας των σκελετικών μυών. Στις ευεργετικές επιδράσεις της άσκησης ανήκουν, επίσης, οι προσαρμογές των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ιστών. Όμως, πολλές έρευνες που έγιναν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η άσκηση, ιδίως η έντονη, σχετίζεται με αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών και συνεπώς με την εμφάνιση οξειδωτικού στρες.

Η πρώτη μελέτη που έδειξε αυτή τη σχέση μεταξύ άσκησης και οξειδωτικού στρες πραγματοποιήθηκε το 1982 (Davies et al., 1982). Στη συνέχεια υπήρξαν πολλές άλλες μελέτες, που συσχέτισαν την άσκηση με το οξειδωτικό στρες. Οι πιο πολλές έχουν μελετήσει την επίδραση της αερόβια άσκησης όπως τρέξιμο, κολύμπι και 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., 2000; Lovlin et al., 1987;

Aguilo et al., 2005, Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2006). Επιπλέον, έχει βρεθεί αυξημένη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, GPX) στο σκελετικό μυ, την καρδιά και το ήπαρ μετά από χρόνια άσκηση (Jenkins, 1988; Ji, 1999). Η αυξημένη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων λειτουργεί ως ένας μηχανισμός προσαρμογής και προστασίας από τις παραγόμενες κατά την άσκηση ελεύθερες ρίζες. Επίσης, βρέθηκε ότι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξάνονται στο πλάσμα και το γαστροκνήμιο μυ μετά από εξαντλητική άσκηση (Alessio et al., 1993; Gomez-Cabrera et al., 2005; Stadtman and Levine, 2000; You et al., 2005; Veskoukis et al., 2008). Η άσκηση αύξησε και τη λιπιδική υπεροξειδωση στο πλάσμα και το σκελετικό μυ, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες εργασίες (Ajmani et al., 2003; Alessio et al., 1993; You et al., 2005). Η αερόβια άσκηση συνοδεύεται από υψηλή πρόσληψη οξυγόνου και αυτό αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Έτσι, οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι αυξάνεται το οξειδωτικό στρες σε ανθρώπους και ζώα που πραγματοποίησαν έντονη άσκηση.

Σε μελέτες όμως που το πρωτόκολλο δεν περιελάμβανε έντονη άσκηση, αλλά άσκηση όπου η μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου ήταν μικρότερη από το 50% της μέγιστης, δεν εμφανίστηκε οξειδωτικό στρες. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού επαρκεί για την αντιμετώπιση των παραγόμενων ελευθέρων ριζών (Lovlin et al., 1987). Όσο όμως αυξάνεται η ένταση της άσκησης τόσο αυξάνεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια και το οξειδωτικό στρες (Palmer et al., 2003).

Πέρα από την αερόβια άσκηση έχει δειχθεί ότι και η αναερόβια άσκηση μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες. Τέτοιου είδους ασκήσεις είναι τα άλματα, τα σπριντ και η άρση βαρών (Groussard et al., 2003). Εδώ οι μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι διαφορετικοί από την αερόβια άσκηση καθώς ενεργοποιούνται διάφορα μονοπάτια πέρα από την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Groussard et al., 2003). Σημαντικό ρόλο παίζει η οξειδάση της ξανθίνης ενώ εμφανίζονται φαινόμενα όπως η ισχαιμία επαναιμάτωση, η φλεγμονή και ο κυτταρικός τραυματισμός.

Μελέτες έχουν γίνει σε αθλητές διαφόρων αθλημάτων. Σε τριαθλητές μετά από αγώνα παρατηρήθηκε αύξηση ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) (Palazzetti et al., 2003). Σε κολυμβητές 800 μέτρων έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα καταλάσης είναι αυξημένα μετά την άσκηση (Inal et al., 2001). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι ποδηλάτες μετά από αγώνα είχαν αυξημένα επίπεδα GSSG στο

αίμα, μειωμένα επίπεδα GSH και μειωμένο λόγο GSH/GSSG (Aguilo et al., 2005). Συγκριτικές έρευνες όσο αφορά την ένταση της ποδηλασίας έδειξαν ότι ποδηλασία που έφτανε το 100% της VO_{2max} παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα ερυθροκύτταρα σε σχέση με ποδηλασία που έγινε σε ένταση 40% της VO_{2max} (Lovlin et al., 1987).

Όσον αφορά την αναερόβια άσκηση, πρόσφατες μελέτες σε επίμυες που εκτέλεσαν μια σειρά από σπριντς μέτρησαν αυξημένο οξειδωτικό στρες σε σκελετικούς μύες καθώς και στο ήπαρ. Παρατηρήθηκε, επίσης, αύξηση των TBARS στους μύες αλλά όχι στο ήπαρ (Kayatekin et al., 2002). Σε ανθρώπους είχε γίνει μια μελέτη όπου εθελοντές πραγματοποίησαν μια ισοτονική άσκηση αντοχής και παρατηρήθηκε αύξηση στην MDA του αίματος (McBride et al., 1998).

Υπάρχουν όμως και κάποιες μελέτες στη βιβλιογραφία που δε βρίσκουν οξειδωτικό στρες μετά από έντονη αερόβια άσκηση (Vasankari et al., 1997; Vider et al., 2001; Chevion et al., 2003). Αυτό, πιθανόν, οφείλεται στην ένταση και τον τύπο της άσκησης αλλά και στον τύπο και στην εξοικείωση πριν από αυτή. Γενικά, όμως, φαίνεται ότι αερόβια και αναερόβια άσκηση υψηλής έντασης προκαλούν οξειδωτικό στρες (Finaud et al., 2006).

1.7 Πηγές παραγωγής ROS κατά την άσκηση

Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων

Η αερόβια αναπνοή πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια με τη βοήθεια των ενζύμων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Εκεί το μοριακό οξυγόνο ανάγεται σε νερό, που είναι ο τελικός δέκτης των ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Όμως δεν ανάγεται όλη η ποσότητα του οξυγόνου σε νερό αλλά ένα μικρό ποσοστό 2-5% μπορεί να μετατραπεί σε $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 που διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα και πιο συγκεκριμένα από το σύμπλεγμα της ουβικινόνης (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). Κατά την έντονη αερόβια άσκηση, όμως, η συνολική πρόσληψη οξυγόνου είναι αυξημένη κατά 20 φορές και τα επίπεδα οξυγόνου σε μια μυϊκή ίνα είναι αυξημένα κατά 100 φορές (Ji, 1999). Έτσι, άμεσα αυξάνεται η παραγωγή ριζών οξυγόνου που ξεφεύγουν από την οξειδωτική φωσφορυλίωση και κατά συνέπεια προκαλείται οξειδωτικό στρες (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001).

Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Κατά την αναερόβια άσκηση παρατηρείται το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (ischemia-reperfusion), όπου ενεργοποιείται το μονοπάτι της οξειδάσης της ξανθίνης. Λόγω της άμεσης ενέργειας που χρειάζεται ο οργανισμός το ATP διασπάται σε ADP και αυτό μετά σε AMP. Τότε, η αφυδρογονάση της ξανθίνης οξειδώνει το AMP σε υποξανθίνη. Μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης, η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Τα επίπεδα της οξειδάσης της ξανθίνης και υποξανθίνης τόσο στο πλάσμα όσο και σε ιστούς αυξάνονται μετά από αναερόβια άσκηση (Radak et al., 1996; Vina et al., 2000). Η δράση του ενζύμου αυτού οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 (McCord & Fridovich, 1968). Κάτω από αερόβιες συνθήκες το ATP αναπληρώνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ γίνεται μέσω της δευδρογονάσης της ξανθίνης και όχι μέσω της οξειδωμένης της μορφής (XO) (Ji, 1999).

Φλεγμονώδης αντίδραση

Η φλεγμονώδης αντίδραση μπορεί να ενεργοποιείται κατά την άσκηση και ειδικότερα από το είδος της άσκησης που προκαλεί μυϊκή καταστροφή (π.χ. έκκεντρη άσκηση). Τα πολυμορφοουδετερόφιλα (Polymorphonuclear neutrophils, PMN) είναι μια ομάδα κυττάρων που συμμετέχει στη φλεγμονώδη αντίδραση. Κατά τη μυϊκή καταστροφή λόγω άσκησης, τα PMN πλησιάζουν την περιοχή της καταστροφής και εκκρίνουν το ένζυμο λυσοζύμη και $O_2^{\bullet-}$. Έτσι, με την άσκηση προκαλείται ενεργοποίηση και δράση των PMN και παράγονται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες συχνά είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση οξειδωτικού στρες (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). Το γεγονός ότι κατά την άσκηση, που προκαλεί μυϊκή καταστροφή εμφανίζεται φλεγμονή έχει επιβεβαιωθεί και με τον προσδιορισμό δύο ακόμη δεικτών της φλεγμονής, της IL-6 και της μυελουπεροξειδάσης (Childs et al., 2000).

Δράση των κατεχολαμινών

Οι κατεχολαμίνες είναι νευροδιαβιβαστές που εκκρίνονται όταν ο οργανισμός βρίσκεται σε εγρήγορση. Κατά την έντονη άσκηση η συγκέντρωσή τους αυξάνεται και ενεργοποιούνται έτσι οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς. Οι κατεχολαμίνες επάγουν το μεταβολισμό για τη μεγαλύτερη παραγωγή ενέργειας με αποτέλεσμα να εμφανίζεται

έντονη παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια.

Υπεροξειδιοσώματα

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι οργανίδια που διαθέτουν οξειδωτικά ένζυμα και βοηθούν στη αποτοξίνωση του κυττάρου. Εκεί όμως οξειδώνονται τα λιπαρά οξέα που αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για το μυοκάρδιο και το σκελετικό μυ κατά την άσκηση. Κατά τη διάσπασή τους στα υπεροξειδιοσώματα ελευθερώνονται ROS που προκαλούν οξειδωτικό στρες (Ji, 1999).

