ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΣΤΑΦΥΛΙ ΣΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΔΙΑΚΟ ΚΑΙ ΤΟΝ ΕΞΩ ΠΛΑΤΥ ΤΕΤΡΑΚΕΦΑΛΟ ΜΥ ΕΠΙΜΥΩΝ

Γκουτζουρέλας Νικόλαος

Λάρισα 2010

Τριμελής επιτροπή: Κουρέτας Δημήτριος

Λιαδάκη Καλλιόπη

Στάγκος Δημήτριος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ **ΣΕΛΙΔΑ**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ ΣΕΛΙΔΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ ΣΕΛΙΔΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτες έχουν δείξει ότι η εξαντλητική αερόβια άσκηση οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής ελευθέρων ριζών με αποτέλεσμα να προκαλείται οξειδωτικό στρες στον οργανισμό. Επίσης, προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας έδειξε ότι η αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης, του κύριου ενζύμου παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της άσκησης, προκαλεί οξειδωτικό στρες και μειώνει την απόδοση επιμύων. Σκοπός, λοιπόν, της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της επίδρασης ενός φυτικού εκχυλίσματος από σταφύλι Τυρνάβου, το οποίο αναστέλλει τη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης *in vitro*, στο οξειδωτικό στρες και την απόδοση επιμύων. Οι επίμυες έκαναν εξαντλητική αερόβια άσκηση και οι δείκτες που μετρήθηκαν ήταν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC), η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), η δραστικότητα της καταλάσης και της οξειδάσης της ξανθίνης (ΧΟ), οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβατβιτουρικό οξύ (TBARS) ως δείκτης λιπιδικής υπεροξείδωσης και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ως δείκτης οξείδωσης των πρωτεϊνών στον καρδιακό μυ και τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ μετά από την άσκηση και τη χορήγηση του εκχυλίσματος. Βρέθηκε ότι τόσο η άσκηση όσο και το εκχύλισμα προκάλεσαν οξειδωτικό στρες αλλά δεν επηρέασαν την απόδοση των επιμύων. Συμπερασματικά, μία συγκέντρωση φυτικού εκχυλίσματος που συχνά χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία προκαλεί οξειδωτικό στρες *in vivo* σε μικρότερο βαθμό όμως σχετικά με την προηγούμενη εργασία μας. Επίσης, το εκχύλισμα δεν ανέστειλε τη δραστικότητα της ΧΟ *in vivo*, λόγοι στους οποίους πιθανόν οφείλεται το γεγονός ότι δεν επηρεάστηκε η απόδοση. Περαιτέρω, λοιπόν, μελέτες χρειάζονται για τον καθορισμό της κατάλληλης συγκέντρωσης χορήγησης τέτοιου είδους αντιοξειδωτικών στη διατροφή αθλούμενων ή όχι ανθρώπων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελεύθερες ρίζες και δραστικά ήδη οξυγόνου

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

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

1.2 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

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

Ενδογενείς πηγές

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

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

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

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

$Fe^{3+} + O_2^{\bullet -} \rightarrow F^{2+} + O_2$

$F^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$

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

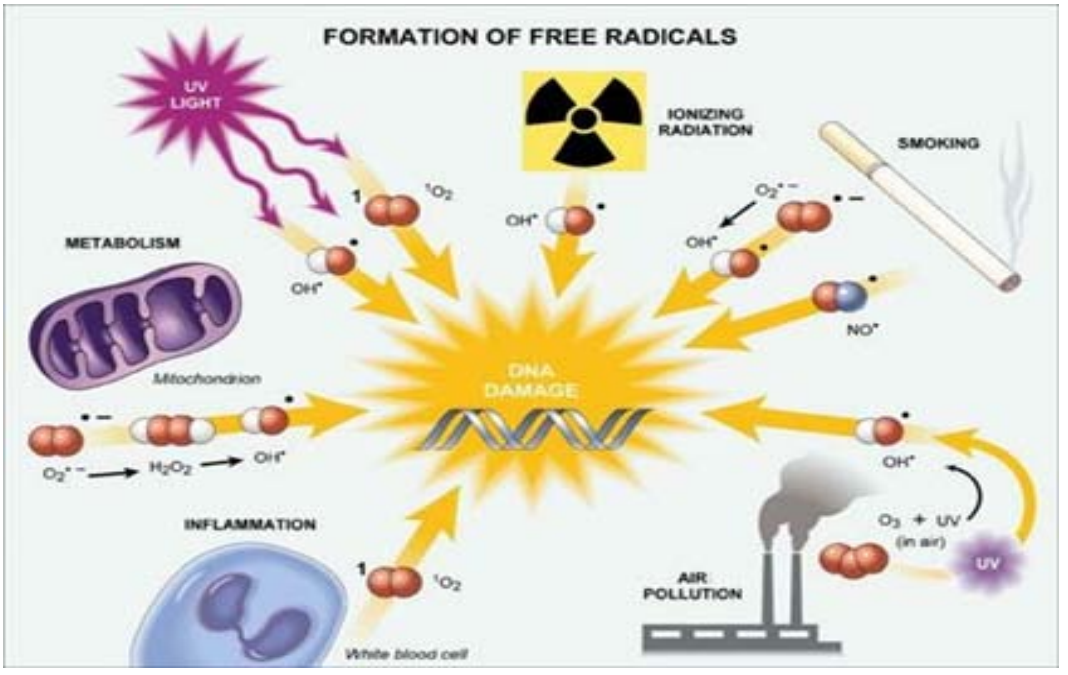
RH (ξενοβιοτικό) + O_2 + NADPH + H+ $\rightarrow$ROH + NADP+ +H_2O

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

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

Εξωγενείς πηγές

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



Εικόνα 1. Εξωγενείς και ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

1.3 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Θετικές

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

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

Αρνητικές

Η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών εμπλέκεται στη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Halliwell & Gutteridge, 1998), τη μυική καταστροφή (Nikolaidis et al., 2008) και την κόπωση (Betters et al., 2004). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το 2%-5% του μοριακού οξυγόνου (O_2) που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια σκελετικών μυών οδηγεί στην παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου στην ηρεμία (Sjodin et al., 1990). Εντούτοις, πιο πρόσφατα έχει δειχτεί ότι η διαρροή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια του καρδιακού μυός κυμαίνεται από 0,4% ως 0,8% (Hansford et al., 1997) ή ακόμα και σε 0,15% στο σκελετικό μυ (St-Pierre et al., 2002). Επιπλέον, όταν τα μιτοχόνδρια εργάζονται έντονα για την παραγωγή ATP από το ADP, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της άσκησης, το ποσό οξυγόνου που μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες μειώνεται περίπου στο ένα δέκατο του ποσοστού που παρατηρείται κατά την ηρεμία (Vina et al., 2000). Οι ελεύθερες ρίζες, επίσης, οξειδώνουν διάφορα βιομόρια όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, τις πρωτεΐνες και το DNA. Έχουν ακόμα συσχετιστεί και με διάφορες ασθένειες όπως του Parkinson, του Alzheimer, την κατάθλιψη και τη γήρανση (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Λιπίδια

Όσον αφορά τα λιπίδια, είναι ευαίσθητα σε οξείδωση. Καθώς όλες οι μεμβράνες, κυτταρικές και κυτταρικών οργανιδίων, αποτελούνται από λιπίδια μπορούν να υποστούν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Εδώ κυρίως προσβάλλονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ως δομικά συστατικά των μεμβρανών. Η

οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου $ROO^{\bullet}$, συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεΰδης (MDA). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητάς τους. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny, 2001).

Πρωτεΐνες

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

DNA

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

1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

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

στοιχεία και να βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες.

Α) Ενζυμικοί μηχανισμοί

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

<u>Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)</u>

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

$$2O_2^{\cdot -} + 2H \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O2$$

Το $O_2\cdot^-$ παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια και ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, ή οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυικά κύτταρα.

<u>Καταλάση (CAT)</u>

Η καταλάση βρίσκεται στα υπεροξειδιοσώματα. Αυτά παίζουν ρόλο στην αποτοξίνωση του κυττάρου χρησιμοποιώντας οξυγόνο και παράγοντας H_2O_2 (Antunes et al., 2002). Η καταλάση καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2.

$$2H_2O_2 \xrightarrow{CAT} 2H_2O + O$$

<u>Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)</u>

Είναι ένα ένζυμο που βρίσκεται στα μιτοχόνδρια, το κυτταρόπλασμα αλλά και τον εξωκυττάριο χώρο. Όπως και η καταλάση, έτσι και η GPX καταλύει την αντίδραση μετατροπής του H_2O_2 σε H_2O και O_2 χρησιμοποιώντας την ανηγμένη

γλουταθειόνη. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η γλουταθειόνη οξειδώνεται (Antunes et al., 2002).

