

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΕΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη δεικτών οξειδωτικού στρες σε  
αθλητές υπό την επίδραση αναβολικών  
παραγόντων

ΙΩΑΝΝΙΔΗΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ  
ΣΕΠΤΕΜΒΡΗΣ 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4647/1  
Ημερ. Εισ.: 08-03-2006  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΙΩΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087832

---

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία προσεγγίστηκε η σχέση της κατανάλωσης αναβολικών ουσιών (στανολόλης και αυξητική ορμόνης) και διατροφικών αντιοξειδωτικών παραγόντων (βιταμίνες C και E) και του οξειδωτικού στρες στο αίμα αθλητών bodybuilders. Η χορήγηση στανολόλης μείωσε τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού έναντι του DPPH, ενώ η αυξητική ορμόνη την επανέφερε στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου. Η συγκέντρωση της GSH βρέθηκε αυξημένη στην ομάδα αθλητών που έλαβαν στανολόλη και αντιοξειδωτικά, ενώ επανήλθε στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου μετά από χορήγηση αυξητικής ορμόνης. Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι η στανολόλη προκαλεί οξειδωτικό στρες στο αίμα των αθλητών, σε αντίθεση με την GH που φαίνεται ότι σε συνδυασμό με τα συγκεκριμένα αντιοξειδωτικά μειώνει το οξειδωτικό στρες που προκαλεί η χρήση στανολόλης. Τέλος, τα αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις (1 g βιταμίνη E και 600mg βιταμίνη C) φαίνεται ότι ενισχύουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του αίματος των αθλητών.

---

### Τριμελής Επιτροπή

- Κουρέτας Δημήτριος, αναπληρωτής καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας
- Κοσταρόπουλος Ιάσων
- Κυπάρης Αντώνιος

Το πειραματικό μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο *Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών* του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας υπό την καθοδήγηση του κ. *Ιάσων Κοσταρόπουλου* και την επίβλεψη του *Δημήτριου Κουρέτα*, αναπληρωτή καθηγητή του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας.

## Πίνακας περιεχομένων

<i>1 Εισαγωγή</i>	5
<b>1.1 Οξυγόνο</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Ελεύθερες ρίζες</b>	<b>6</b>
1.2.1 Γενικά	6
1.2.2 Πηγές παραγωγής	8
1.2.2.1 Ενδογενείς πηγές	8
1.2.2.2 Εξωγενείς πηγές	9
1.2.3 Βιολογική δράση ελευθέρων ριζών	9
1.2.3.1 Θετικές συνέπειες	10
1.2.3.2 Αρνητικές συνέπειες	10
<b>1.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού</b>	<b>11</b>
1.3.1 Ενζυμικοί	13
1.3.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση	13
1.3.1.2 Καταλάση	15
1.3.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης	16
1.3.1.4 Αναγωγή της γλουταθειόνης	17
1.3.1.6 Συνεργασία των GPx και CAT	17
1.3.2 Μη ενζυμικοί	18
1.3.2.1 Γλουταθειόνη	18
1.3.2.2 Μεταλλικά ιόντα	19
1.3.2.3 Μελατονίνη	20
1.3.2.4 Συνένζυμο Q	20
1.3.2.5 Ουρικό οξύ	20
1.3.2.6 Άλλα αντιοξειδωτικά	20
1.3.3 Διατροφικοί παράγοντες	20
1.3.3.1 Ασκορβικό οξύ	20
1.3.3.2 Βιταμίνη E	21
1.3.3.3 Άλλα αντιοξειδωτικά	22
<b>1.4 Οξειδωτικό stress</b>	<b>22</b>
1.4.1 Γενικά	22
1.4.1.1 Ενδογενείς παράγοντες	22
1.4.1.2 Εξωγενείς παράγοντες	22
1.4.2 Οξειδωτικό stress και σωματική άσκηση	23
1.4.2.1 Ιστορική αναδρομή	23
1.4.2.2 Φυσική άσκηση και οξειδωτικό στρες	23
1.4.2.3 Μηχανισμοί παραγωγής ROS κατά τη σωματική άσκηση	24
1.4.2.3 Σωματική άσκηση και αντιοξειδωτική προσαρμογή	27
<b>1.5 Αναβολικά</b>	<b>28</b>
1.5.1 Αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή (AAS)	28
1.5.1.1 Ιστορική αναδρομή	28
1.5.1.2 Ιατρικές εφαρμογές	31
1.5.1.3 Εφαρμογές στον αθλητισμό	32
1.5.1.4 Παρενέργειες	33
1.5.1.5 Μηχανισμός δράσης	34
1.5.1.5 Ανδρογόνα Αναβολικά Στεροειδή και οξειδωτικό stress	36
1.5.2 Αυξητική ορμόνη (GH)	37

