

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗΣ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ
ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΗΠΑΡ ΕΠΙΜΥΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ**

του

Γκανούρη Γεώργιου

Μεταπτυχιακή διατριβή που υποβάλλεται
στο καθηγητικό σώμα για τη μερική εκπλήρωση των υποχρεώσεων απόκτησης του
μεταπτυχιακού τίτλου του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Άσκηση
και Ποιότητα Ζωής» των Τμημάτων Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού
του Δημοκρίτειου Παν/μίου Θράκης και του Παν/μίου Θεσσαλίας στην κατεύθυνση
«Μεγιστοποίηση Αθλητικής Επίδοσης ή Απόδοσης».

Κομοτηνή

2010

Εγκεκριμένο από το Καθηγητικό σώμα:

1^{ος} Επιβλέπων: Φατούρος Ιωάννης, Επικ. Καθηγητής

2^{ος} Επιβλέπων: Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής

3^{ος} Επιβλέπων: Τζιαμούρτας Αθανάσιος, Επικ. Καθηγητής



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αρ. Εισ.: 10039/1
Ημ. Εισ.: 29/11/2011
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξινόμησης Κωδικός: Δ
616.07
ΓΚΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



004000107789

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αλοπουρινόλη είναι ένας αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης, ενός ενζύμου που κατά τη διάρκεια της άσκησης παράγει ελεύθερες ρίζες σε σημαντικό βαθμό. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι σημαντικές για τις φυσιολογικές προσαρμογές κατά την άσκηση. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης σε δείκτες οξειδωτικού στρες στο ήπαρ επιμύων μετά από εξαντλητική άσκηση. Ογδόντα ένηβοι αρσενικοί επίμυες (ηλικίας 8 εβδομάδων και βάρους 220 ± 10 g) κολύμπησαν μέχρι εξάντλησης σε ειδική δεξαμενή με θερμοκρασία νερού στους $33 - 36$ °C. Η λήψη του ήπατος από τους επίμυες έγινε χειρουργικά πριν, αμέσως μετά και 5 ώρες μετά από την άσκηση και τις αντίστοιχες χρονικές στιγμές μετά από τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Υπολογίστηκαν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), ο λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH/GSSG), η καταλάση (CAT), τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και η οξειδάση της ξανθίνης. Όπως αναμενόταν βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης στην οξειδάση της ξανθίνης, καθώς η αλοπουρινόλη και ο συνδυασμός αλοπουρινόλης και άσκησης μείωσαν κατά 4 περίπου φορές τη δραστηριότητά της. Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου στην TAC, την GSH και την GSSG. Τόσο η χορήγηση αλοπουρινόλης όσο και η άσκηση μείωσαν τους παραπάνω δείκτες. Όσον αφορά το λόγο GSH/GSSG, την καταλάση, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια και τα TBARS δε βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου ή του συνδυασμού τους. Η χορήγηση αλοπουρινόλης δεν φάνηκε να ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα του ήπατος των επιμύων ενώ η άσκηση φαίνεται να αυξάνει το οξειδωτικό στρες.

Λέξεις-Κλειδιά: Οξειδωτικό στρες, αλοπουρινόλη, οξειδάση της ξανθίνης, άσκηση

ABSTRACT

Allopurinol is a structural analogue of hypoxanthine and inhibits xanthine oxidase activity. Xanthine oxidase is an enzyme responsible for the production of reactive species during exercise. According to previous studies reactive species are important for useful adaptations during exercise. To examine the effect of exhaustive exercise and allopurinol on oxidative stress biomarkers in rat liver. Eighty adult male Wistar rats, (8 weeks old, weighing $220 \pm 10\text{g}$, mean \pm SEM) swam until exhaustion in water tanks at a water temperature of 33–36 °C. The liver was surgically excised pre, immediately after and 5 hours after exercise and the respective time points after allopurinol administration. Total antioxidant capacity (TAC), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), reduced and oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG), catalase (CAT), protein carbonyls, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and xanthine oxidase (XO) were determined in rat liver homogenates spectrophotometrically. As expected allopurinol induced a 4-fold decrease in xanthine oxidase activity. Exercise and allopurinol also decreased TAC, GSH and GSSG concentrations, whereas GSH/GSSG ratio, catalase activity, protein carbonyls and TBARS concentrations remained unaffected. Allopurinol administration did not exert antioxidant activity. Exhaustive exercise induced oxidative stress in rat liver.

Key-Words: Oxidative stress, allopurinol, xanthine oxidase, exercise

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	II
ABSTRACT	III
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	IV
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	VII
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	VIII
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
Σκοπός της έρευνας.....	3
Σημασία της μελέτης.....	3
Ερευνητικές υποθέσεις.....	3
Μηδενικές υποθέσεις	3
Περιορισμοί έρευνας.....	4
Λειτουργικοί ορισμοί.....	4
II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	6
Οξειδωτικό στρες	6
Ελεύθερες ρίζες.....	6
Βιοχημεία Δραστικών ειδών	7
Οξυγόνο (O ₂).....	7
Υπεροξειδικό ανιόν (O ₂ ^{·-}).....	7
Ρίζα υδροξυλίου (OH [·])	8
Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H ₂ O ₂)	8
Μονήρες οξυγόνο (1O ₂)	9
Βιολογικές επιδράσεις των ελεύθερων ριζών οξυγόνου.....	9
Θετικές επιδράσεις.....	9
Αρνητικές επιδράσεις.....	10
Αντιοξειδωτικός μηχανισμός	12
Ενζυμικά αντιοξειδωτικά	12
Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά	14

Οξειδωτικό στρες.....	16
Μέθοδοι προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες.....	17
Παράγοντες που επάγουν το οξειδωτικό στρες	17
Παραγωγή ελεύθερων ριζών κατά την άσκηση.....	18
Οξειδωτικό στρες και άσκηση	19
Αλοπουρινόλη.....	21
Αλοπουρινόλη και άσκηση	22
III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	24
Δείγμα	24
Χορήγηση αλοπουρινόλης.....	25
Κολυμβητική εξοικείωση.....	25
Κολυμβητικό πρωτόκολο.....	25
Λήψη ύπατος.....	26
Ομογενοποίηση ύπατος.....	26
Πειραματικές μετρήσεις.....	26
Οξειδάση της ξανθίνης.....	26
Ανοιγμένη και οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH και GSSG)	26
Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (tbars).....	28
Πρωτεϊνικά καρβονύλια.....	28
Καταλάση (CAT)	29
Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (tac).....	30
Στατιστική ανάλυση.....	25
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
Οξειδάση της ξανθίνης.....	32
Δείκτες οξειδωτικής καταστροφής.....	33
Αντιοξειδωτικοί δείκτες	35
Γλουταθειόνες.....	37
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	44

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ταξινόμηση και δράση των ελευθέρων ριζών (Finaud et al., 2006).....	6
---------------------------------------------------------------------------------------	---

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Οξειδωτικό stress, η διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ παραγωγής δραστικών ειδών κι αντιοξειδωτικών, προς όφελος των πρώτων (Mylonas & Kouretas 1999).....	16
Σχήμα 2: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο ήπαρ επιμύων. # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και την αλοπουρινόλη κατά την ηρεμία ($P < 0.05$).....	32
Σχήμα 3: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο ήπαρ επιμύων	33
Σχήμα 4: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των TBARS στο ήπαρ επιμύων	34
Σχήμα 5: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη δραστικότητα της καταλάσης στο ήπαρ επιμύων	35
Σχήμα 6: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στην TAC στο ήπαρ επιμύων. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή pre στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$)	36
Σχήμα 7: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της GSH στο ήπαρ επιμύων. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή pre στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$)	37
Σχήμα 8: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της GSSG στο ήπαρ επιμύων. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή pre στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$)	38
Σχήμα 9: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο λόγο GSH/GSSG στο ήπαρ επιμύων.....	39

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗΣ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΗΠΑΡ ΕΠΙΜΥΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η άσκηση όταν συνδυάζεται με σωστή διατροφή αποτελεί σημαντικό παράγοντα βελτίωσης και διατήρησης της υγείας (Cooper, Vollaard, Choueiri, & Wilson, 2002). Ωστόσο η εξαντλητική ή η έντονη άσκηση είναι δυνατόν να προκαλέσει τραυματισμούς και χρόνια κούραση η οποία αν δεν προσεχθεί θα μπορούσε να οδηγήσει σε σύνδρομο υπερπροπόνησης. Αιτία εν μέρει αυτών των αποτελεσμάτων αποτελούν οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη διάρκεια της άσκησης (Davies, Quintanilha, Brooks, & Packer, 1982; Tiidus, 1998).

Η «θεωρία των ελεύθερων ριζών» πρωτοδημοσιεύτηκε το 1969 από τον Irwin Fridovich, αλλά μόλις τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη της βιολογίας προκάλεσε ένα εντυπωσιακό ενδιαφέρον για τον ρόλο τους. Κατά τον Bray (1999), η ανακάλυψη του ρόλου των ελεύθερων ριζών στις χρόνιες εκφυλιστικές ασθένειες είναι το ίδιο σημαντική με την ανακάλυψη του ρόλου των μικροοργανισμών στις μολυσματικές ασθένειες.

Οι ελεύθερες ρίζες είναι χημικές ουσίες που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια, παράγονται σε όλους τους ζώντες οργανισμούς και υπάρχουν ως ελεύθερα μόρια (Halliwell & Gutteridge 1989). Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν *in vivo* είναι ή προέρχονται από δραστικά είδη οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) ή δραστικά είδη αζώτου. Τα δραστικά είδη οξυγόνου περιλαμβάνουν όχι μόνο τα μόρια που περιέχουν οξυγόνο, όπως το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) και το ανιόν υδροξυλίου (OH^{\cdot}), 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 μονοξειδίο του αζώτου (NO^{\cdot}) και τις μη ρίζες αζώτου όπως η ρίζα του ONOO $^{\cdot}$. Τα δραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου μπορούν να οξειδώσουν διάφορα βιομόρια λόγω της έντονης χημικής δραστικότητάς τους.

Οι ελεύθερες ρίζες, συμμετέχουν σε ορισμένες φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού όπως στην αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος, στη ρύθμιση μεταγραφής γονιδίων και στην ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών (Vollaard, Shearman, & Cooper, 2005).

Όταν όμως η παραγωγή των ελευθέρων ριζών είναι αυξημένη, όπως συμβαίνει κατά την άσκηση (Cooper et al., 2002), τότε αυτές σχετίζονται με τη μυϊκή κόπωση (Reid, Khawli, & Moody, 1993), τη μυϊκή καταστροφή (Nikolaidis, et al., 2007a; Nikolaidis, et al., 2007b,) και την αποδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού (Tiidus, 1998).

Οι κυριότερες ενδοκυττάρειες πηγές παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου κατά τη διάρκεια της άσκησης είναι οι ακόλουθες τρεις:

- i) Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στο μιτοχόνδριο
- ii) Η ξανθική οξειδάση
- iii) Ορισμένες άλλες οξειδάσες, όπως είναι η NADH οξειδάση.

Η αλοπουρινόλη είναι ένα αντιοξειδωτικό που αναστέλλει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της τελευταίας σε ουρικό οξύ. Συγκεκριμένα η χορήγηση της αλοπουρινόλης αναστέλλει την παραγωγή ελευθέρων ριζών και κυρίως του ανιόντος υπεροξειδίου (Moorhouse, Grootveld, Halliwell, Quinlan, & Gutteridge, 1987).

Επιπρόσθετα, η αλοπουρινόλη και κυρίως η οξυπουρινόλη είναι αποτελεσματικές και στην απομάκρυνση της ρίζας του υδροξυλίου (Moorhouse et al., 1987; Hoey, Butler, & Halliwell, 1988). Μάλιστα, η οξυπουρινόλη έχει τέσσερις φορές μεγαλύτερη συγγένεια για την εν λόγω ρίζα σε σχέση με την αλοπουρινόλη (Moorhouse et al., 1992). Η αντιοξειδωτική δράση της αλοπουρινόλης έγκειται στην αναστολή της παραγωγής των ελευθέρων ριζών, οι οποίες σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί και άλλες δράσεις της σχετικές με τον περιορισμό της μυϊκής καταστροφής σε ζώα (Gomez-Cabrera, Pallardo, Sastre, Vina, & Garcia-del-Moral, 2003; Duarte, Carvalho, Bastos, Soares, & Appell, 1994) την αναστολή κύριων σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των ελευθέρων ριζών (Gomez-Cabrera, Borrás, Pallardo, Sastre, Ji, & Vina, 2005) και τη μείωση δεικτών οξειδωτικού στρες (Gomez-Cabrera et al. 2005; Heunks, Vina, Herwaarden, Folgering, Gimeno, & Dekhuijzen, 1999; Mills, Smith, & Harris, 1997).

Ωστόσο νεότερα ευρήματα αμφισβητούν το ρόλο της αλοπουρινόλης στη μείωση του οξειδωτικού στρες, το οποίο φαίνεται να αυξάνεται στο πλάσμα, στα ερυθροκύτταρα και στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης (Veskoukis et al., 2008). Επιπλέον δεν υπάρχουν δεδομένα για την επίδραση της αλοπουρινόλης στο οξειδωτικό στρες που δημιουργείται μετά από εξαντλητική

άσκηση στο ήπαρ. Για το λόγο αυτό η παρούσα έρευνα μελετά την επίδραση της χορήγησης αλοπουρινόλης και της εξαντλητικής άσκησης στις τιμές των δεικτών οξειδωτικού στρες στο ήπαρ επίμυων. Οι δείκτες που μετρήθηκαν ήταν η ανηγμένη και η οξειδωμένη γλουταθειόνη, η καταλάση, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και η οξειδάση της ξανθίνης.

Σκοπός της έρευνας

Σκοπός της παρούσης εργασίας ήταν να μελετήσει την επίδραση της οξείας άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στην παραγωγή ελευθέρων ριζών στο ήπαρ επιμύων.

Σημασία της μελέτης

Τα αποτελέσματα της έρευνας αναμένεται να βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους προκαλείται οξειδωτικό στρες κατά την άσκηση.

Ερευνητικές υποθέσεις

1. Οι ομάδες που θα κάνουν άσκηση θα έχουν υψηλότερου βαθμού οξειδωτικού στρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.
2. Οι ομάδες που θα ασκηθούν μετά από λήψη αλοπουρινόλης πιθανόν να παρουσιάσουν μειωμένα επίπεδα οξειδωτικού στρες σε σχέση με τις ομάδες που θα ασκηθούν χωρίς τη λήψη αλοπουρινόλης.
3. Θα υπάρξει διαφορετική μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του οξειδωτικού στρες μεταξύ των ομάδων που θα λάβουν αλοπουρινόλη στην ηρεμία και αυτών που δεν θα λάβουν.

Μηδενικές υποθέσεις

1. Οι ομάδες που θα κάνουν άσκηση δε θα έχουν υψηλότερου βαθμού οξειδωτικού στρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.
2. Οι ομάδες που θα ασκηθούν μετά από λήψη αλοπουρινόλης δε θα παρουσιάσουν μειωμένα επίπεδα οξειδωτικού στρες σε σχέση με τις ομάδες που θα ασκηθούν χωρίς τη λήψη αλοπουρινόλης.

3. Δεν θα υπάρχει διαφορετική μεταβολή στις συγκεντρώσεις των δεικτών του οξειδωτικού στρες μεταξύ των ομάδων που θα λάβουν αλοπουρινόλη στην ηρεμία και αυτών που δεν θα λάβουν.

Περιορισμοί έρευνας

- Περιορισμός ως προς το δείγμα: Το δείγμα θα αποτελείται από επίμυες φυλής Wistar.
- Περιορισμός ως προς το φύλο του δείγματος: Στη μελέτη αυτή θα χρησιμοποιηθούν μόνο αρσενικοί επίμυες.
- Περιορισμός ως προς τη χρονολογική ηλικία του δείγματος: Οι επίμυες που θα χρησιμοποιηθούν θα είναι οκτώ εβδομάδων.
- Περιορισμός ως προς το είδος της άσκησης: Η άσκηση που έχει επιλεγεί είναι οξεία κολύμβηση μέχρις εξαντλήσεως.
- Περιορισμός ως προς τους δείκτες του οξειδωτικού στρες και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού που θα μετρηθούν: Θα προσδιοριστούν η ανηγμένη και η οξειδωμένη γλουταθειόνη, η καταλάση, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και η οξειδάση της ξανθίνης.