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPX} 2\,H_2O + GSSG$$

Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)

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

Β) Μη ενζυμικοί μηχανισμοί

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

Βιταμίνη Ε

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

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

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

Β-καροτίνη

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

Ουρικό οξύ

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

Γλουταθειόνη

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

Συνένζυμο Q10

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

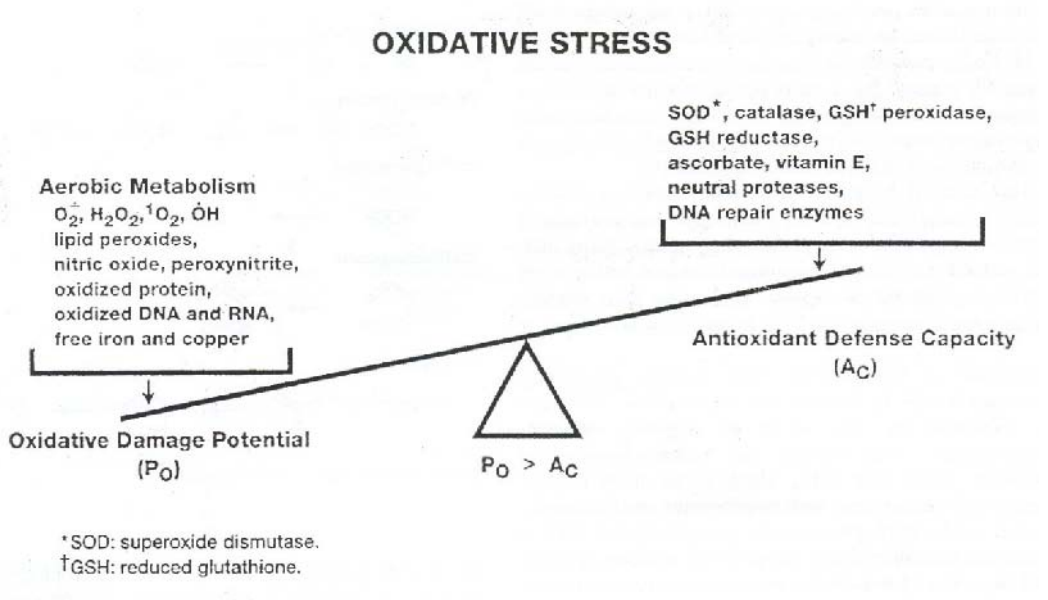
Σελήνιο

Είναι ένα απαραίτητο μέταλλο που συγκαταλέγεται στα ιχνοστοιχεία. Φαίνεται ότι βοηθά στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Λειτουργεί ως

συμπαράγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και με αυτό τον τρόπο συμμετέχει στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.5 Οξειδωτικό στρες

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



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες

Εμφάνιση οξειδωτικού στρες μπορεί να προκύψει εξαιτίας τόσο εξωγενών όσο και ενδογενών παραγόντων.

Α) Εξωγενείς παράγοντες:

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

Β) Ενδογενείς παράγοντες:

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

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

1.6 Άσκηση και οξειδωτικό στρες

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

Η πρώτη μελέτη που έδειξε αυτή τη σχέση μεταξύ άσκησης και οξειδωτικού στρες πραγματοποιήθηκε το 1982 (Davies et al., 1982). Στη συνέχεια υπήρξαν πολλές άλλες μελέτες, που συσχέτισαν την άσκηση με το οξειδωτικό στρες. Οι πιο πολλές έχουν μελετήσει την επίδραση της αερόβια άσκησης όπως τρέξιμο, κολύμπι και ποδηλασία (Alessio, 1993; Vasankari et al., 1997; Liu et al., 1999; Mastaloudis et al., 2001; Palmer et al., 2003; Ashton et al., 1998; Child et al., 2000; Lovlin et al., 1987; Aguilo et al., 2005, Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2006). Επιπλέον, έχει βρεθεί αυξημένη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, GPX) στο σκελετικό μυ, την καρδιά και το ήπαρ μετά από χρόνια άσκηση (Jenkins, 1988; Ji, 1999). Η αυξημένη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων λειτουργεί ως ένας μηχανισμός προσαρμογής και προστασίας από τις παραγόμενες κατά την άσκηση ελεύθερες ρίζες. Επίσης, βρέθηκε ότι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξάνονται στο πλάσμα και το γαστροκνήμιο μυ μετά από εξαντλητική άσκηση (Alessio et al., 1993; Gomez-Cabrera et al., 2005; Stadtman and Levine, 2000; You et al., 2005; Veskoukis et al., 2008). Η άσκηση αύξησε και τη λιπιδική υπεροξείδωση στο πλάσμα και το σκελετικό μυ, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες εργασίες (Ajmani et al., 2003; Alessio et

al., 1993; You et al., 2005). Η αερόβια άσκηση συνοδεύεται από υψηλή πρόσληψη οξυγόνου και αυτό αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Έτσι, οι παραπάνω μελέτες έδειξαν ότι αυξάνεται το οξειδωτικό στρες σε ανθρώπους και ζώα που πραγματοποίησαν έντονη άσκηση.

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

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

Μελέτες έχουν γίνει σε αθλητές διαφόρων αθλημάτων. Σε τριαθλητές μετά από αγώνα παρατηρήθηκε αύξηση ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) (Palazzetti et al., 2003). Σε κολυμβητές 800 μέτρων έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα καταλάσης είναι αυξημένα μετά την άσκηση (Inal et al., 2001). Άλλες μελέτες έδειξαν ότι ποδηλάτες μετά από αγώνα είχαν αυξημένα επίπεδα GSSG στο αίμα, μειωμένα επίπεδα GSH και μειωμένο λόγο GSH/GSSG (Aguilo et al., 2005). Συγκριτικές έρευνες όσο αφορά την ένταση της ποδηλασίας έδειξαν ότι ποδηλασία που έφτανε το 100% της VO_{2max} παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα ερυθροκύτταρα σε σχέση με ποδηλασία που έγινε σε ένταση 40% της VO_{2max} (Lovlin et al., 1987).

Όσον αφορά την αναερόβια άσκηση, πρόσφατες μελέτες σε επίμυες που εκτέλεσαν μια σειρά από σπριντς μέτρησαν αυξημένο οξειδωτικό στρες σε σκελετικούς μύες καθώς και στο ήπαρ. Παρατηρήθηκε, επίσης, αύξηση των TBARS στους μύες αλλά όχι στο ήπαρ (Kayatekin et al., 2002). Σε ανθρώπους είχε γίνει μια

μελέτη όπου εθελοντές πραγματοποίησαν μια ισοτονική άσκηση αντοχής και παρατηρήθηκε αύξηση στην MDA του αίματος (McBride et al., 1998).

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

1.7 Πηγές παραγωγής ROS κατά την άσκηση

Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων

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

Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Κατά την αναερόβια άσκηση παρατηρείται το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (ischemia-reperfusion), όπου ενεργοποιείται το μονοπάτι της οξειδάσης της ξανθίνης. Λόγω της άμεσης ενέργειας που χρειάζεται ο οργανισμός το ATP διασπάται σε ADP και αυτό μετά σε AMP. Τότε, η αφυδρογονάση της ξανθίνης οξειδώνει το AMP σε υποξανθίνη. Μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης, η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Τα επίπεδα της οξειδάσης της ξανθίνης και υποξανθίνης τόσο στο πλάσμα όσο και σε ιστούς αυξάνονται μετά από αναερόβια άσκηση (Radak et al., 1996; Vina et al., 2000). Η δράση του ενζύμου

αυτού οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 (McCord & Fridovich, 1968). Κάτω από αερόβιες συνθήκες το ATP αναπληρώνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ γίνεται μέσω της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης και όχι μέσω της οξειδωμένης της μορφής (XO) (Ji, 1999).

Φλεγμονώδης αντίδραση

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

Δράση των κατεχολαμινών

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

Υπεροξειδιοσώματα

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

1.8 Άσκηση και χορήγηση εκχυλίσματος

Στη συγκεκριμένη εργασία χορηγήθηκε στους επίμυες εκχύλισμα από σταφύλι και μελετήθηκε η επίδρασή του στο οξειδωτικό στρες σε ηρεμία αλλά και μετά από έντονη αερόβια άσκηση. Το εκχύλισμα αυτό δεν έχει γνωστή σύσταση αλλά έχει αντιοξειδωτική και προοξειδωτική δράση *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε στο εργαστήριό μας ότι το εκχύλισμα αυτό αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες DPPH και ABTS, αναστέλλει την επιβλαβή δράση των ριζών περοξυλίου και υδροξυλίου στο DNA αλλά αναστέλλει και τα ένζυμα οξειδάση της ξανθίνης, καταλάση και υπεροξειδική δισμουτάση. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές εργασίες, στις οποίες έχουν μελετηθεί οι επιδράσεις ανάλογων εκχυλισμάτων σε δείκτες οξειδωτικού στρες. Αυτές οι εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί σε πειραματόζωα αλλά και σε ανθρώπους.

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

Έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα εκχυλίσματα που έχουν αντιοξειδωτική δράση. Ένα από αυτά είναι το εκχύλισμα από το φυτό *Rhodiola rosea*, που ζει στις ψυχρές περιοχές της γης, όπως αρκτική, βουνά της κεντρικής Ασίας, Άλπεις, και Σκανδιναβία. Σε μία εργασία, είχαμε χορήγηση 2-4 εβδομάδες σε επίμυες και κολύμβηση για 90min με 5% επιπρόσθετο σωματικό βάρος. Με την άσκηση

αυξήθηκε η δραστικότητα της κιτρικής συνθάσης και τα επίπεδα του γλυκογόνου στο ήπαρ. Όσον αφορά την άσκηση παρατηρήθηκε αυξημένος χρόνος κολύμβησης και μειωμένη κόπωση (Lee et al., 2009). Χορήγηση του ίδιου εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε 2 φορές την ημέρα σε δόση 100mg εκχυλίσματος για 4 εβδομάδες σε κωπηλάτες. Παρατηρήθηκε αρκετά αυξημένη TAC και μειωμένη δραστικότητα SOD μέχρι και 24 ώρες μετά την άσκηση (Skarpanska-Stejnborn et al., 2008).