1.8 Σπιρουλίνα

Η **σπιρουλίνα** (*Spirulina*) είναι γένος (βρώσιμων) κυανοβακτηρίων. Γνωστότερα είδη είναι η *Spirulina maxima* (απαντά κυρίως σε Αφρική και Ευρώπη) και η *Spirulina platensis* (απαντά κυρίως στην Κεντρική και Νότια Αμερική). Παλαιότερα το γένος *Spirulina* ταυτιζόταν με το γένος *Arthrospira*, πρόσφατες μελέτες όμως δείχνουν ότι δεν έχουν στενούς δεσμούς και ότι το γένος *Arthrospira* είναι μονοφυλετική ομάδα.

Η σπιρουλίνα ως συμπλήρωμα διατροφής προέρχεται από το γένος *Arthrospira* και περιέχει περισσότερες από 100 πολύτιμες θρεπτικές ουσίες και αποτελεί ισορροπημένο και πλήρες τρόφιμο, ένα από τα πιο πλούσια που έχει δώσει η φύση. Έχει υψηλή πεπτικότητα (95%) σε σύγκριση με αυτή των περισσότερων τροφίμων, που είναι μόνο 10 - 15%.

Η σπιρουλίνα παράγει όλες τις θρεπτικές τις ουσίες με τη βοήθεια του ηλιακού φωτός και του διοξειδίου του άνθρακα της ατμόσφαιρας. Το κυανό χρώμα της οφείλεται στην φυκοκυανίνη, ενώ το πράσινο στην χλωροφύλλη. Περιέχει πρωτεΐνες (50 - 70%), λιπίδια (5 - 7%), σάκχαρα (15 - 25%), βιταμίνες (B1, B5 και B6), ιχνοστοιχεία και μέταλλα. Επίσης περιέχει Βιταμίνη B12, Σίδηρο, Βιταμίνη E, β-καροτένιο, αντιοξειδωτικά, λιπαρά οξέα και χλωροφύλλη.

Η σπιρουλίνα περιέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζεται ο οργανισμός, όχι μόνο βιταμίνες και μεταλλικά στοιχεία. Αποτελεί πηγή βιοχημικού οργανικού σιδήρου και ως τροφή, δεν είναι καθόλου τοξική. Είναι 58 φορές πιο πλούσια σε σχέση με το ωμό σπανάκι και 28 φορές πιο πλούσια σε σχέση με το ήπαρ του ωμού βοδινού. Είναι, επίσης, πηγή βιταμίνης E. Είναι 3 φορές πιο πλούσια σε

σύγκριση με το σπόρο του σιτάλευρου και η βιολογική της αξία είναι 49% μεγαλύτερη σε σχέση με εκείνη της συνθετικής βιταμίνης E. Περιέχει σε υψηλές ποσότητες και β-καροτίνη (προβιταμίνη A) σε τέσσερις διαφορετικές μοριακές μορφές σε ένα φυσικά σχηματισμένο χημικό σύμπλεγμα, το οποίο είναι πολύ πιο εύκολα απορροφήσιμο από ότι το β-καροτένιο του μπρόκολου ή του καρότου. Είναι 25 φορές πλουσιότερη σε σχέση τα ωμά καρότα. Αντίθετα από την συνθετική βιταμίνη A και εκείνη των ιχθυελαίων, το β-καροτένιο είναι μη τοξικό, ακόμη και σε μεγάλες ποσότητες.

Τα αντιοξειδωτικά είναι συστατικά τα οποία βοηθούν στην ελαχιστοποίηση των ζημιών, οι οποίες οφείλονται στην οξειδωτική δράση των τοξικών ελευθέρων ριζών. Περιέχει ένα ευρύ φάσμα όλων των γνωστών αντιοξειδωτικών παραγόντων, όπως βιταμίνες B1 και B6, τα μεταλλικά στοιχεία ψευδάργυρος, μαγγάνιο, και χαλκός, το αμινοξύ μεθειονίνη και τα αντιοξειδωτικά συστατικά β-καροτένιο, βιταμίνη E και το ιχθυοστοιχείο σελήνιο.

Περιέχει, επίσης, γ-λινολεϊκό οξύ (<31A). Τα έλαιά της είναι 3 φορές πιο πλούσια σε <3I_A σε σύγκριση με το έλαιο του νυχτολούλουδου. Από όλες τις φυτικές πηγές ΟΙΑ μόνο η σπιρουλίνα το παρέχει σε αυτή τη μορφή. Είναι, επίσης, πλούσια σε χλωροφύλλη, πολλές φορές πιο πλούσια από ότι τα αγροστόδια, ενώ παράλληλα είναι ιδιαίτερα πλούσια σε πλήρεις και υψηλής βιολογικής αξίας πρωτεΐνες.

Σήμερα παράγεται με καλλιέργεια στη Νιγρίτα του νομού Σερρών, αφού προηγήθηκε μελέτη του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου σχετικά με την επιλογή καταλληλότητας του τόπου.

1.9 Άσκηση και χορήγηση εκχυλισμάτων

Στη συγκεκριμένη εργασία χορηγήθηκε στους εθελοντές σπιρουλίνα και μελετήθηκε η επίδρασή της στο οξειδωτικό στρες σε ηρεμία αλλά και μετά από έκκεντρη άσκηση. Η σπιρουλίνα έχει γνωστή σύσταση και περιέχει αντιοξειδωτικά συστατικά.

Πολλές εργασίες έχουν μελετήσει την επίδραση διαφόρων φυτικών προϊόντων και εκχυλισμάτων. Η σπιρουλίνα έχει μελετηθεί ιδιαίτερα σε εργασίες που ασχολήθηκαν με την δράση της όσον αφορά τον καρκίνο, την υπεργλυκαιμία, την

ανοσοκαταστολή και την φλεγμονή. Ωστόσο έχουν γίνει μελέτες για την επίδρασή της στο οξειδωτικό στρες. Σε μια πρόσφατη εργασία που πραγματοποιήθηκε σε προπονημένους ανθρώπους που τους χορηγήθηκε σπιρουλίνα 6gr την ημέρα ή εικονικό σκεύασμα (placebo) για 4 εβδομάδες και στη συνέχεια πραγματοποίησαν εξαντλητική αερόβια άσκηση, τρέξιμο στο διάδρομο στο 70-75% της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου για 2 ώρες και μετά συνέχισαν να τρέχουν στο 95% της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου μέχρι τελική εξάντληση. Βρέθηκε ότι η σπιρουλίνα αύξησε τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης σε σύγκριση με το placebo σε ανάπαυση και 24 ώρες μετά την άσκηση, καθώς και ότι η λιπιδική υπεροξειδωση ήταν αυξημένη μετά την άσκηση μετά την χορήγηση placebo αλλά όχι μετά την χορήγηση σπιρουλίνας (Kalafati M. et al, 2010). Σε μια άλλη μελέτη που χρησιμοποιήθηκαν ποντικοί SAMP8, στους οποίους χορηγήθηκαν 50mg/kg και 200mg/kg βρέθηκε ότι στον ιππόκαμπο και στο ραβδωτό σώμα του εγκεφάλου μειώνονται τα επίπεδα λιπιδικής υπεροξειδωσης και αυξάνεται η δραστικότητα καταλάσης (Juen-Haur Hwang et al, 2011).

Εκχύλισμα του φυτού *Panax Ginseng*, το οποίο φυτρώνει κυρίως στην Κίνα και την Κορέα έχει μελετηθεί ιδιαίτερα. Μελέτες έχουν γίνει σε επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκαν διάφορες δόσεις για κάποιο χρονικό διάστημα και πραγματοποίησαν άσκηση. Σε μια μελέτη η στοματική χορήγηση του *Panax Ginseng* σε επίμυες για τρεις μήνες σε δόσεις 3, 10, 100 και 500mg/kg σωματικού βάρους είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης της MDA και μειωμένη δράση κιτρικής συνθάσης αλλά καμία επίδραση σε συγκέντρωση μέχρι 100mg/kg (Voces et al., 2004). Σε μια άλλη εργασία με χορήγηση σε επίμυες εκχυλίσματος *Panax Ginseng* για 8 εβδομάδες σε δόσεις 2g, 3 φορές τη μέρα μετρήθηκαν δείκτες οξειδωτικού στρες σε ηρεμία, 10min και 30min μετά την άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο μέχρι εξάντλησης. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της MDA και σημαντικά αυξημένη δραστικότητα της CAT και της SOD. Τελικά, παρατηρήθηκε αύξηση της αντοχής κατά 1,5min (Kim et al., 2005). Χορήγηση *Panax ginseng* σε δόσεις των 50 mg/kg και ταυτόχρονη άσκηση σε 4 ομάδες επιμύων για 12 εβδομάδες πραγματοποιήθηκε σε άλλη εργασία. Εδώ, μελετήθηκε η γαλακτική δεϋδρογονάση και δε βρέθηκε σημαντική διαφορά (Ferrando et al., 1999).

Έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα εκχυλίσματα που έχουν αντιοξειδωτική δράση. Ένα από αυτά είναι το εκχύλισμα από το φυτό *Rhodiola rosea*, που ζει στις

ψυχρές περιοχές της γης, όπως αρκτική, βουνά της κεντρικής Ασίας, Άλπεις, και Σκανδιναβία. Σε μία εργασία, είχαμε χορήγηση 2-4 εβδομάδες σε επίμυες και κολύμβηση για 90min με 5% επιπρόσθετο σωματικό βάρος. Με την άσκηση αυξήθηκε η δραστηριότητα της κιτρικής συνθάσης και τα επίπεδα του γλυκογόνου στο ήπαρ. Όσον αφορά την άσκηση παρατηρήθηκε αυξημένος χρόνος κολύμβησης και μειωμένη κόπωση (Lee et al., 2009). Χορήγηση του ίδιου εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε 2 φορές την ημέρα σε δόση 100mg εκχυλίσματος για 4 εβδομάδες σε κωπηλάτες. Παρατηρήθηκε αρκετά αυξημένη TAC και μειωμένη δραστηριότητα SOD μέχρι και 24 ώρες μετά την άσκηση (Skarpanska-Stejnborn et al., 2008).