Λειτουργικοί Ορισμοί

- Οξειδωτικό στρες: Με τον όρο αυτό καλείται μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρος του δεύτερου. Έχει οριστεί ως μια διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων.
- Ελεύθερη ρίζα: Ένα άτομο ή μόριο, το οποίο έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στιβάδα.
- Αντιοξειδωτικός μηχανισμός: Είναι ένα σύνολο μηχανισμών του οργανισμού για την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών.
- Ουσίες αντιδρώσες με θειοβαρβιτουρικό οξύ (Thiobarbituric acid reactive substances, TBARS): Είναι αλδεΰδες που ανιχνεύονται στο αίμα και τους ιστούς και σχηματίζονται από την υπεροξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Αποτελούν δείκτη της υπεροξείδωσης των λιπιδίων.

- Μαλονδιαλδεϋδη (MDA): Αποτελεί μια μορφή των TBARS και είναι δείκτης της υπεροξειδωσης των λιπιδίων.
- Πρωτεϊνικά καρβονύλια: Είναι ενώσεις που σχηματίζονται από την υπεροξειδωση των λιπιδίων (δραστικές αλδεϋδες), από την οξειδωση σακχάρων ή την οξειδωση των προϊόντων τους με υπολείμματα λυσίνης. Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε οξειδωτικές βλάβες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας γενικός δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών.
- Ανηγγμένη γλουταθειόνη (GSH): Η ανηγμένη γλουταθειόνη (γ-γλουταμυλοκυστεϊνογλυκίνη) είναι η πιο άφθονη θειόλη (SH) στους ιστούς των ζώων και του ανθρώπου. Είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλουταμινικό οξύ, γλυκίνη και κυστεΐνη. Οι αναγωγικές (αντιοξειδωτικές) της ιδιότητες παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια όπως και στο αντιοξειδωτικό σύστημα των περισσότερων αερόβιων κυττάρων.
- Οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG): Είναι η οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης που σχηματίζεται παίρνοντας ένα ζεύγος υδρογονοϊόντων από την τελευταία κατά την αντίδραση αναγωγής του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2).
- Λόγος ανηγμένης/οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG): Αποδίδει τη σχέση μεταξύ της ανηγμένης και της οξειδωμένης μορφής της γλουταθειόνης. Χρησιμοποιείται ως δείκτης για τη μελέτη του οξειδωτικού στρες.
- Καταλάση: Είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε νερό και οξυγόνο.
- Συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC): Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών του πλάσματος του αίματος και των ιστών να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες.

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Οξειδωτικό στρες

Ελεύθερες ρίζες

Σύμφωνα με τους Clarkson και Thompson (2000), ρίζα καλείται ένα μόριο ή άτομο που περιέχει ένα τουλάχιστον ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική του στιβάδα. Η διαμόρφωση αυτή, η οποία είναι εξαιρετικά ασταθής, προκύπτει είτε από την απώλεια είτε από την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στην εξωτερική στιβάδα σθένους (Mylonas & Kouretas 1999). Εξαιτίας της αυξημένης χημικής τους δραστηριότητας που προκύπτει από τη μεγάλη αστάθειά τους, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν ταχύτατα με άλλα γειτονικά μόρια ή άλλες ελεύθερες ρίζες αφαιρώντας ή συνεισφέροντας ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα (Sen, 2001). Ο χρόνος ημιζωής των ελευθέρων ριζών είναι πολύ μικρός (Finaud, Lac, & Filaire, 2006).

Οι ελεύθερες ρίζες κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες: α. Τα δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), β. Τα δραστικά είδη αζώτου (RNS) γ. Τα δραστικά είδη θείου (RSS), (πίνακας I) (Finaud et al., 2006).

Πίνακας 1: Ταξινόμηση και δράση των ελευθέρων ριζών (Finaud et al., 2006)

Ελεύθερες Ρίζες (E. P.)	Μοριακός Τύπος	Χρόνος ημιζωής	Δράση E. P.
<u>Δραστικές Μορφές Οξυγόνου (Ελεύθερες Ρίζες Οξυγόνου)</u> Ίόν υπεροξειδίου του οξυγόνου Όζον Μονήρης κατάσταση μοριακού οξυγόνου Ρίζα υδροξυλίου Υπεροξειδίου του Υδρογόνου Υποχλωρικό οξύ Ρίζα αλκοξυλίου Ρίζα περοξυλίου Υδροπεροξυλίου	<u>ROS (EPO)</u> $O_2^{\cdot-}$ O_3 O_2 OH^{\cdot} H_2O_2 $HOCl$ RO^{\cdot} ROO^{\cdot} $ROOH^{\cdot}$	10^{-5} sec Σταθερό 1 msec 10^{-9} sec Σταθερό Σταθερό 10^{-6} sec 7 sec	Οξείδωση και υπεροξείδωση λιπιδίων, οξείδωση πρωτεϊνών, καταστροφή DNA
<u>Δραστικές Μορφές Αζώτου</u> Οξειδίου του Αζώτου Διοξειδίου του Αζώτου Περοξείνιτρίτιο ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου	<u>RNS</u> NO^{\cdot} NO_2^{\cdot} $ONOO^{\cdot-}$	1-10 sec 0.05^{-1} sec	Υπεροξείδωση λιπιδίων, οξείδωση πρωτεϊνών, καταστροφή DNA
<u>Δραστικές Μορφές Θείου</u> Ρίζα Θείου	<u>RSS</u> RS^{\cdot}		Οξείδωση πρωτεϊνών, καταστροφή DNA, παραγωγή ROS.

Βιοχημεία δραστικών ειδών οξυγόνου

Οξυγόνο (O₂)

Η παρουσία του οξυγόνου (O₂) στην ύπαρξη και διατήρηση της ζωής είναι καθοριστική. Οι αερόβιοι οργανισμοί απαιτούν O₂ γιατί το μόριο αυτό λειτουργεί ως δέκτης ηλεκτρονίων κατά την οξείδωση των ενεργειακών υποστρωμάτων. Κατά τον αερόβιο μεταβολισμό το οξυγόνο υφίσταται σταδιακή ελεγχόμενη τετρασθενή αναγωγή σε H₂O με την πρόσληψη τεσσάρων ηλεκτρονίων που παράγονται στον κύκλο του Krebs, και μεταφέρονται σε αυτό μέσω των μιτοχονδριακών ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας από την οξειδωτική φωσφορυλίωση (Finaud et al., 2006). Ωστόσο κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, ένα ποσοστό 2-5% δε σχηματίζει νερό, αλλά «διαφεύγει» και παράγει δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), τα οποία μπορεί να αποδειχθούν ιδιαίτερα επιβλαβή οξειδώνοντας βιομόρια, όπως πρωτεΐνες και DNA (Jenkins, 1988).

Στην πραγματικότητα, τα δραστικά είδη οξυγόνου παράγονται διαρκώς στον οργανισμό από διάφορους εξωγενούς παράγοντες όπως είναι η έκθεση σε ιονίζουσα ακτινοβολία, σε υπεριώδη ακτινοβολία, σε περιβαλλοντική μόλυνση, η χρήση καπνού και αλκοόλ (Koren, 1995; Victoria, 1994) και η έντονη άσκηση (Davies et al., 1982; Tiidus, 1998). Παραγωγή όμως ROS παρατηρείται και από παράγοντες ενδογενούς προελεύσεως όπως κατά το μεταβολισμό του O₂ (Thomas, 2000).

Κατά το μεταβολισμό του O₂ γίνεται πρόσληψη δύο ηλεκτρονίων. Η πρόσληψη αυτή δε γίνεται συγχρόνως, αλλά σταδιακά προσλαμβάνοντας ένα ηλεκτρόνιο τη φορά με αποτέλεσμα το O₂ να μετατρέπεται σε υπεροξειδικό ανιόν (O₂^{•-}). Έτσι το 2-5% της κατανάλωσης O₂ μετατρέπεται σε O₂^{•-} (Sen, 2001).

Υπεροξειδικό ανιόν (O₂^{•-})

Το υπεροξειδικό ανιόν (O₂^{•-}) δημιουργείται από την πρόσληψη του O₂ ενός ηλεκτρονίου σύμφωνα με την εξίσωση (1):

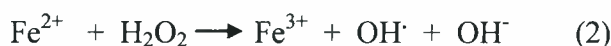


Στην πράξη, το O₂^{•-} είναι μοριακό οξυγόνο με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, που του παρέχει αυξημένη χημική δραστικότητα και ένα στοιχειώδες αρνητικό φορτίο. Η ρίζα αυτή είναι βραχύβια, πολύ δραστική σε υδρόφιλο περιβάλλον και δεν μπορεί να διαπεράσει τις βιολογικές μεμβράνες, εκτός αν υπάρχει διαθέσιμο κανάλι ανιόντων

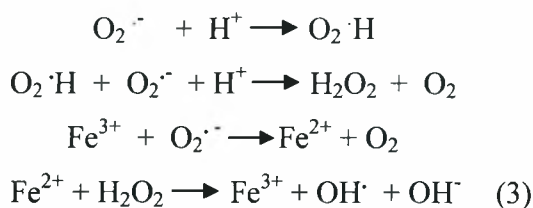
για να διευκολύνει τη διάβαση της. Έτσι, η κινητικότητα της ρίζας αυτής μετά το σχηματισμό της περιορίζεται στον ενδοκυττάριο χώρο. Ο περιορισμός αυτός δε μειώνει τη δυνατότητα πρόκλησης βλαβών από το υπεροξειδικό ανιόν, αλλά καθορίζει πιθανότατα τον τύπο της βλάβης αυτής. Η κυτταρική μεμβράνη των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι διαπερατή στη ρίζα αυτή. Αυξημένη παραγωγή υπεροξειδικού ανιόντος σε θέσεις που βρίσκονται κοντά σε μεμβράνες είναι δυνατό να προκαλέσει τη βλάβη τους εξαιτίας της υδρόφοβης φύσης του χώρου μεταξύ των μεμβρανών (McCord & Fridovich 1968).

Ρίζα υδροξυλίου (OH·)

Η ύπαρξη της υδροξυλικής ρίζας προτάθηκε από τον Fenton το 1894, όταν υποστήριξε ότι σχηματίζονταν κατά την οξείδωση του δισθενούς σιδήρου (Fe^{2+}) από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (εξίσωση 2).



Η ρίζα υδροξυλίου προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση (εξίσωση 3). Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν να καταλύσουν την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas & Kouretas, 1999).

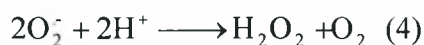


Η δραστηριότητα της ρίζας υδροξυλίου είναι εξαιρετικά υψηλή (Bielski & Cabelli 1995; Halliwell & Gutteridge 1999; von Sonntag 1987).

Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H2O2)

Η πρόσληψη ενός μονήρους ηλεκτρονίου από το υπεροξειδικό ανιόν οδηγεί στο σχηματισμό του δισθενούς υπεροξειδικού ιόντος (O_2^{2-}), που δεν έχει πλέον ασύζευκτα ηλεκτρόνια και εξ ορισμού δεν είναι ρίζα. Ο σχηματισμός του ιόντος αυτού *in vivo* σε φυσιολογικό pH συνοδεύεται από την ταχύτατη πρόσληψη πρωτονίου που οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου. Σε υδατικό

διάλυμα, δύο υπεροξειδικά ανιόντα αντιδρούν αυτόματα ή με την καταλυτική επίδραση της SOD με δύο πρωτόνια και σχηματίζεται υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο:



Άλλωστε, η υδροϋπεροξειδική ρίζα, όπου σχηματίζεται, μετατρέπεται παρουσία του υπεροξειδικού ανιόντος και πρωτονίων σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο με την καταλυτική επίδραση της SOD:



Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι σχετικά σταθερό και ενώ δεν είναι ελεύθερη ρίζα συγκαταλέγεται σε αυτές εξαιτίας της τοξικότητας και της ικανότητάς του να προκαλεί το σχηματισμό ελευθέρων ριζών (Finaud et al., 2006).

Μονήρες οξυγόνο (1O₂)

Το ¹O₂ (singlet oxygen) σχηματίζεται μέσω μιας αλλαγής στην κατάσταση του spin, από παράλληλη σε αντιπαράλληλη. Αυτό αυξάνει πάρα πολύ τη δραστηριότητά του επειδή αναιρείται ο περιορισμός του spin. Μπορεί να αντιδράσει εύκολα με αμινοξέα (όπως η κυστεΐνη, η μεθειονίνη, η τρυπτοφάνη και η ιστιδίνη) και αποτελεί το μεγαλύτερο καταλύτη για την έναρξη της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, η οποία οδηγεί σε καταστροφή των μεμβρανών. Το ¹O₂ σχηματίζεται κατά την άμεση μεταφορά ενέργειας από φωτοευαίσθητα μόρια.

Βιολογικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου

Θετικές επιδράσεις

Οι ROS φαίνεται ότι συμμετέχουν στους μηχανισμούς σηματοδότησης διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών (Vollaard et al., 2005). Έχει αναφερθεί ότι η παραγωγή ελευθέρων ριζών στον οργανισμό αποτελεί μια φυσιολογική βιολογική διαδικασία απαραίτητη στην αναβολική λειτουργία των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου του σχηματισμού του DNA και του RNA καθώς και βασικών πρωτεϊνών (Karlsson, 1997). Οι ελεύθερες ρίζες χρησιμεύουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι και έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν το επίπεδο οξειδοαναγωγής (Linnane, Zhang, & Yarovaya, 2002; Sen, & Packer 2000).

Παρουσία φλεγμονής οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν στην αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος ενισχύοντας τις διαδικασίες καταστροφής των

αντιγόνων κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης (Jenkins, 1988). Η σημασία των ελευθέρων ριζών στο μυϊκό σύστημα όμως δεν περιορίζεται μόνο στην αποκατάσταση φλεγμονών που μπορεί να δημιουργηθούν ύστερα από έντονη άσκηση και έκκεντρες συσπάσεις (Malm, 2001). Η αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών συμβάλει στην αύξηση της μυϊκής συστολής, ενώ αντίθετα αναστολή της οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής (Reid, 2001).

Αρνητικές επιδράσεις

Η αυξημένη χημική δραστηριότητα που χαρακτηρίζει τις ελεύθερες ρίζες εξαιτίας της έντονης αστάθειάς τους έχει ως συνέπεια την αντίδραση αυτών με όλα σχεδόν τα μακρομόρια με αρνητικές επιπτώσεις (Alessio, 1993; Cooper et al., 2002; Jenkins 1988; Pietta, 2000). Συνοπτικά οι αρνητικές επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών είναι:

α. Λιπιδική υπεροξειδωση.

Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών στα κύτταρα και τους ιστούς μπορεί να οδηγήσει σε βλάβες στις μεμβράνες των κυτταρικών οργανιδίων (Slater 1984). Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία οξειδώνονται σχετικά εύκολα.

Η λιπιδική υπεροξειδωση έχει τρία στάδια: έναρξη (initiation), διάδοση (propagation) και τερματισμό (termination), (Clarkson & Thompson 2000).

Αρχικά παρατηρείται η αφαίρεση ενός ατόμου υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου στα λιπίδια και το σχηματισμό μιας αλκυλορίζας (-CH[•]-). 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 (LOO[•]) κατά τη διάρκεια της φάσης της διάδοσης. Αυτές οι ελεύθερες ρίζες (LOO[•]) 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 LOO[•]

προωθούν την διάδοση της λιπιδικής υπεροξειδωσης σε άλλα λιπαρά οξέα (Halliwell & Gutteridge 1999).

β. Οξειδωση πρωτεϊνών

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών εκτός από τα λιπίδια έχει επιπτώσεις και στις πρωτεΐνες (Szweda, Friguet, & Szweda, I., 2002). Η οξειδωση που προκαλείται έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση μεταλλάξεων και τη δυσλειτουργία τους (Radak et al., 1999), το θρυμματισμό των αμινοξέων τους και τη μεταβολή της δομής και της λειτουργικότητάς τους. Η πρωτεϊνική οξειδωση μπορεί να προκληθεί από φλεγμονή, άσκηση ή ισχαιμία-επαναιμάτωση (Levine, 2002). Η καταστροφή των πρωτεϊνών αυξάνεται με την ηλικία (Standman et al., 2001).