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

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

Τέλος, θα αναφερθούμε σε άλλες δύο εργασίες που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπους. Στην εργασία των Skarpanska-Stejnborn et al., 2008 έχουμε χορήγηση εκχυλίσματος από αγγινάρα 3 φορές την ημέρα σε συγκέντρωση 400mg για 5 εβδομάδες σε κωπηλάτες. Παρατηρήθηκε αυξημένη TAC. Επίσης, στην εργασία των Lyall et al., 2009 έχουμε χορήγηση εκχυλίσματος μαύρης σταφίδας σε ανθρώπους και

κυτταρικά μοντέλα και μελέτη οξειδωτικού στρες που προκαλείται από άσκηση. Παρατηρήθηκε μείωση των πρωτεινικών καρβονυλίων.

Γενικά, στη βιβλιογραφία υπάρχουν αρκετές μελέτες που συσχετίζουν τη χορήγηση εκχυλισμάτων με την άσκηση και το οξειδωτικό στρες. Τα περισσότερα πειράματα έγιναν σε επίμυες που πραγματοποίησαν έντονη άσκηση. Τα αποτελέσματα δεν ήταν πάντα προς την ίδια κατεύθυνση καθώς τα εκχυλίσματα άλλοτε προκάλεσαν οξειδωτικό στρες και άλλοτε είχαν αντιοξειδωτική δράση. Συνήθως, η χορήγηση γινόταν στοματικά σε καθημερινή βάση για κάποιο χρονικό διάστημα και μετά οι επίμυες πραγματοποιούσαν το πρωτόκολλο άσκησης. Στη συγκεκριμένη μελέτη η χορήγηση του εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε ενδοπεριτοναϊκά μόνο μια φορά, πριν την άσκηση.

ΣΚΟΠΟΣ

Σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης στο οξειδωτικό στρες και την αθλητική απόδοση (Veskoukis et al., 2008). Η οξειδάση της ξανθίνης είναι το κύριο ένζυμο παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της άσκησης (Gomez-Cabrera et al., 2005). Έτσι, χορηγήθηκε σε επίμυες αλοπουρινόλη, ένας γνωστός αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης και μετά υποβλήθηκαν σε εξαντλητική κολύμβηση. Οι μελέτες που εξετάζουν το ρόλο της αλοπουρινόλης ενάντια στο προκαλούμενο από άσκηση οξειδωτικό στρες είναι σχετικά λίγες (Gomez-Cabrera et al., 2005, 2006, 2003, Koyama et al., 1999). Έχει βρεθεί ότι η χορήγηση αλοπουρινόλης αναστέλλει τη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης, η οποία αυξάνεται με την άσκηση στους επίμυες μετά από τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο (Gomez-Cabrera et al., 2005 Koyama et al., 1999) και στον άνθρωπο μετά από το μαραθώνιο (Gomez-Cabrera et al., 2006) και ποδηλασία (Gomez-Cabrera et al., 2003). Η αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης στις εργασίες αυτές είχε αντιοξειωτική δράση ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση στην απόδοση.

Στο εργαστήριό μας, όμως, βρέθηκε ότι η προκαλούμενη από την αλοπουρινόλη αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης προκαλεί οξειδωτικό στρες στο πλάσμα, τα ερυθροκύτταρα και το γαστροκνήμιο μυ όπως φάνηκε από σχετικούς δείκτες που μετρήθηκαν. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μία μεγάλη πτώση της απόδοσης σε ποσοστό 35% (Veskoukis et al., 2008).

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

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πειραματόζωα

Σαράντα ένηβοι αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar, ηλικίας 9 εβδομάδων και βάρους 285 ± 5g (mean ± SEM) αποκτήθηκαν από το ελληνικό ινστιτούτο Paster, στην Αθήνα. Οι επίμυες ζούσαν κάτω από ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (12ώρες φως/12ώρες σκοτάδι στους 20°C) σε κλουβιά των τριών. Είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό. Οι επίμυες μελετήθηκαν πριν και μετά την άσκηση μετά από χορήγηση φυσιολογικού ορού ή φυτικού εκχυλίσματος από σταφύλι. Πιο συγκεκριμένα, οι 4 πειραματικές ομάδες καθεμία εκ των οποίων αποτελούνταν από 10 επίμυες ήταν οι παρακάτω: α) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και θανατώθηκαν 1 ώρα μετά, β) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός, έκαναν άσκηση 1 ώρα μετά και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση, γ) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε το εκχύλισμα και θανατώθηκαν 1 ώρα μετά και δ) επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε το εκχύλισμα, έκαναν άσκηση 1 ώρα μετά και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση. Το εκχύλισμα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε μία δόση των 300mg·kg^{-1} σωματικού βάρους 1 ώρα πριν την άσκηση.

Εξοικίωση των επιμύων στην κολύμβηση

Οι επίμυες έμειναν στο χώρο του πειράματος για 7 μέρες μετά την άφιξή τους. Τις πρώτες 5 μέρες εξοικειώθηκαν με το νερό και πιο συγκεκριμένα την πρώτη ημέρα έμειναν στη δεξαμενή για 10 λεπτά χωρίς βάρος στη βάση της ουράς τους. Τις επόμενες 2 μέρες οι επίμυες κολύμπησαν για 10 λεπτά με βάρος που αντιστοιχούσε στο 1% του σωματικού τους βάρους και τις δύο τελευταίες μέρες το βάρος αυξήθηκε στο 2%. Τελικά, οι επίμυες ξεκουράστηκαν για 3 μέρες πριν πραγματοποιηθεί το πρωτόκολο κολύμβησης.

Πρωτόκολο κολύμβησης

Οι επίμυες ασκήθηκαν ο καθένας μόνος του μέχρι εξάντλησης σε δεξαμενή με διάμετρο 1m, βάθος 0,7m και θερμοκρασία νερού 33-36^{o}C. Ένα μόνιμο βάρος που αντιστοιχούσε στο 4% του σωματικού βάρους κάθε επίμυος προσαρμόστηκε στη βάση της ουράς τους για να εξασφαλιστεί ότι οι επίμυες θα ασκούνταν συνεχόμενα. Οι επίμυες παρακολοθούνταν συνεχώς και θεωρούνταν ότι έφταναν στην εξάντληση

όταν δεν μπορούσαν να διατηρήσουν για αρκετή ώρα τη μύτη τους έξω από το νερό. Το κολύμπι επιλέχθηκε επειδή είναι ένα είδος άσκησης, που σε αντίθεση με το τρέξιμο προκαλεί πολύ μικρή μυική καταστροφή (Komulainen et al., 1995). Έτσι, η επίδραση της άσκησης στο οξειδωτικό στρες δεν ήταν αποτέλεσμα της μυικής καταστροφής αλλά της ίδιας της άσκησης (Nikolaidis et al., 2008).

Συλλογή ιστών και δείκτες που μετρήθηκαν

Οι επίμυες θανατώθηκαν με αποκεφαλισμό μετά από μικρή έκθεση σε αιθέρα. Οι ιστοί συλλέχθηκαν χειρουργικά και πάγωσαν αμέσως σε υγρό άζωτο. Η ομογενοποίηση των ιστών έγινε με γουδί και γουδοχέρι με τη χρήση υγρού αζώτου σε PBS σε αναλογία με τον ιστό 2/1 και προστέθηκε ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών (1μmol/L απροτινίνη, 1μg/ml λιουπεπτίνη, 1mmol/L PMSF). Το ομογενοποίημα αναδεύτηκε έντονα και ακολούθησε χρήση υπερήχων και φυγοκεντρήθηκε στα 12000g για 30min στους 4^{o}C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Μετρήθηκαν φωτομετρικά η δραστικότητα της καταλάσης και της οξειδάσης της ξανθίνης, η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης, των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) στον καρδιακό και τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ.

Στατιστική ανάλυση

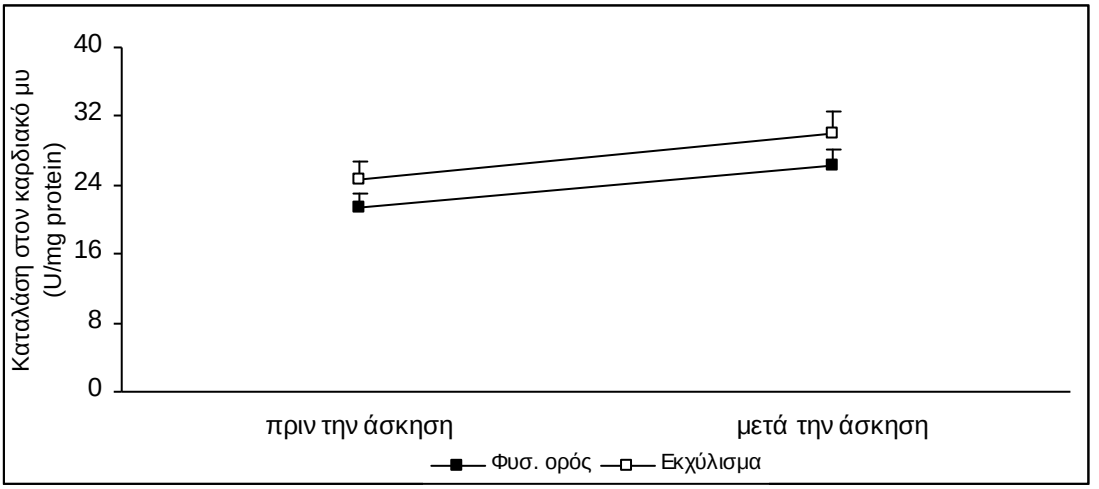
Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (παρέμβαση × χρόνος) (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν με bonferroni t-test. Για τα δεδομένα της απόδοσης χρησιμοποιήθηκε t-test για ανεξάρτητα δείγματα. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0,05$. Για όλες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