## Περιεχόμενα

1.5.2.1 Δράση της αυξητικής ορμόνης	37
1.5.2.2 Κλινικές εφαρμογές της αυξητικής ορμόνης	39
1.5.2.3 Αυξητική ορμόνη και σωματική άσκηση	39
1.5.2.4 Χορήγηση αυξητικής ορμόνης σε αθλητές	40
1.5.2.5 Παρενέργειες	41
1.5.2.6 Αυξητική ορμόνη και οξειδωτικό στρες	41
<b>1.6 Διατροφική ενίσχυση και σωματική άσκηση</b>	<b>42</b>
1.6.1 Βιταμίνη C	42
1.6.2 Βιταμίνη E	43
1.6.3 Συνδυασμός αντιοξειδωτικών ουσιών	44
<b>1.7 Σκοπός της εργασίας</b>	<b>45</b>
<b>2.1 Υλικά</b>	<b>46</b>
2.1.1 Αντιδραστήρια	46
2.1.2 Πειραματικό Υλικό	46
<b>2.2 Μέθοδοι</b>	<b>46</b>
2.2.1 Σύλλογή ορού αίματος	46
2.2.2 Παρασκευή αιμολύματος	47
2.2.3 Βιοχημικοί παράμετροι	47
2.2.3.1 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού	47
2.2.4.2 TBARS	48
2.2.4.3 Δραστικότητα καταλάσης του ορού	49
2.2.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της GSH	50
2.2.4.5 Ποσοτικός προσδιορισμός της GSSG	51
2.2.5 Στατιστική ανάλυση	53
<b>3 Αποτελέσματα</b>	<b>54</b>
<b>3.1 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού</b>	<b>54</b>
<b>3.2 TBARS</b>	<b>55</b>
<b>3.3 Δραστικότητα καταλάσης του ορού</b>	<b>56</b>
<b>3.4 Συγκέντρωση της GSH αιμολύματος</b>	<b>57</b>
<b>3.5 Συγκέντρωση της GSSG αιμολύματος</b>	<b>58</b>
<b>3.6 Προσδιορισμός του λόγου GSH/GSSG</b>	<b>59</b>
<b>4 Συζήτηση</b>	<b>61</b>
<b>5 Βιβλιογραφικές αναφορές</b>	<b>67</b>

## Πίνακας εικόνων

Εικόνα 1: Δραστικές Ενώσεις Οξυγόνου (ROS)	7
Εικόνα 2: Τα λιποκύτταρα παράγουν ιντερλευκίνες που ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα, τα οποία με τη σειρά τους απελευθερώνουν ROS και RNS	9
Εικόνα 3: Μεταβολισμός των ROS	11
Εικόνα 4: Ισορροπία μεταξύ οξειδωτικού στρες και αντιοξειδωτικών μηχανισμών	12
Εικόνα 5: Η ενζυμική αντιοξειδωτική απόκριση των κυττάρων στην αύξηση των ROS	13
Εικόνα 6: Τρισδιάστατη δομή Mn-SOD	15
Εικόνα 7: Τρισδιάστατη δομή καταλάσης	16

## Περιεχόμενα

Εικόνα 8: Τρισδιάστατη δομή της GSH-Px.....	16
Εικόνα 9: Τρισδιάστατη δομή της GR.....	17
Εικόνα 10: Μοριακός τύπος ανηγμένης γλουταθειόνης.....	18
Εικόνα 11: Μοριακός τύπος οξειδωμένης γλουταθειόνης.....	19
Εικόνα 12: Κύκλος αντιδράσεων γλουταθειόνης.....	19
Εικόνα 13: κύκλος ασκορβικού – γλουταθειόνης.....	21
Εικόνα 14: Το ενζυμικό σύστημα της οξειδάσης της ξανθίνης κατά τη σωματική άσκηση.....	25
Εικόνα 15: Ο ρόλος του H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> για τα T-λεμφοκύτταρα.....	25
Εικόνα 16: Στάδια λιπιδικής υπεροξειδωσης.....	27
Εικόνα 17: Χημική δομή τεστοστερόνης.....	30
Εικόνα 18: Χημική δομή στανοζολόλης (Winstrol).....	31
Εικόνα 19: Μηχανισμός δράσης των στεροειδών μέσα στο κύτταρο.....	35
Εικόνα 20: Τρισδιάστατη διαμόρφωση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης.....	37
Εικόνα 21: Χημική δομή βιταμίνης C.....	43
Εικόνα 22: Χημική δομή βιταμίνης E.....	44

