

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΠΕΔΑ ΔΙΜΕΡΩΝ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ ΚΑΙ ΙΣΤΟΥΣ
ΕΠΙΜΥΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΑΣΚΗΣΗ

Σταθούλη Δήμητρα
Λάρισα 2010

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ
Κουρέτας Δημήτριος, καθηγητής φυσιολογίας	
Λιαδάκη Καλλιόπη, λέκτορας βιοχημικής φαρμακολογίας	
Στάγκος Δημήτριος, λέκτορας φυσιολογίας ζωικών οργανισμών	

Περίληψη	6
1. Εισαγωγή	7
1.1. Ελεύθερες ρίζες	7
1.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών	7
1.2.1. Ενδογενείς πηγές	7
1.2.2. Εξωγενείς πηγές	8
1.3. Θετικές επιδράσεις	8
1.4. Αρνητικές επιδράσεις	9
1.4.1. Λιπιδική υπεροξειδωση	9
1.4.2. Πρωτεϊνική οξείδωση	10
1.4.3. Οξείδωση του DNA	10
1.4.4. Μυικός κάματος	10
1.5. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	11
1.5.1. Ενζυμικά αντιοξειδωτικά	11
1.5.2. Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά	12
1.6. Οξειδωτικό στρες	14
1.7. Άσκηση και οξειδωτικό στρες	15
1.8. Πηγές παραγωγής ROS κατά την άσκηση	16
1.8.1. Αναπνευστική αλυσίδα	16
1.8.2. Φαινόμενο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης	16
1.8.3. Οξείδωση αιμοσφαιρίνης και μυοσφαιρίνης	17
1.8.4. Φλεγμονώδης αντίδραση	17
1.9. Χορήγηση φυτικών εκχυλισμάτων πριν την άσκηση	17
1.9.1. Πειράματα σε ζώα	18
1.9.2. Πειράματα στον άνθρωπο	20
1.10. Αλβουμίνη	20
1.11. Σκοπός	24
2. Υλικά και μέθοδοι	25

2.1. Πειραματόζωα	25
2.2. Πειραματικές ομάδες	25
2.3. Εξοικείωση επίμυων	25
2.4. Πρωτόκολλο κολύμβησης	26
2.5. Θανάτωση των επίμυων, συλλογή και ομογενοποίηση των δειγμάτων και μετρήσεις	26
2.6. Στατιστική ανάλυση	26
3. Αποτελέσματα	27
3.1. Αλβουμίνη στο πλάσμα	27
3.2. Αλβουμίνη στο γαστροκνήμιο μυ	27
3.3. Αλβουμίνη στον καρδιακό μυ	28
3.4. Αλβουμίνη στο ήπαρ	28
3.5. Αλβουμίνη στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ	29
3.6. Αλβουμίνη στον υποκνημίδιο μυ	29
4. Συζήτηση	30
5. Παράρτημα , πρωτόκολλο αλβουμίνης	33
6. Βιβλιογραφία	34

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο πλάσμα	27
Διάγραμμα 2: Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο γαστροκνήμιο μυ	27
Διάγραμμα 3: Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον καρδιακό μυ	28
Διάγραμμα 4: Επίδραση της άσκησης και	28

της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο ήπαρ	
Διάγραμμα 5: Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ	29
Διάγραμμα 6: Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον υποκνημίδιο μυ.	29

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Είναι κοινώς αποδεκτό ότι η αερόβια εξαντλητική άσκηση προκαλεί αύξηση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών. Η αλβουμίνη είναι μια πρωτεΐνη που βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών. Έχει θέσεις δέσμευσης για πολλά μόρια καθώς επίσης και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της αλβουμίνης αυξήθηκε μετά την άσκηση σε σκελετικούς μύες αλλά η χορήγηση αλοπουρινόλης, ενός γνωστού αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης, δεν είχε καμία επίδραση. Έτσι, σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξετάσει αν η άσκηση και η χορήγηση ενός αντιοξειδωτικού εκχυλίσματος από σταφύλι, ενός *in vitro* φυσικού αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης, επηρεάζουν τη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο πλάσμα και σε διάφορους ιστούς των επίμυων μετά από εξαντλητικό κολύμπι. Βρέθηκε ότι η άσκηση μείωσε τη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο πλάσμα ενώ αντίθετα την αύξησε στο γαστροκνήμιο μυ. Η αλβουμίνη στον καρδιακό μυ βρέθηκε αυξημένη στην ομάδα που πήρε το εκχύλισμα σε σχέση με αυτήν που πήρε το φυσιολογικό ορό ενώ δεν επηρεάστηκε καθόλου στους υπόλοιπους ιστούς. Στους υπόλοιπους ιστούς που εξετάστηκαν δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής φαίνεται να ενισχύουν ως ένα βαθμό την αρχική υπόθεση, η οποία υποστήριζε ότι η αλβουμίνη συμμετέχει στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του οργανισμού όταν αυξάνεται κατά το οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, η αύξησή της φαίνεται να εξαρτάται από το είδος του οξειδωτικού στρες και από την παρέμβαση που εφαρμόζεται κάθε φορά. Η παρατήρηση αυτή ίσως είναι ένας περιορισμός για τη χρησιμοποίηση της αλβουμίνης σα δείκτη οξειδωτικού στρες. Ο μηχανισμός μεταφοράς της αλβουμίνης στους ιστούς, η πιθανότητα η αύξηση των επιπέδων της να εξαρτάται από το ερέθισμα που εφαρμόζεται κάθε φορά και ο ακριβής της ρόλος στην αντιοξειδωτική άμυνα, λοιπόν, χρήζουν περαιτέρω έρευνας.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στη στοιβάδα σθένους (Finaud et al., 2006). Λόγω αυτής της διαμόρφωσής τους είναι πολύ δραστικές και τείνουν να οξειδώνουν τα βιομόρια (Sen, 2001). Η διάρκεια ζωής τους είναι πολύ μικρή καθώς κυμαίνεται από milliseconds έως nanoseconds (Finaud et al., 2006).

Ο σχηματισμός ελευθέρων ριζών συμβαίνει με τρεις διαφορετικούς μηχανισμούς (Bloomer et al., 2005):

α) με διάσπαση των ομοιοπολικών δεσμών: $A-B \rightarrow A\cdot + B\cdot$

β) με προσθήκη ενός ηλεκτρονίου σε ένα ουδέτερο άτομο: $A + e \rightarrow A\cdot-$

γ) με απομάκρυνση ενός ηλεκτρονίου από ένα ουδέτερο άτομο: $A \rightarrow A\cdot- + e$

Οι ελεύθερες ρίζες αφενός προκαλούν βλάβες στα βιομόρια, αφετέρου συμμετέχουν σε διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες. Οι ελεύθερες ρίζες διακρίνονται στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), που προέρχονται από το οξυγόνο, στις δραστικές μορφές αζώτου (RNS), που προέρχονται από το άζωτο, στις δραστικές μορφές θείου (RSS), που προέρχονται από το θείο και στις δραστικές μορφές χλωρίου (RCS), που προέρχονται από το χλώριο (Finaud et al., 2006).

1.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να προέλθουν τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς πηγές.

1.2.1 Ενδογενείς πηγές

Το κύριο μονοπάτι για την παραγωγή ελευθέρων ριζών στα βιολογικά συστήματα είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου το O_2 χρησιμοποιείται για την παραγωγή ATP. Ένα μικρό ποσοστό, περίπου 1-5% του O_2 περνάει μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας και δημιουργεί ανιόν σουπεροξειδίου οδηγώντας έτσι στην παραγωγή και άλλων

ελευθέρων ριζών. Τα μιτοχόνδρια επίσης παράγουν μονοξειδίο του αζώτου (NO), το οποίο αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου για το σχηματισμό ONO_2^- , που είναι πολύ ισχυρό οξειδωτικό (Bloomer et al., 2005).

Ελεύθερες ρίζες παράγονται και κατά το μεταβολισμό των προσταγλανδινών. Οι προσταγλανδίνες απελευθερώνονται από μυικά κύτταρα σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Ο πρόδρομος των προσταγλανδινών, το αραχιδονικό οξύ, μπορεί να μετατραπεί σε ενεργό μεταβολίτη από τη λιποξυγενάση παράγοντας επιπλέον ελεύθερες ρίζες. Οι κατεχολαμίνες, επίσης, οι οποίες αυξάνονται κατά την άσκηση μπορούν να αυτοοξειδωθούν οδηγώντας σε παραγωγή RONS (Bloomer et al., 2005).

Τα ένζυμα οξειδάση της ξανθίνης και NADPH οξειδάση είναι πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών. Μειωμένα επίπεδα ATP λόγω εξαντλητικής άσκησης οδηγούν σε υψηλά επίπεδα ενδοκυτταρικού ADP. Αυτό προάγει την αποικοδόμηση του ADP και τη μετατροπή της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης σε οξειδάση της ξανθίνης, της σημαντικότερης πηγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση. Η παραγωγή RONS μέσω του μονοπατιού της οξειδάσης της ξανθίνης εμπλέκει άσκηση υψηλής έντασης και μικρής διάρκειας γιατί σε αυτές τις συνθήκες προκαλείται μυική καταστροφή. Η NADPH οξειδάση βρίσκεται στα ουδετερόφιλα και σε άλλους τύπους κυττάρων (Bloomer et al., 2005).

Η άσκηση προκαλεί αύξηση της οξειδωσης της αιμοσφαιρίνης και της μυοσφαιρίνης. Η αυτοοξειδωση της αιμοσφαιρίνης παράγει μεθαιμοσφαιρίνη και ανιόν σουπεροξειδίου ενώ η αυτοοξειδωση της μυοσφαιρίνης παράγει υπεροξειδίο του υδρογόνου, τα οποία στη συνέχεια σχηματίζουν περισσότερο επιβλαβή οξειδωτικά (Bloomer et al., 2005).

1.2.2 Εξωγενείς πηγές

Στις εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών ανήκουν η άσκηση, το κάπνισμα, το αλκοόλ, το άγχος, η ρύπανση του περιβάλλοντος, διάφορες μορφές ακτινοβολίας όπως ηλεκτρομαγνητική και ηλιακή καθώς και συντηρητικά τροφών (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.3 ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Οι ελεύθερες ρίζες και κυρίως οι ROS συμμετέχουν στο ανοσοποιητικό σύστημα έχοντας δράση ενάντια στα αντιγόνα κατά τη φαγοκύτωση. Η δράση τους αυτή είναι έντονη στη διάρκεια της φλεγμονής, η οποία προκαλείται από έντονη

άσκηση που δημιουργεί μυϊκό τραυματισμό, όπως είναι η έκκεντρη άσκηση (Finaud et al., 2006). Οι ROS παίζουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία επειδή λειτουργούν σα μεταφορείς μηνυμάτων ή τροποποιητές της οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Είναι γνωστό ότι εμπλέκονται, επίσης, στην ενεργοποίηση ενζύμων, την αποτοξίνωση από φάρμακα και τη μυϊκή συστολή. Η συμμετοχή στη μυϊκή συστολή είναι πολύ σημαντική διότι αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της συσταλτότητας των μυϊκών ινών. Αντιθέτως, αύξηση των ROS οδηγεί σε αυξημένη δύναμη συστολής των ινών (Finaud et al., 2006).