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α) Καρδιακός μυς

1. Καταλάση

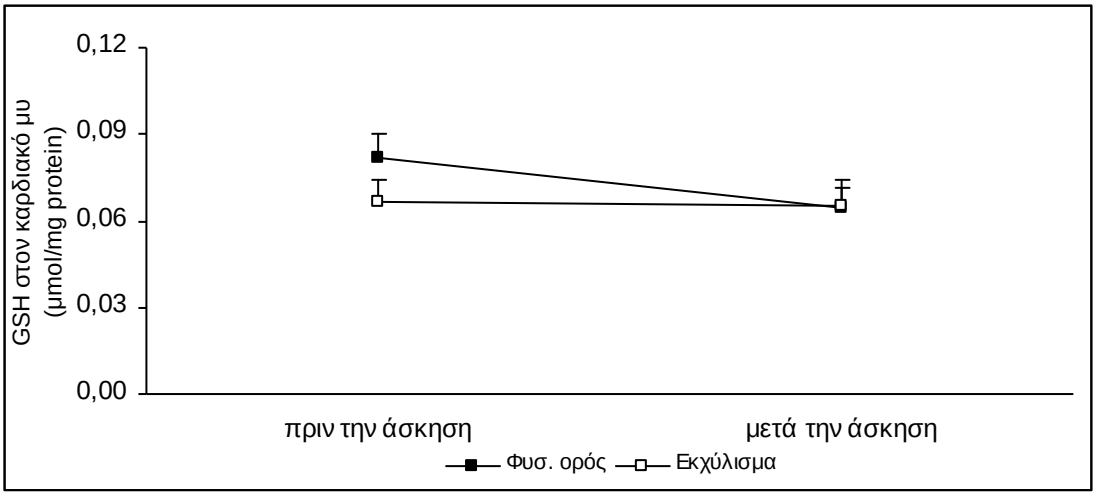
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η δραστικότητα της καταλάσης αυξήθηκε μετά την άσκηση ανεξάρτητα από τη χορήγηση φυσιολογικού ορού ή εκχυλίσματος**.**



Διάγραμμα 1. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη δραστικότητα της καταλάσης στον καρδιακό μυ.

2. Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)

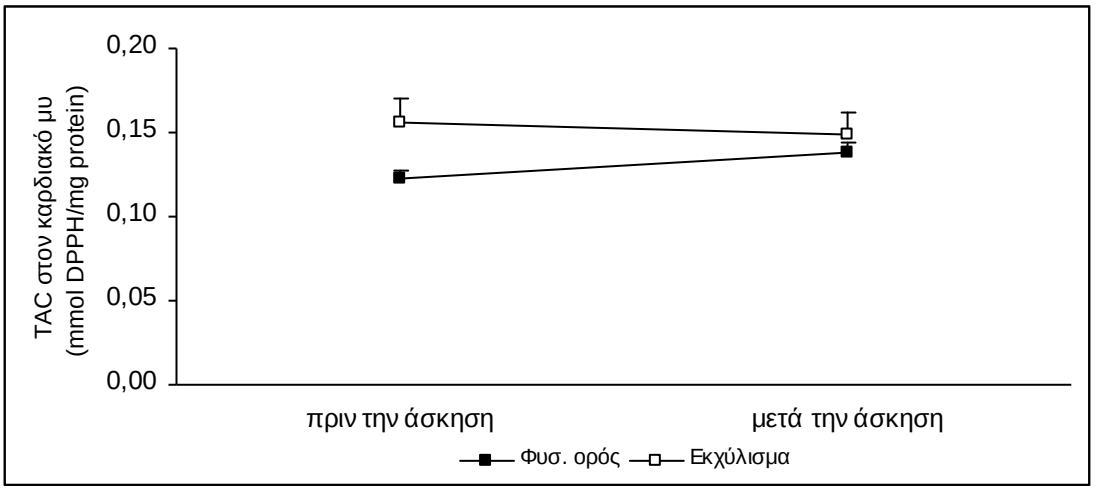
Δε βρέθηκε καμία επίδραση.



Διάγραμμα 2. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης στον καρδιακό μυ.

3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

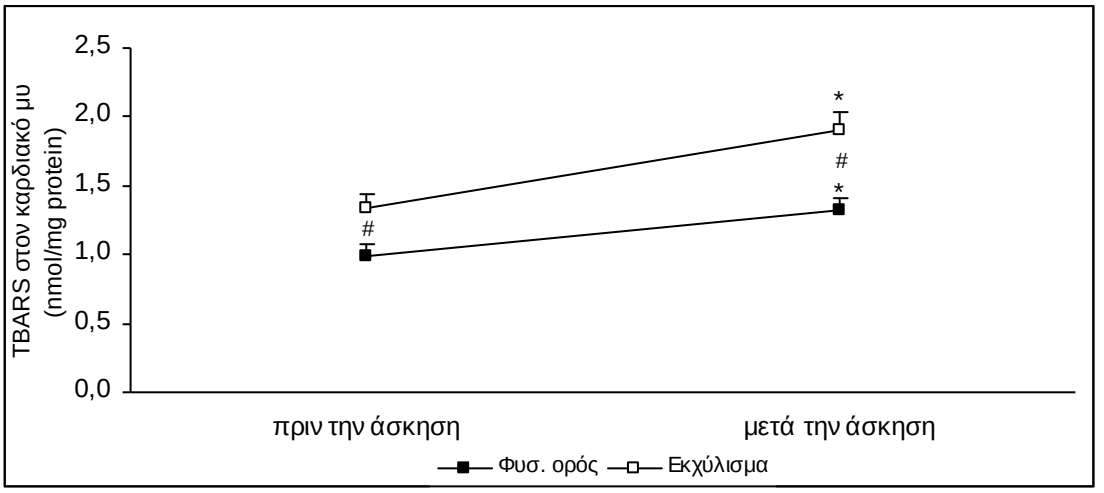
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης. Η TAC ήταν αυξημένη στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα σε σχέση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός.



Διάγραμμα 3. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στην TAC στον καρδιακό μυ.

4. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

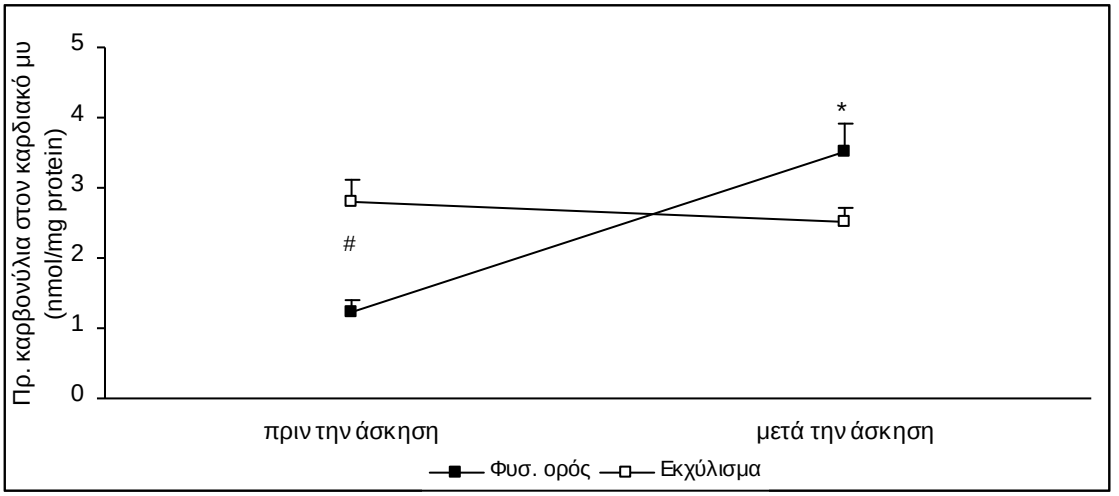
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και της παρέμβασης. Η συγκέντρωση των TBARS αυξήθηκε μετά την άσκηση και στις δύο ομάδες. Επίσης, ήταν αυξημένα στην ομάδα στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα σε σχέση με την άλλη ομάδα.



Διάγραμμα 4. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των TBARS στον καρδιακό μυ. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0,05$). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ($P < 0,05$).