## Πίνακας διαγραμμάτων

Διάγραμμα 1: Ραβδόγραμμα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού μεταξύ των τριών ομάδων και της ομάδας ελέγχου.....	55
Διάγραμμα 2: Ραβδόγραμμα TBARS του ορού μεταξύ των τριών ομάδων και της ομάδας ελέγχου.....	56
Διάγραμμα 3: Ραβδόγραμμα για τη δραστηριότητα της καταλάσης του ορού μεταξύ των τριών ομάδων και της ομάδας ελέγχου.....	57
Διάγραμμα 4: Ραβδόγραμμα για τη GSH αιμολύματος μεταξύ των τριών ομάδων και της ομάδας ελέγχου.....	58
Διάγραμμα 5: Ραβδόγραμμα για τη GSSG αιμολύματος μεταξύ των τριών ομάδων και της ομάδας ελέγχου.....	59
Διάγραμμα 6: Ραβδόγραμμα του λόγου GSH/GSSG αιμολύματος μεταξύ των τριών ομάδων και της ομάδας ελέγχου.....	60

## Συντομογραφίες

AA	ασκορβικό οξύ
AAS	Αναβολικά Ανδρογόνα Στεροειδή
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
AH	A-τοκοφερόλη
AMP	Μονοφωσφορική αδενοσίνη
ANOVA	Analysis of variance
APX	Υπεροξειδάση ασκορβικού οξέος
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
CAT	Καταλάση
CK	Κρεατινική κινάση
CoQ10	συνένζυμο Q10
CYP	Κυτόχρωμα P450
DHA	Δεϋδροασκορβικό οξύ
DHAR	Αναγωγή δεϋδροασκορβικού οξέος
DHT	Διδροτεστοστερόνη
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DTNB	5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)

## Περιεχόμενα

E	Οιστραδιόλη
EDTA	Αιθυλενοδιάμινο τετραοξικό οξύ
FAD	Φλαβινο-αδένινο δινουκλεοτίδιο
GH	αυξητική ορμόνη
GHB	Gammahydroxybutyrate
GHRH	Απελευθερωτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης
GIH	Σωματοστατίνη
GPx	Περοξειδάση της γλουταθειόνης
GR	Ρεδουκτάση της γλουταθειόνης
GSH	Ανηγμένη γλουταθειόνη
GSSG	Οξειδωμένη γλουταθειόνη
IGF-1	Ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας
IGFBP-1	Προσδενόμενη πρωτεΐνη στον ινσουλινομιμητικό αυξητικό παράγοντα
L <sup>•</sup>	Λιπιδική ρίζα
LOO <sup>•</sup>	Λιπούπεροξειδική ρίζα
MDA	Μαλανδυαλδεύδη
MDHA	Μονοδεϋδροασκορβικό οξύ
MDHAR	Αναγωγάση μονοδεϋδροασκορβικού οξέος
NAC	n-acetylcysteine
NADPH	Φωσφορικό νικοτάμιδο αδένινο δινουκλεοτίδιο
PMN	Πολυμορφοουδετερόφιλα
PUFAs	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
Q	Ουβικινόνη
QH	Ημικινόνη
QH <sub>2</sub>	Ουβικινόλη
Rec	Υποδοχέας
RNS	Ενεργές ενώσεις αζώτου
ROO <sup>•</sup>	Λιπούπεροξειδική ρίζα
ROOH	Λιπούπεροξείδιο
ROS	Ενεργές ενώσεις οξυγόνου
SOD	Δισμουτάση του υπεροξειδίου
T	Τεστοστερόνη
TBARS	Ενεργά υποστρώματα θειοβαρβιτουρικού οξέος
TCA	Τριχλωροακετικό οξύ
XO	Οξειδάση της ξανθίνης
Δ.Ο.Ε.	Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή

# 1 Εισαγωγή

## 1.1 Οξυγόνο

Η λέξη «οξυγόνο» προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «οξύ» και «γίνομαι» επειδή αρχικά πιστευόταν ότι όλα τα οξέα υποχρεωτικά περιέχουν οξυγόνο. Το οξυγόνο παράγεται από τα φυτά κατά τη φωτοσύνθεση και είναι απαραίτητο για την αερόβια αναπνοή των ζώων. Περίπου 25 δισεκατομμύρια χρόνια πριν συντελείται το πιο σημαντικό ίσως βήμα στην εξέλιξη της ζωής. Θαλάσσιοι μονοκύτταροι οργανισμοί, τα κυανοβακτήρια, χρησιμοποιούν τη φωτοσύνθεση για την παραγωγή της τροφής τους. Με αυτή τη διαδικασία παγιδεύουν την ηλιακή ενέργεια και τη χρησιμοποιούν για τη μετατροπή του  $H_2O$  και του  $CO_2$  σε υδατάνθρακες με ταυτόχρονη απελευθέρωση μοριακού οξυγόνου ( $O_2$ ) στην ατμόσφαιρα.