Κάποιες μελέτες χρησιμοποίησαν εκχυλίσματα πολυσακχαριτών. Σε μία εκ των οποίων χορηγήθηκε εκχύλισμα πολυσακχαριτών από το *Lycium Barbarum*, ένα φυτό της νοτιοανατολικής Ευρώπης και της Ασίας γνωστό και ως κινέζικο μούρο, σε 32 αρσενικά ποντίκια σε πρόγραμμα άσκησης 30 ημερών. Παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα MDA, μειωμένη δραστηριότητα κρεατινικής κινάσης και αυξημένα επίπεδα γλυκογόνου (Niu et al., 2008). Στην εργασία των Yu et al., 2006 έχουμε στοματική χορήγηση εκχυλίσματος πολυσακχαριτών από το κινέζικο παραδοσιακό φυτό *Euphorbia kansui* που περιέχει τοξικά και αναλγητικά συστατικά, σε ποντίκια και εξάντλητική κολύμβηση. Παρατηρήθηκε μείωση των MDA, αυξημένη δράση SOD και μειωμένη κόπωση.

Στην εργασία των Moselhy & Ali, (2009) χορηγήθηκε εκχύλισμα από κανέλα στοματικά σε επίμυες σε συγκέντρωση 200mg/kg για 7 μέρες για τη μελέτη οξειδωτικού στρες προκαλούμενου από τετραχλωράνθρακα στο ήπαρ. Παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων MDA και μείωση της δραστηριότητας της CAT και της SOD. Σε μια άλλη μελέτη σε επίμυες χορηγήθηκαν φλαβονοειδή γλυκοσίδια από το φυτό *Evolvulus alsinoides*, που φυτρώνει στην Ινδία αλλά χρησιμοποιείται σε όλο τον κόσμο εναντίον της νευρικής εξάντλησης, της απώλειας μνήμης και της σωματικής αδυναμίας, σε δόσεις 3, 5, 9, 10, 100 και 200mg/kg που εκτέθηκαν σε στρες για 7 μέρες. Παρατηρήθηκε αύξηση της MDA και αύξηση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στον υπόκαμπο και το πλάσμα (Kumar et al., 2009).

Τέλος, θα αναφερθούμε σε άλλες δύο εργασίες που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπους. Στην εργασία των Skarpanska-Stejnborn et al., 2008 έχουμε χορήγηση εκχυλίσματος από αγκινάρα 3 φορές την ημέρα σε συγκέντρωση 400mg για 5

εβδομάδες σε κωπηλάτες. Παρατηρήθηκε αυξημένη TAC. Επίσης, στην εργασία των Lyall et al., 2009 έχουμε χορήγηση εκχυλίσματος μαύρης σταφίδας σε ανθρώπους και κυτταρικά μοντέλα και μελέτη οξειδωτικού στρες που προκαλείται από άσκηση. Παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Γενικά, στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που συσχετίζουν τη χορήγηση εκχυλισμάτων με την άσκηση και το οξειδωτικό στρες. Τα περισσότερα πειράματα έγιναν σε επίμυες που πραγματοποίησαν έντονη άσκηση. Τα αποτελέσματα δεν ήταν πάντα προς την ίδια κατεύθυνση καθώς τα εκχυλίσματα άλλοτε προκάλεσαν οξειδωτικό στρες και άλλοτε είχαν αντιοξειδωτική δράση ενώ κάποιες φορές δεν είχαν κάποια επίδραση. Συνήθως, η χορήγηση γινόταν στοματικά σε καθημερινή βάση για κάποιο χρονικό διάστημα και μετά οι επίμυες ή οι άνθρωποι πραγματοποιούσαν το πρωτόκολλο άσκησης. Στη συγκεκριμένη μελέτη η χορήγηση της σπιρουλίνας πραγματοποιήθηκε στοματικά.

ΣΚΟΠΟΣ

Σε προηγούμενη εργασία μελετήθηκε η επίδραση της χορήγησης σπιρουλίνας στο οξειδωτικό στρες σε ανθρώπους που εκτέλεσαν έντονη αερόβια άσκηση και βρέθηκε ότι έχει θετική επίδραση στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα άτομα που τους χορηγήθηκε (Kalafati et al., 2010). Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι να μελετηθεί η επίδραση της σπιρουλίνας σε δείκτες οξειδωτικού στρες σε ανθρώπους που εκτέλεσαν έκκεντρη άσκηση. Είναι γνωστό ότι η έκκεντρη άσκηση προκαλεί μυϊκή καταστροφή. Η μυϊκή καταστροφή έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση φλεγμονώδους αντίδρασης η οποία είναι υπεύθυνη για την παραγωγή ελευθέρων ριζών, οι οποίες συχνά είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση οξειδωτικού στρες (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). Έτσι λοιπόν, σκοπός είναι να μελετηθεί εάν η χορήγηση σπιρουλίνας θα μπορούσε να παρέμβει και να επηρεάσει την εμφάνιση ασκησιογενούς οξειδωτικού στρες.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ισοκινητικό πρωτόκολλο άσκησης

Για την προπόνηση και τις αξιολογήσεις θα χρησιμοποιηθεί το ισοκινητικό δυναμόμετρο Cybex Norm (Ronkonkoma, NY) όπως έγινε και σε προηγούμενες μελέτες (Paschalis et al. 2005a). Κατά τη διάρκεια της προπόνησης οι δοκιμαζόμενοι θα εκτελέσουν προπόνηση που θα αποτελείται από 5 σειρές των 15 επαναλήψεων που θα εκτελεστεί και από τα δύο πόδια χρησιμοποιώντας τους πρόσθιους μηριαίους με γωνιακή ταχύτητα 60 s^{-1} από την καθιστή θέση. Δύο λεπτά διάλειμμα θα υπάρχει μεταξύ των σειρών. Πριν από κάθε μέτρηση ή αξιολόγηση οι δοκιμαζόμενοι θα εκτελούν προθέρμανση οκτώ λεπτών σε ποδήλατο και πέντε λεπτά διατατικές ασκήσεις.

	ΥΨΟΣ	ΒΑΡΟΣ	ΗΛΙΚΙΑ	max ecc. R Nm	max ecc. L Nm
Spirulina	179,8	78,2	24,3	335,6	306,3
Placebo	181,0	73,5	21,2	300,6	346,5

Πίνακας 1: Φυσιολογικά Χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων

Εικοσιτέσσερα άτομα πήραν μέρος στην εργασία τα οποία χωρίστηκαν σε δύο ομάδες των 12 ατόμων. Η πρώτη ομάδα έλαβε συμπλήρωμα σπιρουλίνας (6 γραμμάρια την ημέρα σε τρεις ημερήσιες δόσεις) ενώ η δεύτερη ομάδα έλαβε εικονικό συμπλήρωμα (placebo). Οι συμμετέχοντες επισκέφτηκαν το εργαστήριο σε δύο διαφορετικές περιόδους. Στην πρώτη περίοδο έγινε αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των συμμετεχόντων χωρίς την λήψη συμπληρώματος και στη δεύτερη περίοδο έγινε αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των συμμετεχόντων μετά τη λήψη συμπληρώματος και την πραγματοποίηση μιας οξείας συνεδρίασης άσκησης για την πρόκληση μυϊκής βλάβης. Για την πρόκληση της μυϊκής βλάβης οι συμμετέχοντες πραγματοποίησαν 5 σετ των 15 μέγιστων επαναλήψεων σε ένα ισοκινητικό μηχάνημα (CYBEX). Το εύρος της κίνησης της άσκησης ήταν από τις 0° έως της 120° της κάμψης του γονάτου για να αποφευχθεί υπερέκταση του γόνατος. Η ταχύτητα της κίνησης της άσκησης ήταν $60^\circ/\text{s}$. Μεταξύ των σετ υπήρχε ένα διάλειμμα 2 λεπτών. Πριν την πραγματοποίηση της προπόνησης οι συμμετέχοντες έκαναν προθέρμανση 8 λεπτών σε κυκλοεργόμετρο ((Monark, Vansbro, Sweden), με 70 περιστροφές ανά λεπτό και 50 W αντίσταση ενώ έκαναν και 5 λεπτά διατάσεις. Πριν την πραγματοποίηση της άσκησης και 24, 48, 72 και 96 ώρες μετά το τέλος της άσκησης λήφθηκαν δείγματα αίματος για την αξιολόγηση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των συμμετεχόντων.

2.2 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (παρέμβαση × χρόνος) (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν με bonferroni t-test. Για τα δεδομένα της απόδοσης χρησιμοποιήθηκε t-test για ανεξάρτητα δείγματα. 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.

2.3 Μέθοδοι

Τα πρωτόκολλα των δεικτών οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν στην διπλωματική εργασία παρουσιάζονται αναλυτικά στο παράρτημα. Οι δείκτες οξειδωτικού στρες μετρήθηκαν φασματοφωτομετρικά και η αρχή προσδιορισμού του καθενός αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω.

Προσδιορισμός μηλονικής διαλδεϋδης (MDA)

Αρχή της μεθόδου

Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των ασταθών μορίων είναι η μηλονική διαλδεϋδη (MDA). Η μηλονική διαλδεϋδη μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της αντίδρασής της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Έτσι, τα TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) εκφράζονται σαν ισοδύναμα της μηλονικής διαλδεϋδης, η οποία σχηματίζει μία ένωση με το θειοβαρβιτουρικό οξύ με αναλογία 1/2 αντίστοιχα.

Η μέτρηση της μηλονικής διαλδεύδης είναι μία φωτομετρική μέθοδος για τον προσδιορισμό του βαθμού υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Για τον προσδιορισμό των TBARS χρησιμοποιήθηκε μια ελαφρά τροποποιημένη μέθοδος του Keles et al., (2001).

Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Αρχή της μεθόδου

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεύδες και κετόνες) παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (pro), της αργινίνης (arg), της λυσίνης (lys) και της θρεονίνης (thr). Είναι ένα αξιόπιστος δείκτης οξειδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια.

Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες καθώς εκτρέπονται από τη φυσιολογική τους λειτουργία. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες σε μέτριο βαθμό, διασπώνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν υποστούν πολύ δριμείες βλάβες τότε δεν μπορούν να διασπαστούν και συγκεντρώνονται σε συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους.

Η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών όχι μόνο επηρεάζει τη δική τους λειτουργία αλλά και τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν και άλλα βιομόρια. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επισκευάζουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δίνιτροφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δίνιτροφαινυλδραζονίου. Ο προσδιορισμός των καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο Patsoukis et. al.

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total Antioxidant Capacity, TAC)

Αρχή της μεθόδου

Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του ιστού να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό του ιστού που έχει αντιοξειδωτική δράση συνεισφέρει με διαφορετικό τρόπο στην ολική

αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία είναι γενικά ένα μέτρο της αντιοξειδωτικής κατάστασης.

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι προσέγγισης της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Ο πρώτος και πιο επίπονος τρόπος είναι ο υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας κάθε συστατικού του ιστού ξεχωριστά. Ο δεύτερος τρόπος είναι η μέτρηση της TAC ως συνόλου.

Το ουρικό οξύ φαίνεται να είναι το μόριο που έχει τον πιο ισχυρό ρόλο στον καθορισμό της τιμής της TAC προκαλώντας μεγάλη αύξησή της όταν η συγκέντρωσή του αυξάνεται. Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), οι βιταμίνες E και A και η αλβουμίνη είναι μερικά από τα μόρια που συμβάλλουν επίσης στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ιστού. Ο προσδιορισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszweska και Bartosz, (2002).

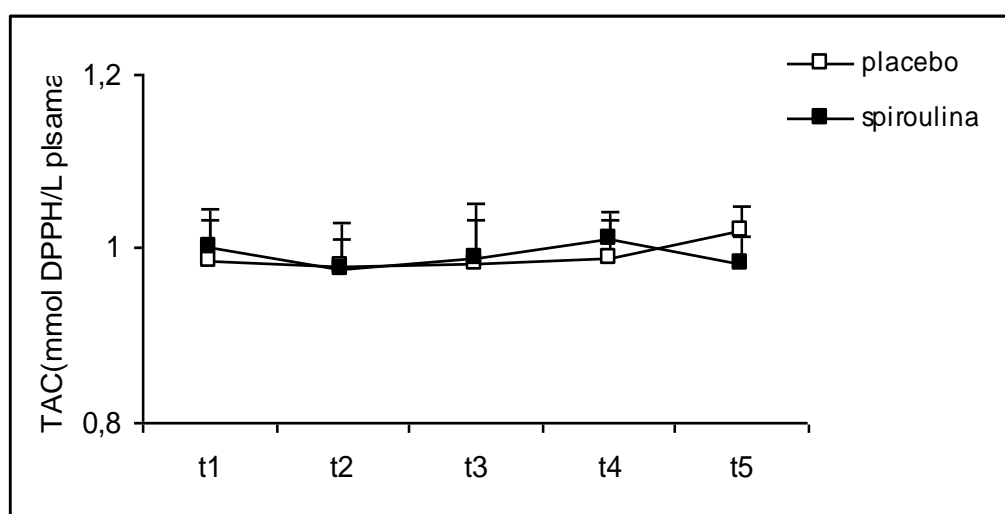
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνολικά μελετήθηκαν 3 δείκτες οξειδωτικού στρες σε 24 εθελοντές που χωρίστηκαν σε 2 ομάδες. Στην πρώτη ομάδα χορηγήθηκε σπιρουλίνα και στη δεύτερη placebo σε 5 χρονικές στιγμές. Παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα όταν οι δύο ομάδες βρίσκονταν σε ηρεμία (χωρίς πραγματοποίηση άσκησης) και έπειτα από έκκεντρη άσκηση. Οι χρονικές στιγμές t1, t2, t3, t4 και t5 αντιστοιχούν στις χρονικές στιγμές: πριν την πραγματοποίηση της άσκησης, 24 ώρες μετά, 48 ώρες μετά, 72 ώρες μετά και 96 ώρες μετά την άσκηση.

A) Ηρεμία

1. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

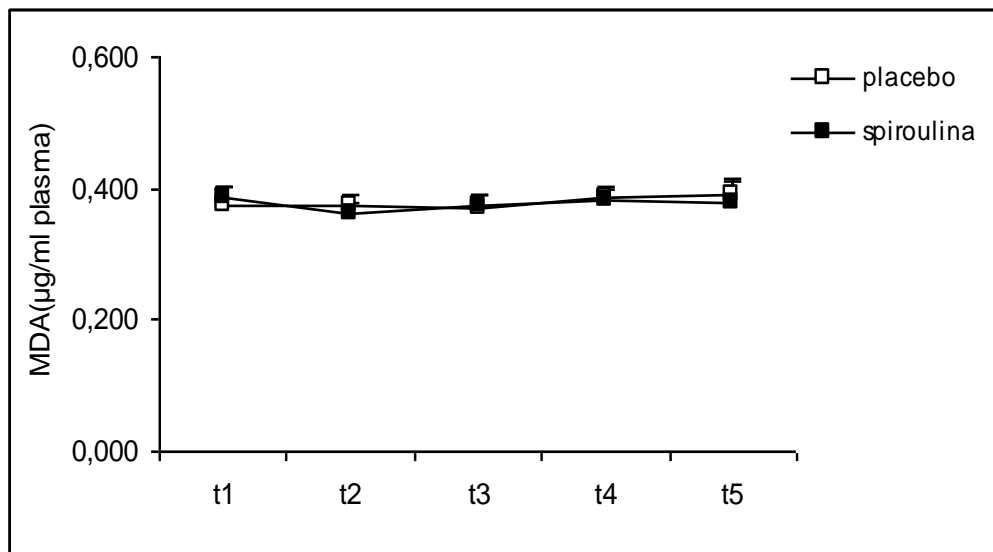
Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα όταν δεν πραγματοποιήθηκε άσκηση φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται από την χορήγηση σπιρουλίνας και από τον χρόνο.



Διάγραμμα 1. Η επίδραση της χορήγησης της σπιρουλίνας στη TAC.

2_Μηλονική διαλδεΐδη_(MDA)

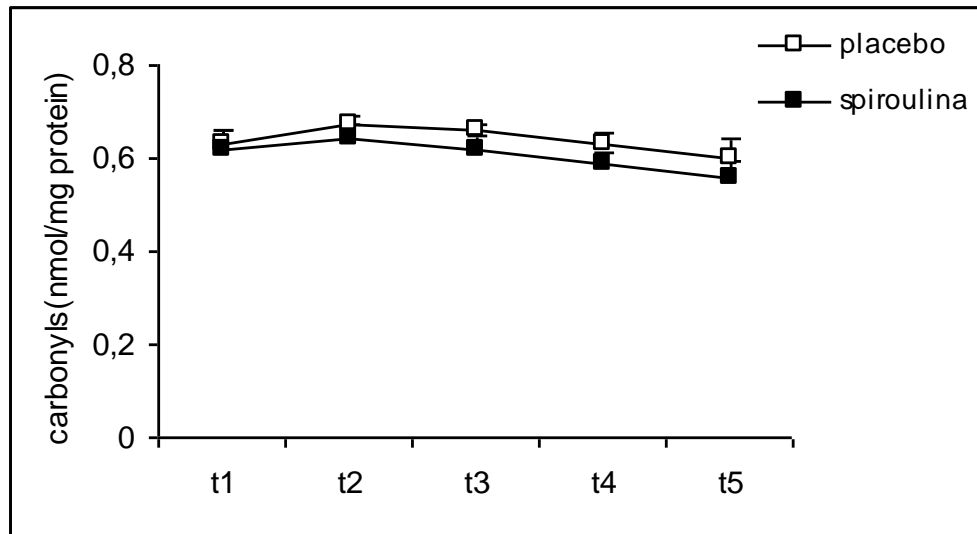
Η συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεΐδης όταν δεν πραγματοποιήθηκε άσκηση φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται από την χορήγηση σπιρουλίνας και από τον χρόνο.



Διάγραμμα 2. Η επίδραση της χορήγησης της σπιρουλίνας στη MDA.

3. Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων όταν δεν πραγματοποιήθηκε άσκηση φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται από την χορήγηση σπιρουλίνας και από τον χρόνο.



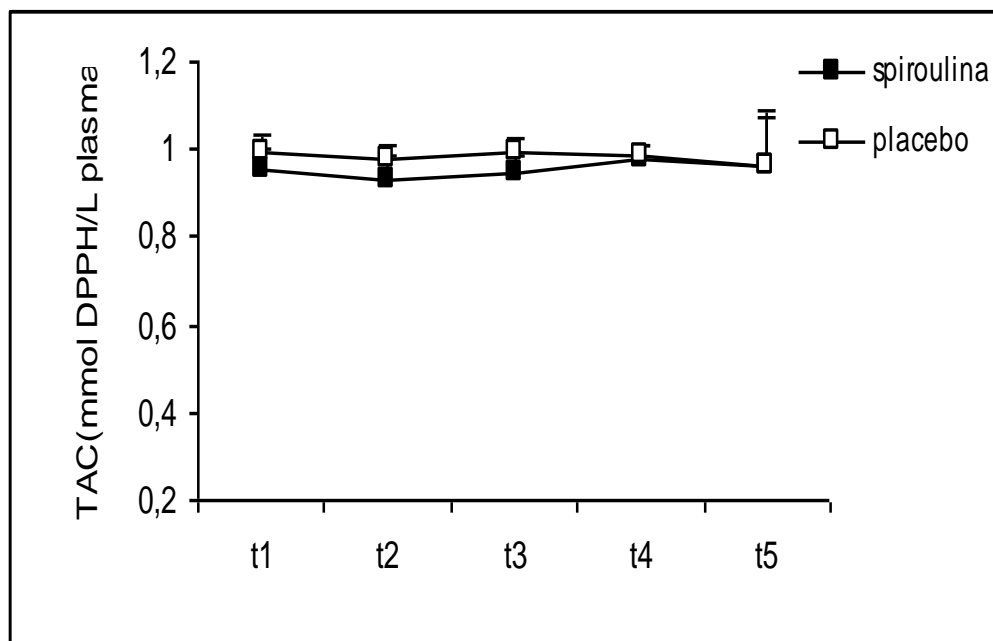
Διάγραμμα 3. Επίδραση της χορήγησης της σπιρουλίνας στα CARB

Γενικά οι τρεις δείκτες που μελετήθηκαν φαίνεται ότι δεν επηρεάστηκαν από την χορήγηση σπιρουλίνας όταν οι εθελοντές βρίσκονταν σε ηρεμία.