1.4 ΑΡΝΗΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Οι ελεύθερες ρίζες επιδρούν και αρνητικά στον οργανισμό. Επάγουν την απόπτωση σε υγιή κύτταρα και προκαλούν φλεγμονή, ιδιαίτερα σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι ο καρκίνος, η νόσος του Alzheimer ή του Parkinson και η κυτταρική γήρανση.

1.4.1 Λιπιδική υπεροξείδωση

Η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην παθογένεια της αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny, 2001). Οι ROS προκαλούν οξείδωση κυρίως της LDL (Morel et al., 1983). Η οξείδωση εξαρτάται από την αντιοξειδωτική ικανότητα του αίματος και μπορεί να αυξηθεί λόγω του οξειδωτικού στρες, που προκαλεί η άσκηση (Liu et al., 1999). Οι ROS έχουν επίσης την ικανότητα να οξειδώνουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), τα οποία συμμετέχουν στη σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης (Cheeseman & Slater TF, 1993). Η οξείδωση των PUFA είναι η αρχική αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ROO[•], συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεύδης (Young & McEneny, 2001). Η λιπιδική υπεροξείδωση αλλάζει τη ρευστότητα των κυτταρικών μεμβρανών, μειώνει την ικανότητα διατήρησης μιας εξισορροπημένης συγκέντρωσης και επίσης αυξάνει την μεμβρανική διαπερατότητα (Radak et al., 1999). Οι ROS μπορούν να προκαλέσουν βλάβη σε κάθε τύπο κυττάρου συμπεριλαμβανομένων του μυϊκού και του ερυθροκυττάρου (Tavazzi et al., 2000).

1.4.2 Πρωτεϊνική οξείδωση

Οι ROS μπορούν, επίσης, να οξειδώσουν πρωτεΐνες του αίματος και δομικές πρωτεΐνες καθώς και να αναστείλουν την πρωτεόλυση (Szweda et al., 2002). Κατά τη διάρκεια της οξείδωσης οι πρωτεΐνες μπορεί να χάσουν το αμινοτελικό τους άκρο ή να τεμαχιστούν. Αυτές οι αντιδράσεις οδηγούν σε αλλαγές στη δομή ή τη λειτουργία τους (Radak et al., 1999). Η πρωτεϊνική οξείδωση συνοδεύεται από μια συνολική αύξηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των οξειδωμένων αμινοξέων, τα οποία θεωρούνται δείκτες οξειδωτικής καταστροφής (Leewenburgh et al., 1999). Η οξείδωση μπορεί να είναι συνέπεια της φλεγμονής, της φυσικής άσκησης ή του φαινομένου της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (Levine, 2002). Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες καταβολίζονται για να παραχθούν αμινοξέα αλλά τα καρβονύλια δεν εισέρχονται σε αυτή τη διαδικασία με αποτέλεσμα να σχηματίζουν συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους (Levine, 2002). Συμπερασματικά, η ανακύκλωση των πρωτεϊνών, η γενετική μεταγραφή και η ακεραιότητα των κυττάρων μειώνονται από τις δράσεις των ROS.

1.4.3 Οξείδωση του DNA

Οι ROS προκαλούν σπασίματα στις αλυσίδες του DNA και βλάβες στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς των βάσεων (Jenkins, 1988). Κάθε περιοχή του DNA είναι ευπαθής στις ελεύθερες ρίζες (Dizdaroglu et al., 2002). Ως αποτέλεσμα προκαλούνται μεταλλάξεις, οι οποίες πιθανόν οδηγούν σε καρκίνο και κυτταρική γήρανση (Radak et al., 1999). Διαφορετικές πηγές καταστροφής του DNA έχουν βρεθεί ως αποτέλεσμα του καπνίσματος, της χρόνιας φλεγμονής και της διαρροής ελευθέρων ριζών από τα μιτοχόνδρια (Alessio, 1993).

1.4.4 Μυϊκός κάματος

Ένα μικρό ποσοστό των ROS είναι απαραίτητο για τη μυϊκή συστολή (Reid, 2001). Το οξειδωτικό στρες, το οποίο έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των ROS στο μυ σχετίζεται με το μυϊκό κάματο κατά την άσκηση και το μυϊκό τραυματισμό μετά το τέλος της (Cooper et al., 2002). Οι αλλαγές στις μιτοχονδριακές λειτουργίες λόγω έκθεσης στις ROS θεωρούνται κύριος παράγοντας του μυϊκού κάματος (Reid et al., 1992). Καταστροφές στο μιτοχονδριακό DNA επάγουν αλλαγές στα αναπνευστικά συμπλέγματα με αποτέλεσμα τη μείωση της μεταφοράς ηλεκτρονίων και του σχηματισμού ATP. Αυτό το φαινόμενο επάγει την

αυξημένη χρησιμοποίηση αναερόβιων μονοπατιών έχοντας αρνητικές συνέπειες για το μυ λόγω της παραγωγής ανόργανου φωσφορικού (Reid et al., 1992). Οι συσταλτές πρωτεΐνες, ακτίνη και μυοσίνη, καθώς και η αντλία Ca^{+2} είναι ευαίσθητες στις αλλαγές της οξειδοαναγωγής κατάστασης. Οι ROS επάγουν αύξηση του ενδοκυττάριου Ca^{+2} και απενεργοποίηση των ενδοκυττάρων ενζύμων με αποτέλεσμα την εμφάνιση μυικού κάματος (Evans, 2000).

1.5. ANΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

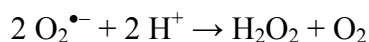
Αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία, η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με εκείνη ενός προς οξείδωση υποστρώματος, επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Halliwell & Gutteridge, 1999). Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι ενζυμικά (ενδογενή) ή μη ενζυμικά (προέρχονται από την τροφή) (Powers & Lennon, 2000). Στα ενζυμικά αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνονται η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, ενώ στα μη ενζυμικά ανήκουν η βιταμίνη Α (ρετινόλη), η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), η βιταμίνη E (τοκοφερόλη), τα φλαβονοειδή, οι θειόλες και το ουρικό οξύ.

1.5.1. ENΖΥΜΙΚΑ ANΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η SOD αποτελεί κύριο αμυντικό μηχανισμό ενάντια στο οξειδωτικό στρες και κυρίως ενάντια στις ρίζες σουπεροξειδίου. Αντιπροσωπεύει μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν την αυτοοξείδωση του $O_2^{\bullet-}$ σχηματίζοντας H_2O_2 ως εξής:

SOD



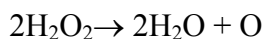
Σε όλα τα κύτταρα κατά την ηρεμία το μεγαλύτερο μέρος του μιτοχονδριακά παραγόμενου $O_2^{\bullet-}$ ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD και το υπόλοιπο μέρος διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Das et al., 1997). Στα μυικά κύτταρα το 65-85% της ενεργότητας της SOD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Powers & Lennon, 2000).

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδιοσώματα, τα οποία είναι κυτταρικές δομές που χρησιμοποιούν οξυγόνο για την αποτοξίνωση τοξικών

υποστρωμάτων (Antunes et al., 2002). Η καταλάση μετατρέπει το H₂O₂ σε H₂O και O₂ ως εξής :

CAT



Στη συνέχεια μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει το H₂O₂ για την αποτοξίνωση ουσιών διαμέσου μιας αντίδρασης υπεροξειδωσης. Η αντίδραση αυτή χρειάζεται υποστρώματα όπως είναι η φαινόλη, η αλκοόλη ή το φορμικό οξύ:

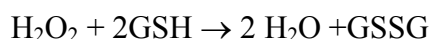
CAT



Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Η GPX βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν το H₂O₂ σε νερό. Αυτή η αντίδραση χρησιμοποιεί γλουταθειόνη και τη μετατρέπει σε GSSG, που είναι η οξειδωμένη μορφή της.

GPX



Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και η καταλάση έχουν την ίδια δράση πάνω στο υπεροξειδίο του υδρογόνου. Αλλά η GPX είναι πιο αποτελεσματική σε υψηλές συγκεντρώσεις ROS, ενώ η καταλάση σε μικρότερες συγκεντρώσεις (Jenkins & Goldfarb, 1993).

1.5.2. ΜΗ ENZYMΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

Βιταμίνη E (τοκοφερόλη)

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, που αποτελείται από διάφορες ισομορφές γνωστές ως τοκοφερόλες. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο ενεργή και άφθονη μορφή καθώς και ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά λόγω της ικανότητάς της να δρα απευθείας στις ROS (Evans, 2000). Αλληλεπιδρά με αρκετά άλλα αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη C, η GSH, το β-καροτένιο και το λιποϊκό οξύ. Αυτά τα αντιοξειδωτικά έχουν την ικανότητα να την αναγεννούν από την οξειδωμένη της

μορφή (Alessio, 1993). Η βιταμίνη E επίσης παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της δομής των κυτταρικών μεμβρανών επειδή αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση.

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και πιθανόν το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό στο εξωκυττάριο υγρό. Είναι περισσότερο άφθονη σε ιστούς, όπου η παραγωγή ROS είναι έντονη. Στο μεσοκυττάριο υγρό έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει τις ROS, ενώ μέσα στα κύτταρα ενισχύει τη δράση της βιταμίνης E και της GSH αναγεννώντας τις ενεργές μορφές τους μετά την αλληλεπίδραση με τις ROS. Επίσης, έχει την ικανότητα να δεσμεύει ιόντα χαλκού, τα οποία έχουν ισχυρή οξειδωτική δράση (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες, που σχηματίζονται στα φυτά από φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και μηλονικό οξύ. Μπορούν και αναστέλλουν προοξειδωτικά ένζυμα ή σχηματίζουν σύμπλοκα με προοξειδωτικά ιόντα *in vitro*. Επιπλέον, έχουν μικρή επίδραση στη βιταμίνη E και το β-καροτένιο (Willcox et al., 2002).

Θειόλες

Οι θειόλες είναι μια ομάδα μορίων που χαρακτηρίζονται από σουλφυδρυλικά κατάλοιπα στο ενεργό τους κέντρο. Συντίθενται από κυστεΐνη και μεθειονίνη και συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση, την ανοσολογική αντίδραση και την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού (Sen & Packer, 2000). Η γλουταθειόνη είναι η κύρια θειόλη, που βρίσκεται στους οργανισμούς (Mylonas & Kouretas, 1999). Δρα ως υπόστρωμα για την GPX και έτσι συμμετέχει στην αναστολή παραγωγής των ROS. Μπορεί, επίσης, να εξουδετερώσει απευθείας τις ROS και να ενισχύσει την αντιοξειδωτική ικανότητα των βιταμινών E και C (May et al., 1996). Παρουσία οξειδωτικού στρες είναι πιθανόν να παρατηρηθεί μείωση του λόγου GSH/GSSG και των επιπέδων των ολικών θειολών. Αυτά τα φαινόμενα εμφανίζονται σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως οι νόσοι του Parkinson και του Alzheimer, η γήρανση και κατά την άσκηση (Tessier et al., 1995). Μειωμένες συγκεντρώσεις GSH στα κύτταρα σχετίζονται με κυτταρική καταστροφή και μειωμένη ανοσολογική δράση και μπορούν να αντισταθμιστούν με συμπληρώματα βιταμινών C και E. Το

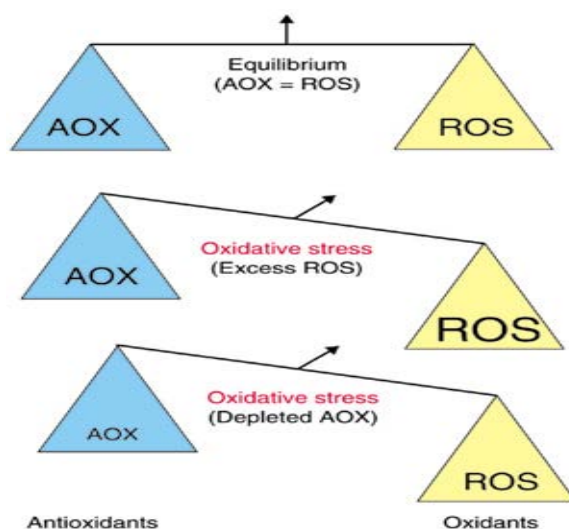
λιποϊκό οξύ είναι μια θειόλη που αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση και μειώνει τις οξειδωμένες μορφές των βιταμινών C και E (Sen & Packer, 2000).