γ. Οξειδωση νουκλεϊκών οξέων

Ο πιο σημαντικός βιολογικά στόχος οξειδωτικής βλάβης είναι το DNA (Niess, 2005). Το DNA είναι ένα πολύ ευαίσθητο μόριο στη δράση των E.P.O. *in vivo* (Dizdaroglu, Jaruga, & Birincioglu, 2002). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προκαλέσουν μεταλλάξεις, καταστροφή του DNA και των χρωμοσωμάτων και να επάγουν την κυτταρική διαίρεση. Επίσης πιστεύεται ότι μέσω της καταστροφής του DNA επηρεάζουν τη λειτουργία των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Rodney et al., 2000).

Η έκθεση των ζωντανών οργανισμών στην ιονίζουσα ακτινοβολία οδηγεί στην *in vivo* ομολυτική σύντηξη των δεσμών O-H στα μόρια νερού με αποτέλεσμα την παραγωγή OH· και H·. Οι ρίζες υδροξυλίου είναι ιδιαίτερα δραστικές και καταστρέφουν το DNA κι άλλα βιομόρια. Σύμφωνα μάλιστα με τους Mylonas & Kouretas (1999) τόσο η αδενίνη όσο και οι πυριμιδίνες μπορούν να τροποποιηθούν μετά από αλληλεπίδραση με τη ρίζα OH·. Άλλες πηγές της καταστροφής του DNA θεωρούνται το κάπνισμα, η χρόνια φλεγμονή και η διαρροή ενζύμων από τα μιτοχόνδρια, η οποία αυξάνεται με την άσκηση (Alessio, 1993; Kasai, 2002).

δ. Μυϊκός κάματος

Για τη φυσιολογική λειτουργία του μυός απαιτείται ένας μικρός αριθμός ελευθέρων ριζών (Reid, 2001). Η αυξημένη όμως συγκέντρωση ελευθέρων ριζών στο μυ, που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της άσκησης, σχετίζεται με το μυϊκό κάματο και το μυϊκό πόνο που υπάρχει μετά το τέλος αυτής (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, Haack, & Franchek, 1992). Οι συσταλτές πρωτεΐνες του μυός

(ακτίνη, μυσίνη) είναι ευαίσθητες στις αλλαγές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, η οποία μεταβάλλεται από την παραγωγή των ROS. Συνεπώς, μεταβάλλεται και η μυϊκή σύσπαση καθώς και ο έλεγχός της (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.

ε. Πρόκληση ασθενειών

Η υπερβολική και παρατεταμένη αύξηση ελευθέρων ριζών έχει συνδεθεί με την αποδυνάμωση του ανοσοποιητικού συστήματος του οργανισμού (Tiidus, 1998), τον καρκίνο, το διαβήτη, την αθηροσκλήρωση, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, το σύνδρομο Down και τη νόσο Parkinson. Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες έχουν ενοχοποιηθεί και για το μηχανισμό της γήρανσης (Droge, 2002).

Αντιοξειδωτικός μηχανισμός

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς είναι συνεχής και αναπόφευκτη και είναι αδύνατον να προληφθεί ολοκληρωτικά *in vivo*. Ο οργανισμός για να εξουδετερώνει τις βλαπτικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών και να ελέγχει τη δραστηριότητά τους έχει αναπτύξει έναν αντιοξειδωτικό αμυντικό μηχανισμό στον οργανισμό (Cooper et al., 2002; Bulkley, 1990). 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).

Τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με τη χημική τους φύση μπορούν να καταταχθούν σε ενζυμικά και μη ενζυμικά.

Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

α. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η SOD αποτελεί την κύρια άμυνα έναντι των ριζών υπεροξειδίου (Mylonas & Kouretas 1999) και κατά του οξειδωτικού stress. Πρώτη φορά απομονώθηκε από τους Mann και Kleilin το 1938. Διακρίνεται σε τρεις τύπους: i. την κυτταροπλασματική Cu-Zn SOD, ii. τη μιτοχονδριακή Mn-SOD και iii. την εξωκυτταρική SOD (Deaton et al., 2004).

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, Lewis-Molock, & White, 1997).

β. Καταλάση (CAT)

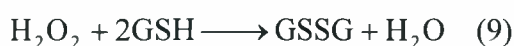
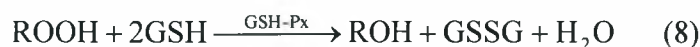
Η CAT είναι ένα άλλο αντιοξειδωτικό ένζυμο που διασπά το H_2O_2 σε H_2O και O_2 σύμφωνα με την αντίδραση (7) (Niess, 2005). Υπάρχει σε όλα σχεδόν τα κύτταρα του οργανισμού και εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα (Sinclair, Barnett, Lunec, 1990).



γ. Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης (GSH-Px)

Η GSH-Px ανήκει στην οικογένεια των σεληνιοπρωτεϊνών και αποτελεί ένα πολύ σημαντικό ενζυμικό αντιοξειδωτικό καθώς καταλύει την αναγωγή μίας ποικιλίας υπεροξειδίων όπως είναι τα υδροϋπεροξειδία και τα λιπούπεροξειδία. Πρόκειται για ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα καθώς και στο εξωτερικό του κυττάρου και είναι άφθονο στην καρδιά, τους πνεύμονες και τον εγκέφαλο. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τέσσερις ισομορφές GSH-Px στα θηλαστικά: i) το κλασσικό κυτταρικό ένζυμο, ii) η ισομορφή που μεταβολίζει τα λιπιδιακά υπεροξειδία iii) αυτή που εντοπίζεται στην γαστρεντερική οδό και iv) στο πλάσμα. Η GSH-Px αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες, καθεμία από τις οποίες περιέχει ένα άτομο σεληνίου και το σταθερό υπόστρωμα της είναι η γλουταθειόνη (GSH) (Halliwell & Gutteridge 1998).

Η GSH-Px καταλύει την μετατροπή των υπεροξειδίων σε νερό οξειδώνοντας την GSH στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) σύμφωνα με τις αντιδράσεις (8) και (9) :



Η GSH-Px και η CAT έχουν την ίδια δράση ενάντια στο υπεροξειδίο. Αλλά η πρώτη είναι περισσότερο αποτελεσματική σε υψηλές συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών, ενώ η δεύτερη δρα περισσότερο αποτελεσματικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου (Antunes, Derick, & Cadenas, 2002).

Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

α. Βιταμίνη E (τοκοφερόλη)

Είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη που αποτελείται από διάφορες ισομορφές γνωστές ως τοκοφερόλες με την α-τοκοφερόλη να είναι η πιο δραστική και άφθονη μορφή. Η βιταμίνη E θεωρείται από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά εξαιτίας της αφθονίας της στις μεμβράνες των κυττάρων και των μιτοχονδρίων, αλλά και της ικανότητάς της να δρα απευθείας έναντι των ελευθέρων ριζών (Finaud et al, 2006). Η βιταμίνη E παίζει σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές μεμβράνες διότι σταματά την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Η μοριακή της δομή επιτρέπει την απενεργοποίηση των ελευθέρων ριζών σε λιπιδικό περιβάλλον και ιδιαίτερα των ριζών υπεροξειδίου, που προέρχονται από την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών στις κυτταρικές μεμβράνες ή στο αίμα (Mylonas & Kouretas 1999).

Η περιεκτικότητα ορισμένων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) του πλάσματος σε α-τοκοφερόλη είναι το μέτρο της άμυνας τους στην υπεροξειδωση και, κατ' επέκταση, στην εξέλιξη νόσων που σχετίζονται με την υπεροξειδωση αυτή όπως είναι η αθηροσκλήρυνση (Gey, Brubacher, Stahelin, 1987).

β. Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη δραστική τόσο στο εξωκυττάριο υγρό όσο και στο κυτταρόπλασμα. Στα υγρά των ιστών η βιταμίνη C έχει την ικανότητα να ουδετεροποιεί τις ελεύθερες ρίζες (OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, LOO^\bullet , RO^\bullet) ενώ στο εσωτερικό των κυττάρων ενισχύει τη δράση της βιταμίνης E και της GSH αναγεννώντας τις ενεργές τους μορφές μετά την αλληλεπίδραση τους με τα ROS (Finaud et al., 2006).

γ. Βιταμίνη A (ρετινόλη) και β-καροτένιο

Η βιταμίνη A είναι μία λιποδιαλυτή βιταμίνη που απαντάται σε αρκετές λιπαρές ουσίες. Το β-καροτένιο εντοπίζεται στις κυτταρικές μεμβράνες και μετατρέπεται σε βιταμίνη A όταν απαιτείται από τις ανάγκες του οργανισμού. Αν κι ο μηχανισμός της δράσης του β-καροτένιου *in vivo* είναι ασαφής, έχει προταθεί ότι απενεργοποιεί τις ελεύθερες ρίζες (συγκεκριμένα το ατομικό οξυγόνο και τις ρίζες των λιπιδίων) κι αναστέλλει την υπεροξειδωση των λιπιδίων (Finaud et al., 2006). 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, Tesoriere, & Bongiorno, 1995).

δ. Φλαβονοειδή

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

ε. Θειόλες

Οι θειόλες είναι μόρια που διαθέτουν σουλφυδρυλικά κατάλοιπα (-SH) στο ενεργό τους κέντρο και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην προστασία του οργανισμού από τις βλαπτικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών. Συντίθενται από τα αμινοξέα κυστεΐνη και μεθειονίνη. Συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση και την ανοσολογική αντίδραση και έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Sen & Packer 2000).

Η γλουταθειόνη (GSH) είναι ένα τριπεπτίδιο (γ-Glu-Cys-Gly) που περιέχει μία σουλφυδρυλομάδα και αποτελεί ένα σημαντικό διαλυτό αντιοξειδωτικό καθώς συμβάλλει στην προστασία των ερυθροκυττάρων από οξειδωτική βλάβη. Η GSH είναι η μεγαλύτερη παρούσα θειόλη στον οργανισμό. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα, στα μιτοχόνδρια και αποτελεί το κυριότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό στα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Δρα ως υπόστρωμα της GPX κι έτσι συμμετέχει στην αναστολή της παραγωγής των ελευθέρων ριζών. Η GSH, επίσης, εξουδετερώνει και απευθείας τις ελεύθερες ρίζες ενώ παράλληλα ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών E και C (May, Qu, Whitesell, 1996).

ζ. Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο. Το ουρικό οξύ έχει την ικανότητα να δεσμεύει σταθερά τα ιόντα σιδήρου και χαλκού, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζει την υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων και να αποτελεί εκκαθαριστή ελευθέρων ριζών (Ames, Catchcart, & Schwieters, 1981).

Η άσκηση αυξάνει τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser 1988). Στη συνέχεια διαχέεται στο εσωτερικό των μυών και λειτουργεί προστατευτικά απέναντι στην προκαλούμενη από τις ελεύθερες ρίζες οξείδωσή τους (Hellsten, Sjödin, Richter, & Bangsbo, 1998).

η. Συνένζυμο Q10

Είναι ένα ενδογενές μόριο το οποίο βρίσκεται στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων και είναι απαραίτητο για τη σύνθεση του ATP. Είναι γνωστό ότι δρα

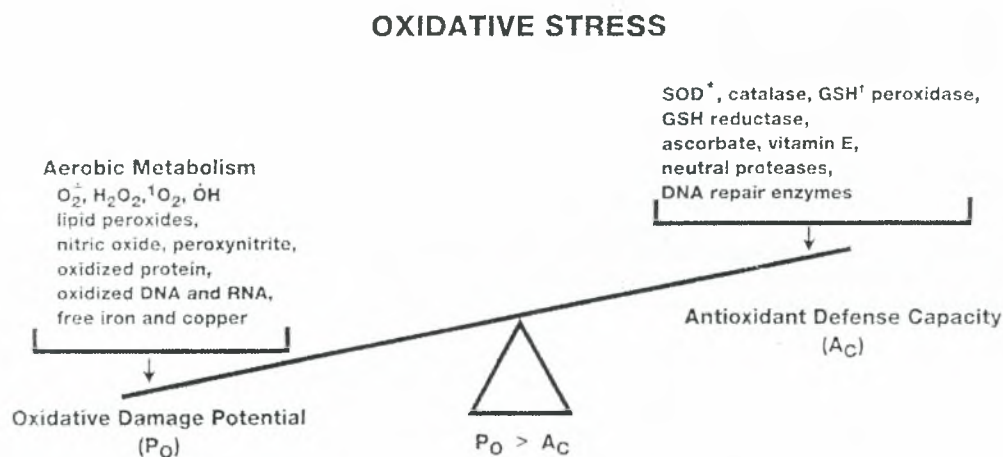
απευθείας ως αντιοξειδωτικό ενάντια στις ρίζες υπεροξειδίου, ενώ παράλληλα είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση ενός άλλου πολύ ισχυρού λιπόφιλου αντιοξειδωτικού, της α-τοκοφερόλης (Siemieniuk & Skrzydlewska, 2005).

θ. Άλλα αντιοξειδωτικά

Οι πρωτεΐνες αλβουμίνη, σερουλοπλασμίνη και φερριτίνη αποτελούν μερικές από τις πολλές πρωτεΐνες που ενισχύουν την άμυνα του οργανισμού απέναντι στις ελεύθερες ρίζες (Finaud et al., 2006). Τέλος τα ιχνοστοιχεία χαλκός, ψευδάργυρος, σίδηρος, σελήνιο και μαγγάνιο εμπλέκονται σε αντιοξειδωτικές λειτουργίες ως συνεργιστικοί παράγοντες των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Powers, 2004).

Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως η διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προέλθει είτε από αυξημένη παραγωγή των ελευθέρων ριζών, είτε από μειωμένη παραγωγή ή πρόσληψη αντιοξειδωτικών ουσιών (βιταμίνη E και C) (Clarkson & Thompson, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1998).



*SOD: superoxide dismutase.

†GSH: reduced glutathione.

Σχήμα 1: Οξειδωτικό stress, η διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ παραγωγής δραστικών ειδών κι αντιοξειδωτικών, προς όφελος των πρώτων (Mylonas & Kouretas, 1999)

Μέθοδοι προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προσδιοριστεί είτε άμεσα με τη μέτρηση της ποσότητας των ελευθέρων ριζών που παράγονται είτε έμμεσα με τη μέτρηση της βλάβης που προκαλείται σε λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA από τις ελεύθερες ρίζες. (Halliwell & Whiteman, 2004).

α. Άμεσος προσδιορισμός του οξειδωτικού στρες

Η τεχνική της παγίδευσης του spin ακολουθούμενη από την τεχνική παραμαγνητικού συντονισμού ηλεκτρονίων (electron spin resonance technique) χρησιμοποιούνται για την απευθείας μέτρηση των ROS με βάση τις παραμαγνητικές τους ιδιότητες. Οι μετρήσεις είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν *in vivo*, *ex vivo* και *in vitro*. Τα δείγματα συλλέγονται σε σωληνάρια που περιέχουν ειδικό διάλυμα με παγιδευμένα spin, τα οποία αποτελούν σταθεροποιητές των ROS. Έπειτα από φυγοκέντρηση ο ορός αναλύεται με την φασματοφωτομετρική μέθοδο. Ωστόσο τα αποτελέσματα από την παραπάνω μέθοδο δεν θεωρούνται σε μεγάλο βαθμό αξιόπιστα εξαιτίας του μικρού χρόνου ημιζωής των ROS και της χαμηλής τους συγκέντρωσης (Urso & Clarkson, 2003).

β. Έμμεσος προσδιορισμός του οξειδωτικού στρες

Πραγματοποιείται με την χρήση ειδικών δεικτών (δείκτες οξειδωτικού στρες) με τους οποίους προσδιορίζεται το μέγεθος της βλάβης που έχουν υποστεί μακρομόρια όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και DNA, εξαιτίας της δράσης των ελευθέρων ριζών (Halliwell & Whiteman, 2004).