5. Πρωτεϊνικά καρβονύλια

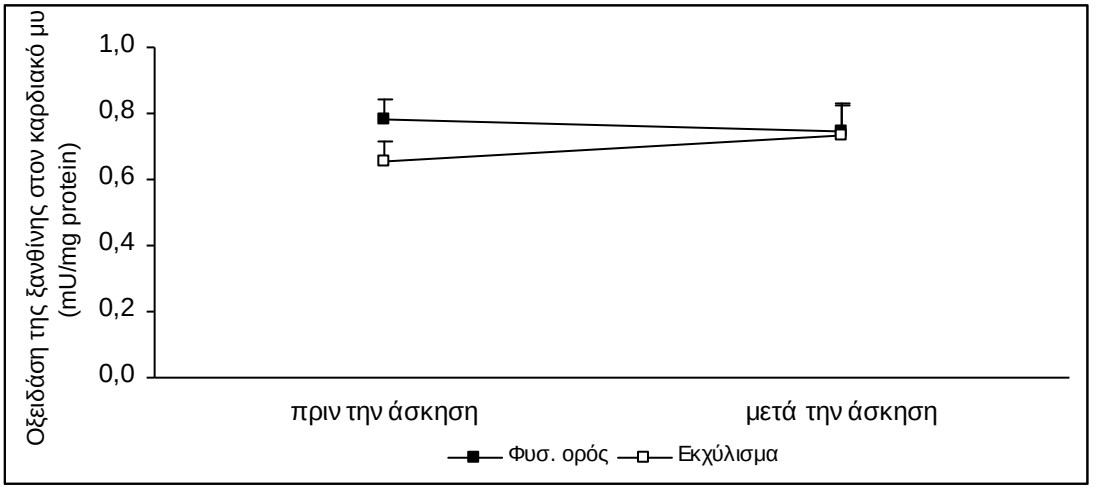
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και επίδραση του συνδυασμού χρόνου και παρέμβασης. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός αυξήθηκε μετά την άσκηση ενώ ήταν μειωμένη στην ηρεμία στην ομάδα που χορηγήθηκε το εκχύλισμα σε σύγκριση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός.



Διάγραμμα 5. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον καρδιακό μυ. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0,05$). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ($P < 0,05$).

6. Οξειδάση της ξανθίνης

Δε βρέθηκε καμία επίδραση.

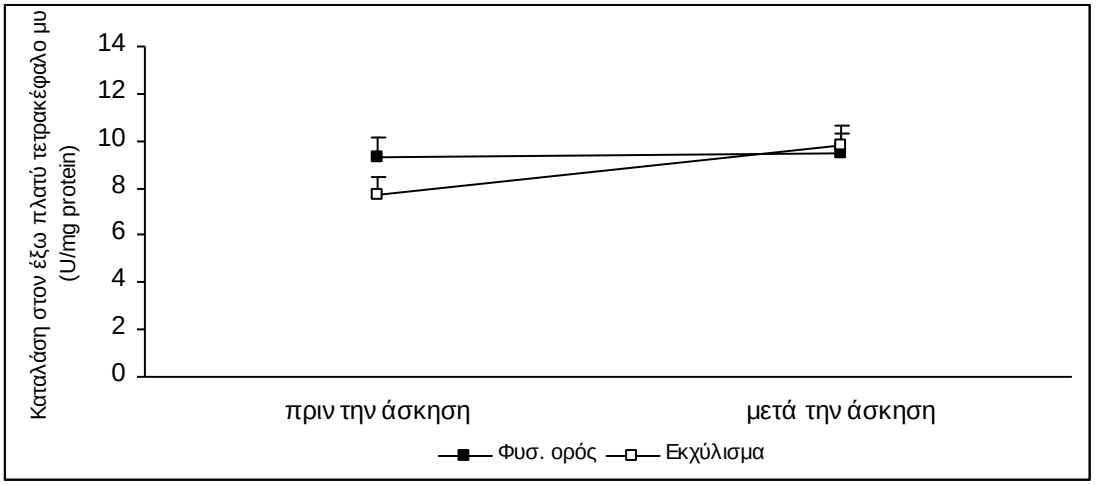


Διάγραμμα 6. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στον καρδιακό μυ.

Β) Έξω πλατύς τετρακέφαλος μυς

1. Καταλάση

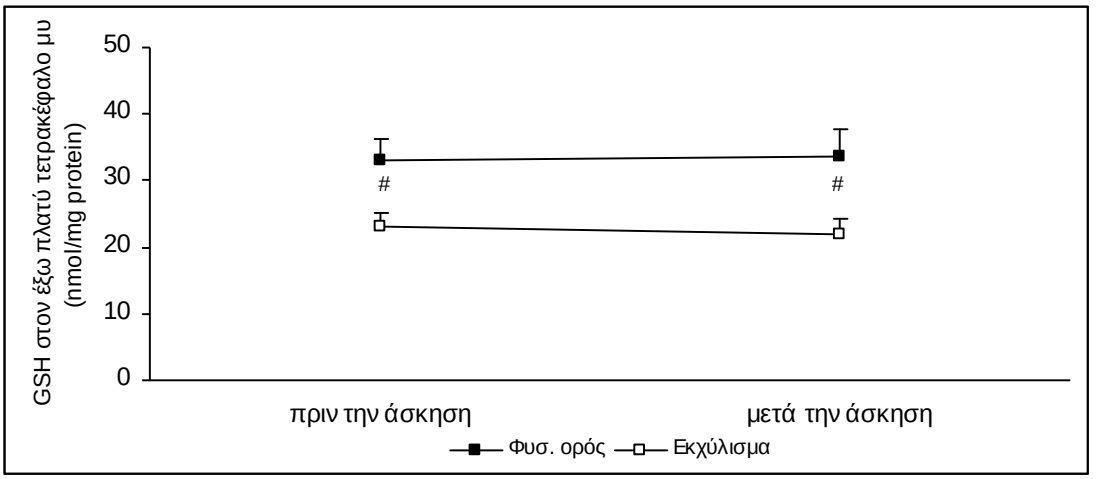
Δε βρέθηκε καμία επίδραση.



Διάγραμμα 7. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη δραστικότητα της καταλάσης στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ.

2. Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)

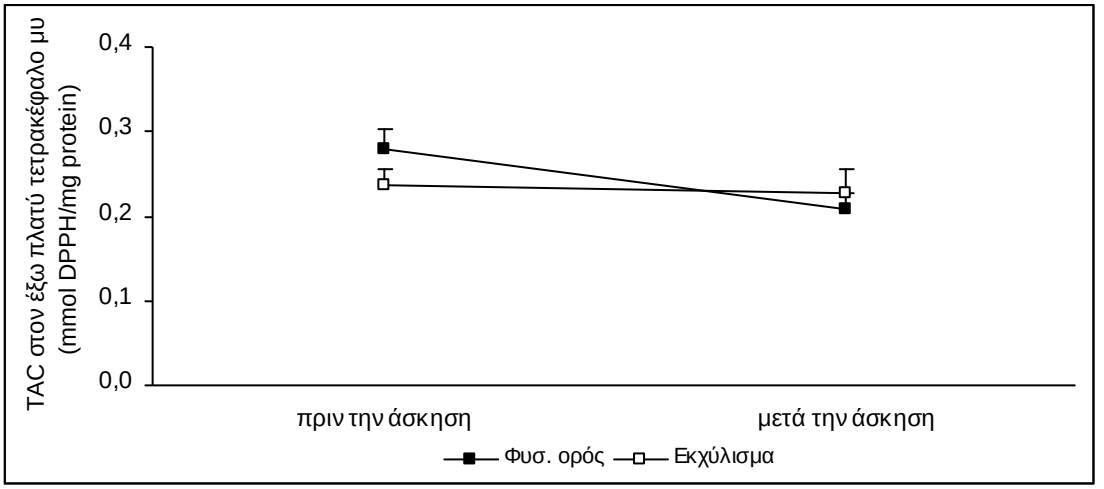
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης. Η συγκέντρωση της GSH ήταν μειωμένη στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα σε σχέση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα, τόσο στην ηρεμία όσο και μετά την άσκηση.



Διάγραμμα 8. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της GSH στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ. # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ($P < 0,05$).

3. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

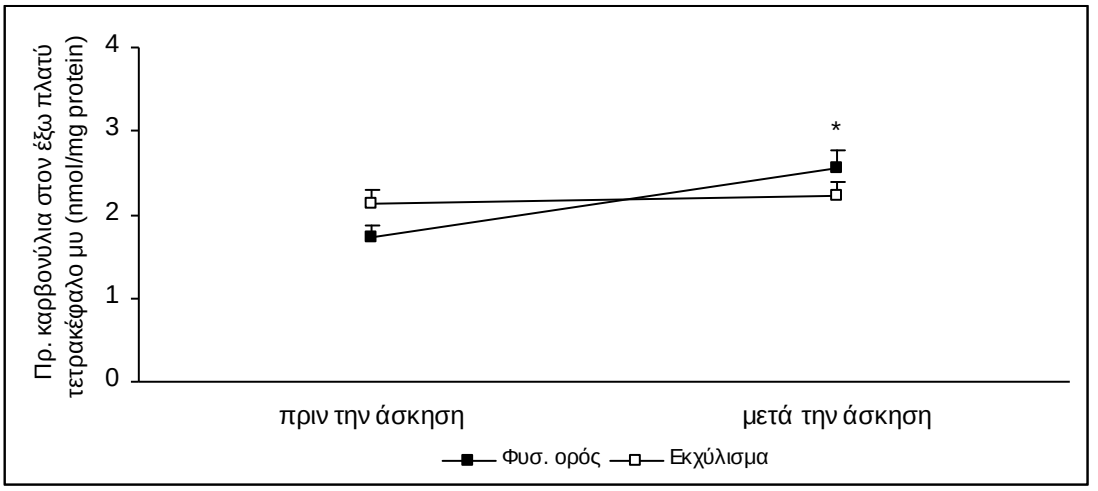
Δε βρέθηκε καμία επίδραση.



Διάγραμμα 9. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στην TAC στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ.