Σήμερα, εκτός από ορισμένους αναερόβιους οργανισμούς, όλα οι υπόλοιποι χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την παραγωγή της απαιτούμενης για την επιβίωση τους ενέργεια. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η παραγωγή ενέργειας συμβαίνει στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Οι οργανισμοί που μπορούν να επιβιώσουν σε περιβάλλον με οξυγόνο απέκτησαν εξελικτικά τη δυνατότητα να το χρησιμοποιούν στο μεταβολισμό τους, όπως σε ενζυμικά συστήματα οξειδασών, οξυγενασών, υδροξυλασών, αλλά και για την παραγωγή ενέργειας στη διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. [Halliwell and Gutteridge, 1998]. Η διαδικασία αυτή, γνωστή και ως αερόβιος αναπνοή, επικράτησε της αερόβιας ζύμωσης καθ' ότι παράγονται πολύ μεγαλύτερα ποσά ενέργειας. Μάλιστα, είναι τόσο μεγάλη η ποσότητα ATP που παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση που πλέον σήμερα χρησιμοποιείται από τη συντριπτική πλειοψηφία των ζωντανών οργανισμών [Bulkley, 1990]. Τα παράγωγα του οξυγόνου είναι ωστόσο πολύ επικίνδυνα για την ίδια τη ζωή. Ο αερόβιος μεταβολισμός πέρα από τα μεγάλα ενεργειακά ποσά που προσφέρει, συνεπάγεται και παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Έτσι, οι αερόβιοι οργανισμοί, όπως και ο άνθρωπος, έχει εξελικτικά προσαρμοστεί, αναπτύσσοντας ένα σύνολο αντιοξειδωτικών μηχανισμών, ως γραμμή άμυνας για την προστασία τους [Halliwell and Gutteridge 1998].



## 1.2 Ελεύθερες ρίζες

### 1.2.1 Γενικά

Ο γενικός ορισμός της ελεύθερης ρίζας περιλαμβάνει κάθε χημικό άτομο που διαθέτει περιττό αριθμό ηλεκτρονίων σθένους, και συνεπώς διαθέτει τουλάχιστον ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική στοιβάδα. Η διαμόρφωση αυτή είναι εξαιρετικά ασταθής με αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες να αντιδρούν ταχύτατα με άλλα γειτονικά μόρια ή άλλες ελεύθερες ρίζες προκειμένου να αποκτήσουν 4 ζεύγη ηλεκτρονίων στην εξωτερική τους στοιβάδα. Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα είναι ένα άτομο H με ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο [Bulkley, 1990].

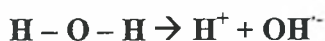
Το μοριακό οξυγόνο δεν τοξικό, καθώς η ηλεκτρονιακή του δομή το καθιστά ανενεργό. Το ατομικό όμως οξυγόνο περιέχει δυο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, είναι συνεπώς μια ελεύθερη ρίζα. Όταν τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στοιβάδας ενός ατόμου είναι συζευγμένα με ηλεκτρόνια αντίθετης στροφορμής, το μόριο στο σύνολό του παραμένει σταθερό και διατηρείται σε χαμηλή ενεργειακή στάθμη. Ένα τέτοιο μόριο δεν είναι δραστικό, καθώς σε όσο υψηλότερη ενεργειακά στάθμη βρίσκονται τα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στοιβάδας του τόσο πιο δραστικό είναι. Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στοιβάδας είναι ασύζευκτο, δηλαδή μονήρες, το μόριο γίνεται ασταθές [Bulkley, 1990].

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν μέσω των παρακάτω μηχανισμών [Halliwell and Gutteridge, 1998]:

- Απώλεια ενός ηλεκτρονίου από μια μη-ρίζα  $A \rightarrow A^+ + e^-$
- Απόκτηση ενός μονήρους ηλεκτρονίου από μια μη-ρίζα  $A + e^- \rightarrow A^-$
- Ομολυτική διάσπαση, όπου ο ομοιοπολικός δεσμός διασπάται συμμετρικά ώστε κάθε τμήμα του μορίου να λαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο.