Παράγοντες που επάγουν το οξειδωτικό στρες

Οι παράγοντες που μπορούν να επάγουν το οξειδωτικό στρες διακρίνονται σε ενδογενείς και εξωγενείς. Στους ενδογενείς περιλαμβάνονται η φυσική δραστηριότητα, το ψυχολογικό στρες, η φλεγμονή (παροδική μόλυνση/χρόνια πάθηση), ο καρκίνος, η ισχαιμία/επαναιμάτωση (επανοξυγόνωση) και ο κυτταρικός θάνατος. Στους εξωγενείς παράγοντες περιλαμβάνονται η διατροφή, οι ρύποι, τα φάρμακα, η ακτινοβολία και διάφορες ενώσεις που απορροφώνται από το δέρμα. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες δρουν συχνά πολύ γρήγορα και πολλές φορές η δράση τους είναι αθροιστική ή τουλάχιστον συνεργιστική (Møller, Wallin, & Knudsen, 1996).

Παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση

Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση είναι οι παρακάτω (Ji, 1999).

α. Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων

Ο μεταβολικός ρυθμός στους σκελετικούς μύες κατά την άσκηση αυξάνει μέχρι και 100 φορές σε σχέση με τα επίπεδα ηρεμίας, ενώ η συνολική πρόσληψη οξυγόνου αυξάνεται 20 φορές (Ji, 1999). Αυτή η αύξηση, που είναι απόρροια της αυξημένης ροής ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια, έχει ως αποτέλεσμα τον αυξημένο σχηματισμό $O_2^{\cdot-}$ (Niess, 2005).

β. Η οξειδάση της ξανθίνης

Σε περιπτώσεις έντονου μεταβολικού στρες, όπως συμβαίνει με την άσκηση, η αφυδρογονάση της ξανθίνης μετατρέπεται σε οξειδάση της ξανθίνης. Κατά τη διάρκεια της οξείας άσκησης προκαλείται το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης το οποίο ενεργοποιεί την οξειδάση της ξανθίνης. Για τη μετατροπή αυτή, η αφυδρογονάση της ξανθίνης χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο ως αποδέκτη ηλεκτρονίων με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Hellsten, Sjödin, Richter, & Bangsbo, 1996).

Η οξειδάση της ξανθίνης μπορεί να είναι πιο σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση σε σύγκριση με τα μιτοχόνδρια (Cooper et al., 2002) ενώ 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).

γ. Φλεγμονώδης αντίδραση

Η έντονη άσκηση προκαλεί μυϊκή καταστροφή με αποτέλεσμα την αύξηση των ουδετερόφιλων και μονοπύρηνων κυττάρων από τα οποία απελευθερώνονται ελεύθερες ρίζες (Ji, 1999). Επιπλέον, φλεγμονώδης αντίδραση που δημιουργείται κατά την άσκηση παράλληλα με την καταστροφή του μυϊκού ιστού 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).

δ. 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).

Οξειδωτικό Στρες και Άσκηση

Η άσκηση επομένως αφού προκαλεί αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, οδηγεί τον οργανισμό σε μια κατάσταση ανισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών υπέρ των πρώτων προκαλώντας οξειδωτικό στρες (Azzi, Davies, & Kelly, 2004). Επομένως ενώ η άσκηση βελτιώνει την ποιότητα ζωής του ανθρώπου συγχρόνως προκαλεί και οξειδωτικό στρες με όλες τις προαναφερθείσες συνέπειες για τον οργανισμό.

Ωστόσο, η άσκηση σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες με δυο τρόπους. Από τη μια πλευρά αυξάνει τον οξειδωτικό μεταβολισμό, ενισχύοντας το οξειδωτικό στρες από την άλλη προκαλεί προσαρμογές που φαίνεται να έχουν προστατευτικές, αντιοξειδωτικές επιδράσεις (Møller et al., 1996). Η διαφορούμενη σχέση της άσκησης με το οξειδωτικό στρες ήταν φυσιολογικό να προκαλέσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον.

Έτσι, αύξηση του οξειδωτικού στρες έχει βρεθεί μετά από υπομέγιστη άσκηση με αντιστάσεις (Ramel, Wanger, & Elmadfa, 2004), τρέξιμο απόστασης μισού μαραθωνίου (Child, Wilkinson, Fallowfield, & Donnelly, 1998), τρέξιμο διάρκειας 20 λεπτών (Özbay & Dülger, 2002), τρέξιμο 50 χλμ (Mastaloudis, Leonard, & Traber, 2001), ποδηλασία 171 χλμ (Aguilo, Tauler, Fuentespina, Tur, Cordova, & Pons, 2005), άσκηση αυξανόμενης έντασης στο εργοποδήλατο (Koska, et al., 2000) αλλά και στο δαπεδοεργόμετρο (Sastre, Asensi, Gascó, Ferrero, Furukawa, & Viña, 1992), ισομετρική άσκηση (Alesio, 1993), ποδηλασία μέχρι εξάντλησης και μέγιστες στατικές ασκήσεις (Steinberg, Delliaux, & Jammes, 2006). Τέλος, οι Ilhan, Kamanlı και Ozmerdivenli (2004), παρατήρησαν ότι το οξειδωτικό στρες αυξήθηκε περισσότερο μετά από συνδυασμένη αερόβια και αναερόβια άσκηση συγκριτικά με την εφαρμογή μόνο αερόβιων ή μόνο αναερόβιων μορφών άσκησης.

Στον αντίποδα, οι Lee, Goldfarb, Rescino, Hegde, Patrick και Apperson (2002), σε ερευνά τους παρατήρησαν ότι η έκκεντρη άσκηση υψηλής έντασης δεν επέφερε μεταβολές στο οξειδωτικό στρες ενώ στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Bloomer, Smith, και Fisher-Wellman (2007), μετά από μελέτη αθλητών σε ταχυδυναμικές ασκήσεις. Μη αύξηση του οξειδωτικού στρες διαπιστώθηκε επίσης

και μετά από έντονη αερόβια άσκηση (Chevion, Moran, & Heled, 2003; Vasankari, Kujala, & Vasankari, M., 1997; Vider et al., 2001).

Η άσκηση βελτιώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού (Kabasakalis et al., 2008; Ramel et al., 2004). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και από τους Inal και συν. (2001), μετά τη μελέτη μέγιστων προσπαθειών σε κολύμβηση αποστάσεων 100 και 800 μέτρων. Τέλος οι Koska και συν. (2000), παρατήρησαν ότι η άσκηση είχε ως αποτέλεσμα εκτός από το οξειδωτικό στρες και αύξηση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων. Όλοι οι προαναφερόμενοι ερευνητές ανέφεραν ως πιθανή αιτία της βελτίωσης του αντιοξειδωτικού μηχανισμού την ανάγκη του οργανισμού να αντιμετωπίσει το αυξανόμενο οξειδωτικό στρες.

Η ευεργετική όμως επίδραση της άσκησης στη βελτίωση της άμυνας του οργανισμού απέναντι στο οξειδωτικό στρες μπορεί να φανεί και από το γεγονός ότι τα προπονημένα άτομα παρουσίαζαν καλύτερη προσαρμογή στο οξειδωτικό στρες συγκριτικά με τα μη προπονημένα.

Οι Ramel και συν. (2004), συγκρίνοντας άτομα προπονημένα με βάρη και μη προπονημένα άτομα διαπίστωσαν ότι δεν υπήρχε διαφορά στην αντιοξειδωτική ικανότητα μεταξύ των δυο πειραματικών ομάδων στην ηρεμία. Αντίθετα κατά τη διάρκεια της άσκησης τα απροπόνητα άτομα ήταν λιγότερο επιρρεπή στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Οι Leeuwenburgh, Fiebig, & Chandwaney (2001), επίσης τονίζουν ότι στα απροπόνητα άτομα η έντονη άσκηση είναι ιδιαίτερα επιβλαβής αφού υπάρχει αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών ενώ το αντιοξειδωτικό σύστημα αυτών δεν είναι κατάλληλα προσαρμοσμένο.

Οι αθλητές όμως παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα και κατά την ηρεμία, αφού σύμφωνα με μελέτη των Cazzola, Russo-Volpe, Cervato, & Cestaro (2003), σε ποδοσφαιριστές παρατηρήθηκε ότι η αντιοξειδωτική τους ικανότητα ήταν υψηλότερη από αυτή των ατόμων που αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου.

Το προπονητικό επίπεδο ενός ατόμου αποτελεί επίσης παράγοντα που σχετίζεται με την ικανότητα αντιμετώπισης του οξειδωτικού στρες. Αυτό απέδειξαν οι Mena, Maynar, Timon, Maynar, & Campillo (1991), σε έρευνά τους όταν παρατήρησαν ότι οι συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών ενζύμων ήταν υψηλότερες σε ποδηλάτες υψηλού επιπέδου, χαμηλότερες σε ερασιτέχνες ποδηλάτες και ακόμη πιο χαμηλές σε μη αθλητές.

Τέλος οι Lee και συν. (2002), όπως επίσης και οι Bloomer και συν. (2006), στις έρευνες τους δεν παρατήρησαν μεταβολές του οξειδωτικού στρες και εξήγησαν

το γεγονός αυτό πως ίσως οφείλεται στο υψηλό προπονητικό επίπεδο των συμμετεχόντων.

Συμπερασματικά η προπόνηση – ανεξάρτητα από το αν είναι αερόβια, αναερόβια ή συνδυασμός και των δυο – προκαλεί μείωση του οξειδωτικού στρες και αύξηση της αποδοτικότητας του αντιοξειδωτικού συστήματος απέναντι στην αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών που προκαλείται κατά την άσκηση. Για την επίτευξη όμως αυτού του έργου της προπόνησης, σημαντικό ρόλο παίζει η δομή του προπονητικού προγράμματος, η διάρκεια και η ένταση του οποίου πρέπει να είναι τέτοια ώστε να προκαλεί ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού και μείωση του οξειδωτικού στρες. Αυτό θα επιτευχθεί με την προσαρμογή του οργανισμού στην προπόνηση, η οποία θα είναι αποτελεσματικότερη αν αυτή αυξάνεται σταδιακά (Finaud et al., 2006).

Ωστόσο, υπάρχει μεγάλος αριθμός ερευνών στις οποίες διαπιστώνεται ότι η έντονη προπόνηση είναι δυνατόν να προκαλέσει την αποδυνάμωση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού και κυρίως σε αθλητές υψηλού επιπέδου. Το φαινόμενο αυτό ενισχύεται όταν οι αθλητές δεν διατρέφονται σωστά. Στις περιπτώσεις αυτές το οξειδωτικό στρες αυξάνεται και είναι δυνατόν να οδηγήσει σε σύνδρομο υπερπροπόνησης (Finaud et al., 2006).

Αλοπουρινόλη

Το ουρικό οξύ είναι ένα ισχυρό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό, το οποίο θεωρείται ότι ευθύνεται για το μεγαλύτερο μέρος της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Maxwell, Jakeman, Thomason, Leguen, & Thorpe, 1993). Το ουρικό οξύ ασκεί την αντιοξειδωτική του δράση τόσο σε κυτταρικό επίπεδο (κυτταρικές μεμβράνες) όσο και σε γενετικό (DNA) (Hellsten et al., 1998). Επιπλέον θεωρείται ότι προστατεύει από οξείδωση και τα λιπίδια του πλάσματος (Yanai & Morimoto, 2004).

Ωστόσο το ουρικό οξύ σε συγκεντρώσεις υψηλότερες του φυσιολογικού (υπερουριχαιμία) παρουσιάζει την ιδιαιτερότητα να προκαλεί ουρική αρθρίτιδα, μια μεταβολική πάθηση που χαρακτηρίζεται από εναπόθεση ουρικού οξέος στις αρθρώσεις, με αποτέλεσμα φλεγμονή και έντονο πόνο. Η φαρμακευτική αγωγή που ακολουθείται στην εμφάνιση αυτής της πάθησης είναι η χορήγηση αλοπουρινόλης, η οποία βοηθάει στη μείωση του ουρικού οξέος στο αίμα, επιβραδύνοντας τον ρυθμό

παραγωγής του από τον οργανισμό. Η αλοπουρινόλη είναι ένα δομικό ανάλογο της υποξανθίνης και αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης και της δευδρογονάσης της ξανθίνης (Hoey et al., 1988).

Αλοπουρινόλη και άσκηση

Η χορήγηση αλοπουρινόλης αναστέλλει την αύξηση του ουρικού οξέος μετά από άσκηση (Kaya et al., 2005; Stathis, Carey, Snow, 2005).

Κατά την άσκηση οι σκελετικοί μύες συστέλλονται και το ATP μετατρέπεται σε ADP (διφωσφορική αδενοσίνη). Στη συνέχεια το ADP αποδομείται σε AMP (μονοφωσφορική αδενοσίνη) και αυτό με τη σειρά του σε IMP (μονοφωσφορική ινοσίνη). Το IMP μετατρέπεται σε ινοσίνη και έπειτα σε υποξανθίνη. Η υποξανθίνη περνά στο αίμα και προσλαμβάνεται από το ήπαρ, όπου, με τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης, υφίσταται δυο διαδοχικές οξειδώσεις προς ξανθίνη και ουρικό οξύ (Mougiou, 2006).

Η οξειδάση της ξανθίνης χρησιμοποιεί ως δέκτη ηλεκτρονίων μοριακό οξυγόνο κατά τη διαδικασία της διάσπασης των πουρινών με αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) (McCord & Fridovich, 1968).

Η αλοπουρινόλη μεταβολίζεται σε οξυπουρινόλη από τη δευδρογονάση της ξανθίνης και την αλδευδική οξειδάση. Τόσο η αλοπουρινόλη όσο και η οξυπουρινόλη έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ρίζες OH^{\cdot} (Moorhouse et al., 1987). Λόγω της ιδιότητας της αλοπουρινόλης να αναστέλλει την παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ μέσω της αναστολής της δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης, η αλοπουρινόλη θεωρείται ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο (Gomez-Cabrera et al., 2005; Gomez-Cabrera et al., 2006).

Εξαιτίας, λοιπόν της αντιοξειδωτικής της δράσης η αλοπουρινόλη ήταν φυσικό να προκαλέσει το ενδιαφέρον μελετητών για τη σχέση της με την άσκηση και το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από αυτή.

Έτσι μολονότι ο αριθμός των εργασιών με σκοπό τη μελέτη του προστατευτικού ρόλου της αλοπουρινόλης απέναντι στο προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες είναι σχετικά μικρός, παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση αλοπουρινόλης απέτρεψε την οξείδωση της γλουταθειόνης και των λιπιδίων στο αίμα αλόγων μετά το πέρας έντονης άσκησης (Mills et al., 1997) καθώς και τη λιπιδική υπεροξείδωση στο ήπαρ επίμυων που είχαν υποβληθεί σε τρέξιμο μέχρι εξάντλησης

σε κυλιόμενο τάπητα (Koyama et al., 1999). Επίσης, η χορήγηση αλοπουρινόλης μείωσε τη συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων μετά από τρέξιμο μέχρι εξάντλησης σε δαπεδοεργόμετρο (Gomez-Cabrera et al., 2005).

Η δράση της αλοπουρινόλης όμως, απέναντι στο οξειδωτικό στρες μελετήθηκε και σε ανθρώπους αποδεικνύοντας πως η χορήγησή της μειώνει φαινόμενα οξειδωτικού στρες. Έτσι οι Gomez-Cabrera και συν. (2005), αναφέρουν ότι οι μαραθωνοδρόμοι στους οποίους είχε χορηγηθεί αλοπουρινόλη παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες σε σύγκριση με αυτούς που δεν έλαβαν αλοπουρινόλη ενώ το ίδιο διαπιστώθηκε και σε ποδηλάτες (Gomez-Cabrera et al., 2003).

Η οξείδωση της γλουταθειόνης και η λιπιδική υπεροξείδωση του αίματος ανεστάλησαν μετά από τη χορήγηση αλοπουρινόλης σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια οι οποίοι υποβλήθηκαν σε άσκηση σε κυκλοεργόμετρο (Heunks et al., 1999).

Η αλοπουρινόλη όμως έχει προστατευτικό ρόλο και απέναντι στη μυική καταστροφή που προκαλείται κατά την άσκηση. Οι Duarte και συν. (1994), παρατήρησαν ότι η μυική καταστροφή στον υποκνημίδιο μυ επιμύων που είχαν υποβληθεί σε τρέξιμο μέχρι εξάντλησης ήταν μεγαλύτερη συγκριτικά με αυτούς στους οποίους είχε χορηγηθεί αλοπουρινόλη. Επιπλέον, οι Gomez-Cabrera και συν. (2003), αναφέρουν ότι η αλοπουρινόλη μείωσε την αυξημένη από την άσκηση κρεατινική κίνηση, η οποία είναι ένας δείκτης μυικής καταστροφής.