4. Πρωτεϊνικά καρβονύλια

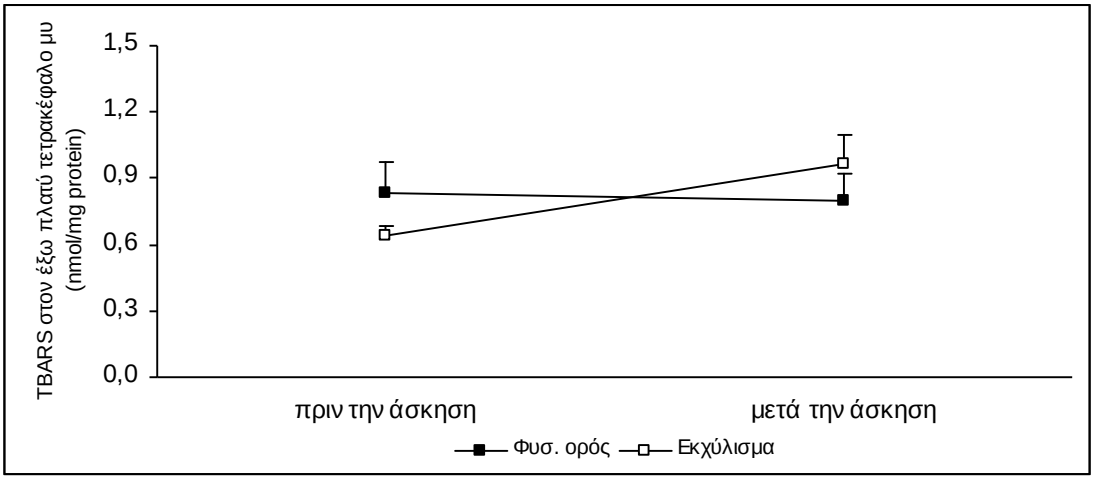
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η άσκηση αύξησε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός.



Διάγραμμα 10. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0,05$).

5. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

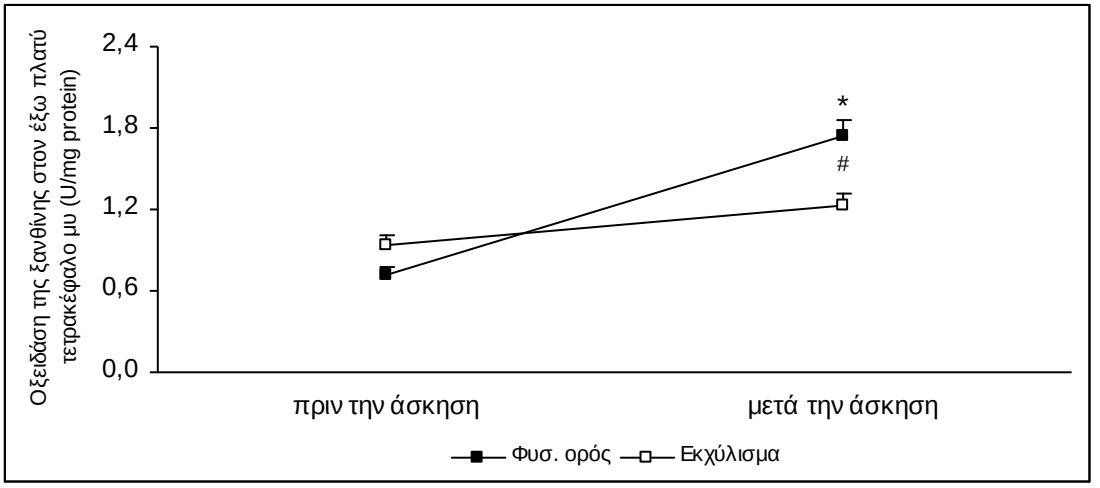
Δε βρέθηκε καμία επίδραση.



Διάγραμμα 11. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των TBARS στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ.

6. Οξειδάση της ξανθίνης

Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και επίδραση του συνδυασμού χρόνου και παρέμβασης. Η δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης αυξήθηκε μετά την άσκηση στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός.



Διάγραμμα 12. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης του εκχυλίσματος στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στον στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0,05$). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα, στην ίδια χρονική στιγμή ($P < 0,05$).

Γ) Αθλητική απόδοση

Η απόδοση μελετήθηκε συνολικά σε 20 επίμυες. Στους 10 χορηγήθηκε το εκχύλισμα και στους άλλους 10 φυσιολογικός ορός. Ο χρόνος που χρειάστηκαν για να φτάσουν ως την εξάντληση ήταν 45,1 ± 1,4min και 46,1 ± 2,0min, αντίστοιχα. Συμπερασματικά, το εκχύλισμα δεν επηρέασε την αθλητική απόδοση των επιμύων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η επίδραση της άσκησης, της χορήγησης ενός φυτικού εκχυλίσματος από σταφύλι και ο συνδυασμός τους στο οξειδωτικό στρες και την απόδοση. Παρατηρήθηκε ότι η εξαντλητική αερόβια άσκηση οδήγησε σε οξειδωτικό στρες στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ και το μυοκάρδιο των επιμύων. Το αποτέλεσμα φαίνεται από την αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης, της συγκέντρωσης των TBARS και των καρβονυλίων στον καρδιακό μυ αλλά και από την αύξηση της συγκέντρωσης των καρβονυλίων στον τετρακέφαλο μυ αμέσως μετά από την άσκηση. Η άσκηση δεν επηρέασε τη συγκέντρωση της GSH, την TAC και τη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στον καρδιακό μυ. Επίσης, δεν επηρέασε τη δραστικότητα της καταλάσης, την TAC και τη συγκέντρωση των TBARS στον τετρακέφαλο μυ. Όσον αφορά το εκχύλισμα, προκάλεσε οξειδωτικό στρες στον καρδιακό μυ όπως φάνηκε από την αύξηση της δραστικότητας της καταλάσης και τη συγκέντρωση των TBARS. Επίσης, το οξειδωτικό στρες στην ηρεμία ήταν αυξημένο στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα όπως φάνηκε από τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, τα TBARS, την καταλάση και την TAC. Στον έξω πλατύ τετρακέφαλο με ο οξειδωτικό στρες ήταν αυξημένο όπως φάνηκε από τη μειωμένη συγκέντρωση της GSH τόσο στην ηρεμία όσο και μετά την άσκηση.

Σε προηγούμενες εργασίες έχουν εφαρμοστεί διάφορα μοντέλα άσκησης. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησημοποιήθηκε η κολύμβηση. Αυτό γιατί η κολύμβηση δεν προκαλεί μυικό τραυματισμό (Komulainen et al., 1995). Έτσι, αποφεύγεται το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τον τραυματισμό και παρουσιάζεται μόνο το οξειδωτικό στρες που οφείλεται αποκλειστικά στην άσκηση. Η αερόβια άσκηση συνοδεύεται από αυξημένη πρόσληψη οξυγόνου, η οποία αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την αερόβια άσκηση σχετίζεται με τη διαφυγή ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα (Groussard et al., 2003).

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι η άσκηση επάγει το οξειδωτικό στρες, όπως φάνηκε από την αύξηση των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο αίμα (Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2006). Σε μια μελέτη που έγινε στον γαστροκνήμιο μυ επίμυων η άσκηση αύξησε τη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Gomez-Cabrera et al., 2005). Σε μια άλλη μελέτη σε κολυμβητές η δραστικότητα της καταλάσης του

πλάσματος βρέθηκε αυξημένη (Inal et al., 2001).

Σε εργασίες όπου χορηγήθηκαν διάφορα εκχυλίσματα παρατηρήθηκαν διάφορες επιδράσεις. Σε εργασίες που χορηγήθηκε εκχύλισμα Panax ginseng και πραγματοποιήθηκε έντονη αερόβια άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο και παρατηρήθηκε μείωση της MDA αλλά βρέθηκε και σημαντικά αυξημένη δραστικότητα της CAT και της SOD (Kim et al., 2005). Σε άλλη εργασία όπου χορηγήθηκε στοματικά G115 για τρεις μήνες παρατηρήθηκε μείωση των TBARS και αυξημένη δραστικότητα της SOD αλλά και αύξηση της ολική αντιοξειδωτικής ικανότητας του ήπατος (Voses et al., 1999). Σε μια εργασία όπου μελετήθηκε η χορήγηση εκχυλίσματος Rhodiola rosea σε κωπηλάτες βρέθηκε αρκετά αυξημένη η TAC και μειωμένη η δραστικότητα της SOD μέχρι και 24 ώρες μετά την άσκηση (Skarpanska-Stejnborn et al., 2009).