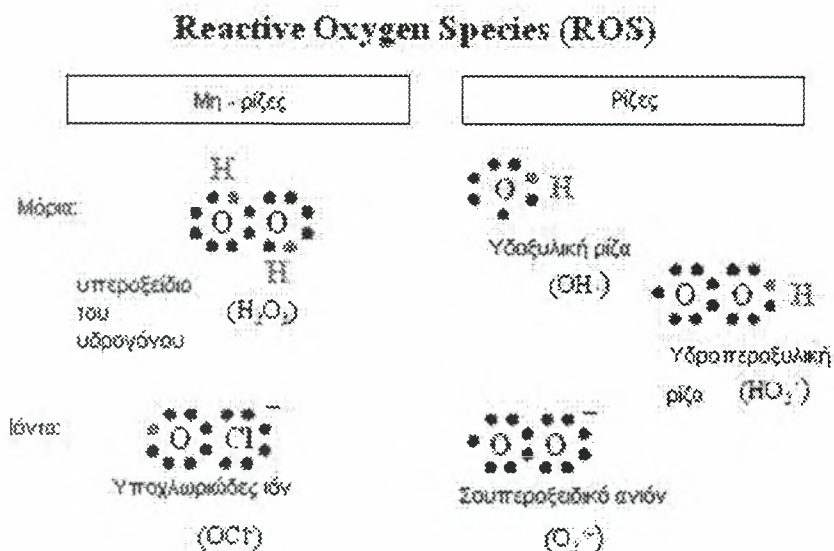
- Ετερολυτική διάσπαση, όπου ο ομοιοπολικός δεσμός διασπάται μη συμμετρικά, έτσι ώστε και τα δυο δεσμικά ηλεκτρόνια παραμένουν στο ίδιο τμήμα, αφήνοντας το άλλο με ένα κενό τροχιακό.



Επίσης, οι ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με μια μη-ρίζα όποτε και σχηματίζεται μια νέα ελεύθερη ρίζα. Πιο συγκεκριμένα, οι ρίζες κατά την αντίδρασή τους με άλλα μόρια προκειμένου να αποκτήσουν τη συμπληρωμένη οκτάδα

ηλεκτρονίων των ευγενών αερίων μετατρέπουν το μόριο – στόχο σε ρίζα, με αποτέλεσμα την έναρξη μιας αλυσιδωτής αντίδρασης. Η μεγάλη δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στην ιδιότητά τους να δημιουργούν αλυσιδωτές αντιδράσεις [Halliwell and Gutteridge, 1998].

Εκτός από τις ίδιες τις ελεύθερες ρίζες υπάρχουν και άλλες ενώσεις, παράγωγα του οξυγόνου, που δεν περιέχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια αλλά είναι ιδιαίτερα δραστικές. Τέτοια ένωση είναι για παράδειγμα το  $H_2O_2$ . Οι ενώσεις αυτές στο σύνολό τους ονομάζονται δραστικές ενώσεις οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS). Τα τελευταία χρόνια διαπιστώθηκε αντίστοιχα μια δεύτερη κατηγορία ενώσεων που μπορούν να παράγουν ελεύθερες ρίζες, οι δραστικές ενώσεις αζώτου (RNS).



**Εικόνα 1: Δραστικές Ενώσεις Οξυγόνου (ROS)**

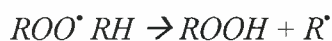
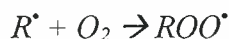
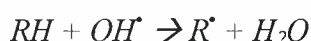
Στην εικόνα 1 περιγράφονται τα μέλη των δραστικών ενώσεων οξυγόνου. Εκτός από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου στην ομάδα συμπεριλαμβάνονται δύο πολύ δραστικές ενώσεις οξυγόνου, το υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ) [Nindl, 2004].

## 1.2.2 Πηγές παραγωγής

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς είναι συνεχής και αναπόφευκτη. Υπάρχουν πολλές πηγές παραγωγής ριζών, τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς.