Όλες οι παραπάνω εργασίες έχουν μελετήσει τη δράση της αλοπουρινόλης στο αίμα, στο σκελετικό μυ και στο ήπαρ σε πειραματόζωα και ανθρώπους που ασκήθηκαν σε τρέξιμο και ποδηλασία. Ωστόσο δεν υπάρχουν εργασίες που να έχουν ασχοληθεί με τη μελέτη του οξειδωτικού στρες μετά από κολύμβηση μέχρι εξάντλησης στο ήπαρ επιμύων. Το θέμα αυτό θα αποτελέσει αντικείμενο αυτής της έρευνας.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Δείγμα

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν ογδόντα ένηβοι αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar, (ηλικίας 8 εβδομάδων, βάρους 220 ± 10 g), οι οποίοι αποκτήθηκαν από το ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ. Οι επίμυες τοποθετήθηκαν σε ειδικά κλουβιά και διαβίωσαν σε ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (δωδεκάωρος κύκλος φωτός – σκοταδιού, υγρασία $55\% \pm 10$ και θερμοκρασία $20^{\circ} - 24^{\circ}\text{C}$). Τροφή και νερό παρέχονταν *ad libitum*. Η μελέτη είχε εγκριθεί από το συμβούλιο του τμήματος. Όλες οι διαδικασίες που ακολουθήθηκαν ήταν ανάλογες με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης σχετικά με τη φροντίδα και τη χρήση πειραματόζων, σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας για τη φροντίδα εργαστηριακών ζώων (L358, 18.12.86, σελ. 1).

Οι επίμυες χωρίστηκαν τυχαία σε 8 ομάδες των 10 ατόμων ως εξής: α) ασκηθέντες που εξετάστηκαν αμέσως μετά την άσκηση, β) ασκηθέντες που εξετάστηκαν 5 ώρες μετά την άσκηση, γ) ασκηθέντες στους οποίους είχε χορηγηθεί αλοπουρινόλη και που εξετάστηκαν αμέσως μετά την άσκηση, δ) ασκηθέντες στους οποίους είχε χορηγηθεί αλοπουρινόλη και που εξετάστηκαν 5 ώρες μετά την άσκηση, ε) μη ασκηθέντες στους οποίους είχε χορηγηθεί αλοπουρινόλη και που εξετάστηκαν 1.5 ώρες μετά τη χορήγηση, στ) μη ασκηθέντες στους οποίους είχε χορηγηθεί αλοπουρινόλη και που εξετάστηκαν 2.5 ώρες μετά τη χορήγηση, ζ) μη ασκηθέντες στους οποίους είχε χορηγηθεί αλοπουρινόλη και που εξετάστηκαν 7.5 ώρες μετά τη χορήγηση, η) μη ασκηθέντες στους οποίους είχε χορηγηθεί DMSO και εξετάστηκαν 1.5 ώρες μετά τη χορήγηση (ομάδα ελέγχου).

Προκαταρκτική μελέτη μας έδειξε ότι ο μέσος χρόνος κολύμβησης μέχρι την εξάντληση είναι περίπου 1 ώρα. Επιπλέον η αλοπουρινόλη χορηγήθηκε 1.5 ώρες πριν από την άσκηση γιατί τόση ώρα χρειάζεται περίπου για να παρατηρηθεί η μέγιστη συγκέντρωσή της στον ιστό. Έτσι τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε μόνο αλοπουρινόλη εξετάστηκαν 1.5, 2.5 και 7.5 ώρες μετά τη χορήγηση για να μπορούν να συγκριθούν με τα αντίστοιχα μη ασκηθέντα ζώα που έλαβαν μόνο DMSO, καθώς επίσης και με τα ασκηθέντα που εξετάστηκαν αμέσως μετά και 5 ώρες μετά την άσκηση, αντίστοιχα.

Χορήγηση αλοπουρινόλης

Η αλοπουρινόλη χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε δόση των $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ σωματικού βάρους (Gomez-Cabrera et al., 2005). Η αλοπουρινόλη διαλύθηκε σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), καθώς δεν είναι δυνατό να διαλυθεί σε φυσιολογικό ορό ή μείγμα φυσιολογικού ορού και DMSO. Το DMSO είναι ένας καλός διαλύτης της αλοπουρινόλης και έχει χρησιμοποιηθεί σε πειράματα με ανθρώπους.

Κολυμβητική εξοικείωση

Πριν το πειραματικό πρωτόκολλο (το οποίο ήταν σύμφωνα με τους Matsakas, Friedel, Hertrampf, & Diel, 2005), οι επίμυες αφέθηκαν μία βδομάδα στο χώρο του πειράματος για να εγκλιματιστούν. Στη συνέχεια οι επίμυες εξοικειώθηκαν με την κολύμβηση για μια περίοδο πέντε ημερών προτού εφαρμοστεί το πειραματικό πρωτόκολλο. Την πρώτη ημέρα οι επίμυες παρέμειναν στο νερό για δέκα λεπτά χωρίς πρόσθετο βάρος. Στη συνέχεια η άσκηση υλοποιήθηκε με αυξανόμενο βάρος στην ουρά τους (από 0 έως 2% του σωματικού τους βάρους). Τρεις μέρες πριν το πείραμα έμειναν στα κλουβιά τους για να ξεκουραστούν.

Κολυμβητικό πρωτόκολλο

Οι επίμυες κολύπησαν ο καθένας χωριστά μέχρι εξάντλησης σε ειδικά κατασκευασμένες δεξαμενές (διάμετρος 1.0m, βάθος 0.7m) σε νερό θερμοκρασίας 33-36 °C. Κατά την εκτέλεση της άσκησης τοποθετήθηκε ένα ομοιόμορφο φορτίο στη βάση της ουράς τους ίσο με το 4% του σωματικού βάρους των επίμυων, προκειμένου να επιτευχθεί συνεχής κολύμβηση. Οι επίμυες εποπτεύονταν διαρκώς γιατί η εξάντληση προσδιοριζόταν με την παρατήρηση. Ένα ζώο θεωρούταν ότι έφτανε στην εξάντληση όταν ήταν ανίκανο να διατηρήσει τη μουσούδα του έξω από το νερό. Το κολυμβητικό πρωτόκολλο επιλέχθηκε να είναι μέχρι εξάντλησης επειδή η πρόκληση οξειδωτικού στρες κατά την άσκηση σχετίζεται με την έντασή της. Η κολύμβηση επιλέχθηκε ως άσκηση γιατί σε αντίθεση με το τρέξιμο ελαχιστοποιεί τον κίνδυνο μυϊκής καταστροφής. Επιπλέον η όποια αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την κολύμβηση δεν μπορεί να αποδοθεί σε μυϊκή καταστροφή.

Λήψη ήπατος

Οι επίμυες θανατώθηκαν με αποκεφαλισμό αφού προηγουμένως εκτέθηκαν για κάποιο διάστημα στον αιθέρα. Η λήψη του ήπατος έγινε χειρουργικά. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως τη βιοχημική τους ανάλυση, για τον προσδιορισμό δεικτών οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά η ανηγμένη και η οξειδωμένη γλουταθειόνη, η καταλάση, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και η οξειδάση της ξανθίνης.

Ομογενοποίηση ήπατος

Η ομογενοποίηση έγινε με γουδί και γουδοχέρι. Ο ιστός ομογενοποιήθηκε σε ένα phosphate buffered saline pH 7.4 που περιέχει 138 mM NaCl, 2,7 mM KCL και 1 mM EDTA καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών: Απροτινίνη (10mg/mL), λιουπεπτίνη (1mg/mL) και PMSF (9mg/mL).

Πειραματικές μετρήσεις

Οξειδάση της ξανθίνης.

Ο προσδιορισμός της οξειδάσης της ξανθίνης έγινε σύμφωνα με τους Prajda & Weber, (1975). Είκοσι μL ομογενοποιημένου τμήματος του ήπατος προστέθηκαν σε 430 μL 33 mM διαλύματος φωσφορικού άλατος νατρίου-καλίου (pH 7.5) με 50 μL ξανθίνης 1.7 mM και η αντίδραση σταμάτησε αμέσως με την πρόσθεση 50 μL 100% TCA. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 10,000 g για 15 λεπτά και η απορρόφησή του μετρήθηκε στα 293 nm. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και η αντίδραση διακόπηκε όπως πριν αλλά το δείγμα πριν είχε τοποθετηθεί σε κλίβανο θερμοκρασίας $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 20 λεπτά. Επαναλήφθηκε η ίδια φυγοκέντρηση και η απορρόφηση του δείγματος μετρήθηκε στα 293 nm. Η δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης υπολογίστηκε από την διάφορα του πρώτου δείγματος από το δεύτερο και μετρήθηκε σε units/mg πρωτεΐνης.

Ανηγμένη και η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH και GSSG).

Η ανηγμένη και η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSH και GSSG) υπολογίστηκαν σύμφωνα με τους Reddy, Murthy, Krishna, & Prabhakar, (2004) και Tietze (1969) αντιστοίχως.

Για την GSH, 20 μL ομογενοποιημένου τμήματος του ήπατος αραιωμένου 1/5 προστέθηκαν σε 660 μL 67 mM φωσφορικού άλατος νατρίου-καλλίου (pH 8.0) και 330 μL από 1 mM 5,5' διθειοδυο νιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB). Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρήθηκαν στα 412 nm.

Η συγκέντρωση της GSH υπολογίστηκε σε mmol/L ως εξής:

$$\text{GSH} = (\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta\text{Abs}_{\text{τυφλού}} / 13.6) \times 3 \times 2 \times 5 \times 50.5,$$

όπου:

- 50.5 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του δείγματος (20 μL) (1010 / 20 = 50.5). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για να λάβουμε υπόψη την 1/3 αραιώση του δείγματος κατά την ομογενοποίηση του ιστού, με 2 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη αραιώση που έγινε από το TCA 5% (1:1) και με το 5 για να λάβουμε υπόψη την 1/5 αραιώση του δείγματος. 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

Για την GSSG, σε 50 μL ομογενοποιημένου τμήματος του ήπατος ρυθμίστηκε το pH στο 7.0–7.5 με προσθήκη καυστικού νατρίου (NaOH) (περίπου 5 μl) και ακολούθως 4 μL από 2-2-vinyl pyridine προστέθηκαν στα δείγματα τα οποία στη συνέχεια επώαστηκαν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Πέντε μL ομογενοποιημένου τμήματος του ήπατος αραιωμένου 1/2 αναμείχθηκαν με 600 μL από 143 mM sodium phosphate (6.3 mM EDTA, pH 7.5), 100 μL από 3 mM NADPH, 100 μL από 10 mM DTNB και 194 μL αποσταγμένο νερό. Τα δείγματα επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά προστέθηκε 1 μL αναγωγάσης της γλουταθειόνης και η μέτρηση της απορρόφησης έγινε στα 412 nm για 70 δευτερόλεπτα.

Η συγκέντρωση της GSSG υπολογίστηκε σε mmol/L ως εξής:

$$\text{GSSG} = [(\text{Abs}_{\text{δείγματος}} - \Delta\text{A}_{\text{τυφλού}}) \times 0,75] / [\Delta\text{A}_{\text{πρότυπου}} - \Delta\text{A}_{\text{τυφλού}}] \times 3 \times 2 \times 2 \times 200 \times 0,9] / 2/1000$$

όπου:

200 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1000 μL) προς τον όγκο του δείγματος (5 μL) (1000 / 5 = 200). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για να λάβουμε υπόψη την 1/3 αραιώση του δείγματος κατά την ομογενοποίηση του

ιστού, με 2 για να συνυπολογίσουμε την πρώτη αραιώση που έγινε από το TCA 5% (1:1), με το 2 για να λάβουμε υπόψη την 1/2 αραιώση του δείγματος, με το 0.9 για να λάβουμε υπόψη την αραιώση με το NaOH. Διαιρούμε με 2 για να λάβουμε υπόψη τη στοιχειομετρία της αντίδρασης (2 GSH → 1 GSSG). 0,75 είναι η συγκέντρωση του πρότυπου.

Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS).

Οι μετρήσεις των TBARS έγιναν σύμφωνα με τους Keles, Taysi, Sen, Aksoy, & Akcay, (2001) αλλά με κάποιες ελαφρές τροποποιήσεις. Πενήντα μl ομογενοποιημένου τμήματος του ήπατος αραιωμένου 1/5 αναμείχθηκαν με 500 μL από 35% TCA και 500 μL Tris-HCl (200 mM, pH 7.4) και επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Χίλια μL από 2 M Na₂SO₄ και 55 mM διαλύματος θειοβαρβιτουρικού οξέος προστέθηκαν και τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία 95 °C για 45 λεπτά. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο να κρυσώσουν για 5 λεπτά, και έπειτα προστέθηκε 1 mL TCA 70% και έγινε ανάδευση. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000 g για 3 λεπτά και φωτομετρήθηκαν στα 530 nm.

Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίστηκε σε μmol/L ως εξής:

$$TBARS = (Abs \text{ δείγματος} - Abs \text{ τυφλού}) / 0.156 \times 62 \times 3 \times 5,$$

όπου:

- 62 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (3100 μL) προς τον όγκο του δείγματος (50 μL) (3100 / 50 = 62). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για να λάβουμε υπόψη την 1/3 αραιώση του δείγματος κατά την ομογενοποίηση του ιστού και με το 5 για να λάβουμε υπόψη την 1/5 αραιώση του δείγματος.
- 0.156 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της MDA, ο οποίος είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L σε μmol/L.

Πρωτεϊνικά καρβονύλια.

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων έγινε σύμφωνα με τους Patsoukis και συν. (2004). Σε 50 μL ομογενοποιημένου τμήματος του ήπατος αραιωμένου 1/2 προστέθηκαν 50 μL 20% TCA και αναδεύτηκαν. Ακολούθησε επώαση στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους

4°C. Στη συνέχεια απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν στο ίζημα 0.5 mL του 14 mM DNPH (διαλυμένο σε 2.5 N HCL) για τα δείγματα ή 0.5 mL 2.5 N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα είχε το δικό του τυφλό), ακολούθησε ανάδευση και τοποθέτηση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση κάθε 15 λεπτά. Μετά έγινε φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4°C. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1 mL από το 10% TCA. Ακολούθησε πάλι ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0.5 mL αιθανόλης και 0.5 mL οξικού αιθυλεστέρα (αναλογία μίγματος 1:1 v/v), αναδεύτηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 15000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε άλλες 2 φορές. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και προστέθηκε 1 mL 5M ουρίας (pH 2.3). Μετά την ανάδευση τα δείγματα και τα τυφλά επωάστηκαν στους 37 °C για 15 λεπτά. Τέλος έγινε φυγοκέντρηση στα 15000 g για 3 λεπτά στους 4°C και φωτομέτρηση στα 375 nm.

Η συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίστηκε σε nmol/mL ως εξής:

$$\text{Πρωτεϊνικά καρβονύλια} = A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \times 1000/50 \times 3 \times 2,$$

όπου:

- 1000/50 είναι ο συντελεστής αραιώσης, που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (100 μL) προς τον όγκο του δείγματος (50 μL) (1000/50). Πολλαπλασιάζουμε με 3 για να λάβουμε υπόψη την 1/3 αραιώση του δείγματος κατά την ομογενοποίηση του ιστού και με το 2 για να λάβουμε υπόψη την 1/2 αραιώση του δείγματος.
- 0.022 συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH ($22 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Καταλάση (CAT).

Η καταλάση (CAT) προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του Aebi, (1984). Σύμφωνα με το πρωτόκολο αυτό 2991 μL από 67 mM sodium potassium phosphate (pH 7.4) προστέθηκαν σε 40 μL ομογενοποιημένου τμήματος του ήπατος αραιωμένου 1/20 και τα δείγματα επωάστηκαν στους 37 °C για 10 min. Πέντε μL 30% υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) προστέθηκαν στα δείγματα και πραγματοποιήθηκε φωτομέτρηση στα 240 nm για 130 δευτερόλεπτα.