Όσον αφορά την συγκεκριμένη εργασία, βρέθηκε ότι η δραστικότητα της καταλάσης δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση εκχυλίσματος αλλά και στις δύο περιπτώσεις αυξήθηκε μετά από την άσκηση στον καρδιακό μυ. Αντίθετα, στον τετρακέφαλο μυ δεν υπήρξε σημαντική διαφορά σε καμία περίπτωση. Στην ανηγμένη γλουταθειόνη δεν βρέθηκε καμία επίδραση του εκχυλίσματος ή της άσκησης στον καρδιακό μυ. Στον τετρακέφαλο μυ όμως η ανηγμένη γλουταθειόνη παρουσίασε μειωμένη συγκέντρωση στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα σε σχέση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός τόσο στην ηρεμία όσο και μετά την άσκηση. Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του καρδιακού μυός φαίνεται ότι επηρεάστηκε από την χορήγηση του εκχυλίσματος καθώς ήταν αυξημένη στην ομάδα που χορηγήθηκε και δεν επηρεάστηκε από την άσκηση. Κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρήθηκε στον τετρακέφαλο μυ. Στα TBARS βρέθηκε επίδραση και του εκχυλίσματος αλλά και της άσκησης στον καρδιακό μυ. Έτσι και στις δύο ομάδες αυξήθηκαν μετά την άσκηση οι TBARS αλλά στην ομάδα που χορηγήθηκε το εκχύλισμα η αύξηση ήταν μεγαλύτερη. Ωστόσο δεν βρέθηκε καμία επίδραση στον τετρακέφαλο μυ. Στα πρωτεϊνικά καρβονύλια στον καρδιακό μυ βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και επίδραση του συνδυασμού χρόνου και παρέμβασης. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός αυξήθηκε μετά την άσκηση ενώ ήταν μειωμένη στην ηρεμία σε σύγκριση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Στον τετρακέφαλο μυ όμως η άσκηση αύξησε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην ομάδα που χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Τέλος όσον αφορά

την οξειδάση της ξανθίνης ενώ στον καρδιακό μυ δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά, στον τετρακέφαλο μυ βρέθηκε ότι η δραστικότητά της αυξήθηκε στους επίμυες που έκαναν άσκηση αλλά χωρίς τη χορήγηση εκχυλίσματος.

Στην εργασία αυτή μετρήθηκε, επίσης, η απόδοση των επιμύων μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος. Όπως είχε βρεθεί σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας (Veskoukis et al., 2008), η χορήγηση αλοπουρινόλης, ενός χημικού αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης μείωσε την απόδοση των επιμύων. Το εκχύλισμα, παρόλο που *in vitro* αναστέλλει την οξειδάση της ξανθίνης (Spanou et al., 2010 under review), δεν προκάλεσε αναστολή της και *in vivo*. Αυτός ίσως να είναι ένας πολύ σημαντικό λόγος που η απόδοση των επιμύων δεν επηρεάστηκε από τη χορήγησή του σε αυτό το πείραμα.

Όπως φαίνεται παραπάνω οι διάφοροι δείκτες οξειδωτικού στρες επηρεάστηκαν διαφορετικά στον καρδιακό και στον τετρακέφαλο μυ. Αυτό οφείλεται πιθανόν στις διαφορετικές λειτουργείες που επιτελούν οι δυο αυτοί μύες αλλά και στη διαφορετική συγκέντρωση και λειτουργία των δεικτών σε κάθε μυ. Γενικά όμως παρατηρήθηκε αυξημένο οξειδωτικό στρες και στους δύο μύες μετά την άσκηση άσχετα αν χορηγήθηκε το εκχύλισμα ή όχι. Επίσης, η χορήγηση εκχυλίσματος αύξησε τη συγκέντρωση κάποιων δεικτών οξειδωτικού στρες ανεξάρτητα από την άσκηση.

Συμπερασματικά, το εκχύλισμα σταφυλιού Τυρνάβου που χορηγήθηκε προκάλεσε οξειδωτικό στρες σε μία συγκέντρωση που χρησιμοποιείται συχνά στη βιβλιογραφία σε ανάλογες μελέτες. Ωστόσο, δεν επηρέασε την απόδοση των επιμύων γεγονός που πιθανόν να οφείλεται αφενός στις μειωμένες επιδράσεις του στους δείκτες σχετικά με την αλοπουρινόλη, και αφετέρου στο ότι δεν ανέστειλε την οξειδάση της ξανθίνης στον καρδιακό και τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Πρωτόκολα δεικτών οξειδωτικού στρες

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Ο υπολογισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszewska and Bartosz (2002). Σαράντα μL ιστού, αραιωμένα 1/10 για το σκελετικό και 1/5 για τον καρδιακό μυ, προστέθηκαν σε 460μL ρυθμιστικού διαλύματος 10mM (pH 7.4) και 500μL της ελεύθερης ρίζας DPPH και τα δείγματα επωάστηκαν στο σκοτάδι για 60min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 20.000g και μετρήθηκε η απορρόφησή τους 520nm.

Υπολογισμοί

μmol DPPH που απομακρύνθηκαν / mL ιστού = [(% Abs μείωση / 100) * 50 * 25 * 3 * 10] / 1000

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

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50μmol/L.

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 25 διότι η αραίωση του δείγματος στην κυψελίδα είναι 1/25 (1000 μL / 40 μL δείγματος = 25).

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

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

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

Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο:
mmol DPPH / mg total prot.

Καταλάση

Η δραστικότητα της καταλάσης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον Aebi (1984). Συνοπτικά, 40μL ιστού αραιωμένου 1/2 τόσο για το γαστροκνήμιο όσο και για τον καρδιακό μυ προστέθηκαν σε 2955μL ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 7.4) και τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C για 10min. Πέντε μL υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% προστέθηκαν και η μεταβολή της απορρόφησης στα 240nm μετρήθηκε για 130sec.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα της καταλάσης (U/mg total protein) = (ΔAbssample per min / 40) * (75 * 1000 * 3 * 2) / Conc. Protein (mg/mL)

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H_2O_2 πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 75 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000μL) με τον όγκο του δείγματος (40μL) (3000/40=75). Πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν 1/3 και με 2 λαμβάνοντας υπόψη την 1/2 αραίωση του δείγματος κατά τη μέτρηση. Η απορρόφηση του τυφλού είναι μηδενική και γι' αυτό δε χρειάζεται να μετρηθεί.

Πρωτεϊνικά καρβονύλια

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

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = Absδείγματος – Abstυφλού / 0.022 * 1000/50 * 3 * 2.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM · cm^{-1}. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000μL στην κυψελίδα / 50μL δείγματος). Πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν 1/3 και με 2 λαμβάνοντας υπόψη την 1/2 αραίωση του δείγματος κατά τη μέτρηση. Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο: Συγκέντρωση πρ. καρβονυλίων: nmol/mg total prot.

Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Για τα TBARS, ο υπολογισμός έγινε σύμφωνα με τους Keles et al. (2001). Πενήντα μL ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 500μL TCA 35% και 500μL Tris-HCl 200mM (pH 7.4) και επωάστηκαν για 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Χίλια μL διαλύματος Na_2SO_4 2M και 55mM θειοβαρβιτουρικού οξέος προστέθηκαν και τα δείγματα επωάστηκαν σε υδατόλουτρο στους 95°C για 45min. Ακολούθως, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στον πάγο για 5min και προστέθηκαν 1000μL από TCA 70%. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 3min και η απορρόφηση του υπερκείμενου μετρήθηκε στα 530nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση των TBARS (μmol/L) = (Abs δείγματος – Abs τυφλού) / 0,156 * 31* 3 * 2.

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

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

Συγκέντρωση TBARS: nmol/mg total prot.

Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)

Πριν τη μέτρηση της GSH έπρεπε να κάνουμε την απαραίτητη προετοιμασία των δειγμάτων. Έτσι, 100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5% και

φυγοκεντρήθηκαν στα 21.000g για 5 min στους 5^{o}C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε ένα φιαλίδιο eppendorf. Η GSH υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Reddy et al. (2004). Είκοσι μL ιστού, αραιωμένου 1/2 αναμίχθηκαν με 660μL ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 8.0) και 330μL DTNB. Τα δείγματα επωάστηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45min και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 412nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση της GSH (mmol/L ή μmol/mL) = (Abssample - Absblank / 13.6) * 3 * 2 * 50.5.

Όπου 50,5 είναι ο συντελεστής αραίωσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο στην κυψελίδα (1010μL) με τον όγκο του ιστού (20μL) (1010 / 20 = 50.5), πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν 1/3 και πολλαπλασιάζουμε με 2 λαμβάνοντας υπόψη την 1/2 αραίωση του δείγματος κατά τη μέτρηση. Το 13,6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο:
Συγκέντρωση GSH: μmol/mg total prot.

Οξειδάση της ξανθίνης

Η δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Prajda & Weber (1975). Για τη μέτρηση στον έξω πλατύ τετρακέφαλο προστέθηκαν 20μL ομογενοποιημένου ιστού και για τον καρδιακό μυ 20μL ομογενοποιημένου ιστού αραιωμένου 1/2 σε 430μL 33mM ρυθμιστικού διαλύματος (pH 7.5) και 50μL ξανθίνης 1.7mM και η αντίδραση διακόπηκε προσθέτοντας 50μL 100% TCA. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 10,000g για 15 min και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 293nm. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε, ωστόσο το TCA προστέθηκε αφού το δείγμα επωάστηκε για 20min στους 37°C. Η ίδια φυγοκέντρηση ακολούθησε και η απορρόφηση του δείγματος μετρήθηκε στα 293nm. Η δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης υπολογίστηκε αφαιρώντας τη δραστικότητα του πρώτου δείγματος από το δεύτερο.

Υπολογισμοί

Δραστικότητα οξειδάσης της ξανθίνης (U/mL) = (Abssample 20 min - Abssample 0 min / 20 / 12.2) * 27,5 * 3) (U is μmol/min) για τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ ενώ για τον καρδιακό μυ: Δραστικότητα οξειδάσης της ξανθίνης (U/mL) = (Abssample 20 min - Abssample 0 min / 20 / 12.2) * 27,5 * 3 * 2) (U is μmol/min).