### 1.2.2.1 Ενδογενείς πηγές

➤ Διαρροή ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Είναι η πιο σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών στους αερόβιους οργανισμούς και λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Υπολογίζεται ότι 2-5% περίπου του οξυγόνου που χρησιμοποιείται για τον αερόβιο μεταβολισμό μετατρέπεται σε ROS. Πιο συγκεκριμένα, ένα ποσοστό των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται για την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε σουπεροξειδίο ( $O_2^{\cdot-}$ ) από την ημικινόνη (UQH της NADH-αναγωγάσης του συνενζύμου Q [Boveris and Cadenas, 1997]. Ένα μέρος του  $O_2^{\cdot-}$  ανάγεται και δίνει  $H_2O_2$ , μια αντίδραση που καταλύεται από την Mn-σουπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD). Η παραγωγή αυτών των δυο ROS μπορεί να προκαλέσει την έναρξη κάποιας αλυσιδωτής αντίδρασης ριζών λόγω παραγωγής της ρίζας υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton – Haber Weiss.

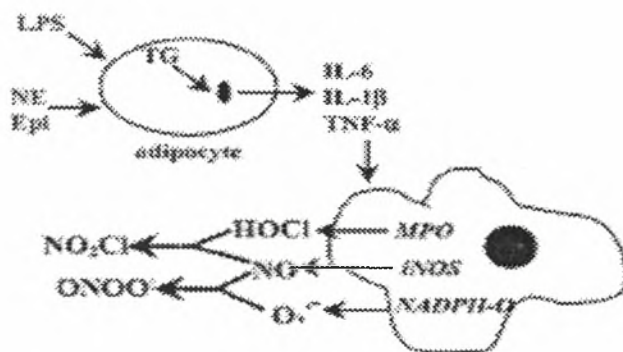


Επίσης, στο μιτοχόνδριο παράγεται και μονοξειδίο του αζώτου (NO) από τη συνθάση του NO. Το NO αντιδρά με το  $O_2^{\cdot-}$  και παράγεται υπεροξυνιτρικό ( $ONOO^{\cdot}$ ), το οποίο σε ουδέτερο pH μετατρέπεται σε υπεροξυνιτρώδες οξύ ( $ONOOH$ ) [Korpenol, 1998]. Από το τελευταίο σχηματίζονται οι ρίζες  $OH^{\cdot}$  και  $NO_2^{\cdot}$  [Radí και συν.]. Η αντίδραση του NO με την ουβικινόνης οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης (UQH) η οποία λειτουργεί ως σημείο παραγωγής  $O_2^{\cdot-}$ , όπως προαναφέρθηκε [Boveris and Cadenas, 1997].

➤ Οι αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων του ενδοπλασματικού δικτύου και των χλωροπλαστών [Halliwell and Cross, 1994]

➤ Τα υπεροξειδιοσωμάτα, μικρά μεμβρανικά κυστίδια που περιέχουν εξειδικευμένα ένζυμα υπεύθυνα για το μεταβολισμό των λιπιδίων και τοξικών ενώσεων, είναι ενδογενής πηγή  $H_2O_2$  [Halliwell and Cross, 1994].

- Το σύστημα του κυτοχρώματος P-450 [Halliwell and Cross, 1994].
- Οι αντιδράσεις φλεγμονής, ιδιαίτερα οι χρόνιες. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και ουδετερόφιλα παράγουν και απελευθερώνουν μεγάλο αριθμό ROS (εικόνα 2).
- Αυτοοξειδωση διαφόρων βιομορίων, όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες, αιμοσφαιρίνη, κορτιζόλη [Halliwell and Cross, 1994].



Εικόνα 2: Τα λιποκύτταρα παράγουν ιντερλευκίνες που ενεργοποιούν τα ουδετερόφιλα, τα οποία με τη σειρά τους απελευθερώνουν ROS και RNS

[Fenster, C. P. και συν, 2002]

### 1.2.2.2 Εξωγενείς πηγές

Διάφοροι εξωγενείς παράγοντες, διατροφικοί, περιβαλλοντικοί, κοινωνικοί οδηγούν στην παραγωγή ROS από τον ανθρώπινο οργανισμό. Το κάπνισμα, η ρύπανση του περιβάλλοντος, η κατανάλωση αλκοόλ, η σωματική άσκηση, η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (συμπεριλαμβανομένης και της ηλιακής) καθώς και αρκετές τροφές που καταναλώνουμε, οι οποίες περιέχουν διάφορα χημικά, όπως εντομοκτόνα και φυτοφάρμακα. Μια πολύ σημαντική, κοινωνική πηγή παραγωγής ROS είναι το άγχος, το οποίο ενεργοποιεί τη σωματική προσαρμογή στο στρες που οδηγεί στην παραγωγή ROS [Halliwell and Cross, 1994].

### 1.2.3 Βιολογική δράση ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται συνεχώς στον οργανισμό και η δράση τους έχει τόσο θετικές όσο και αρνητικές συνέπειες (εικόνα 3) [Halliwell and Cross, 1994].