Η δραστηριότητα της καταλάσης υπολογίστηκε σε mmol/L/min ως εξής:

$$\text{CAT} = \Delta \text{Abs}_{\text{δείγματος}} \text{ per min} / 40) \times (75 \times 1000 \times 3 \times 20),$$

όπου:

- 75 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000 μL) με τον όγκο του δείγματος (40 μL) ($3000 / 40 = 75$). Πολλαπλασιάζουμε με 1000 για να μετατραπούν τα mmol/mL σε $\mu\text{mol/mL}$, με 3 για να λάβουμε υπόψη την 1/3 αραίωση του δείγματος κατά την ομογενοποίηση του ιστού και με το 20 για να λάβουμε υπόψη την 1/20 αραίωση του δείγματος.
- 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2
- $\Delta \text{Abs} (\text{min})$ = η μεταβολή της απορρόφησης σε ένα λεπτό. Η συγκέντρωση του H_2O_2 στην κυψελίδα είναι 16 Mm .

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC).

Ο προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) βασίστηκε στους Janaszewska & Bartosz (2002). Σαράντα μL ομογενοποιημένου τμήματος του ήπατος αραιωμένου 1/10 προστέθηκαν σε 480 μL από 10 mM sodium potassium phosphate (pH 7.4) και 500 μL από 0.1 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στο σκοτάδι για 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στα 20.000g στους 25 °C και φωτομετρήθηκαν στα 520 nm.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της TAC εκφράστηκαν ως η % μείωση της απορρόφησης (Abs) σε σχέση με το τυφλό,

$$\% \text{ Abs μείωση} = (\text{Abs τυφλού} - \text{Abs δείγματος}) / \text{Abs τυφλού} \times 100.$$

Κάθε μέτρηση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν την ίδια μέρα για την ελαχιστοποίηση σφαλμάτων. Οι τιμές των δεικτών υπολογίστηκαν σε σχέση με την ολική πρωτεΐνη του κάθε δείγματος. Όλα τα δείγματα διατηρούνταν στους -80 °C και η χρήση τους γινόταν μόνο πριν την ανάλυση.

Οι συντελεστές διακύμανσης (intra- and inter-assay coefficient of variation-CV) είναι οι εξής: 5.1% και 6.5% για την οξειδάση της ξανθίνης, 3.1% και 4.5% για τη GSH, 6.0% και 7.3% για τη GSSG, 3.9% και 5.9% για τα TBARS, 4.3% και 7.0%

για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, 6.2% και 10.0% για την καταλάση, 2.9% και 5.4% για την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, αντίστοιχα.

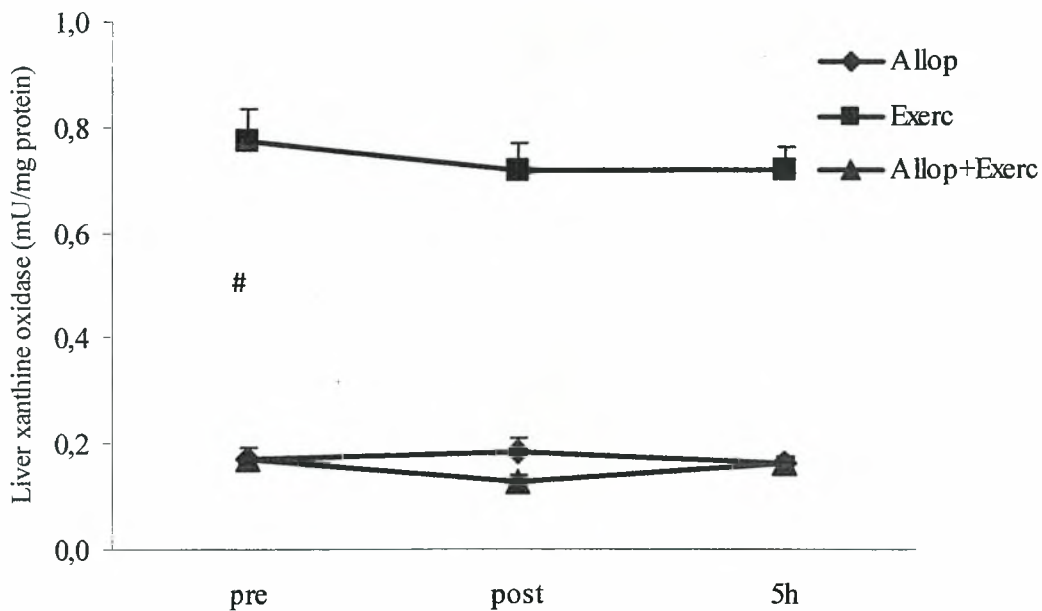
Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) δύο παραγόντων (χειρισμός × χρόνος). Ο παράγων χειρισμός είχε τα εξής 3 επίπεδα: 1. Ομάδα αλοπουρινόλης, 2. Ομάδα άσκησης, 3. Ομάδα αλοπουρινόλης και άσκησης. Ο παράγων χρόνος είχε τα εξής 3 επίπεδα: 1. Ομάδα που εξετάστηκε πριν την άσκηση, 2. Ομάδα που εξετάστηκε αμέσως μετά την άσκηση, 2. Ομάδα που εξετάστηκε 5 ώρες μετά την άσκηση. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας είχε οριστεί στο $\alpha = 0.05$. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με το πρόγραμμα SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οξειδάση της ξανθίνης

Από τις μετρήσεις της οξειδάσης της ξανθίνης βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης ($P < 0.05$). Η αλοπουρινόλη και ο συνδυασμός αλοπουρινόλης και άσκησης μείωσαν κατά 4 περίπου φορές τη δραστηριότητά της.

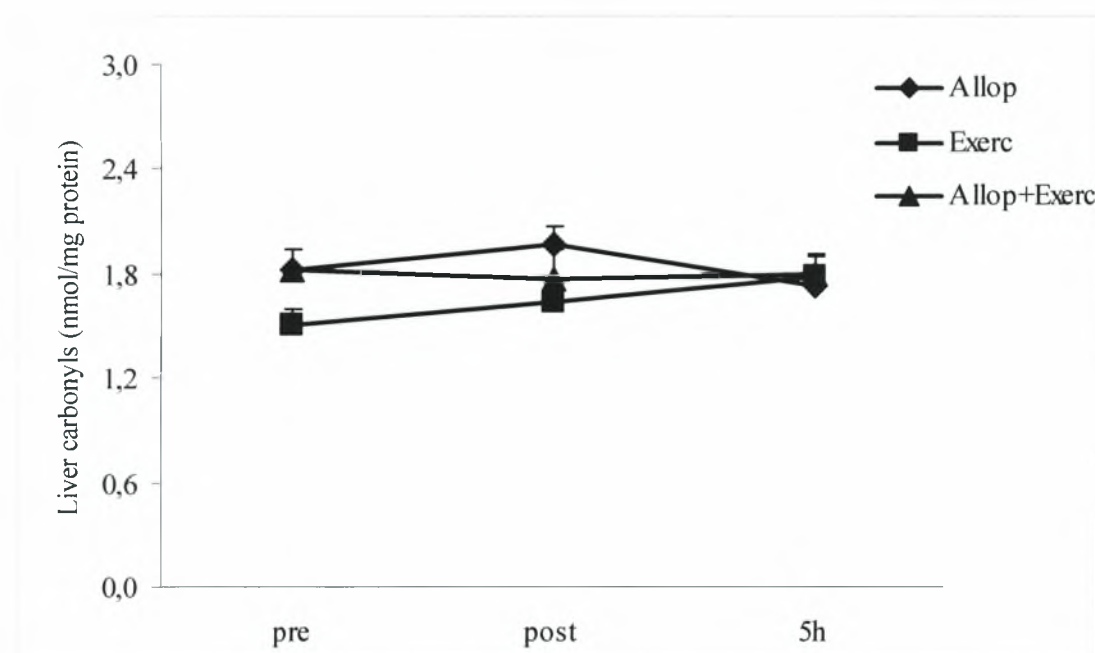


Σχήμα 2: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο ήπαρ επιμύων. # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και την αλοπουρινόλη κατά την ηρεμία ($P < 0.05$)

Δείκτες οξειδωτικής καταστροφής

Πρωτεϊνικά καρβονύλια

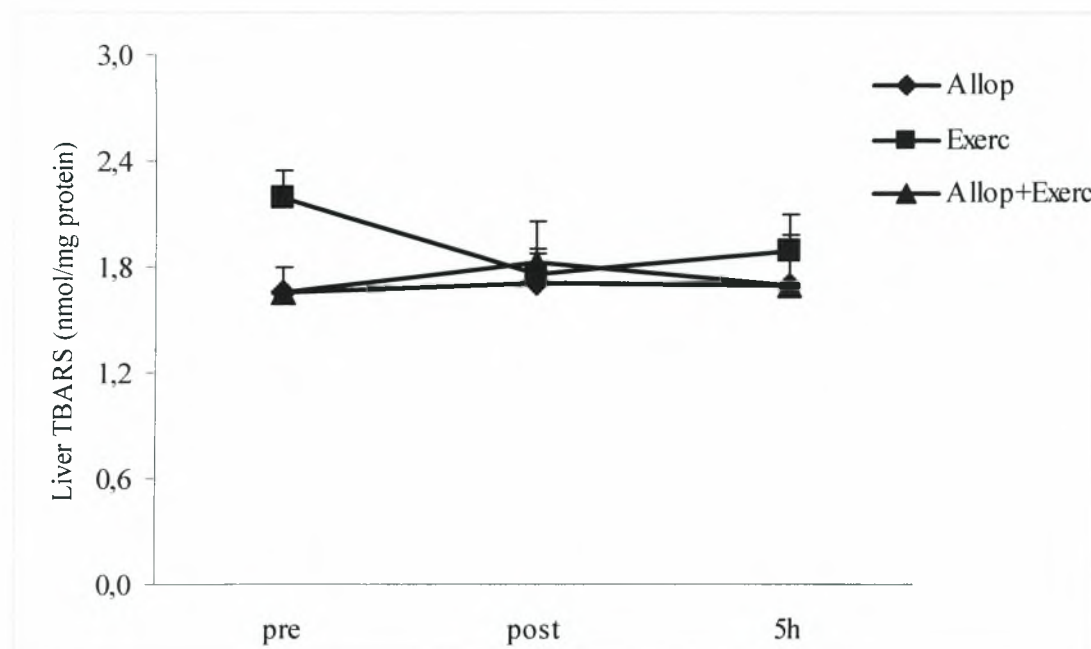
Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια δε βρέθηκε καμία επίδραση της χορήγησης αλοπουρινόλης και της άσκησης.



Σχήμα 3: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο ήπαρ επιμύων

Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Όπως στα πρωτεϊνικά καρβονύλια έτσι και στα TBARS δε βρέθηκε καμία επίδραση της χορήγησης αλοπουρινόλης και της άσκησης.

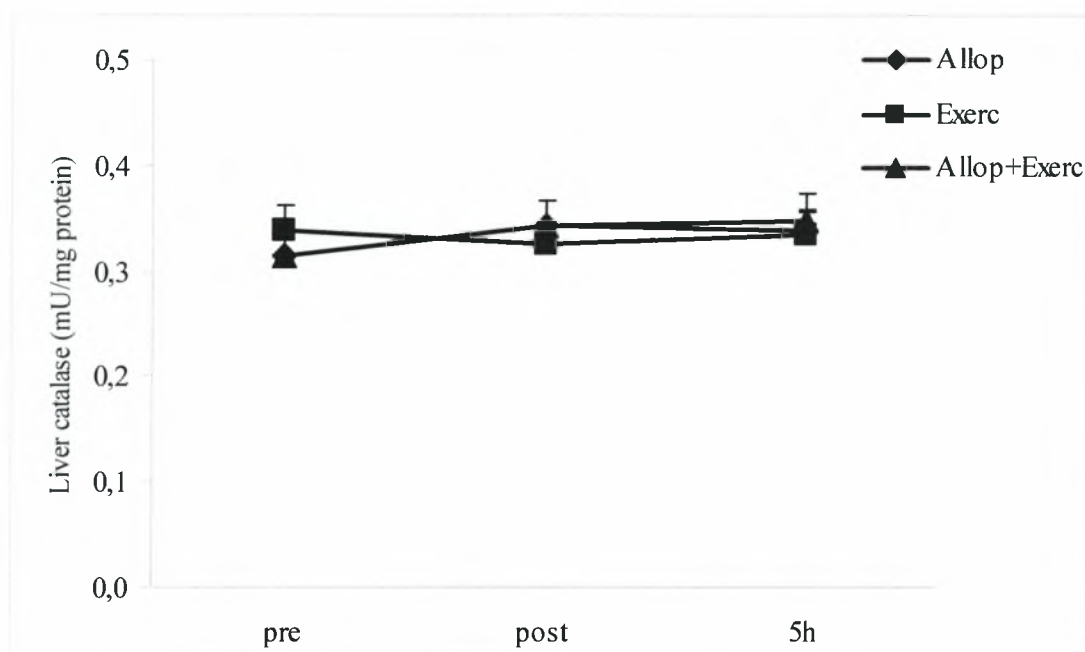


Σχήμα 4: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των TBARS στο ήπαρ επιμύων

Αντιοξειδωτικοί δείκτες

Καταλάση (CAT)

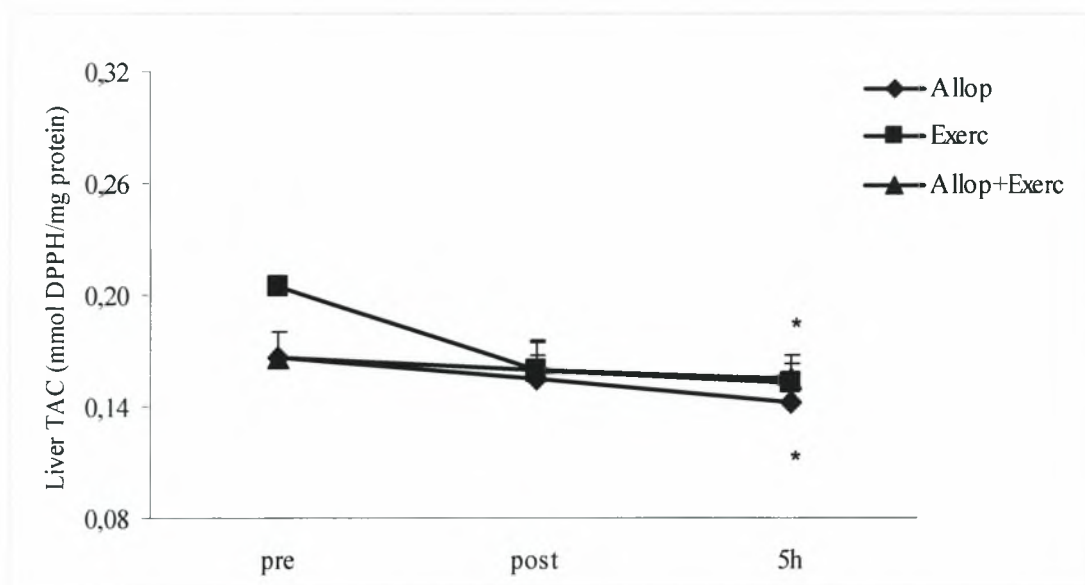
Η χορήγηση αλοπουρινόλης και η άσκηση δεν είχαν καμία επίδραση στη δραστηριότητα της καταλάσης.



Σχήμα 5: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη δραστηριότητα της καταλάσης στο ήπαρ επιμύων

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Στην TAC παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση του χρόνου αφού τόσο η αλοπουρινόλη όσο και η άσκηση προκάλεσαν μείωσή της ($P < 0.05$).