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο (Halliwell & Gutteridge, 1999). Η έντονη φυσική άσκηση αυξάνει τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος του πλάσματος (Mastaloudis et al., 2001). Στη συνέχεια διαχέεται μέσα στους μύες για να τους προστατέψει από την οξείδωση που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες (Hellsten et al., 1998). Αντιπροσωπεύει το 50% της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Wayner et al., 1987) και προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες και το DNA από την οξείδωση. Μια άλλη σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα του ουρικού οξέος είναι η ικανότητά του να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου (Davies et al., 1986).

1.6. ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Ως οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται η ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών με επικράτηση των πρώτων (Sies, 1991).



Εικόνα 2: Οξειδωτικό στρες

Μπορεί να προκληθεί είτε από μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών, είτε από αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Τα μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών ίσως οφείλονται σε μεταλλάξεις, που επηρεάζουν τη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ενώ η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών οφείλεται σε έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα οξυγόνου. Εξωγενείς πηγές πρόκλησης οξειδωτικού στρες είναι οι

ξενοβιοτικές ουσίες, οι παθογόνοι ιοί, τα βακτήρια, η ακτινοβολία, η διατροφή, το κάπνισμα, οι υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου και το όζον. Στις ενδογενείς πηγές δημιουργίας οξειδωτικού στρες ανήκουν τα ουδετερόφιλα καθώς και ένζυμα, όπως η οξειδάση της ξανθίνης.

1.7. ΑΣΚΗΣΗ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Στις θετικές επιδράσεις της άσκησης ανήκουν η μείωση της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου, καρδιαγγειακών παθήσεων και διαβήτη, καθώς και η καθυστερημένη εμφάνιση γήρανσης σε επίμυες (McCarter, 2000). Οι ευεργετικές αυτές επιδράσεις οφείλονται στις προσαρμογές των αντιοξειδωτικών μηχανισμών στους ιστούς. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα λειτουργούν ως μηχανισμός προσαρμογής και προστασίας από τις ελεύθερες ρίζες. Ένα ακόμα θετικό της άσκησης είναι η ευεξία που προκαλεί στον οργανισμό και η διατήρηση μιας καλής εξωτερικής εμφάνισης.

Άσκηση υψηλής έντασης και διάρκειας αυξάνει την παραγωγή RONS δημιουργώντας μια ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών. Αυτή η ανισορροπία επάγει την πρόκληση του οξειδωτικού στρες (Bloomer et al., 2005). Υπάρχουν δύο μηχανισμοί που συνδέουν την αερόβια άσκηση με το οξειδωτικό στρες. Ο ένας μηχανισμός είναι η αύξηση της δράσης των προ-οξειδωτικών όταν η VO_2 αυξάνεται 10-15 φορές και ο δεύτερος είναι η ανεπαρκής δράση των αντιοξειδωτικών. Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει ότι ενώ η οξεία αερόβια άσκηση προκαλεί οξειδωτικό στρες, η χρόνια αερόβια άσκηση ίσως το μειώνει μέσω των προσαρμογών που προκαλεί (Alessio & Goldfarb, 1988). Σε μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι κατά τη διάρκεια εξαντλητικής άσκησης αυξάνονται τα πρωτεϊνικά καρβονύλια στο πλάσμα και το γαστροκνήμιο μυ καθώς επίσης και η λιπιδική υπεροξείδωση στο πλάσμα και το σκελετικό μυ (Alessio et al., 2000). Αντίθετα, ο λόγος GSH/GSSG μειώνεται στον άνθρωπο μετά από ποδηλασία (Aguilo et al., 2005). Εκτεταμένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι υπεύθυνη για τη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Schneider & Tiidus, 2007), για τη μυϊκή καταστροφή (Nikolaidis et al., 2007) και για την κόπωση (Betters et al., 2004). Σε άλλες εργασίες έχει δειχτεί ότι το 2-5% του μοριακού οξυγόνου που χρησιμοποιείται στην οξειδωτική φωσφορυλίωση στα μιτοχόνδρια των σκελετικών μυών ανάγεται σε ρίζα σουπεροξειδίου κατά την ηρεμία (Sjodin et al., 1990). Πιο πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι κατά την ηρεμία η διαρροή των ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια του

καρδιακού μυός κυμαίνεται από 0,4-0,8% (Hansford et al., 1997) ή ακόμα σε 0,15% στους σκελετικούς μύες (St-Pierre et al., 2002). Επιπλέον, όταν τα μιτοχόνδρια δουλεύουν έντονα για την παραγωγή ATP από ADP με υψηλή ροή ηλεκτρονίων στο οξυγόνο, όπως στην περίπτωση της άσκησης, τότε το ποσοστό του οξυγόνου που μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες κυμαίνεται στο ένα δέκατο περίπου της αναλογίας που παρατηρείται σε κατάσταση ηρεμίας (Vina et al., 2006). Σε παλαιότερη εργασία του εργαστηρίου μας βρέθηκε ότι η άσκηση επάγει το οξειδωτικό στρες όπως φάνηκε από την αύξηση των συγκεντρώσεων των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα, τα ερυθροκύτταρα και το γαστροκνήμιο μυ επιμύων. Επίσης η χορήγηση αλλοπουρινόλης, μιας ουσίας που αναστέλλει την οξειδάση της ξανθίνης, βρέθηκε ότι επάγει το οξειδωτικό στρες καθώς αύξησε τις συγκεντρώσεις των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα ερυθροκύτταρα και το γαστροκνήμιο μυ (Veskoukis et al., 2008).

1.8. ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ROS ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ

1.8.1. ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ ΑΛΥΣΙΔΑ

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι ο μεταβολισμός του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια σχετίζεται με την παραγωγή ROS (Di Meo & Venditti, 2001). Στην αναπνευστική αλυσίδα περίπου το 95-99% του οξυγόνου που καταναλώνεται μετατρέπεται σε νερό μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από το συνένζυμο Q (Fehrenbach & Northoff, 2001). Όμως, μόνο το 1-5% του O₂ σχηματίζει O₂^{•-} (Jenkins & Goldfarb, 1993). Δυο κύριες θέσεις παραγωγής των ROS έχουν εντοπιστεί στην αναπνευστική αλυσίδα, το σύμπλεγμα I και το σύμπλεγμα II. Βλάβες στο μιτοχονδριακό DNA επάγουν αλλαγές στα πολυπεπίδια των αναπνευστικών συμπλόκων με αποτέλεσμα να μειώνεται η μεταφορά ηλεκτρονίων και να αυξάνεται η παραγωγή των ROS. Κατά την άσκηση, λοιπόν, η παραγωγή οξειδωτικού στρες είναι έντονη διότι η συνολική πρόσληψη οξυγόνου αυξάνεται 20 περίπου φορές (Halliwell & Gutteridge, 1999).

1.8.2. ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΙΣΧΑΙΜΙΑΣ-ΕΠΑΝΑΙΜΑΤΩΣΗΣ

Η δεύτερη πηγή οξειδωτικού στρες είναι το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, το οποίο συμβαίνει μετά από χειρουργικές επεμβάσεις και κατά τη διάρκεια φυσικής άσκησης (Frederiks & Bosch, 1995). Η δεϋδρογονάση της ξανθίνης (XDH) παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του ουρικού οξέος από ATP και

AMP. Σε ιστούς με υποξεία η XDH μετατρέπεται σε οξειδάση της ξανθίνης (XO) (Frederiks & Bosch, 1995). Μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης, η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και στη συνέχεια σε ουρικό οξύ. Η δράση του ενζύμου αυτού οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, κυρίως $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 (McCord & Fridovich, 1968). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ισχαιμία-επαναιμάτωση αυξάνει τη μιτοχονδριακή παραγωγή ελευθέρων ριζών (Di Meo & Venditti, 2001) μέσω μηχανισμών όπως η αυτοοξειδωση των κατεχολαμινών και της μυοσφαιρίνης (Gunther et al., 1999).

1.8.3. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΜΥΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Η οξειδωση της αιμοσφαιρίνης μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό ROS (Thomas, 2000). Στον άνθρωπο το 3% της αιμοσφαιρίνης μετασχηματίζεται με αυτοοξειδωση. Αυτή η αντίδραση, η οποία εντείνεται κατά την άσκηση παράγει μεθαιμοσφαιρίνη και $O_2^{\bullet-}$ (Misra & Fridovich., 1972). Η μυοσφαιρίνη μπορεί επίσης να οξειδωθεί και στη συνέχεια να αλληλεπιδράσει με το H_2O_2 και να παράγει άλλες ελεύθερες ρίζες, όπως ρίζες υπεροξειδίου (Gunther et al., 1999).

1.8.4. ΦΛΕΓΜΟΝΩΔΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ

Κατά την άσκηση ενεργοποιείται η φλεγμονώδης αντίδραση, στην οποία συμμετέχουν τα πολυμορφοουδετερόφιλα (PMN). Τα PMN προσεγγίζουν την περιοχή που έχει υποστεί μυϊκή καταστροφή και εκκρίνουν λυσοζύμη και $O_2^{\bullet-}$. Έτσι, παράγονται ελεύθερες ρίζες, που προκαλούν οξειδωτικό στρες (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). Επίσης, η παρουσία φλεγμονής κατά την άσκηση που προκαλεί μυϊκή καταστροφή επιβεβαιώνεται και με τον προσδιορισμό της IL-6 και της μυελοπεροξειδάσης, που είναι δείκτες φλεγμονής (Childs et al., 2000).

1.9. ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται εργασίες, στις οποίες έχουν χορηγηθεί φυτικά εκχυλίσματα είτε σε πειραματόζωα είτε στον άνθρωπο και έχουν μελετηθεί οι επιδράσεις τους στο οξειδωτικό στρες και το μεταβολισμό μετά από την εφαρμογή διαφόρων πρωτοκόλων άσκησης.