### 1.2.3.1 Θετικές συνέπειες

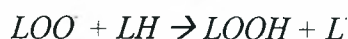
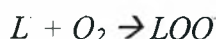
Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν μια από τις σημαντικότερες προσαρμογές του οργανισμού ενάντια σε μικροβιακές μολύνσεις, μεσολαβώντας σε πολλά στάδια της φλεγμονώδους αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα στα μακροφάγα και στα ουδετερόφιλα παράγονται και απελευθερώνονται  $O_2^-$  τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε  $H_2O_2$  από την σουπεροξειδική δισμουτάση. Το  $H_2O_2$  θανατώνει τα εγκολλημένα βακτήρια. Η συγκεκριμένη δράση των ROS συνεισφέρει στην αποτελεσματική προστασία του οργανισμού από μολυσματικούς παράγοντες [Fenster, C. P. και συν, 2002].

Πολλά στοιχεία μαρτυρούν συμμετοχή των ROS σε ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Επιπλέον, το  $H_2O_2$  συμμετέχει στην παραγωγή των θυροειδικών ορμονών. Τέλος, το NO παίζει διάφορους ρόλους, ανάμεσα στους οποίους ρυθμίζει την κυτταρική αναπνοή [Boveris και συν., 1996b], την παραγωγή ενέργειας και τον κυτταρικό θάνατο. Το NO αναστέλλει την παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια, ενώ επίσης συμμετέχει στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και στην ανοσολογική απόκριση [Cleeter και συν., 1994].

### 1.2.3.2 Αρνητικές συνέπειες

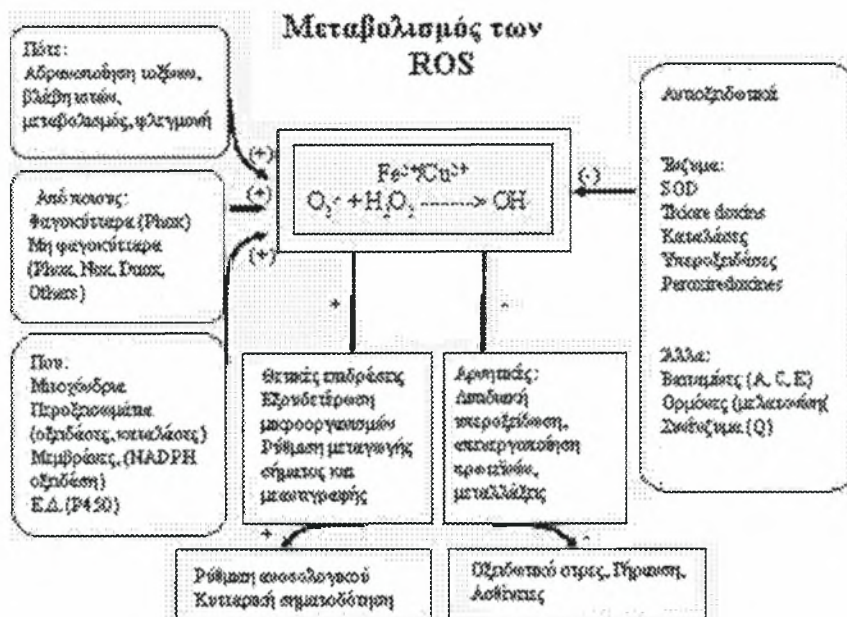
Οι αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών μέσα στον οργανισμό συνοψίζονται στα παρακάτω (εικόνα 3):

➤ Τροποποίηση των βιολογικών μακρομορίων, όπως το DNA, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια. Τα ROS είναι ισχυρά μεταλλαξιγόνες ουσίες, προκαλώντας μεταλλάξεις μετάπτωσης  $GC \rightarrow TA$ . Επιπλέον, χρόνια έκθεση του DNA σε περιβάλλον με ROS μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή του. Τα ROS επηρεάζουν και τις πρωτεΐνες, οξειδώνοντάς τις. Οι τροποποιήσεις που προκαλούνται στις πρωτεΐνες αλλοιώνουν τη δραστηριότητα και λειτουργία τους, και ενδεχομένως να οδηγήσουν στη μετουσίωσή τους. Η καταστροφή των πρωτεϊνών αυξάνεται με την ηλικία [Standman, 2001]. Οι κυτταρικές μεμβράνες που είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα προσβάλλονται από ελεύθερες ρίζες, μια διαδικασία που ονομάζεται υπεροξείδωση των λιπιδίων και χάνουν τη ρευστότητά τους [Beckman and Ames, 1998]