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

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

Η διόρθωση με βάση την ολική πρωτεΐνη έγινε σύμφωνα με τον ακόλουθο τρόπο:
Δραστικότητα οξειδάσης της ξανθίνης (U/mg total prot.)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984; 105: 121-126.
2. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. Physiol Behav 2005; 84(1): 1-7.
3. Ajmani, R.S., Fleg. J.L., Demehin, A.A., Wright, J.G., O'Connor, F., Heim, J.M., Tarien, E., and Rifkind, J.M. Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2003; 28: 29-40.
4. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. Med Sci Sports Exerc 1993; 25 (2): 218-24.
5. Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. Proc Natl Acad Sci U S A 1981; 78: 6858-62.
6. Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H_2O_2 detoxification in in vivo conditions. Free Radic Biol Med 2002; 33 (9): 1260-7.
7. Ashton T, Rowlands CC, Jones E, et al. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. Eur J Appl Physiol 1998; 77(6): 498-502.
8. Betters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, et al. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. Am.J.Respir.Crit Care Med 2004; 170:1179-1184.
9. Brandley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, et al. The mechanism of autoxidation of myoglobin. J Biol Chem 1993; 268 (10): 6995-7010.
10. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 1979; 59: 527-605.
11. Chevion S, Moran DS, Heled Y, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100(9): 5119-23.
12. Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Leeuwenburgh C. Free Rad. Biol. Med. 2000, 29 (suppl. 1), 531.
13. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. Biochem Soc Trans 2002; 30 (2): 280-5.

14. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA et al. Free radicals and tissue damage produced by exercise. Biochem Biophys Res Commun 1982; 107: 1198-205.
15. Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. Biol Signals Recept 2001; 10: 125-40.
16. Ferrando A, Vila L, Voces JA, Cabral AC, Alvarez AI, Prieto JG. Effects of a standardized Panax ginseng extract on th e skeletal muscle of the rat: a comparative study in animals at rest and under exercise. Planta Med. 1999; Apr;65(3):239-44.
17. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. Sports Med. 2006;36(4):327-58.
18. Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. Biol Chem 2002; 383: 375-88.
19. Gomez-Cabrera MC, Borras C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL, Vina J.Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. J Physiol 567:113-120; 2005.
20. Gomez-Cabrera MC, Martinez A, Santangelo G, Pallardo FV, Sastre J Vina J. Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. Br J Nutr 96 Suppl 1:S31-33; 2006.
21. Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV, Sastre J, Vina J, Garcia-del-Moral L. Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. JAMA 289:2503-2504; 2003.
22. Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. Med Sci Sports Exerc 1988; 20(2): 55-9.
23. Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. Eur J Appl Physiol 2003;89(1):14-20.
24. Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). Free radicals in biology and chemistry. New York: Oxford Science Publications.
25. Hansford R, Hogue BA and Mildaziene, V. Dependence of H2O2 formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. Bioenerg Biomembr. 1997; 29: 89-95.
26. Inal M, Akyuz F, Turgut A, et al. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. Med Sci Sports Exerc 2001;33(4):564-7.

27. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. Scand J Clin Lab Invest. 2002 62: 231 236.
28. Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. Sports Med 1988; 5: 156 70.
29. Ji LL. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 222:283-292.
30. Kayatekin BM, Gonenc S, Acikgoz O, et al. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. Eur J Appl Physiol 2002;87(2):141-4.
31. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. Can J Neurol Sci. 2001; 28: 141-143.
32. Kim SH, Park KS, Chang MJ, Sung JH. Effects of Panax ginseng extract on exercise-induced oxidative stress. J Sports Med Phys Fitness. 2005 Jun;45(2):178-82.
33. Komulainen J, Takala TE, Vihko V. Does increased serum creatine kinase activity reflect exercise-induced muscle damage in rats? Int. J. Sports Med 1995; 16: 150-154.
34. Koyama K, Kaya M, Ishigaki T, Tsujita J, Hori S, Seino T, Kasugai A. Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. Eur J Appl Physiol Occup Physiol 80:28-33; 1999.
35. Kumar M, Ahmad A, Rawat P, Khan MF, Rasheed N, Gupta P, Sathiamoorthy B, Bhatia G, Palit G, Maurya R. Antioxidant flavonoid glycosides from Evolvulus alsinoides. Fitoterapia. 2009.
36. Lee DK, Wang DP. Formulation development of allopurinol suppositories and injectables. Drug Dev Ind Pharm. 1999; 25: 1205-1208.
37. Lee FT, Kuo TY, Liou SY, Chien CT. Chronic Rhodiola rosea extract supplementation enforces exhaustive swimming tolerance. Am J Chin Med. 2009;37(3):557-72.
38. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. Curr Med Chem. 2001 Jun;8(7): 829-38.
39. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. Free Radic Biol Med 2002; 32 (9): 790-6.

40. Liu ML, Bergholm R, Makimattila S, Lahdenpera S, Valkonen M, Hilden H, et al. A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. Am J Physiol 1999; 276:E1083–E1091.
41. Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, and Belcastro AN. 1987. Are indices of free radical damage related to exercise intensity? Eur. J. Appl. Physiol. Occup.Physiol. 1987; 56(3):313-6.
42. Lyall KA, Hurst SM, Cooney J, Jensen D, Lo K, Hurst RD, Stevenson LM. Short-term blackcurrant extract consumption modulates exercise-induced oxidative stress and lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2009; 297(1):R70-81.
43. Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. Acta Physiol Scand 2001; 171: 233-9.
44. Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. Free Radical Biology and Medicine 2001; 31: 911-922.
45. McCord, JM, and Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 1968. 243: 5753-5760.
46. Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis, Y, Papassotiriou I, Kouretas D. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. Med Sci Sports Exerc 39:1107-1113; 2007.
47. Moselhy SS, Ali HK. Hepatoprotective effect of cinnamon extracts against carbon tetrachloride induced oxidative stress and liver injury in rats. Biol Res. 2009;42(1):93-8.
48. Mylonas C, and Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. In Vivo. 13: 295-309.
49. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. Sports Med. 2008;38(7):579-606.
50. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, and Kouretas D. 2006. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. Med Sci Sports Exerc. 38: 1443-1450.

51. Niu AJ, Wu JM, Yu DH, Wang R. Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides on oxidative damage in skeletal muscle of exhaustive exercise rats. Int J Biol Macromol. 2008 Jun 1;42(5):447-9.
52. Palazzetti S, Richard MJ, Favir A. Overload training increase exercise-induced oxidative stress and damage. Can J Appl Physiol 2003; 28(4):588-604.
53. Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Morrow JD. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. Eur J Appl Physiol. 2003; 89: 100 107.
54. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. Neurosci Lett. 2004; 357: 83-86.
55. Prajda N, Weber G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. FEBS Lett. 1975; 59: 245-249.
56. Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, and Ohno, H. (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in Uver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. Eur. J. Appl. PhysioL 72: 189-194.
57. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. Free Radic Biol Med 1999; 27 (1-2): 69-74.
58. Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. Indian J Tuberc. 2004; 213-218.
59. Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. J Appl Physiol 2001; 90: 724-31.
60. Sies, H. (1991). Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. New York: Academic Press.
61. Sjodin B, Hellsten Westing Y, et al. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. Sports Med 1990; 10: 236-54.
62. Skarpanska-Stejnborn A, Pilaczynska-Szczesniak L, Basta P, Deskur-Smielecka E. The influence of supplementation with Rhodiola rosea L. extract on selected

redox parameters in professional rowers. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 2009 Apr;19(2):186-99.

63. Skarpanska-Stejnborn A, Pilaczynska-Szczesniak L, Basta P, Deskur-Smielcka E, Horoszkiewicz-Hassan M. The influence of supplementation with artichoke (Cynara scolymus L.) extract on selected redox parameters in rowers. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 2008 Jun;18(3):313-27.
64. Spanou C, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki , Skaltsounis AL, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D. Effects of grape extracts on activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. Eur J Nutr 2010, submitted.
65. St-Pierre J, Buckingham, JA, Roebuck SJ, and Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. J Biol Chem 2002; 277: 44784-44790.
66. Stadtman, E.R., and Levine, R.L. Protein oxidation. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2000; 899: 191-208.
67. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. Nutrition 2000; 16 (7-8): 716 8.
68. Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, et al. Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defences. Free Radic Biol Med 1997; 22(3): 509-13.
69. Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, Kouretas D. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. Appl Physiol Nutr Metab 2008; 33: 1140-54.
70. Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T, et al. Acute immune response in respect to exercise induced oxidative stress. Pathophysiology 2001;7(4):263-270.
71. Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. IUBMB Life 50:271-277; 2000.
72. Voces J, Cabral de Oliveira AC, Prieto JG, Vila L, Perez AC, Duarte ID, Alvarez AI. Ginseng administration protects skeletal muscle from oxidative stress induced by acute exercise in rats. Braz J Med Biol Res. 2004 Dec;37(12):1863-71.
73. You, T., Goldfarb, A.H., Bloomer, R.J., Nguyen, L., Sha, X., and McKenzie, M.J. Oxidative stress response in normal and antioxidant supplemented rats to a

downhill run: changes in blood and skeletal muscles. Can. J. Appl. Physiol. 2005; 30: 677-689.

74. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. Biochem Soc Trans 2001; 29 (2): 358-62.
75. Yu F, Lu S, Yu F, Feng S, McGuire PM, Li R, Wang R. Protective effects of polysaccharide from Euphorbia kansui (Euphorbiaceae) on the swimming exercise-induced oxidative stress in mice**.** Can J Physiol Pharmacol. 2006 Oct;84(10):1071-9.