1.9.1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΕ ΖΩΑ

Πιο συγκεκριμένα, οι Lee et al., (2009) χορήγησαν σε επίμυες εκχύλισμα από το φυτό *Rhodiola rosea*, που ζει στις ψυχρές περιοχές της γης, όπως αρκτική, βουνά της κεντρικής Ασίας, Άλπεις, και Σκανδιναβία, για 2-4 εβδομάδες. Στη συνέχεια άφησαν τους επίμυες να κολυμπήσουν για 90min με 5% επιπρόσθετο σωματικό βάρος. Αποτέλεσμα αυτής της χορήγησης ήταν η αύξηση της κιτρικής συνθάσης, η αύξηση του γλυκογόνου στο ήπαρ και ο αυξημένος χρόνος κολύμβησης μείωνε την κόπωση. Επίσης, εκχύλισμα *Prunus mume*, γνωστό και ως ιαπωνικό βερίκοκο, χορηγήθηκε από τους Kim et al., (2008) σε ποντίκια σε συγκεντρώσεις 1,5%, 0,9% και 0,3% για 4 εβδομάδες, τα οποία υποβλήθηκαν σε άσκηση και θανατώθηκαν αμέσως μετά και 30min μετά. Τα αποτελέσματα ήταν μείωση της δράσης της γαλακτικής δεϋδρογονάσης και αύξηση των ηπατικών και μυϊκών συγκεντρώσεων του γλυκογόνου. Οι Niu et al., (2008) χορήγησαν πολυσακχαρίτες *L. Barbarum* (εκχύλισμα μούρων) σε 32 αρσενικά ποντίκια σε πρόγραμμα άσκησης 30 ημερών. Παρατήρησαν μειωμένα επίπεδα MDA καθώς επίσης και μειωμένη δράση της κρεατινικής κινάσης. Αντίθετα αυξήθηκαν τα επίπεδα του γλυκογόνου. Σε μια άλλη μελέτη χορηγήθηκε εκχύλισμα πολυσακχαριτών από *Euphorbia kansui*, ένα κινέζικο παραδοσιακό φάρμακο, σε ποντίκια από το στόμα, τα οποία υποβλήθηκαν σε εξαντλητική άσκηση. Από τις μετρήσεις που έκαναν στη συνέχεια βρήκαν μειωμένη MDA, αυξημένη δράση της SOD και μείωση της κόπωσης (Yu et al., 2006). Οι Voces et al., (2004) χορήγησαν από το στόμα εκχύλισμα *Panax Ginseng*, που φυτρώνει στη βόρεια Κίνα, στην Κορέα και στην ανατολική Σιβηρία, σε επίμυες για 3 μήνες σε δόσεις των 3, 10, 100, 500mg/kg. Παρατήρησαν μειωμένη MDA καθώς και μειωμένη δράση της κιτρικής συνθάσης, η οποία όμως δεν επηρεαζόταν με τη δόση των 100mg/kg.

Οι Paula et al., 2005 χορήγησαν εκχύλισμα *Pterodon emarginatus*, ενός φυτού της νότιας Αμερικής σε αρσενικούς επίμυες στοματικά μια ή τρεις φορές σε δόση των 498mg/kg πριν και μετά την άσκηση για να μελετήσουν την επίδρασή του στο οξειδωτικό στρες και στο στρες που οφείλεται στις ρίζες N στους μύες, στο ήπαρ και τον εγκέφαλο. Η χορήγηση αυτή προκάλεσε αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, αύξηση των επιπέδων των νιτροδών, η οποία ήταν μικρότερη στο ήπαρ και αύξηση της κρεατινικής κινάσης. Επίσης παρατήρησαν ότι η χορήγηση μείωσε την αύξηση των παραμέτρων που μετρήθηκαν. Μια άλλη ερευνητική ομάδα (Moriyama et al., 2006) χορήγησε εκχύλισμα σκόρδου σε επίμυες. Η χορήγηση έγινε από το στόμα

30min πριν από την άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο σε δόσεις των 2,86g/kg, 5 μέρες/εβδομάδα για 4 εβδομάδες. Διαπίστωσαν μειωμένα επίπεδα της SOD και ενίσχυση της φυσικής δύναμης και αντοχής. Ακόμη, οι Li et al., (1999) χορήγησαν *Eucommia ulmoides* σε ποντίκια. Την 29^η μέρα τα υπέβαλαν σε άσκηση αντοχής σε δαπεδοεργόμετρο με κλίση 7° και 24 ώρες μετά έκαναν μετρήσεις σε μύες και όργανα. Βρήκαν ότι η γαλακτική δεϋδρογονάση είχε αρκετά υψηλότερη δράση, η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος ήταν μειωμένη και ότι αυξήθηκε η αντοχή. Στοματική χορήγηση, επίσης, εκχυλίσματος *Panax Ginseng* για 3 μήνες σε ποντίκια προκάλεσε δοσοεξαρτώμενη μείωση των TBARS ενώ η SOD είχε αυξημένη δράση. Επίσης αυξήθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα σε ηπατικό επίπεδο (Voces et al., 1999).

Όσον αφορά τη χορήγηση εκχυλισμάτων για την αντιστροφή των δυσμενών επιδράσεων οξειδωτικών παραγόντων σε διάφορους ιστούς πειραματόζωων υπάρχουν, επίσης, ορισμένες ενδιαφέρουσες εργασίες. Συγκεκριμένα, οι Gopi & Setty (2009) χορήγησαν εκχύλισμα από το φυτό *hemidesmus indicus* (θάμνος της νότιας Ασίας που οι ρίζες του είναι ξυλώδεις και αρωματικές και χρησιμοποιείται σαν παραδοσιακό φάρμακο) σε συγκέντρωση 100mg/kg σε επίμυες μετά από οξειδωτικό στρες προκαλούμενο από βρωμοβενζένιο. Αυτή η χορήγηση είχε σαν αποτέλεσμα μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και μείωση των σουλφυδρυλίων. Άλλη μελέτη (Moselhy & Ali, 2009) χρησιμοποίησε εκχύλισμα κανέλας. Το εκχύλισμα αυτό χορηγήθηκε στοματικά σε επίμυες σε συγκέντρωση 200mg/kg για 7 μέρες για τη μελέτη οξειδωτικού στρες προκαλούμενο από tetrachloride και ηπατικό τραυματισμό. Τα αποτελέσματα ήταν αύξηση της MDA, μειωμένη CAT καθώς και μειωμένη SOD. Φλαβονοειδή γλυκοσίδια από το φυτό *Evolvulus alsinoides*, που χρησιμοποιείται σε νευρική εξάντληση, απώλεια μνήμης και γενική αδυναμία, χορηγήθηκαν σε επίμυες σε δόσεις των 3, 5, 9, 10, 100, 200mg/kg και εκτέθηκαν σε στρες για 7 μέρες (Kumar et al., 2009). Οι ερευνητές παρατήρησαν αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης, αυξημένη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και μειωμένα επίπεδα της γλουταθειόνης στο πλάσμα και τον ιστόκαμπο. Οι Saada et al., (2009) χορήγησαν εκχύλισμα καρπού του *vitis vinifera* (εκχύλισμα σταφυλιού) σε επίμυες για την προστασία από οξειδωτική βλάβη οφειλόμενη σε ακτινοβολία. Χορηγήθηκαν δόσεις των 100mg/kg/day για 15 μέρες πριν την ακτινοβολία και τα ζώα θανατώθηκαν 1, 14 και 28 μέρες μετά την

ακτινοβόληση. Παρατήρησαν μείωση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, μείωση της CAT, αύξηση των TBARS και μείωση της SOD.

1.9.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Σε δύο εργασίες που έγιναν σε κωπηλάτες βρέθηκε ότι το προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες βελτιώθηκε μετά από τη χορήγηση εκχυλισμάτων από το φυτό *rhodiola rosea* και από αγκινάρα (Skarpanska-Stenjbom et al., 2009, 2008). Στην πρώτη εργασία το *rhodiola rosea* χορηγήθηκε σε δόση των 100mg 2 φορές την ημέρα για 4 εβδομάδες και στη δεύτερη το εκχύλισμα αγκινάρας σε συγκέντρωση 400mg 3 φορές την ημέρα για 5 εβδομάδες. Παρατηρήθηκε αύξηση της TAC και στις δύο εργασίες αλλά μείωση της δραστηριότητας της SOD έως και 24 ώρες μετά την άσκηση.

Βελτίωση του οξειδωτικού στρες παρατηρήθηκε, επίσης, μετά από χορήγηση εκχυλίσματος από το φυτό *Panax Ginseng* για 8 εβδομάδες σε δόσεις των 2g 3 φορές τη μέρα. Από τα αποτελέσματα προέκυψε μείωση της μηλονικής διαλδεύδης ως δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης και αύξηση της δραστηριότητας της καταλάσης και της SOD τόσο σε κατάσταση ηρεμίας όσο και 10min και 30min μετά από εξαντλητική άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο (Kim et al., 2005).

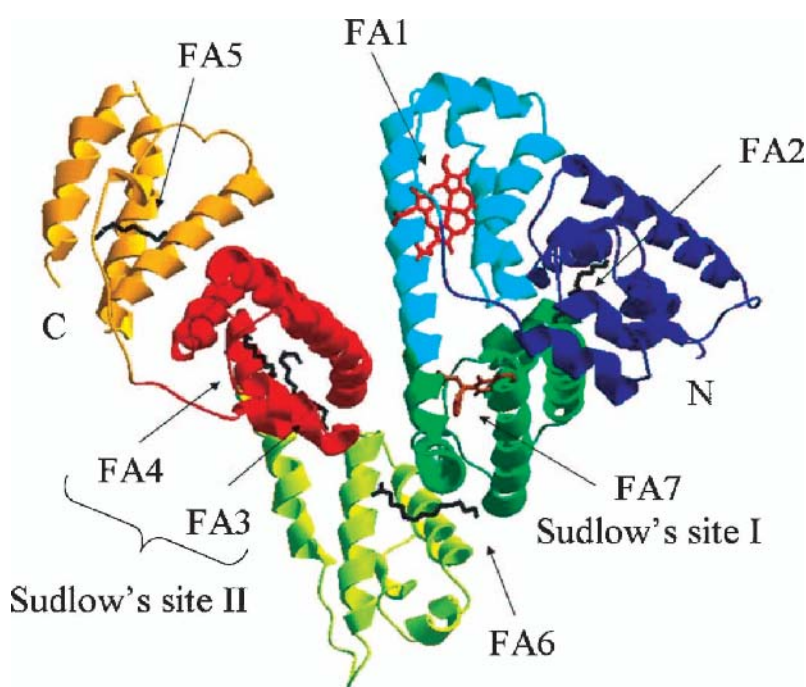
Τέλος, μετά από χορήγηση εκχυλίσματος από μαύρη σταφίδα στον άνθρωπο πριν την άσκηση αλλά και σε κυτταρικά μοντέλα βρέθηκε μείωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αλλά και μείωση της προκαλούμενης από την άσκηση φλεγμονής (Lyall et al., 2009).