B) Άσκηση

4. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

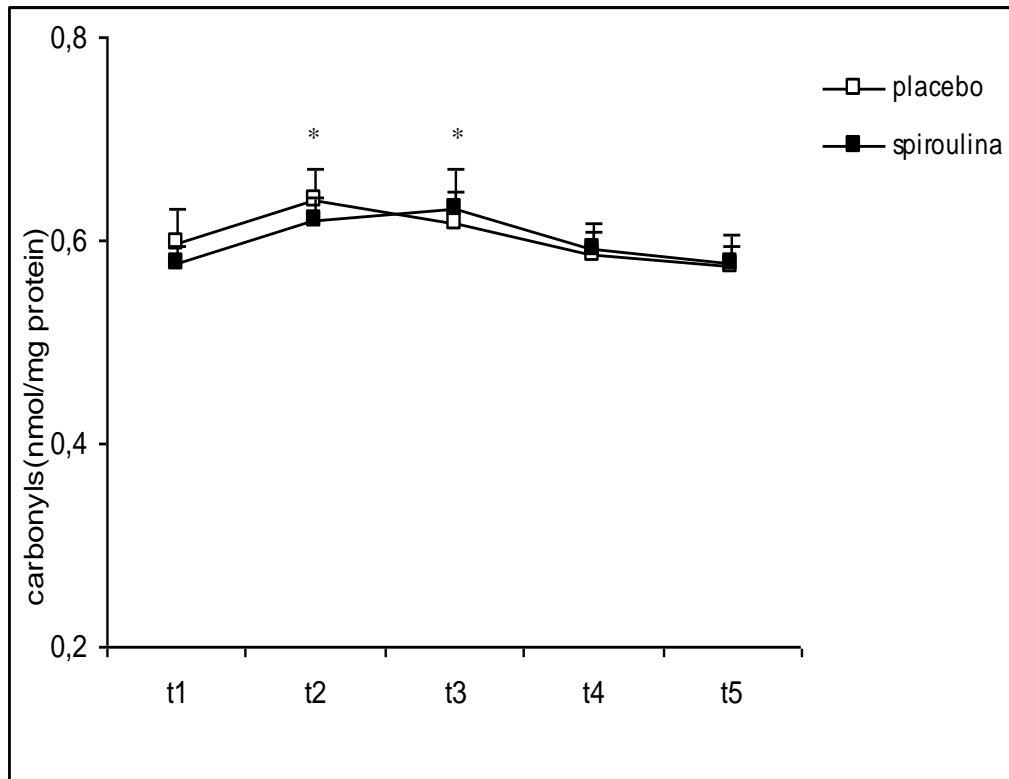
Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα δεν επηρεάζεται από την άσκηση και την χορήγηση σπιρουλίνας.



Διάγραμμα 4. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης σπιρουλίνας στην TAC.

5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια

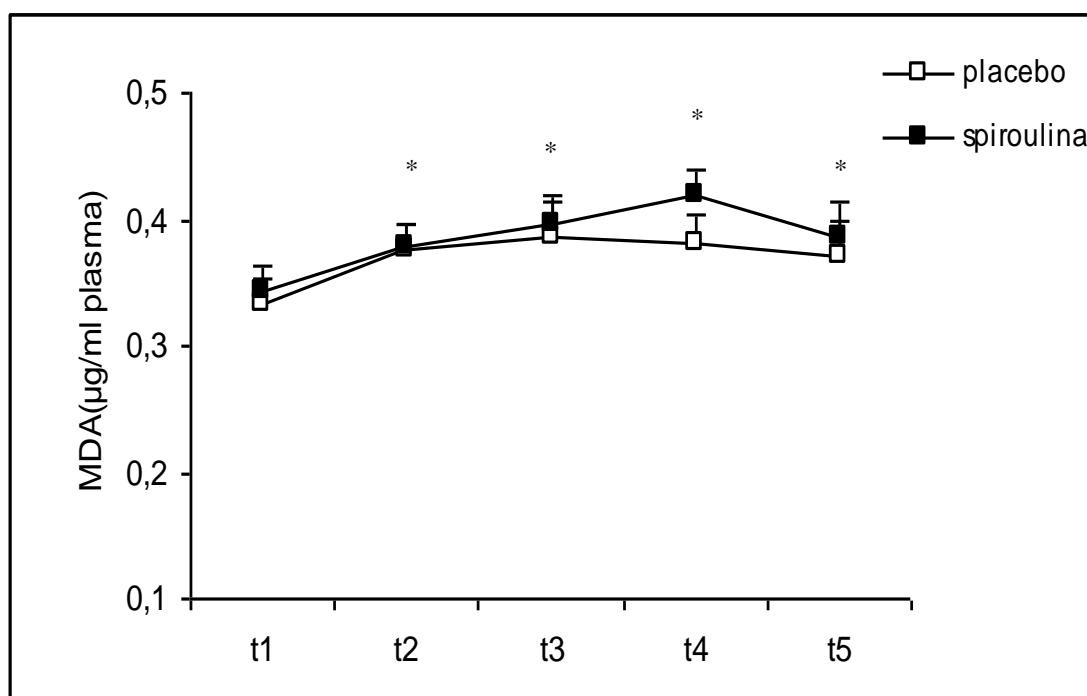
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αυξήθηκε στις 24 και 48 ώρες μετά την άσκηση.



Διάγραμμα 5. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης σπιρουλίνας στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν την άσκηση στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0,05$).

6. Μηλονική διαλδεΐδη (MDA)

Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η συγκέντρωση της MDA αυξήθηκε στις 24, 48, 72 και 96 ώρες μετά την άσκηση και στις δύο ομάδες ανεξάρτητα από την χορήγηση σπιρουλίνας.



Διάγραμμα 6. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης της σπιρουλίνας στη συγκέντρωση των MDA.* Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν την άσκηση στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0,05$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκε η επίδραση της έκκεντρης άσκησης που προκαλεί μυϊκό τραυματισμό. Χρησιμοποιήθηκε ένα ισοκινητικό πρωτόκολλο άσκησης με σκοπό να προκληθεί μυϊκός τραυματισμός σε 24 εθελοντές. Έτσι, εκτός από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την άσκηση, εμφανίζεται και οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τον μυϊκό τραυματισμό. Ο κύριος λόγος της αύξησης του οξειδωτικού στρες μετά από έκκεντρη άσκηση φαίνεται να είναι η φλεγμονώδης αντίδραση του οργανισμού στην προκληθείσα μυϊκή βλάβη. Έπειτα από επίπονη άσκηση έχει βρεθεί μια σημαντική διείσδυση φαγοκυττάρων στο μυ και μια φλεγμονώδης αντίδραση που συνδέεται με την εκδήλωση του καθυστερημένου μυϊκού πόνου (Aoi et al., 2004). Η φλεγμονώδης αυτή αντίδραση του οργανισμού αναστέλλει αρχικά την αποκατάσταση του μυός, σκοπεύοντας στην επούλωση του τραυματισμένου ιστού. Κατά την αντίδραση αυτή του οργανισμού αυξάνεται η συγκέντρωση λευκοκυττάρων στο αίμα και έχουμε είσοδο φαγοκυττάρων μέσα στο μυ προκαλώντας αύξηση των δραστικών στοιχείων αμέσως μετά αλλά και ώρες μετά τη μυϊκή βλάβη που προκλήθηκε από την άσκηση. Η έκκεντρη άσκηση λόγω της μυϊκής βλάβης που επιφέρει μπορεί να προκαλέσει λευκοκυτταρική διήθηση επομένως και οξειδωτικό στρες, αφού τα ουδετερόφιλα που ενεργοποιούνται προκαλούν την παραγωγή αρκετών οξειδωτικών μέσων με σκοπό την απομάκρυνση του κατεστραμμένου μυϊκού ιστού και να ακολουθήσει η επιδιόρθωσή του. Τα δραστικά στοιχεία εάν δράσουν ανεξέλεγκτα μπορούν να καταστρέψουν και υγιή μυϊκό ιστό (Close, Ashton, McArdle et al., 2005). Η παραγωγή αυτών των δραστικών στοιχείων που συνδέονται με την αντιμετώπιση της φλεγμονής φαίνεται να διαρκεί για 3 μέρες μετά από έκκεντρη άσκηση (Close et al., 2004). Συμπερασματικά, ένα σημαντικό μέρος της αύξησης του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό έπειτα από έκκεντρη άσκηση φαίνεται να οφείλεται στα ουδετερόφιλα που ενεργοποιούνται στο σημείο της φλεγμονής. Για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες, οι δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος (TAC), η ανηγμένη και οξειδωμένη γλουταθειόνη καθώς και ο λόγος τους (GSH/GSSG), η συγκέντρωση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), ο προσδιορισμός της μηλονικής διαλδεύδης (MDA), η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, καθώς και η δραστικότητα ενζύμων που εμπλέκονται στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του κυττάρου όπως η καταλάση, η υπεροξειδική

δισμουτάση και η περοξειδάση της γλουταθειόνης.

Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν ότι η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων καθώς και η συγκέντρωση της MDA δεν επηρεάστηκαν από τη χορήγηση σπιρουλίνας σε ηρεμία. Επίσης, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος, η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων καθώς και η συγκέντρωση της MDA δεν επηρεάστηκαν από τη χορήγηση σπιρουλίνας όταν τα άτομα πραγματοποίησαν άσκηση. Ωστόσο η άσκηση προκάλεσε και στις δύο ομάδες αύξηση της συγκέντρωσης της MDA και της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και καθώς ήταν αυξημένα 24 και 48 ώρες μετά την πραγματοποίηση της άσκησης. Στα επίπεδα της MDA, επίσης βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και καθώς ήταν αυξημένα 24, 48, 72 και 96 ώρες μετά την πραγματοποίηση της άσκησης. Τέλος όσον αφορά την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά μετά την πραγματοποίηση της άσκησης.