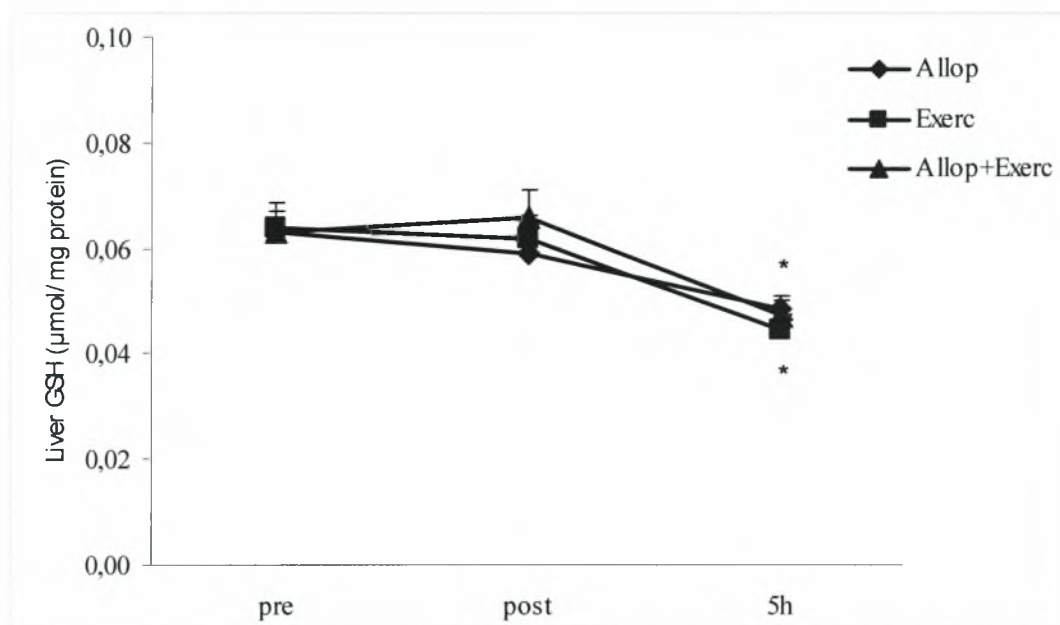


Σχήμα 6: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στην TAC στο ήπαρ επιμύων. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή pre στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$)

Γλουταθειόνες

Ανηγγμένη γλουταθειόνη (GSH)

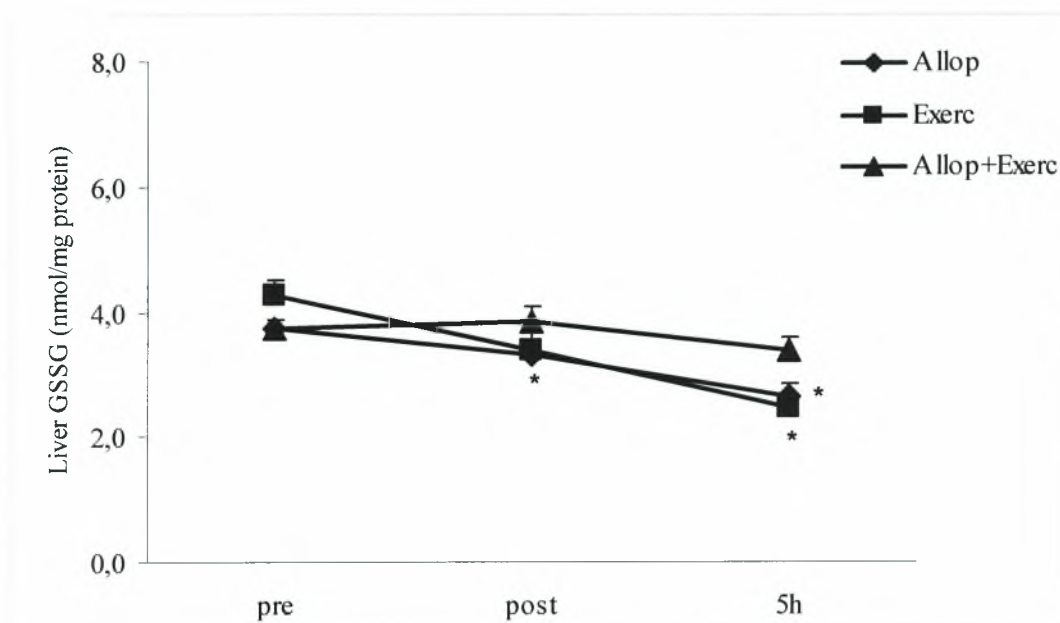
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η χορήγηση αλοπουρινόλης και η άσκηση μείωσαν τη συγκέντρωση της GSH ($P < 0.05$).



Σχήμα 7: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της GSH στο ήπαρ επιμύων. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή pre στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$)

Οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG)

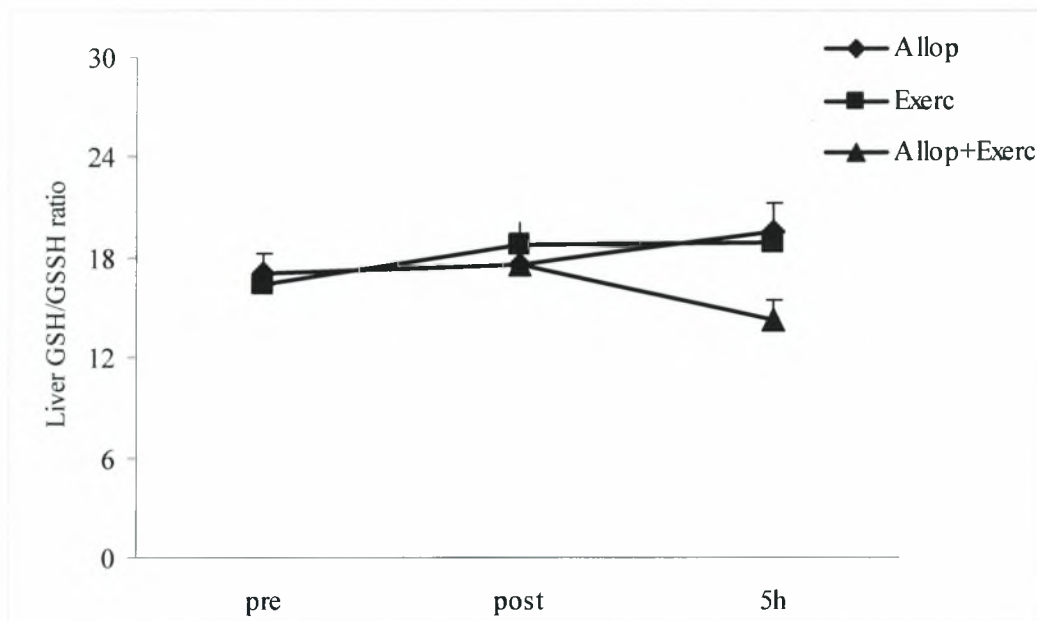
Στη συγκέντρωση της GSSG βρέθηκε επίσης κύρια επίδραση του χρόνου αλλά και του συνδυασμού χρόνου και παρέμβασης ($P < 0.05$). Τόσο η αλοπουρινόλη όσο και η άσκηση μείωσαν τη συγκέντρωση της GSSG.



Σχήμα 8: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της GSSG στο ήπαρ επιμύων. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή pre στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$)

Λόγος ανηγμένης προς οξειδωμένη γλουταθειόνη

Ο λόγος τους GSH/GSSG αποτελεί αξιόπιστο και συχνά μελετούμενο δείκτη οξειδωτικού στρες. Από τις μετρήσεις που έγιναν δεν παρατηρήθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου ή του συνδυασμού τους.



Σχήμα 9: Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο λόγο GSH/GSSG στο ήπαρ επιμύων

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η επίδραση της εξαντλητικής άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στην παραγωγή ελευθέρων ριζών στο ήπαρ επιμύων.

Οι επίμυες μελετήθηκαν κάτω από τρεις καταστάσεις: άσκηση, χορήγηση αλοπουρινόλης και το συνδυασμό τους. Η λήψη των δειγμάτων έγινε πριν, αμέσως μετά και 5h μετά την άσκηση και τις αντίστοιχες χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε ότι η εξαντλητική αερόβια άσκηση οδήγησε σε αύξηση του οξειδωτικού στρες στο ήπαρ των επιμύων, όπως φάνηκε από τη μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας και των συγκεντρώσεων της GSH και της GSSG. Αντιθέτως η άσκηση δεν επέφερε καμία μεταβολή στα πρωτεϊνικά καρβονύλια, τα TBARS και την καταλάση.

Σε προηγούμενες μελέτες αναφορικά με την επίδραση της άσκησης στο οξειδωτικό στρες, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα είδη άσκησης. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η κολύμβηση επειδή είναι μια μορφή άσκησης που προκαλεί περιορισμένο μυϊκό τραυματισμό (Komulainen, Takala, & Vihko, 1995). Έτσι, οι επιδράσεις του πρωτοκόλου στο οξειδωτικό στρες δεν αποδίδονται στο μυϊκό τραυματισμό αλλά κατά κύριο λόγο στην άσκηση.

Έχει παρατηρηθεί ότι η έντονη άσκηση προκαλεί παραγωγή ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια οξειδωτικό στρες (Tiidus, 1998). Διαπιστώθηκε ότι σκιέρ (Hubner-Wozniak, Panczenko-Kresowka, Lerczak, & Posnik, 1994) και δρομείς αποστάσεων (Rokitzki et al., 1994a) παρουσίασαν μειωμένα τα επίπεδα MDA μετά από εξαντλητική άσκηση, ενώ τα επίπεδα της TAC βρέθηκαν μειωμένα σε τριαθλητές (Palazzetti, Richard, & Favier, 2003).

Αύξηση του οξειδωτικού στρες στο ήπαρ επιμύων μετά από άσκηση σημειώνουν επίσης και οι ερευνητές Lang, Gohil, Packer, & Burk (1987), όπως και οι Bejma, Ramirez, & Ji (2000). Σε αντίθεση όμως με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, παρατηρήθηκε ότι η άσκηση προκαλεί αύξηση της GSSG (Lang et al., 1987) καθώς και αύξηση της MDA (Bejma et al., 2000) στο ήπαρ επιμύων. Σε συμφωνία με την παρούσα έρευνα, οι Koyama και συν. (1999), δεν παρατήρησαν καμία μεταβολή

στη συγκέντρωση των TBARS αμέσως μετά την άσκηση στο ήπαρ επιμύων οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε εξαντλητική άσκηση διάρκειας 40min σε δαπεδοεργόμετρο.

Η παραγωγή οξειδωτικού στρες με την άσκηση όμως παρατηρείται και σε άλλους ιστούς πλην του ήπατος. Έτσι ο Terblanche (2000), διαπίστωσε αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης στον καρδιακό μυ σε επίμυες μετά από κολύμβηση. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στη δραστηριότητα της καταλάσης στο ήπαρ των επιμύων.

Παραγωγή οξειδωτικού στρες στον καρδιακό μυ παρατήρησαν και οι Lin και συν. (2006). Οι ερευνητές αυτοί βρήκαν ότι υπήρξε αύξηση της οξειδάσης της ξανθίνης, της GSSG και του λόγου GSH/GSSG στον ιστό αυτό επίμυων, οι οποίοι έτρεξαν σε διάδρομο με ταχύτητα 30m/min, με VO_{2max} 70-75%. Τα αποτελέσματα αυτά δε συμφωνούν με την παρούσα έρευνα, καθώς διαπιστώθηκε ότι η GSSG μειώθηκε και ο λόγος GSH/GSSG παρέμεινε σταθερός ενώ σε μια πρόσφατη έρευνα (Veskoukis et al., 2008) ο λόγος GSH/GSSG μειώθηκε στα ερυθροκύτταρα επιμύων που υποβλήθηκαν σε κολύμβηση μέχρι εξάντλησης.

Στην έρευνα των Veskoukis και συν. (2008), αύξηση παρατηρήθηκε επίσης και στη συγκέντρωση των TBARS στο πλάσμα, στα ερυθροκύτταρα και στον γαστροκνήμιο επιμύων που ασκήθηκαν ενώ σε αυτή την έρευνα η συγκέντρωση παρέμεινε σταθερή.

Σε άλλη μελέτη που έγινε στον γαστροκνήμιο μυ επίμυων η άσκηση αύξησε τη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης και τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, τα οποία έμειναν αμετάβλητα στο ήπαρ (Gomez-Cabrera et al., 2005).

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο γαστροκνήμιο μυ επίμυων μετά από άσκηση μελετήθηκε και από τους Veskoukis και συν. (2008), και παρατηρήθηκε επίσης ότι υπήρξε αύξηση τους μετά το πέρας της άσκησης.

Σε μία μελέτη όπου ο τύπος της άσκησης ήταν το τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο χρησιμοποιήθηκαν άλογα, τα οποία υποβλήθηκαν σε άσκηση συνολικού χρόνου 23min και τους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη 12h και 2h πριν την άσκηση. Σε δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν 5min και 20min μετά το τέλος της άσκησης δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στη συγκέντρωση της GSH στα άλογα που τους είχε χορηγηθεί αλοπουρινόλη ενώ στα ίδια ζώα παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα της GSSG (Mills et al., 1997). Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν από τα ευρήματα της παρούσας εργασίας όσον αφορά τη συγκέντρωση της GSH η οποία μειώθηκε όπως και στην έρευνα των Veskoukis και συν. (2008), ενώ αντιθέτως η μείωση των

επιπέδων της GSSG που αναφέρεται από τους Mills και συν. (1997) παρατηρείται στην παρούσα εργασία αλλά και σε αυτή των Veskoukis και συν. (2008).

Οι Veskoukis και συν. (2008), αναφέρουν επιπλέον πως η αλοπουρινόλη αύξησε τη συγκέντρωση των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα ερυθροκύτταρα και στο πλάσμα των επιμύων ενώ στην παρούσα έρευνα η συγκέντρωση παρέμεινε σταθερή.

Η επίδραση της αλοπουρινόλης όμως σε συνάρτηση με την άσκηση μελετήθηκε και στον άνθρωπο. Έτσι διαπιστώθηκε ότι η χορήγηση αλοπουρινόλης σε ποδηλάτες υψηλού επιπέδου συμβάλει στη μείωση της MDA, η συγκέντρωση της οποίας στο αίμα αυξάνει κατά την άσκηση. Παράλληλα η αλοπουρινόλη φαίνεται να μειώνει τη μυϊκή καταστροφή που προκαλείται από την άσκηση, αφού διαπιστώθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις της κρεατινικής κινάσης και της αμινοτρανσφεράσης του ασπαραγινικού οξέος στο αίμα (Gomez-Cabrera et al., 2005).

Η λιπιδική υπεροξειδωση αυξήθηκε μετά από μαραθώνιο, όπως φάνηκε από την αυξημένη συγκέντρωση της MDA στο πλάσμα (Gomez-Cabrera et al., 2006). Η αύξηση της MDA όμως κατά την άσκηση στα άτομα στα οποία είχε χορηγηθεί αλοπουρινόλη περιορίστηκε (Gomez-Cabrera et al., 2006).

Στην παρούσα εργασία η αλοπουρινόλη και ο συνδυασμός αλοπουρινόλης και άσκησης μείωσαν σημαντικά (4 φορές) τη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης. Η επίδραση αυτή της αλοπουρινόλης ήταν αναμενόμενη αφού είναι ένας αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε πλήρη συμφωνία με τα δεδομένα προηγούμενων εργασιών (Gomez-Cabrera et al., 2005; Gomez-Cabrera et al., 2006; Koyama et al., 1999; Veskoukis et al. 2008).

Στη μείωση της δραστικότητας της οξειδάσης της ξανθίνης ίσως να οφείλεται εν μέρει η πτώση της TAC η οποία παρατηρήθηκε επίσης και στην εργασία των Veskoukis και συν. (2008), στο πλάσμα και στο γαστροκνύμιο μυ επιμύων μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Η TAC είναι ένας δείκτης που συναθροίζει τη δράση αντιοξειδωτικών ουσιών όπως του ουρικού οξέος, των βιταμινών E και C, του β-καροτένιο κ.ά.. Η μείωση της TAC ίσως να οφείλεται στην αναστολή παραγωγής του ουρικού οξέος λόγω της χορήγησης αλοπουρινόλης (Kaya et al., 2005; Stathis et al., 2005). Προφανώς όταν μειώνεται η TAC υπάρχουν αντιροποιστικοί μηχανισμοί που δεν επιτρέπουν τη δημιουργία οξειδωτικού στρες στο κύτταρο με αποτέλεσμα να μην

παρατηρείται καμία μεταβολή στα πρωτεϊνικά καρβονύλια, τα TBARS και την καταλάση.