1.10. ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ

Η αλβουμίνη είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος. Είναι αρνητικά φορτισμένη και συντίθεται κυρίως στο ήπαρ (Quinlan et al., 2005) ενώ έχει αποδειχθεί ότι συντίθεται επίσης και σε σκελετικούς μύες επίμυων (Yamada et al., 1984). Εξάγεται από το ήπαρ σε μη-γλυκοσυλιωμένη μορφή, που φτάνει στο αίμα σε συγκέντρωση περίπου 0,7mM. Η ανθρώπινη αλβουμίνη αποτελεί περίπου το 60% των πρωτεϊνών του πλάσματος. Είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη 68kD, που αποτελείται από 585 αμινοξέα και χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 4. Το μόριο της αλβουμίνης αποτελείται από τρεις ομόλογες περιοχές (I, II, III). Η καθεμία αποτελείται από δύο ξεχωριστές ελικοειδείς υποπεριοχές (A και B). Στην υποπεριοχή ΙΑ προσδένονται ογκώδη ετεροκυκλικά ανιόντα ενώ στην υποπεριοχή ΙΙΑ προσδένονται αρωματικά

καρβοξύλια (Fasano et al., 2005). Ο χρόνος ημιζωής της αλβουμίνης είναι περίπου 20 μέρες (Bourdon et al., 1999) αλλά ασθένειες ή οξειδωτική βλάβη μπορούν να μειώσουν το χρόνο αυτό. Στο μόριο της αλβουμίνης προσδένονται, επίσης, ενδογενή και εξωγενή συστατικά, όπως λιπαρά οξέα, μεταλλικά ιόντα και χοληστερόλη.

Οι κύριες λειτουργίες της αλβουμίνης είναι η διατήρηση της οσμωτικής πίεσης, η μεταφορά διαφόρων μορίων και η προσωρινή αποθήκευση αμινοξέων (Ellmeier et al., 2000). Έχει θέσεις δέσμευσης για διάφορα συστατικά, όπως ορμόνες, μεταλλικά ιόντα και ξеноβιοτικά. Ακόμα, φάρμακα και μεταβολίτες προσδένονται με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η αποτελεσματικότητά τους. Επίσης, δρα ως ένζυμο έχοντας δράση ενολάσης και εστεράσης (Drmanovitz et al., 1999; Masson et al., 2007). Η αλβουμίνη έχει και αντιοξειδωτική δράση καθώς προστατεύει από την υπεροξείδωση των λιπιδίων, που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες (Quinlan et al., 2005). Αλλαγές στη δομή της αλβουμίνης προκαλούν τροποποιήσεις στις βιολογικές ιδιότητές της. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να εμφανιστούν κατά τον ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη. Η γλυκόζη συνδέεται με μη ενζυμικό ομοιοπολικό τρόπο σε μια πλευρική αλυσίδα λυσίνης της αλβουμίνης *in vivo*. Περίπου 6 - 10% της αλβουμίνης είναι τροποποιημένη με μη ενζυμική γλυκοσυλίωση ποσοστό το οποίο αυξάνει 2 με 3 φορές στην υπεργλυκαιμία.



Εικόνα 1: Η δομή της αλβουμίνης

Η οξειδοαναγωγική κατάσταση της αλβουμίνης επηρεάζεται από την άσκηση. Η πρωτεΐνη περιέχει ένα κατάλοιπο κυστεΐνης, που δε συμμετέχει σε δισουλφιδικό δεσμό. Αυτή η κυστεΐνη-34 μπορεί να υπάρχει σε διάφορες μορφές. Η μερκαπταλβουμίνη (HMA) είναι η μορφή, στην οποία η αλβουμίνη έχει ελεύθερη μια ομάδαθειόλης στην κυστεΐνη-34. Αντίθετα, η κατάσταση της οξειδωμένης αλβουμίνης είναι η μη-μερκαπταλβουμίνη (HNA1), όπου η κυστεΐνη-34 σχηματίζει ένα δισουλφίδιο με χαμηλού μοριακού βάρους συστατικά που περιέχουνθειόλες. Υπάρχει και μια πιο οξειδωμένη μορφή, η HNA2. Το οξειδωτικό βήμα από την HMA στην HNA1 είναι αναστρέψιμο, ενώ η οξείδωση της HNA2 είναι λιγότερο αντιστρεπτή (Lamprecht et al., 2009). Τα κατάλοιπα μεθειονίνης (6 στην HSA) είναι ευαίσθητα στην οξείδωση της αλβουμίνης. Η μεθειονίνη είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην οξείδωση και μια μεγάλη ποικιλία οξειδωτικών οδηγεί στην παραγωγή σουλφιδίων μεθειονίνης. Τα σουλφίδια μεθειονίνης μπορούν να μετατραπούν πάλι σε μεθειονίνη με ήπιες αναγωγικές ουσίες, ενώ ο σχηματισμός σουλφονίων είναι βιολογικά μη αναστρέψιμος. Η οξείδωση των καταλοίπων μεθειονίνης στα βιολογικά συστήματα θα μπορούσε να αποτελέσει σύστημα δέσμευσης των ROS για να προστατέψει τις πρωτεΐνες από εκτεταμένες τροποποιήσεις (Roche et al., 2008).

Η άσκηση σχετίζεται με το οξειδωτικό στρες (Nikolaidis et al., 2006). Έχει αναφερθεί ότι η άσκηση επάγει οξείδωση μακρομορίων, όπως DNA, λιπίδια και πρωτεΐνες ιστών. Κατά τη διάρκεια της αερόβιας εξαντλητικής άσκησης παράγονται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες προκαλούν αλλαγές στο μόριο της αλβουμίνης. Αυτές οι αλλαγές επηρεάζουν τη διαμόρφωση του μορίου και τις δεσμευτικές του ικανότητες (Halliwell & Gutteridge, 1999; Lamprecht et al., 2008). Σε παλαιότερη εργασία του εργαστηρίου μας έχει δειχτεί ότι η αερόβια εξαντλητική άσκηση προκαλεί επαγωγή της λιπιδικής υπεροξειδωσης στα ερυθροκύτταρα και το γαστροκνήμιο μυ (Veskoukis et al., 2008).

Η αλβουμίνη πιστεύεται ότι δεσμεύει υδροξύλια ή άλλες ελεύθερες ρίζες μέσω ενός καταλοίπου ελεύθερης σουλφυδρυλομάδας στην κυστεΐνη-34 (Gutteridge 1986). Όταν υπάρχει οξειδωτικό στρες το μόριο της αλβουμίνης οξειδώνεται αντιστρεπτά και η κυστεΐνη-34 σχηματίζει ένα δισουλφίδιο με χαμηλού μοριακού βάρουςθειόλες (Carballal et al., 2006). Υπάρχουν μελέτες, οι οποίες έχουν δείξει την επίδραση της έντονης άσκησης στο οξειδοαναγωγικό σύστημα της ανθρώπινης αλβουμίνης του ορού (Imai et al., 2002; Lamprecht et al., 2008, 2009). Πιο συγκεκριμένα, βρήκαν ότι η έντονη άσκηση αυξάνει την οξειδωμένη αλβουμίνη

(Imai et al., 2002) και οι οξειδωτικές τροποποιήσεις εξαρτώνται από την ένταση της άσκησης (Lamprecht et al., 2008, 2009). Επιπλέον, η οξειδωμένη αλβουμίνη έχει προταθεί σαν δείκτης οξειδωτικού στρες (Lamprecht et al., 2009). Γενικά, τα επίπεδα θειόλης είναι αξιόπιστος δείκτης οξειδωτικού στρες (Quinlan et al., 2005). Όμως είναι δύσκολο να εκτιμηθεί το οξειδωτικό στρες χρησιμοποιώντας χαμηλού μοριακού βάρους θειόλες, καθώς αυτές είναι ευαίσθητες στην οξειδωτική καταστροφή και η μέτρησή τους δεν είναι εύκολη, ιδιαίτερα στο αίμα. Παρόλα αυτά, η μέτρηση σταθερά οξειδωμένων ομάδων θειόλης, όπως τα διμερή αλβουμίνης είναι πιο πρακτική (Ogasawara et al., 2006). Τα διμερή αλβουμίνης είναι οξειδωμένα προϊόντα που προέρχονται από την αντίδραση με υπεροξείδια και γι' αυτό το λόγο η παρουσία τους στους ιστούς αποτελεί ένδειξη οξειδωτικού στρες (Ogasawara et al., 2006). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι τα διμερή αλβουμίνης σχηματίζονται στο ανθρώπινο πλάσμα μετά την έκθεση σε οξειδωτικά και σε ασθενείς με αιμόλυση, μια νεφρική ασθένεια στην οποία εμφανίζεται οξειδωτικό στρες (Ogasawara et al., 2006).

1.11. ΣΚΟΠΟΣ

Σε παλαιότερη εργασία του εργαστηρίου μας μελετήθηκε η επίδραση της εξαντλητικής αερόβιας άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης, ενός αναστολέα της οξειδάσης της ξανθίνης. Στη συγκέντρωση της αλβουμίνης σε τρεις σκελετικούς μύες, γαστροκνήμιο, υποκνημίδιο και μακρύ εκτείνοντα τους δακτύλους καθώς και στον καρδιακό μυ και το ήπαρ σε επίμυες. Μετά την άσκηση βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της αλβουμίνης αυξήθηκε και στους τρεις σκελετικούς μύες, μειώθηκε όμως στην καρδιά. Στο ήπαρ παρέμεινε ανεπηρέαστη. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Θεωρήθηκε πιθανόν ότι η αλβουμίνη εμπλέκεται στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό των σκελετικών μυών σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με το ήπαρ και την καρδιά. Και αυτό συμβαίνει διότι οι σκελετικοί μύες εμπλέκονται άμεσα στο κολύμπι. Ωστόσο, είναι πιθανόν η ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού μηχανισμού της αλβουμίνης να εξαρτάται από το είδος του οξειδωτικού στρες αλλά και από την παρέμβαση που χρησιμοποιείται κάθε φορά.

Σκοπός, λοιπόν, αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της άσκησης και της χορήγησης ενός αντιοξειδωτικού εκχυλίσματος από σταφύλι στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο πλάσμα και σε ιστούς επιμύων. Το εκχύλισμα αυτό προέρχεται από τους καρπούς του σταφυλιού μπατίκι Τυρνάβου. Έχει βρεθεί στο εργαστήριό μας ότι έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς βρέθηκε ότι αδρανοποιεί τις ελεύθερες ρίζες DPPH και ABTS, αναστέλλει την επιβλαβή δράση των ριζών περοξυλίου και υδροξυλίου στο DNA αλλά αναστέλλει και τα αντιοξειδωτικά ένζυμα καταλάση και υπεροξειδική δισμουτάση δρώντας προοξειδωτικά καθώς και την οξειδάση της ξανθίνης,.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματόζωα

Για την εκτέλεση του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 40 ένηβοι αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar ηλικίας 9 εβδομάδων και βάρους $285 \pm 5\text{g}$ (mean \pm SEM), οι οποίοι αποκτήθηκαν από το Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur. Οι επίμυες διατηρήθηκαν κάτω από ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (12ωρη εναλλαγή φωτός/σκοταδιού και θερμοκρασία 20°C) σε κλουβιά των τριών και η χορήγηση τροφής και νερού γινόταν ελεύθερα.

2.2. Πειραματικές ομάδες

Οι επίμυες χωρίστηκαν σε 4 ομάδες των 10 ατόμων, ως ακολούθως.

1^η ομάδα: 10 επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός και θανατώθηκαν 1h μετά.

2^η ομάδα: 10 επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός, 1h μετά έκαναν άσκηση και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση.