Πιο αναλυτικά στην εργασία μας τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η έκκεντρη άσκηση οδήγησε σε οξειδωτικό στρες. Αυτό φαίνεται από την αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και της MDA μετά την άσκηση. Πιο συγκεκριμένα τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, που μας δείχνουν τον βαθμό οξείδωσης των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες που παρήχθησαν λόγω της άσκησης, βρέθηκαν αυξημένα 24 και 48 ώρες μετά την άσκηση. Τα επίπεδα της MDA που μας δείχνουν τον βαθμό οξείδωσης των λιπιδίων βρέθηκαν αυξημένα 24, 48, 72 και 96 ώρες μετά την άσκηση. Αντίθετα τα επίπεδα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος δεν επηρεάστηκαν από την άσκηση. Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές εργασίες που χρησιμοποίησαν διάφορα πρωτόκολλα έκκεντρης άσκησης και μελέτησαν τους παραπάνω δείκτες οξειδωτικού στρες. Μελέτες έγιναν σε ανθρώπους και πειραματόζωα και οι αιμοληψίες πραγματοποιήθηκαν σε διάφορα χρονικά διαστήματα ανάλογα με την εργασία. Σε όλες τις εργασίες βρέθηκε αυξημένο οξειδωτικό στρες και αυτό φαίνεται στις αλλαγές των επιπέδων των δεικτών που μελετήθηκαν. Στις περισσότερες εργασίες βρέθηκε αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης και αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, δεδομένων που συμβαδίζουν με τα δικά μας αποτελέσματα. Παρακάτω παρουσιάζεται μια βιβλιογραφική αναφορά σε εργασίες όπου μελετήθηκε η επίδραση της έκκεντρης

άσκησης σε δείκτες οξειδωτικού στρες.

Στην εργασία του Paskalis et al., 2007 μελετήθηκε η επίδραση της έκκεντρης άσκησης στο οξειδωτικό στρες 10 απροπόνητες γυναίκες που πραγματοποίησαν έκκεντρη άσκηση. Βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα TBARS 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση και αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων 24, 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα βρέθηκε αυξημένη 48 ώρες μετά την άσκηση. Πιθανόν αυτό λειτουργεί σαν ένας μηχανισμός άμυνας του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες. Κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρήθηκε στην δική μας μελέτη. Σε συγκεκριμένες μελέτες που έγιναν σε επίμυες που εκτέλεσαν μια σειρά από σπριντς έδειξαν αυξημένο οξειδωτικό στρες σε σκελετικούς μύες καθώς και στο ήπαρ. Παρατηρήθηκε, επίσης, αύξηση των TBARS στους μύες αλλά όχι στο ήπαρ (Kayatekin et al., 2002). Σε ανθρώπους είχε γίνει μια μελέτη όπου εθελοντές πραγματοποίησαν μια ισοτονική άσκηση αντοχής και παρατηρήθηκε αύξηση στην MDA του αίματος (McBride et al., 1998). Μια άλλη μελέτη που έγινε σε ανθρώπους που εκτέλεσαν 3 σετ των 50 έκκεντρων επαναλήψεων εκτάσεων τετρακεφάλου, βρέθηκε σημαντική αύξηση στα πρωτεϊνικά καρβονύλια 24, 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση (Quindry J et al., 2011). Στην εργασία του Graeme L. Close et al., 2003 όπου σύγκρινε την εμφάνιση οξειδωτικού στρες έπειτα από ομόκεντρη και έκκεντρη άσκηση βρέθηκε ότι στους εθελοντές που πραγματοποίησαν έκκεντρη άσκηση τα επίπεδα της MDA ήταν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με την ομάδα που εκτέλεσε ομόκεντρη άσκηση. Σαν ομόκεντρη άσκηση επιλέχθηκε τρέξιμο σε επίπεδη επιφάνεια 30 λεπτών στο 65% της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου, ενώ σαν έκκεντρη άσκηση επιλέχθηκε τρέξιμο ίδιας διάρκειας και έντασης αλλά σε κατηφορική επιφάνεια κλίσης 15%. Σε μια άλλη μελέτη προσδιορίστηκαν δείκτες οξειδωτικού στρες σε ποδοσφαιριστές έπειτα από την ολοκλήρωση ενός ποδοσφαιρικού αγώνα (Fatouros IG et al., 2010). Ο αγώνας διήρκησε 90 λεπτά και μελετήθηκαν δείκτες οξειδωτικού στρες από δείγματα αίματος που λήφθηκαν αμέσως μετά τον αγώνα, 24, 48 και 72 ώρες μετά. Βρέθηκε ότι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ήταν σημαντικά αυξημένα αμέσως τον αγώνα, 24, 48 και 72 ώρες μετά, ενώ η MDA ήταν αυξημένη αμέσως μετά τον αγώνα, 24 και 48 ώρες μετά. Όσον αφορά τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης ήταν μειωμένα 24 ώρες μετά τον αγώνα και τα επίπεδα της οξειδωμένης γλουταθειόνης αυξημένα 24 και 48 ώρες μετά τον αγώνα. Επίσης η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ήταν αυξημένη 24 και 48 ώρες μετά και η δραστικότητα καταλάσης ήταν αυξημένη αμέσως μετά τον αγώνα.

Άλλη μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπους που εκτέλεσαν έκκεντρη άσκηση 60 επαναλήψεων των μυών του βραχίονα έδειξε ότι ο λόγος οξειδωμένης προς ανηγμένης γλουταθειόνης (GSSG/GSH) δεν επηρεάστηκε αλλά η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ήταν αυξημένη 24 και 48 ώρες μετά την πραγματοποίηση της άσκησης και αργότερα επανήλθε στα αρχικά επίπεδα (Lee J., et al 2002). Βλέπουμε ότι στις παραπάνω μελέτες τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και η MDA ή τα TBARS εμφανίζονται αυξημένα μετά την άσκηση αλλά σε κάθε εργασία διαφέρουν ελαφρώς οι χρονικές στιγμές που εμφανίζονται αυξημένα λόγω των διαφορετικών πρωτοκόλλων άσκησης που εφαρμόστηκαν.

Πέρα από τις μελέτες που έγιναν και απέδειξαν την εμφάνιση οξειδωτικού στρες μετά από έκκεντρη άσκηση, αρκετές μελέτες ασχολήθηκαν με την χορήγηση διαφόρων εκχυλισμάτων και διατροφικών στοιχείων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά σε ανθρώπους ή πειραματόζωα που εκτέλεσαν έκκεντρη άσκηση. Σκοπός αυτών των μελετών ήταν να βρεθεί αν κάποια διατροφικά συστατικά θα μπορούσαν να μειώσουν τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών με τελικό αποτέλεσμα την μείωση της εμφάνισης οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματα των διαφόρων εργασιών δείχνουν ότι τα διάφορα σκευάσματα που χορηγήθηκαν σε κάθε περίπτωση, είχαν διαφορετικά αποτελέσματα. Συνεπώς υπάρχουν εργασίες όπου η χορήγηση αντιοξειδωτικών μειώνει το οξειδωτικό στρες, εργασίες στις οποίες αυξάνεται το οξειδωτικό στρες αλλά και εργασίες στις οποίες δεν υπάρχει καμία επίδραση της χορήγησης. Στην δική μας εργασία μελετήθηκε η επίδραση της χορήγησης σπιρουλίνας, ενός φύκου που είναι διαδεδομένο σαν διατροφικό συμπλήρωμα καθώς περιέχει υψηλή συγκέντρωση βιταμινών καθώς και αντιοξειδωτικών συστατικών. Έτσι υπήρχε η υπόθεση ότι η χορήγηση σπιρουλίνας θα μπορούσε να μειώσει τα επίπεδα οξειδωτικού στρες μετά από έκκεντρη άσκηση. Η χορήγηση έγινε για 5 συνεχόμενες ημέρες αρχίζοντας πριν από την άσκηση και συνεχιζόταν για 4 ημέρες μετά την άσκηση. Η δόση ήταν 6γρ ημερησίως. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση της σπιρουλίνας δεν κατάφερε να μειώσει το οξειδωτικό στρες καθώς και στους τρεις δείκτες που μελετήθηκαν δεν βρέθηκαν διαφορές, μετά την άσκηση, μεταξύ της ομάδας που χορηγήθηκε placebo και της ομάδας που χορηγήθηκε σπιρουλίνα.