Συμπερασματικά, η άσκηση προκάλεσε μεταβολές στην TAC και τις γλουταθειόνες του ήπατος, ενώ η αλοπουρινόλη δε φαίνεται να έχει αντιοξειδωτική δράση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aguilo, A., Tauler, P., Fuentespina, E., Tur, J.A., Cordova, A., Pons, A. (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology and Behaviour*, 4, 1-7.
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, 105, 121-126.
- Alessio, H.M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 25(2), 218-24.
- Ames, B.N., Catchcart, R., Schwiers, E. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(11), 6858-62.
- Antunes, F., Derick, H., Cadenas, E. (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in *in vivo* conditions. *Free Radic Biol Med*, 33, 1260-7.
- Azzi, A., Davies, K.J.A., Kelly, F. (2004). Free radical biology – terminology and critical thinking. *FEEBS Letters*, 558, 3-6.
- Bejma, J., Ramires, P., Ji, L.L. (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.
- Belboul, A., Roberts, D., Borjesson, R., Johnsson, J. (2001). Oxygen free radical generation in healthy blood donors and cardiac patients: the protective effect of allopurinol. *Perfusion*, 16, 59-65
- Bielski, B.H.J. & Cabelli, D.E. (1995). Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. In C.S. Foote, J.S. Valentine, A. Greenber, J.F. Liebman, (Eds.), *Active Oxygen in Chemistry (pp. 66-104.)* London: Chapman and Hall.

- Bloomer, R.J., Smith, W.A., Fisher-Wellman, K.H. (2007). Glycine propionyl-L-carnitine increases plasma nitrate/nitrite in resistance trained men. *J Inter Soc Sports Nutr*, 4, 22.
- Cazzola, R., Russo-Volpe, S., Cervato, G., Cestaro, B. (2003). Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *European Journal of Clinical Investigation*, 30, 924-930.
- Chevion, S., Moran, D.S., Heled, Y. (2003). Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci*, 100(9), 5119-23.
- Child, R.B., Wilkinson, D.M., Fallowfield, J.L., Donnelly, A.E. (1998). Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a stimulated half-marathon run. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 30, 1603-1607.
- Cooper, C.E., Vollaard, N.B.J., Choueiri, T., Wilson, M.T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 30, 280–285.
- Clarkson, P.M. & Thompson, H.S. (2000). Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 637-46.
- Das, K.C., Lewis-Molock, Y., White, C.W. (1997). Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17, 713-26.
- Davies, K.J.A., Quintanilha, A.T., Brooks, G.A., Packer, L. (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 107, 1198–1205.
- Deaton, C., Bennett, J.A., Riegel, B. (2004). State of the science for care of older adults with heart disease. *Nurs Clin North Am*, 39(3), 495-528

- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1102-15.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function *Physiological Reviews*, 82, 47-95.
- Duarte, J.A., Carvalho, F., Bastos, M.L., Soares, J.M., Appell, H.J. (1994). 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*, 68, 48-53.
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress: Relationship with exercise and training. *Sports Medicine*, 36, 327-358.
- Gey, K.F., Brubacher, G.B., Stahelin, H.B. (1987). Plasma levels of antioxidant vitamins in relation to ischemic heart disease and cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 45(suppl 5), 1368-77.
- Goldfarb, A.H. (1999). Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol*, 24(3), 249-66.
- Gomez-Cabrera, M.C., Pallardo, F.V., Sastre, J., Vina, J., Garcia-del-Moral, L. (2003). Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA*, 289, 2503-2504.
- Gomez-Cabrera, M.C., Borrás, C., Pallardo, F.V., Sastre, J., Ji, L.L., Vina, J. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol*, 567, 113-120.
- Gomez-Cabrera, M.C., Martinez, A., Santangelo, G., Pallardo, F.V., Sastre, J., Vina, J. (2006). Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr*, 96(suppl 1), 31-33.

- Gutteridge, J.M.C. (1995). Free radicals in disease processes: A complication of cause and consequence. *Free Radic Res Comm*, 19, 141- 158.
- Harrison, D.G. (1997). Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*, 100, 2153–2157.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford Univesrity Press, Midsomer Norton, Avon, England.
- Halliwell, B. & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142, 231–255.
- Hellsten, Y., Sjödin, B., Richter, E.A., Bangsbo, J. (1998). Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *American Journal of Physiology*, 274, 600-606.
- Heunks, L.M., Vina, J., van Herwaarden, C.L., Folgering, H.T., Gimeno, A., Dekhuijzen, P.N. (1999). Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol*, 277, 1697-1704.
- Hoey, B.M., Butler, J., Halliwell, B. (1988). On the specificity of allopurinol and oxypurinol as inhibitors of xanthine oxidase. A pulse radiolysis determination of rate constants for reaction of allopurinol and oxypurinol with hydroxyl radicals. *Free Radic Res Commun*, 4, 259-263.
- Hollander, J., Fiebig, R., Gore, M., Ookawara, T., Ohno, H., Ji, L.L. (2001). Superoxide dismutase gene expression is activated by a single bout of exercise in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch*, 442(3), 426-34.

- Hubner-Wozniak, E., Panczenko-Kresowka, B., Lerczak, K., Posnik, J. (1994). Effects of graded treadmill exercise on the activity of blood antioxidant enzymes, lipid peroxides and nonenzymatic anti-oxidants in long-distance skiers. *Biology of Sport*, 11(4), 217-226.
- Θεοδώρου, Α., Σακελλαρίου, Γ., Νικολαΐδης, Μ., Πασχάλης, Β., Φατούρος, Ι., Τζιαμούρτας, Ζ.Α. (2007). Η Επίδραση της Ασκησιογενούς Μυϊκής Καταστροφής σε Δείκτες Οξειδωτικού Στρες στο Αίμα και στο Μυ. *Αναζητήσεις στη Φυσική Αγωγή & τον Αθλητισμό*, 5(2), 294 – 301.
- Jackson, M.J. (1999). Free radicals in skin and muscle: damaging agents or signals for adaptation? *Proc Nutr Soc*, 58, 673-676.
- Janaszewska, A., Bartosz, G. (2002). Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest*, 62, 231-236.
- Jenkins, R. (1988). Free radical chemistry: Relationship to exercise. *Sport Med*, 5, 156-170.
- Ji, L.L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222, 283-292.
- Ilhan, N., Kamanli, A., Ozmerdivenli, R., Ilhan, N. (2004). Variable effects of exercise intensity on reduced glutathione, thiobarbituric acid reactive substance levels, and glucose concentration. *Archives of Medical Research*, 35, 294-300.
- Inal, M., Akyüz, F., Turgut, A., Getsfrid, W.M. (2001). Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc*, 33(4), 564-567.
- Kabasakalis, A., Kalitsis, K., Nikolaidis, M.G., Tsalis, G., Kouretas, D., Loupos, D., Mougios, V. (2008) Redox, iron, and nutritional status of children during swimming training. *J Sci Med Sport*, Epub ahead of print

- Kasai, H. (2002). Chemistry-based studies on oxidative DNA damage formation, repair, and mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(4), 450-6.
- Kaya, M., Moriwaki, Y., Ka, T., Inokuchi, T., Yamamoto, A., Takahashi, S. (2006). Plasma concentrations and urinary excretion of purine bases (uric acid, hypoxanthine, and xanthine) and oxypurinol after rigorous exercise. *Metabolism*, 55, 103-107.
- Keles, M.S., Taysi, S., Sen, N., Aksoy, H., Akcay, F. (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci*, 28, 141-143.
- Kohen, R. & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, 30(6), 620-50.
- Komulainen, J., Takala, T.E., Vihko, V. (1995). Does increased serum creatine kinase activity reflect exercise-induced muscle damage in rats? *Int. J. Sports Med*, 16, 150-154.
- Koren, H.S. (1995). Association between criteria air pollutants and asthma. *Environ Health Perspect*, 103, 235-242.
- Koska, J., Blazicek, P., Marko, M., Grna, J.D., Kvetnansky, R., Vigas, M. (2000). Insulin, catecholamines, glucose and antioxidant enzymes in oxidative damage during different loads in healthy humans. *Physiological Research*, 49, 95-100.
- Koyama, K., Kaya, M., Ishigaki, T., Tsujita, J., Hori, S., Seino, T., Kasugai, A. (1999). 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.

- Lang, J.K., 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.
- Lee, J., Goldfarb, A.H., Rescino, M.H., Hegde, S., Patrick, S., Apperson, K. (2002). Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 34, 443-448.
- Leeuwenburgh, C., Fiebig, R., Chandwaney, R. (1994). Aging and exercise training in skeletal muscle: Responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol*, 269, 439-445.
- Levine, R.L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9), 790-6.
- Lin, W.T., Yang, S.C., Tsai, S.C., Huang, C.C., Lee, N.Y. (2006). L-Arginine attenuates xanthine oxidase and myeloperoxidase activities in heart of rats during exhaustive exercise. *Br J Nutr*, 95(1), 67-75.
- Linnane, A.W., Zhang, C., Yarovaya, N. (2002). Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci*, 959, 396-411.
- Livrea, M.A., Tesoriere, L., Bongiorno, A. (1995). Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins. *Free Radic Biol Med*, 18(3), 401-9.
- May, J.M., Qu, Z., Whitesell, R.R. (1996). Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med*, 20(4), 543-51.
- Malm, C. (2001). Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. *Acta Physiol Scand*, 171, 233-9.

- Mastaloudis, A., Leonard, S.W., Traber, M.G. (2001), Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 31, 911-922.
- Matsakas, A., Friedel, A., Hertrampf, T., Diel, P. (2005). Short-term endurance training results in a muscle-specific decrease of myostatin mRNA content in the rat. *Acta Physiol Scand*, 183(3), 299-307.
- Maxwell, S.R., Jakeman, P., Thomason, H., Leguen, C., Thorpe, G.H. (1993). Changes in plasma antioxidant status during eccentric exercise and the effect of vitamin supplementation. *Free Radical Research Communications*, 19, 191-202.
- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem*, 243, 5753-5760.
- Mena, P., Maynar, M., Timon, J., Maynar, J.I., Campillo, J.E. (1991). Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. *International Journal of Sports Medicine*, 12, 563-566.
- Mills, P.C., Smith, N.C., Harris, R.C., Harris, P. (1997). Effect of allopurinol on the formation of reactive oxygen species during intense exercise in the horse. *Res Vet Sci*, 62, 11-16.
- Møller, P., Wallin, H., Knudsen, L.E. (1996). Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-Biological Instructions*, 102, 17-36.
- Moorhouse, P.C., Grootveld, M., Halliwell, B., Quinlan, J.G., Gutteridge, J.M. (1987). Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett*, 213, 23-28.
- Mougios, V. (2006). *Exercise Biochemistry*. Champaign, IL:McGraw Hill
- Murrant, C.L., Reid, M.B. (2001). Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. *Microsc Res Tech*, 55(4), 236-48.

- Mylonas, C. & Kouretas, D. (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*, 13, 295-309.
- Niess, A. (2005). *Generation and disposal of reactive oxygen and nitrogen species*, in F.C. Mooren & K. Volker (Eds). *Molecular and Cellular Exercise Physiology* (pp. 179-197). London: Human Kinetics.
- Nikolaidis, M.G., Jamurtas, A.Z., Paschalis, V., Fatouros, I.G., Koutedakis, Y., Kouretas, D. (2007a). The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med*, in press.
- Nikolaidis, M.G., Paschalis, V., Giakas, G., Fatouros, I.G., Koutedakis, Y., Kouretas, D., Jamurtas, A.Z. (2007b). Decreased blood oxidative stress after repeated muscle-damaging exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 39, 1080-1089.
- Ozbay, B. & Dulger, H. (2002), Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: relation to age, gender, exercise, and smoking. *Tohoku Journal Experimental Medicine*, 197, 119-124.
- Palazzetti, S., Richard, M.J., Favier, A. (2003). Overload training increases exercise-induced oxidative stress and damage. *Canadian Journal of Applied Physiology*, 28(4), 588-604.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N.T., Georgiou, C.D., Angelatou, F., Matsokis, N.A. (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett*, 357, 83-86.
- Packer, L. (1997). Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *Journal Sports Science*, 15, 353-363.

- Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63, 1035-42.
- Powers, S.K., Deruisseau, K.C., Quindry, J., Hamilton, K.L. (2004). Dietary antioxidants and exercise. *Journal of Sports Sciences*, 22, 81-94.
- Powers, S.K. & Lennon, S.L. (2000). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*, 58, 1025-33.
- Prajda, N. & Weber, G. (1975). Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett*, 59, 245-249.
- Radak, Z., Asano, K., Inoue, M., Kizaki, T., Oh-Ishi, S., Suzuki, K., Taniguchi, N., 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., Nakamoto, H., Ohno, H., Sasvari, M., Nyakas, C., Goto, S. (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 69-74.
- Ramel, A., Wanger, K.H., Elmadfa, I. (2004). Correlations between plasma noradrenaline concentrations, antioxidants, and neutrophil counts after submaximal resistance exercise in men. *British Journal Sports Medicine*, 38, 22- 24.
- Reddy, Y.N., Murthy, S.V., Krishna, D.R., Prabhakar, M.C. (2004). Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J. Tuberc*, 213-218.
- Reid, M.B., Haack, K.E., Franckek, K.M. (1992). Reactive oxygen in muscle I: intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol*, 73(5), 1797-1804.

- Reid, M.B., Khawli, F.A., Moody, M.R. (1993). Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *J Appl Physiol*, 75, 1081-1087.
- Rokitzki, L., Logemann, E., Sagredos, A.N., Murphy, M., Wetzel-Roth, W., Keul, J. (1994a). Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress. *Acta physiologica Scandinavica*, 151, 149-158.
- Sastre, J., Asensi, M., Gascó, E., Ferrero, J.A., Furukawa, T., Viña, J. (1992). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *American Journal of Physiology*, 263, 992-995.
- Sen, C.K. & Packer, L. (2000). Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr*, 72, 653-669.
- 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.
- Sies, H. (1991). *Oxidative Stress. Oxidants and Antioxidants*. New York: Elsevier. 507.
- Sinclair, A.J., Barnett, A.H., Lunec, J. (1990). Free radicals and antioxidant systems in health and disease. *British Journal of Hospital Medicine*, 43(5), 334-44.
- Slater, T.F. (1984). Free-radicals mechanisms in tissue injury. *Journal of Biochemistry*, 222, 1-15.
- Stathis, C.G., Carey, M.F., Snow, R.J. (2005). The influence of allopurinol on urinary purine loss after repeated sprint exercise in man. *Metabolism*, 54, 1269-1275.
- Steinberg, J.G., Delliaux, S., Jammes, Y. (2006). Reliability of different blood indices to explore the oxidative stress in response to maximal cycling and static exercises. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 26, 106-112.

- Szweda, P.A., Friguet, B., Szweda, L.I. (2002). Poteolysis, free radicals and aging. *Free Radic Biol Med*, 33, 29-36.
- Terblanche, S.E. (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.
- Tietze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*, 27, 502-522.
- Tiidus, P.M. (1998). Radical species in inflammation and overtraining. *Can J Physiol Pharmacol*, 76, 533-538.
- Urso, M.L. & Clarkson P.M. (2003). Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189, 41-54.
- Vasankari, T.J., Kujala, U.M., Vasankari, T.M. (1997). Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defenses. *Free Radic Biol Med*, 22(3), 509-13.
- Veskoukis, A.S., Nikolaidis, M.G., Kyparos, A., Kokkinos, D., Nepka, C., Barbanis, S., Kouretas, D. (2008). Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab.*, 33(6), 1140-54.
- Vider, J., Lehtmaa, J., Kullisaar, T., Vihalemm, T., Zilmer, K., Kairane, C., Landõr, A., Karu, T., Zilmer, M. (2001). Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology*, 7(4), 263-270.
- Victoria, K. (1994). Review of the genotoxicity of nitrogen oxides. *Mutat Res*, 317, 43-55.
- Vina, J., Gimeno, A., Sastre, J., Desco, C., Asensi, M., Pallardo, F.V., Cuesta, A., Ferrero, J.A., Terada, L.S., Repine, J.E. (2000). Mechanism of free radical

production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life*, 49, 539-544.

Vina, J., Gomez-Cabrera, M.C., Lloret, A., Marquez, R., Minana, J.B., Pallardo, F.V., Sastre, J. (2000). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life*, 50, 271-277.

Vollaard, N.B., Shearman, J.P., Cooper, C.E. (2005). Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance *Sports Medicine*, 35, 1045-1062.

Von Sonntag, C. (1987). *The Chemical Basis of radiation Biology*. (Eds.), Taylor & Francis, London.

Willcox, J.K., Catignani, G.L., Roberts, L.J. (2002). Dietary flavonoids fail to suppress F2 isoprostane formation in-vivo. *Free Radic Biol Med*, 34(7), 795-9.

Yanai, H. & Morimoto, M. (2004). Effect of ascorbate on serum lipids and urate metabolism during exhaustive training. *Clinical Science*, 106, 107-109.

Yu, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 74(1), 139-162.