3^η ομάδα: 10 επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε εκχύλισμα και θανατώθηκαν 1h μετά.

4^η ομάδα: 10 επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε εκχύλισμα, 1h μετά έκαναν άσκηση και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση.

Το εκχύλισμα χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε συγκέντρωση 300mg/kg σωματικού βάρους του κάθε επίμυος.

2.3. Εξοικείωση επιμύων

Πριν ξεκινήσει το πείραμα οι επίμυες έμειναν στο χώρο του πειράματος για 3 μέρες χωρίς να κάνουν τίποτα. Ακολούθησε η εξοικείωσή τους με το νερό για 5 μέρες. Την 1^η μέρα παρέμειναν στο νερό για 10min χωρίς φορτίο στην ουρά τους. Για τις επόμενες 2 μέρες κολυμπούσαν για 10min με φορτίο ίσο με το 1% του σωματικού τους βάρους. Και τις 2 τελευταίες μέρες το φορτίο αυξήθηκε στο 2%. Τέλος ξεκουράστηκαν για 3 μέρες πριν λάβει μέρος το πρωτόκολλο της κολύμβησης.

2.4. Πρωτόκολλο κολύμβησης

Η άσκηση, η οποία εφαρμόστηκε ήταν αερόβια εξαντλητική κολύμβηση και διήρκησε περίπου 45 min. Ο χώρος κολύμβησης ήταν μια δεξαμενή βάθους 0,7m και διαμέτρου 1,0m. Η θερμοκρασία του νερού ήταν 33-36°C. Κατά την άσκηση προσδέθηκε στη βάση της ουράς των επιμύων βάρος ίσο με το 4% του σωματικού τους βάρους του κάθε ζώου. Το κολύμπι επιλέχθηκε γιατί σε αντίθεση με το τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο είναι μια μορφή άσκησης που προκαλεί περιορισμένη μυϊκή καταστροφή (Komulainen et al., 1995). Γι' αυτό το λόγο οποιαδήποτε επίδραση της κολύμβησης στο οξειδωτικό στρες δεν οφείλεται στην μυϊκή καταστροφή, η οποία είναι γνωστό ότι αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Nikolaidis et al., 2006).

2.5. Θανάτωση των επιμύων, συλλογή και ομογενοποίηση των δειγμάτων και μετρήσεις

Οι επίμυες θανατώθηκαν με αποκεφαλισμό μετά από σύντομη έκθεση σε αιθέρα. Το αίμα συλλέχθηκε σε σωληνάρια με EDTA, τα οποία φυγοκεντρήθηκαν αμέσως στα 1370g για 10min στους 4°C για τη λήψη του πλάσματος. Τα δείγματα των ιστών συλλέχθηκαν χειρουργικά και τοποθετούνταν σε υγρό άζωτο. Η ομογενοποίηση έγινε με γουδί και γουδοχέρι. Ο ιστός ομογενοποιήθηκε σε ένα PBS pH 7,4 που περιείχε 138mM NaCl, 2,7mM KCL και 1mM EDTA καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών, απροτινίνη (10mg/mL), λιουπεπτίνη (1mg/mL) και PMSF (9mg/mL). Ο ομογενοποιημένος ιστός ανακινήθηκε βίαια, υπέστη σπάσιμο με υπερήχους, φυγοκεντρήθηκε στα 12000g για 30min στους 4°C και συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Η αλβουμίνη μετρήθηκε φωτομετρικά με βάση το σχηματισμό ενός έγχρωμου συμπλόκου με το αντιδραστήριο πράσινο της βρωμοκρεσόλης (Doumas et al., 1971). Η ολική πρωτεΐνη υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

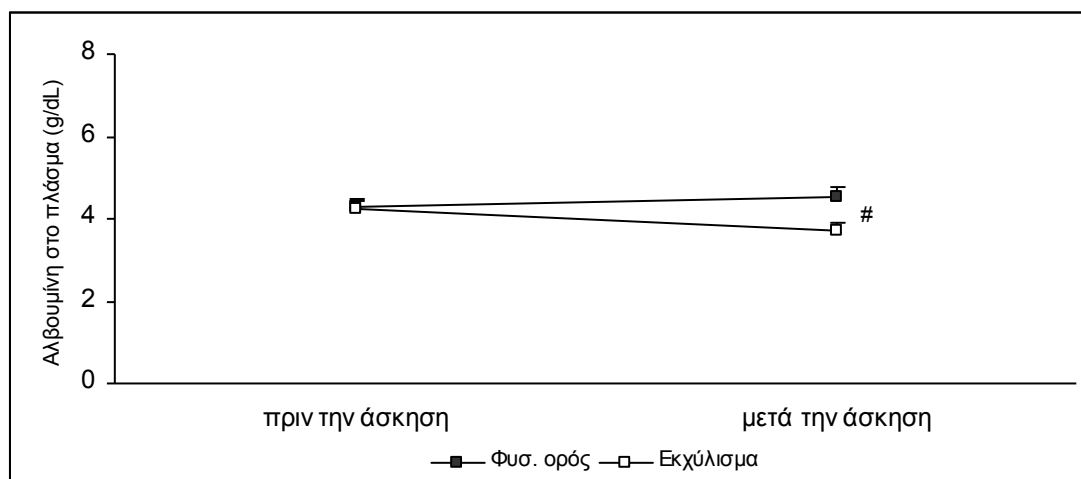
2.6. Στατιστική ανάλυση

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αλβουμίνη στο πλάσμα

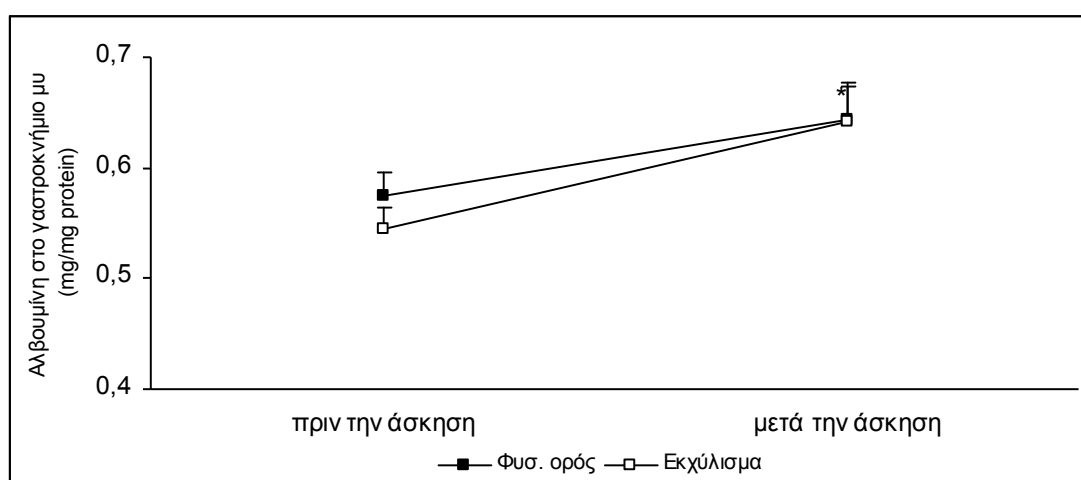
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης μειώθηκε μετά την άσκηση στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα σε σχέση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός.



Διάγραμμα 1: Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο πλάσμα. #Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στη χορήγηση φυσιολογικού ορού και εκχυλίσματος μετά την άσκηση ($P < 0,05$).

3.2. Αλβουμίνη στο γαστροκνήμιο μυ

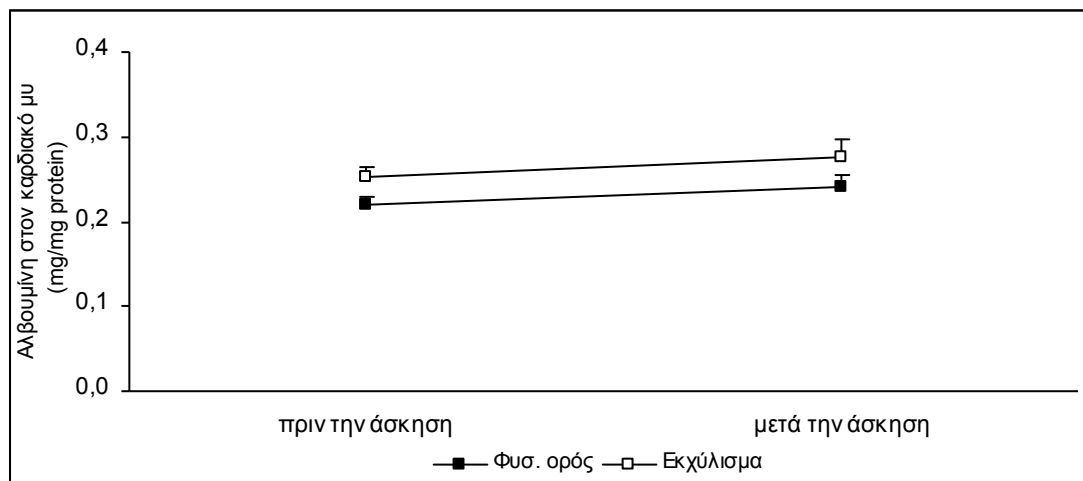
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης με το εκχύλισμα και τάση αύξησής της με την άσκηση.



Διάγραμμα 2: Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο γαστροκνήμιο μυ. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή πριν στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0,05$).

3.3. Αλβουμίνη στον καρδιακό μυ

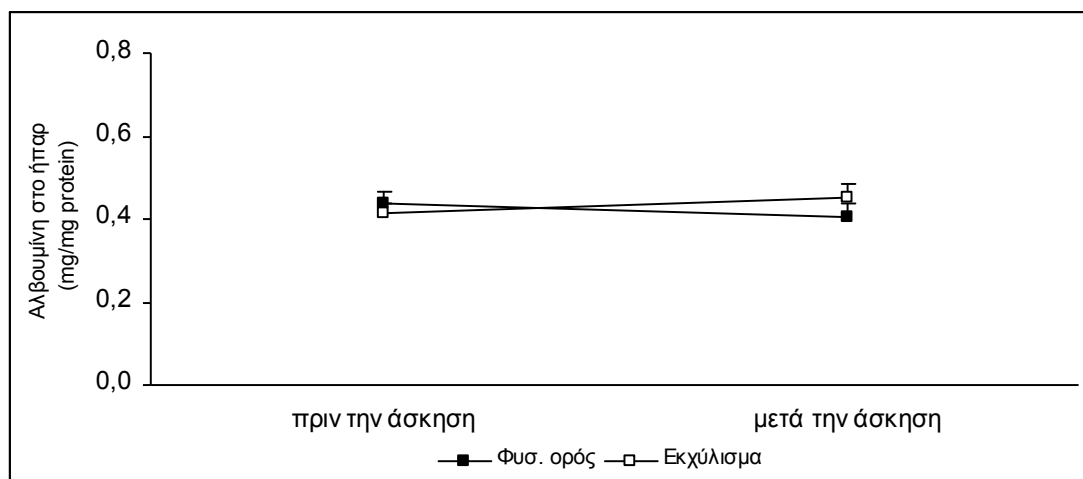
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης βρέθηκε αυξημένη στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα σε σχέση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός.