Σε μια μελέτη 14 εθελοντές πραγματοποίησαν έκκεντρη άσκηση δικεφάλων μυών του βραχίονα στο μηχάνημα Cybex arm curl machine τριών σετ των 10 επαναλήψεων το καθένα στο 80% της μέγιστης δύναμης με σκοπό να προκληθεί μυϊκή

καταστροφή. Στη συνέχεια έλαβαν ένα διατροφικό συμπλήρωμα που περιείχε 12,5mg βιταμίνη C και 10mg N-ακετυλο-κυστεΐνη (NAC) ανά κιλό σωματικού βάρους, αμέσως μετά την άσκηση και κάθε μέρα μετά, για 7 συνεχόμενες ημέρες (Childs et al., 2001). Κάθε ημέρα γινόταν αιμοληψία. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ομάδα που της χορηγήθηκε το εκχύλισμα είχε αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την ομάδα που έλαβε placebo τις ημέρες 2 έως 7 μετά την εκτέλεση της άσκησης. Ωστόσο η λιπιδική υπεροξείδωση ήταν αυξημένη στην ομάδα που έλαβε το συμπλήρωμα τις ημέρες 2, 3 και 4. Η N-ακετυλοκυστεΐνη χρησιμοποιήθηκε και σε μια άλλη εργασία που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπους (Silva LA et al., 2008). Οι εθελοντές λάμβαναν το συμπλήρωμα για 14 ημέρες κι έπειτα πραγματοποίησαν έκκεντρη άσκηση που αποτελούνταν από 3 σετ των 15 επαναλήψεων, καθισμάτων Scott στο 80% της μέγιστης δύναμης και μετά συνέχισαν να παίρνουν το συμπλήρωμα για άλλες 7 ημέρες. Έγιναν αιμοληψίες την 2^η, την 4^η και την 7^η ημέρα μετά την εκτέλεση της άσκησης και μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και η MDA ως δείκτης λιπιδικής υπεροξείδωσης. Βρέθηκε ότι τα επίπεδα της MDA καθώς και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ήταν αυξημένα την 2^η και την 4^η ημέρα άσχετα από την χορήγηση N-ακετυλοκυστεΐνης ή placebo. Η ίδια ερευνητική ομάδα πραγματοποίησε άλλη μια παρόμοια εργασία (Silva LA et al., 2009) όπου μελέτησε την επίδραση της βιταμίνης E στους δείκτες οξειδωτικού στρες μετά από έκκεντρη άσκηση. Το πρωτόκολλο ήταν παρόμοιο δηλαδή οι εθελοντές έλαβαν συμπλήρωμα βιταμίνης E δόσης 800IU την ημέρα για 14 ημέρες πριν την πραγματοποίηση έκκεντρης άσκησης που αποτελούνταν από 3 σετ των 15 επαναλήψεων, καθισμάτων Scott μέχρι στο 80% της μέγιστης δύναμης και μετά συνέχισαν να παίρνουν το συμπλήρωμα για άλλες 7 ημέρες. Έγιναν αιμοληψίες την 2^η, την 4^η και την 7^η ημέρα μετά την εκτέλεση της άσκησης και μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και τα TBARS ως δείκτης λιπιδικής υπεροξείδωσης. Βρέθηκε ότι τα TBARS αυξήκαν στην ομάδα που έλαβε την βιταμίνη E μόνο την 2^η ημέρα μετά την άσκηση και στη συνέχεια επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα. Αντίθετα στην ομάδα που έλαβε placebo τα επίπεδα των TBARS ήταν αυξημένα την 2^η, την 4^η και την 7^η ημέρα μετά την άσκηση. Όσον αφορά τα πρωτεϊνικά καρβονύλια βρέθηκαν αυξημένα επίπεδα μόνο στην ομάδα που έλαβε placebo την 4^η και την 7^η ημέρα. Συνεπώς η βιταμίνη E μείωσε τα επίπεδα οξειδωτικού στρες μετά από έκκεντρη άσκηση. Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε επίμυες εξετάστηκε η επίδραση μιας δίαιτας εμπλουτισμένης σε πολυφαινόλες μήλου. Οι

επίμυες χωρίστηκαν σε 2 ομάδες, μια ομάδα control και μια ομάδα που ακολούθησε την παραπάνω δίαιτα για 3 βδομάδες κι έπειτα εκτέλεσαν έκκεντρη άσκηση για την πρόκληση μυϊκής καταστροφής. Επτά ημέρες μετά την άσκηση αφαιρέθηκε ο γαστροκνήμιος μυς και μελετήθηκαν τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και τα TBARS ως δείκτες οξειδωτικού στρες. Τόσο τα επίπεδα των TBARS όσο των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βρέθηκαν μειωμένα στην ομάδα που ακολούθησε δίαιτα εμπλουτισμένη με πολυφαινόλες μήλου σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Nakazato K et al., 2010). Άλλη μια μελέτη εξέτασε την επίδραση ενός διατροφικού συμπληρώματος που αποτελούνταν από συστατικά φρούτων, μούρων και λαχανικών σε δείκτες οξειδωτικού στρες ανθρώπων που εκτέλεσαν έκκεντρη άσκηση του δικέφαλου μυός του βραχίονα. Το συμπλήρωμα στην δόση που χορηγούνταν καθημερινά περιείχε 7.5 mg β-καροτενίου, 276 mg βιταμίνης C, και 108 IU βιταμίνης E και περιείχε επίσης φλαβονοειδή και ανθοκυανίνες. Η χορήγηση γινόταν καθημερινά για 4 εβδομάδες πριν πραγματοποιηθεί η άσκηση. Μετά την άσκηση έγινε αιμοληψία σε 2, 6, 24, 48, και 72 ώρες και μετρήθηκαν η MDA και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ήταν αυξημένα στην ομάδα ελέγχου σε σχέση με την ομάδα που χορηγήθηκε το εκχύλισμα τις χρονικές στιγμές 6, 24, 48 και 72 ώρες μετά την άσκηση. Επίσης η MDA ήταν αυξημένη στην ομάδα ελέγχου 24, 42 και 72 ώρες μετά την άσκηση (Goldfarb et al., 2011). Βλέπουμε λοιπόν μια ποικίλη επίδραση της χορήγησης αντιοξειδωτικών στους δείκτες οξειδωτικού στρες η οποία εξαρτάται εμφανώς από το πρωτόκολλο άσκησης που εφαρμόστηκε καθώς και από τις διαφορετικές αντιοξειδωτικές ουσίες που χορηγήθηκαν αλλά και από τον χρόνο χορήγησης και την δόση.

Οι εργασίες όπου χορηγήθηκε σπιρουλίνα και μελετήθηκε η επίδραση της σε δείκτες οξειδωτικού στρες μετά από άσκηση είναι λίγες και περιλαμβάνουν κυρίως την επίδραση της σπιρουλίνας στο οξειδωτικό στρες που εμφανίζεται μετά από αερόβια άσκηση. Στην εργασία του Hsueh-Kuan Lu et al.,(2006) 16 εθελοντές έλαβαν για 3 εβδομάδες συμπλήρωμα σπιρουλίνας 7,5γρ την ημέρα και στη συνέχεια πραγματοποίησαν άσκηση 30 λεπτών τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο. Έγινε αιμοληψία πριν και αμέσως μετά την άσκηση και μελετήθηκαν τα επίπεδα της MDA καθώς και η δραστικότητα των ενζύμων υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) και της περοξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx). Βρέθηκε ότι τα επίπεδα της MDA μετά την άσκηση ήταν χαμηλότερα στην ομάδα που χορηγήθηκε σπιρουλίνα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου,

ενώ στην δραστηριότητα των ενζύμων δεν υπήρχαν διαφορές. Στην εργασία της Kalafati et al., (2009), χορηγήθηκε σπιρουλίνα σε ανθρώπους που εκτέλεσαν αερόβια άσκηση 2 ωρών σε δαπεδοεργόμετρο και βρέθηκε μείωση της συγκέντρωσης των TBARS και αύξηση την GSH σε άτομα που τους χορηγήθηκε σπιρουλίνα σε σχέση με τα άτομα που πήραν placebo, μετά την άσκηση. Εδώ βλέπουμε ότι η χορήγηση της σπιρουλίνας μείωσε το οξειδωτικό στρες μετά την άσκηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρήθηκε στην δική μας εργασία. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι προηγούμενες εργασίες δεν μελέτησαν την επίδραση της σπιρουλίνας σε συνδυασμό με έκκεντρη άσκηση, αλλά σε συνδυασμό με αερόβια άσκηση όπου ο μηχανισμός παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι διαφορετικός.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι η έκκεντρη άσκηση, όπως ήταν αναμενόμενο, οδήγησε σε οξειδωτικό στρες. Το αποτέλεσμα φαίνεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των καρβονυλίων και από την αύξηση της συγκέντρωσης της MDA μετά από την άσκηση. Η άσκηση δεν επηρέασε την TAC. Όσον αφορά την σπιρουλίνα, δεν βρέθηκε να βελτιώνει τους δείκτες οξειδωτικού στρες στην ηρεμία αλλά ούτε μετά από άσκηση. Γενικά όμως παρατηρήθηκε αυξημένο οξειδωτικό στρες μετά την άσκηση άσχετα αν χορηγήθηκε η σπιρουλίνα ή όχι.

Συμπερασματικά, η σπιρουλίνα που χορηγήθηκε για 5 ημέρες σε δόση 6 γραμμαρίων την ημέρα, μια δόση που χρησιμοποιείται στην βιβλιογραφία αλλά και στην καθημερινή ζωή σαν διατροφικό συμπλήρωμα, δεν μείωσε τα επίπεδα οξειδωτικού στρες σε ηρεμία και μετά από άσκηση. Ωστόσο αυτό δεν σημαίνει ότι εάν η χορήγηση γινόταν για διαφορετικό χρονικό διάστημα θα είχαμε τα ίδια αποτελέσματα. Εάν η χορήγηση γινόταν για περισσότερες ημέρες πριν την άσκηση πιθανόν να μπορούσε να μειώσει τα επίπεδα οξειδωτικού στρες μετά την άσκηση. Για να διευκρινιστεί αυτό, πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Πρωτόκολα δεικτών οξειδωτικού στρες

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Ο υπολογισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszewska and Bartosz (2002). Σαράντα μL ιστού, αραιωμένα 1/10 για το σκελετικό και 1/5 για τον καρδιακό μυ, προστέθηκαν σε 460 μL ρυθμιστικού διαλύματος 10mM (pH 7.4) και 500 μL 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 μL / 40 μL 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:
mmol DPPH / mg total protein.

Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Patsoukis et al. (2004). Πενήντα μL TCA 20% προστέθηκαν σε 50 μL πλάσματος, το μίγμα επώαστηκε στον πάγο για 15min και φυγοκεντρήθηκε στα 15.000g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και 500 μL DNPH 10mM (διαλυμένης σε 2.5N HCL) για το δείγμα ή 500 μL 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) = $\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \text{Abs}_{\text{εξισωσμένου}} / 0.022 * 1000/50 * 3$

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM · cm⁻¹.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανά πρωτεΐνη πλάσματος μπορεί να γίνει μέσω της εξίσωσης:

Συγκ. πρωτ. καρβ. (nmol/mg) = $\text{συγκ. πρωτ. καρβ. nmol/mL} / \text{συγκ. πρωτ. mg/mL}$

Προσδιορισμός μηλονικής διαλδεΐδης MDA (Malondialdehyde)

Αντιδραστήρια

BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) 0.8%

Για να φτιάξουμε 100mL BHT 0.8% διαλύουμε 0.8gr BHT σε 100mL εξάνιο. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

TCA (Trichloroacetic acid) 5%

Για να φτιάξουμε 100mL TCA 5% διαλύουμε 5gr TCA σε 100mL H₂O. Αν έχουμε διάλυμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης TCA, τότε αραιώνουμε για να πάρουμε το TCA 5%.

TBA (Thiobarbituric acid) 0.8%

Για να φτιάξουμε 100mL TBA 0.8% διαλύουμε 0.8gr TBA σε 100mL H₂O. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος και για να διαλυθεί χρειάζεται χαμηλή θέρμανση και ανάδευση.

Πειραματική διαδικασία

1. Προσθέτουμε τα αντιδραστήρια σε φιαλίδια erpendorf όγκου 2mL όπως φαίνεται στον πίνακα.

	Δείγμα 1
Plasma	40μL
TCA 5%	934μL
BHT 0.8%	576μL
Τελικός όγκος αντίδρασης	1550μL

2. Αναδεύουμε στο vortex για 30sec.

3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3min στα 3000g στους 4 °C.

4. Απομακρύνουμε το εξάνιο, το οποίο είναι το ανώτατο στρώμα του υπερκειμένου.

5. Προσθέτουμε 900μL TCA 5% και αναδεύουμε στο vortex.

6. Αριθμούμε νέα φιαλίδια erpendorf όγκου 1.5mL και προσθέτουμε τα αντιδραστήρια όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

	Τυφλό	Δείγμα
Δείγμα 1	—	625
TBA 0.8%	375	375
TCA 5%	625	—
Τελικός όγκος	1ml	1ml

7. Τοποθετούμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 70°C για 30min.

8. Μεταφέρουμε τα δείγματα για 10min στον πάγο.

9. Φυγοκεντρούμε για 3min στα 3000g στους 4 °C.

10. Ρίχνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά σε πλαστική κυψελίδα και φωτομετρούμε στα 521,5nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση της MDA υπολογίζεται με βάση την εξίσωση που προκύπτει από την

καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων MDA :

$$\text{Συγκέντρωση MDA (}\mu\text{g/mL)} = \text{Absδείγματος} - \text{Abstυφλού} / 0.0727$$

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
- Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 2005; 84(1): 1-7.
- 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.
- Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25 (2): 218-24.
- Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6858-62.
- 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.
- 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.
- Brandley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, et al. The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 1993; 268 (10): 6995-7010.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
- Chevion S, Moran DS, Heled Y, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(9): 5119-23.
- Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Leeuwenburgh C. *Free Rad. Biol. Med.* 2000, 29 (suppl. 1), 531.
- Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2002; 30 (2): 280-5.
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA et al. Free radicals and tissue

damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107: 1198-205.

- Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *BiolSignals Recept* 2001; 10: 125-40.
- 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.
- Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006;36(4):327-58.
- Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem* 2002; 383: 375-88.
- 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.
- Gomez-Cabrera MC, Martínez 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.
- 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.
- Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20(2): 55-9.
- Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003;89(1):14-20.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications.
- Hansford R, Hogue BA and Mildaziene, V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Bioenerg Biomembr.* 1997; 29: 89-95.
- 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.
- 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.
 - Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5:156-70.
 - Ji LL. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:283-292.
 - Kayatekin BM, Gonenc S, Acikgoz O, et al. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur J Appl Physiol* 2002;87(2):141-4.
 - 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.
 - 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.
 - Komulainen J, Takala TE, Vihko V. Does increased serum creatine kinase activity reflect exercise-induced muscle damage in rats? *Int. J. Sports Med* 1995; 16: 150-154.
 - 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.
 - Kumar M, Ahmad A, Rawat P, Khan MF, Rasheed N, Gupta P, Sathiamoorthy B, Bhatia G, Palit G, Maurya R. Antioxidant flavonoid glycosides from *Evolvulus alsinoides*. *Fitoterapia.* 2009.
 - Lee DK, Wang DP. Formulation development of allopurinol suppositories and injectables. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999; 25: 1205-1208.
 - 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.
 - Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in

exercise. *Curr Med Chem.* 2001 Jun;8(7): 829-38.

- Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (9): 790-6.
- 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.
- 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.
- Lyall KA, Hurst SM, Cooney J, Jensen D, Lo K, Hurst RD, Stevenson LM. Short-term blackcurrant extract consumption modulates exercise-induced oxidative stress and lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 297(1):R70-81.
- Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. *Acta Physiol Scand* 2001; 171: 233-9.
- Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radical Biology and Medicine* 2001; 31: 911-22.
- McCord, JM, and Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1968. 243: 5753-5760.
- 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.
- Moselhy SS, Ali HK. Hepatoprotective effect of cinnamon extracts against carbon tetrachloride induced oxidative stress and liver injury in rats. *Biol Res.* 2009;42(1):93-8.
- Mylonas C, and Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* 13: 295-309.
- Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.* 2008;38(7):579-606.

- Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, and Kouretas D. 2006. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc.* 38: 1443-1450.
- 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.
- Palazzetti S, Richard MJ, Favir A. Overload training increase exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol* 2003; 28(4):588-604.
- 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.
- 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.
- Prajda N, Weber G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett.* 1975; 59: 245-249.
- 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.
- 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.
- Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc.* 2004; 213-218.
- 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.

- Sies, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press.
- Sjodin B, Hellsten Westing Y, et al. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 1990; 10: 236-54.
- 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 Apr;19(2):186-99.
- 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 Jun;18(3):313-27.
- Spanou C, Veskokis 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.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, and Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277: 44784-44790.
- Stadtman, E.R., and Levine, R.L. Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000; 899: 191-208.
- Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000; 16 (7-8): 716 8.
- 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.
- Veskokis 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.
- Juen- Haur Hwang, I-Te Lee, Kee- Ching Jeng, Ming Fu Wang, Rolis Chien Wie Hou, Sou-Mei Wu and Yin Chin Chan. Spirulina prevents memory Dysfunction, reduce oxidative stress damage and augments antioxidant activity in senescence-accelerated mice. *J Nutr Sci Vitaminol* 57,186-191, 2011
- Paschalis V, Koutedakis Y, Baltzopoulos V, Mougios V, Jamurtas AZ,

Theoharis V. The effects of muscle damage on running economy in healthy males. *Int J Sports Med.* 2005 Dec;26(10):827-31.

- Armstrong RB. Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc.* 1990 Aug;22(4):429-35. Review.
- Fridén J. Changes in human skeletal muscle induced by long-term eccentric exercise. *Cell Tissue Res.* 1984;236(2):365-72.
- Stauber WT. Eccentric action of muscles: physiology, injury, and adaptation. *Exerc Sport Sci Rev.* 1989;17:157-85.
- Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Ichikawa H, Yoshida N, Yoshikawa T. Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radic Biol Med.* 2004 Aug 15;37(4):480-7.
- 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.
- Kayatekin BM, Gönenç S, Açıkgöz O, Uysal N, Dayi A. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur J Appl Physiol.* 2002 Jun;87(2):141-4. Epub 2002 Apr 12.
- Fatouros IG, Chatzinikolaou A, Douroudos II, Nikolaidis MG, Kyparos A, Margonis K, Michailidis Y, Vantarakis A, Taxildaris K, Katrabasas I, Mandalidis D, Kouretas D, Jamurtas AZ. Time-course of changes in oxidative stress and antioxidant status responses following a soccer game. *J Strength Cond Res.* 2010 Dec;24(12):3278-86.
- Lee J, Goldfarb AH, Rescino MH, Hegde S, Patrick S, Apperson K. Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc.* 2002 Mar;34(3):443-8.
- Quindry J, Miller L, McGinnis G, Irwin M, Dumke C, Magal M, Triplett NT, McBride J, Urbiztondo Z. Muscle-fiber type and blood oxidative stress after eccentric exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2011 Dec;21(6):462-70.
- Graeme L. Close, Tony Ashton, Tim Cable, Dominic Doran and Don P. M. MacLaren. Eccentric exercise, isokinetic muscle torque and delayed onset muscle

soreness: the role of reactive oxygen species. *European Journal of Applied Physiology* Volume 91, Numbers 5-6 (2004), 615-621, DOI: 10.1007/s00421-003-1012-2

- Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C. Free Radic Biol Med. Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. 2001 Sep 15;31(6):745-53.
- Silva LA, Silveira PC, Pinho CA, Tuon T, Dal Pizzol F, Pinho RA. N-acetylcysteine supplementation and oxidative damage and inflammatory response after eccentric exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2008 Aug;18(4):379-88.
- Silva LA, Pinho CA, Silveira PC, Tuon T, De Souza CT, Dal-Pizzol F, Pinho RA. Vitamin E supplementation decreases muscular and oxidative damage but not inflammatory response induced by eccentric contraction. *J Physiol Sci*. 2010 Jan;60(1):51-7. Epub 2009 Oct 27.
- Nakazato K, Ochi E, Waga T. Dietary apple polyphenols have preventive effects against lengthening contraction-induced muscle injuries. *Mol Nutr Food Res*. 2010 Mar;54(3):364-72
- Goldfarb AH, Garten RS, Cho C, Chee PD, Chambers LA. Effects of a fruit/berry/vegetable supplement on muscle function and oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*. 2011 Mar;43(3):501-8.
- Lu HK, Hsieh CC, Hsu JJ, Yang YK, Chou HN. Preventive effects of *Spirulina platensis* on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress. *Eur J Appl Physiol*. 2006 Sep;98(2):220-6. Epub 2006 Aug 30.
- Kalafati M, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Paschalis V, Theodorou AA, Sakellariou GK, Koutedakis Y, Kouretas D. Ergogenic and antioxidant effects of spirulina supplementation in humans. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 142-151, 2009
- Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T, et al. Acute immune response in respect to exercise induced oxidative stress. *Pathophysiology* 2001;7(4):263-270.
- 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.

- 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.
- 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.
- Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29 (2): 358-62.
- 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.