Διάγραμμα 3: Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον καρδιακό μυ.

3.4. Αλβουμίνη στο ήπαρ

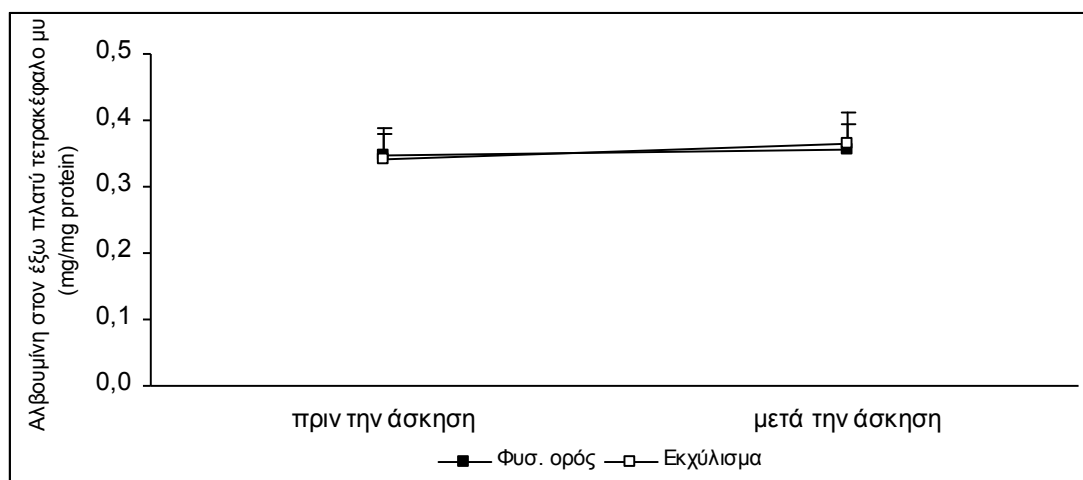
Δεν βρέθηκε καμία επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο ήπαρ.



Διάγραμμα 4: Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο ήπαρ.

3.5. Αλβουμίνη στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ

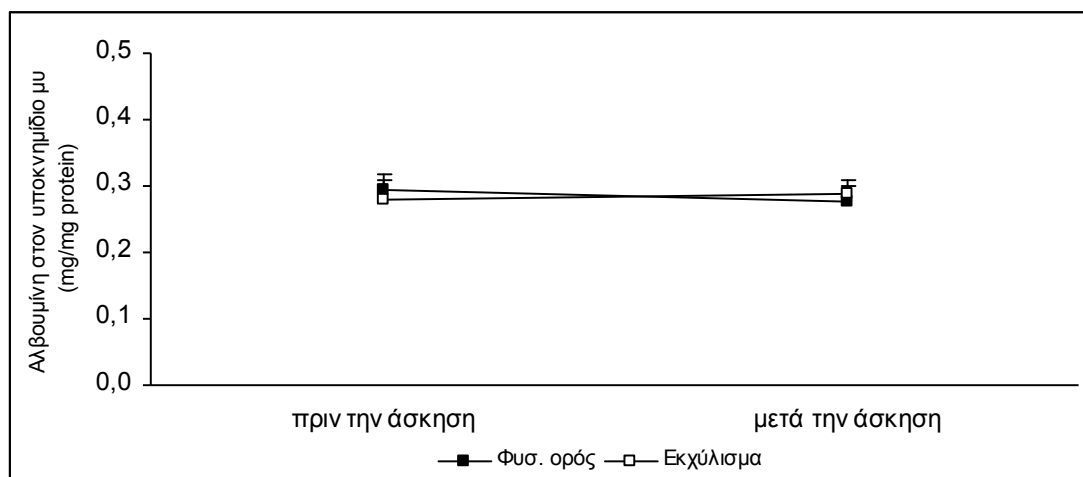
Δεν βρέθηκε καμία επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ.



Διάγραμμα 5: Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ.

3.6. Αλβουμίνη στον υποκνημίδιο μυ

Δεν βρέθηκε καμία επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον υποκνημίδιο μυ.



Διάγραμμα 6: Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον υποκνημίδιο μυ.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην εργασία αυτή μετρήθηκε η συγκέντρωση της αλβουμίνης στο πλάσμα και σε ιστούς επιμύων μετά από άσκηση και χορήγηση εκχυλίσματος σταφυλιού. Παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης στο πλάσμα, ενώ αντίθετα στο γαστροκνήμιο μν παρατηρήθηκε αύξηση μετά την άσκηση, στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε το εκχύλισμα σταφυλιού και τάση αύξησής της στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός. Στον καρδιακό μν η συγκέντρωση της αλβουμίνης βρέθηκε αυξημένη στην ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε εκχύλισμα σε σχέση με την ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε φυσιολογικός ορός ενώ στους υπόλοιπους ιστούς που εξετάστηκαν δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση των παρεμβάσεων.

Η αλβουμίνη είναι ένα μόριο με αντιοξειδωτικές ιδιότητες λόγω των καταλοίπων κυστεΐνης που υπάρχουν στο μόριό της (Gutteridge, 1986). Έτσι, πιστεύεται ότι η αλβουμίνη εξουδετερώνει τις ρίζες υδροξυλίου και τις άλλες ελεύθερες ρίζες μέσω της σουλφυδρυλομάδας στη θέση Cys-34 (Gutteridge, 1986). Σε περιβάλλον οξειδωτικού στρες το μόριο της αλβουμίνης οξειδώνεται αντιστρεπτά και η κυστεΐνη-34 σχηματίζει ένα δισουλφίδιο με χαμηλού μοριακού βάρους θειόλες (Carballal et al., 2006).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν εργασίες σχετικά με τις επιδράσεις της άσκησης στην οξειδοαναγωγική κατάσταση της αλβουμίνης του ορού (Imai et al., 2002; Lamprecht et al., 2008, 2009). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η άσκηση αύξησε την οξειδωμένη αλβουμίνη του ορού (Imai et al., 2002). Έχει, επίσης, προταθεί ότι η οξείδωση της αλβουμίνης του ορού (Lamprecht et al., 2009) αλλά και τα επίπεδα των θειολών (Quinlan et al., 1994) είναι δείκτες οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η έντονη άσκηση αυξάνει την οξειδωμένη μορφή της αλβουμίνης του πλάσματος (Imai et al. 2002) και οι τροποποιήσεις της αλβουμίνης εξαρτώνται από την ένταση της άσκησης (Lamprecht et al. 2008, 2009). Επιπλέον, η οξείδωση της αλβουμίνης του πλάσματος έχει προταθεί ως δείκτης οξειδωτικού στρες (Lamprecht 2009). Γενικά, τα επίπεδα θειολών είναι δείκτες οξειδωτικού στρες (Quinlan et al. 1994). Όμως είναι δύσκολο να εκτιμήσουμε το οξειδωτικό στρες χρησιμοποιώντας θειόλες χαμηλού μοριακού βάρους διότι είναι ευαίσθητες στην οξειδωτική καταστροφή και η μέτρησή τους δεν είναι εύκολη ιδιαίτερα στο αίμα. Τα

αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με την αύξηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης, που παρατηρήσαμε στο γαστροκνήμιο μυ.

Η επίδραση της χορήγησης εκχυλίσματος στη συγκέντρωση της αλβουμίνης δεν ήταν όμοια συγκριτικά με την επίδραση της άσκησης. Μια ανάλογη διαφορά σε παρόμοιες παρεμβάσεις έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενη εργασία όπου η συγκέντρωση της αλβουμίνης στον ορό αυξήθηκε μετά την άσκηση αλλά έμεινε ανεπηρέαστη μετά από τη χορήγηση εξωγενών αντιοξειδωτικών (Lamprecht et al., 2008). Σε μία εργασία του εργαστηρίου μας παρατηρήθηκε, επίσης, τέτοια διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και τη χορήγηση ενός μορίου που επηρεάζει την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών, όπως είναι η αλλοπουρινόλη (Veskoukis et al., 2010). Πιο συγκεκριμένα, η άσκηση αύξησε τη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο γαστροκνήμιο, τον υποκνημίδιο και το μακρύ εκτείνοντα τους δακτύλους μυ ενώ δεν επηρεάστηκε από τη χορήγηση αλλοπουρινόλης. Μία πιθανή εξήγηση για την ασυμφωνία αυτή είναι ότι η αύξηση των επιπέδων της αλβουμίνης εξαρτάται από το είδος του ερεθίσματος, που προκαλεί οξειδωτικό στρες. Κάτι τέτοιο έχει αναφερθεί και από προηγούμενη εργασία, στην οποία η συγκέντρωση της αλβουμίνης αυξήθηκε σε περίπτωση διαβήτη (όπου προκαλείται συστηματικό οξειδωτικό στρες) και όχι σε περιπτώσεις καταρράκτη ή μυικών παθήσεων σχετικών με την ηλικία (όπου προκαλείται τοπικό οξειδωτικό στρες) (Oettl et al., 2010).

Πολλές μελέτες αναφέρουν ότι η άσκηση επάγει το οξειδωτικό στρες στο αίμα, στο γαστροκνήμιο, τον υποκνημίδιο και τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ (Nikolaidis et al., 2006; Veskoukis et al., 2008; You et al., 2005; McArdle et al., 1999). Οι σκελετικοί μύες των οπίσθιων άκρων των επιμύων εμπλέκονται άμεσα στην κολύμβηση, έτσι είναι πιο ευαίσθητοι στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την άσκηση. Γι' αυτό το λόγο παρατηρήθηκε και αυξημένη συγκέντρωση της αλβουμίνης στο γαστροκνήμιο μυ. Αντίθετα, η συγκέντρωσή της βρέθηκε μειωμένη στο πλάσμα διότι φαίνεται ότι μεταφέρεται από το αίμα μέσα στο μυ, ο οποίος επηρεάζεται από το οξειδωτικό στρες και έχει περισσότερο ανάγκη τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες της αλβουμίνης.

Παρά το γεγονός ότι η συγκέντρωση της αλβουμίνης αυξήθηκε μετά την άσκηση στο γαστροκνήμιο μυ, δεν παρατηρήθηκε επίδραση της άσκησης στους υπόλοιπους ιστούς. Υποθέτουμε ότι η αλβουμίνη συμμετέχει κυρίως στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του γαστροκνήμιου μυός, ο οποίος είναι ο κύριος με που δραστηριοποιείται στο κολύμπι. Επίσης, έχουν γίνει διάφορες μελέτες τόσο σε ζώα

όσο και σε ανθρώπους που εξετάζουν την επίδραση εκχυλισμάτων σε δείκτες οξειδωτικού στρες. Σε ορισμένες από αυτές έχουν βρεθεί αυξήσεις και σε άλλες μειώσεις. Αυτό εξαρτάται από το εκχύλισμα που χορηγείται κάθε φορά και από τον τρόπο που αυτό επηρεάζει το προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες.

Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής φαίνεται να ενισχύουν ως ένα βαθμό την αρχική υπόθεση, η οποία υποστήριζε ότι η αλβουμίνη συμμετέχει στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του οργανισμού όταν αυτός αυξάνεται σε περιβάλλον οξειδωτικού στρες. Ωστόσο, η αύξησή της φαίνεται να εξαρτάται από το είδος του οξειδωτικού στρες και από την παρέμβαση, που εφαρμόζεται κάθε φορά. Η παρατήρηση αυτή ίσως είναι ένας περιορισμός για τη χρησιμοποίηση της αλβουμίνης σα δείκτη οξειδωτικού στρες. Ο μηχανισμός μεταφοράς της αλβουμίνης στους ιστούς, η πιθανότητα η αύξηση των επιπέδων της να εξαρτάται από το ερέθισμα που εφαρμόζεται κάθε φορά και ο ακριβής της ρόλος στην αντιοξειδωτική άμυνα, λοιπόν, χρήζουν περαιτέρω έρευνας.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πρωτόκολλο αλβουμίνης

Αρχή της μεθόδου

Η προσθήκη αλβουμίνης σε ένα διάλυμα με πράσινο της βρωμοκρεσόλης και σε 0,075M διαλύματος ηλεκτρικού οξέος με pH 4,2 έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης στα 628 nm.

Αντιδραστήρια

Ηλεκτρικό οξύ 0,1M pH 4.

Διάλυμα πράσινου της βρωμοκρεσόλης συγκέντρωσης 0,6mM.

Διάλυμα Brij-35 30%.

Διάλυμα χρωστικής: Αραιώνουμε έναν όγκο από stock διάλυμα BCG με τρεις όγκους 0,1M ηλεκτρικού οξέος, προσθέτουμε 4mL 30% Brij-35 ανά λίτρο και προσαρμόζουμε το pH στο 4,2.

Διαλύματα αλβουμίνης γνωστών συγκεντρώσεων 2, 3, 4, 5 και 6g/dL για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης

Πειραματική διαδικασία

Πέντε μL από ομογενοποιημένο ιστό ή πλάσμα προστίθενται σε 995 μL χρωστικής. Το διάλυμα ανακινείται έντονα σε vortex και αφήνεται για 10 λεπτά στους 25°C. Το τυφλό αποτελείται από 1000 μL χρωστικής. Η απορρόφηση μετράται στα 628nm αφού μηδενίσουμε αρχικά το φωτόμετρο με το τυφλό.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση της αλβουμίνης υπολογίζεται με βάση την καμπύλη των γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E, et al. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 2005; 84 (1): 1-7.
2. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25 (2): 218-24.
3. Alessio HM. Lipid peroxidation in healthy and diseased models: Influence of different types of exercise. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier Science, 2000; 115–127.
4. Alessio HM, Goldfarb AH. Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: Adaptive response to training. *J Appl Physiol* 1988; 64(4):1333–1336.
5. Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (9): 1260-7.
6. 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.
7. Bloomer R, Goldfarb A, Wideman L, McKenzie M, Consitt L. Effects of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress *Journal of strength and conditioning research* 2005; 19(2), 276-285
8. Bourdon et al. 1999. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin.
9. Carballal S, Alvarez B, Turell L, Botti H, Freeman BA, Radi R. Sulfenic acid in human serum albumin. *Amino Acids* 2006; 32: 543–51.
10. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49(3):481-93.
11. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2002; 30 (2): 280-5.
12. Das KC, Lewis-Molock Y, White CW. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 713-26.
13. Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 2001; 10: 125-40.

14. Davies KJA, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, et al. Uric acid-iron ion complexes: a new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 1986; 235: 747-54.
15. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (11): 1102-15.
16. Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971; 31: 87-96.
17. Ellmerer M, Schaupp L, Brunner G, Sendlhofer G, Wutte A, Wach P, Pieber P. Measurement of interstitial albumin in human skeletal muscle and adipose tissue by open-flow microperfusion. 2000; 278:352-356,.
18. Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72 (S): 647-52.
19. Fasano M, Curry S, Terreno E, et al. (2005). The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. Department of Structural and Functional Biology, University of Insubria, Italy: 788.
20. Fehrenbach E, Northoff H. Free radicals, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev* 2001; 7: 66-89.
21. Finaud J, Lac Gerard, Filaire E. Oxidative Stress Relationship with Exercise and Training. *Sports Med* 2006; 36 (4): 327-358.
22. Frederiks WM, Bosch KS. The role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion damage of rat liver. *Histol Histopathol* 1995; 10: 111-6.
23. Gopi S, Setty OH. Beneficial effect of the administration of *Hemidesmus indicus* against bromobenzene induced oxidative stress in rat liver mitochondria. *J Ethnopharmacol*. 2009.
24. Gunther MR, Sampath V, Caughey WS. Potential roles of myoglobin autoxidation in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1999; 26 (11-12): 1388-95.
25. Gutteridge JM. Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochim Biophys Acta* 1986; 869: 119-127.
26. Halliwell B and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford Univesrity Press, Midsomer Norton, Avon, England.

27. Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Bioenerg Biomembr.* 1997; 29:89-95.
28. Hellsten Y, Sjodin B, Richter EA, et al. Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am J Physiol* 1998; 274: E600-6.
29. Imai H, Hayashi T, Negawa T, Nakamura K, Tomida M, Koda K, Tajima T, Koda Y, Suda K, Era S. Strenuous exercise-induced change in redox state of human serum albumin during intensive kendo training. *Japanese journal of physiology,* 2002; 52: 135-140.
30. Jenkins RR, Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med Sci Sport Exerc* 1993; 25 (2): 210-2.
31. Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156-170.
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; 45(2):178-82.
33. Kim S, Park SH, Lee HN, Park T. Prunus mume extract ameliorates exercise-induced fatigue in trained rats. *J Med Food.* 2008; 11(3):460-8.
34. 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.
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. Lamprecht M, Greilberger JF, Schwabergger G, Hofmann P, Oetl K. Single bouts of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups on plasma protein of trained men in a workload-dependent manner. *J Appl Physiol* 2008; 104: 1611-1617.
37. Lamprecht M, Oetl K, Schwabergger G, Hofmann P, Greilberger JF. Protein modification responds to exercise intensity and antioxidant supplementation. *Med Sci Sports Exerc* (2009); 41(1):155-63.
38. 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.

39. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem*. 2001; 8(7): 829-38.
40. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (9): 790-6.
41. Li Y, Koike K, Che Q, Yamaguchi M, Takahashi S. Changes in lactate dehydrogenase and 3-hydroxyacetyl-CoA dehydrogenase activities in rat skeletal muscle by the administration of *Eucommia ulmoides* OLIVER leaf with spontaneous running-training. *Biol Pharm Bull* 1999; 22(9):941-6.
42. 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.
43. 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.
44. Masson P, Froment MT, Darvesh S, Schopfer LM, Lockridge O. Aryl acylamidase activity of human serum albumin with o-nitrotrifluoroacetanilide as the substrate. 2007; 22(4):463-9.
45. Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG. Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 2001; 31 (7): 911-22.
46. May JM, Qu Z, Whitesell RR, et al. Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med* 1996; 20 (4): 543-51.
47. McCarter RJM. In *Studies in Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Eds, Sen C, Packer L, Hanninen O, Amsterdam, 2000, pp 797-830.
48. McCord, JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1968; 243: 5753-5760.
49. Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1972; 247: 6960-2
50. Morihara N, Ushijima M, Kashimoto N, Sumioka I, Nishihama T, Hayama M, Takeda H. Aged garlic extract ameliorates physical fatigue. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(5):962-6.
51. Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation for lipids. *J Lipid Res* 1983; 24(8):1070-6.

52. 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.
53. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 1999; 13: 295-309.
54. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc* 2006; 38: 1443-1450.
55. Nikolaidis MG, Kyparos A, Hadziioannou M, Panou N, Samaras L, Jamurtas AZ, Kouretas D. Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Appl Physiol Nutr Metab* 2007; 32: 197-205.
56. 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; 42(5):447-9.
57. Ogasawara Y, Namai T, Togawa T, Ishii K. Formation of albumin dimmers induced by exposure to peroxides in human plasma: a possible biomarker for oxidative stress. 2006; 340(2):353-8.
58. Paula FB, Gouvêa CM, Alfredo PP, Salgado I. Protective action of a hexane crude extract of *Pterodon emarginatus* fruits against oxidative and nitrosative stress induced by acute exercise in rats. *BMC Complement Altern Med* 2005; 17:5-17.
59. Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 2000; 58: 1025-33.
60. Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. 2005; 41(6):1211-9.
61. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (1-2): 69-74.
62. 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.
63. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, et al. Reactive oxygen in skeletal muscle I: intracellular oxidant kinetics and fatigue in- vitro. *J Appl Physiol* 1992; 73 (5): 1797-804.
64. Roche M, Rondeau P, Singh R, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties

- of serum albumin. *FEBS Letters* 2008; 582: 1783–1787.
65. Saada HN, Said UZ, Meko NH, Abd El Azime AS. Grape seed extract *Vitis vinifera* protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorders in rats. *Phytother Res.* 2009 Mar;23(3):434-8.
 66. Schneider BS, Tiidus PM. Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? *Sports Med* 2007; 37:837-856.
 67. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 368-70.
 68. Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 653S-69S.
 69. Sies H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press.
 70. Sjodin B, Hellsten WY, Apple FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 1990; 10:236-254.
 71. Skarpanska-Stejnborn A, Pilaczynska-Szczesniak L, Basta P, Deskur-Smielecka E. The influence of supplementation with *Rhodiola rosea* L. extract on selected redox parameters in professional rowers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2009; 19(2):186-99.
 72. Skarpanska-Stejnborn A, Pilaczynska-Szczesniak L, Basta P, Deskur-Smielecka E, Horoszkiewicz-Hassan M. The influence of supplementation with artichoke (*Cynara scolymus* L.) extract on selected redox parameters in rowers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2008; 18(3):313-27.
 73. St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J.Biol.Chem* 2002; 277:44784-44790.
 74. Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Proteolysis, free radicals and aging. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(1):29-36.
 75. Tavazzi B, Di Pierro D, Amorini AM, et al. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *Eur J Biochem* 2000; 267: 684-9.
 76. Tessier F, Margaritis I, Richard MJ, et al. Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27 (3): 390-6.

77. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000; 16 (7-8): 716-8.
78. Veskokoukis 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.
79. Veskokoukis AS, Kyparos A, Stagos D, Kouretas D. Differential effects of xanthine oxidase inhibition and exercise on albumin concentration in rat tissues. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 2010; in press.
80. Vina J, Borras C, Gomez-Cabrera MC, Orr WC. Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signaling and gene expression. Role of reactive oxygen species and (phyto)oestrogens in the modulation of adaptive response to stress. *Free Radic Biol Med* 2006; 40:111-119.
81. Voces J, Alvarez AI, Vila L, Ferrando A, Cabral de Oliveira C, Prieto JG. Effects of administration of the standardized Panax ginseng extract G115 on hepatic antioxidant function after exhaustive exercise. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1999; 123(2):175-84.
82. 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; 37(12):1863-71.
83. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, et al. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 408-19.
84. Willcox JK, Catignani GL, Roberts LJ. Dietary flavonoids fail to suppress F2-isoprostane formation in-vivo. *Free Radic Biol Med* 2002; 34 (7): 795-9.
85. Yamada S, Tomino S, Izumi S, Akino M. Purification, molecular properties and biosynthesis of a specific protein component induced under compensatory hypertrophy in the rat skeletal muscle. 1984; 798(2):260-7.
86. Young IS, McEneaney J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29:358–362.
87. 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; 84(10):1071-9.