➤ Η άποψη ότι η γήρανση είναι αποτέλεσμα της δράσης των ελευθέρων ριζών προτάθηκε το 1956. Τα ROS εμπλέκονται στη διαδικασία της γήρανσης καταστρέφοντας το μιτοχονδριακό DNA. Το mtDNA διαθέτει λιγότερους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς από το πυρηνικό γένωμα, γεγονός που το καθιστά πολύ πιο ευαίσθητο. Τα «ελαττωματικά» μιτοχόνδρια απελευθερώνουν  $Ca^{++}$  και κυτόχρωμα c στο κυτταρόπλασμα, ενεργοποιώντας την αποπτωτική διαδικασία [Druge, 2002].

➤ Τα ROS βρέθηκαν να εμπλέκονται σε πάνω από 100 ανθρώπινες ασθένειες. Ανάμεσα σ' αυτές περιλαμβάνονται ο σακχαρώδης διαβήτης, η οστεοπόρωση, το έλκος, οι νόσοι Parkinson και Alzheimer, το εγκεφαλικό επεισόδιο, η αρτηριοσκλήρυνση [Mylonas and Kouretas 1999].

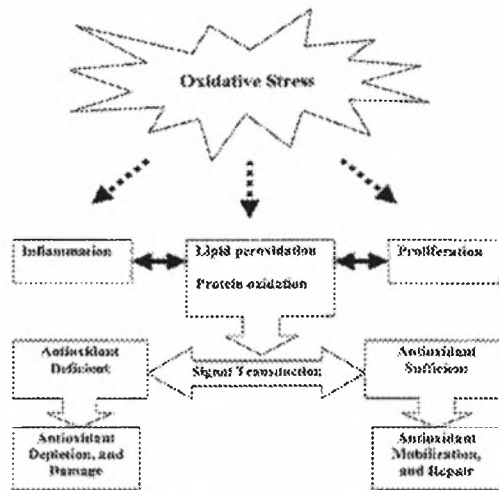


Εικόνα 3: Μεταβολισμός των ROS

### 1.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού

Τα συστατικά των ζωντανών κυττάρων είναι πολύ ευπαθή στις επιθέσεις των ελευθέρων ριζών. Εξελικτικά όλοι οι οργανισμοί έχουν προσαρμοσθεί σε περιβάλλον με υψηλή συγκέντρωση ROS, αναπτύσσοντας μια σειρά αντιοξειδωτικών μηχανισμών που αντισταθμίζουν την τοξικότητα των ROS. Η παραγωγή και αδρανοποίηση των ROS βρίσκονται σε μια λεπτή ισορροπία μέσα στον οργανισμό (εικόνα 4). Η παραγωγή των ROS είναι υπό φυσιολογικές συνθήκες ελαφρά μεγαλύτερη από την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, καθώς, όπως έχει

αναφερθεί, συμμετέχουν σε μια σειρά από βιολογικές λειτουργίες. Μεταβολή της ισορροπίας προς το σχηματισμό μεγάλων συγκεντρώσεων ROS προκαλεί το οξειδωτικό στρες [Halliwell and Gutteridge, 1998].



Εικόνα 4: Ισορροπία μεταξύ οξειδωτικού στρες και αντιοξειδωτικών μηχανισμών

[Elsayed N. M., 2001]

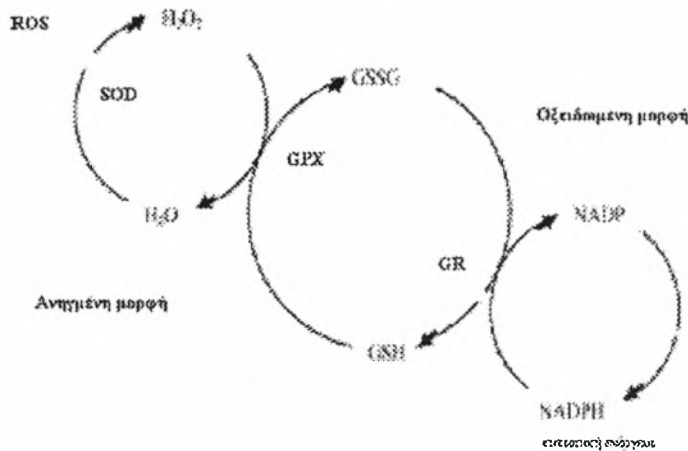
Στο γενικό όρο «αντιοξειδωτικά» συμπεριλαμβάνεται οποιαδήποτε ουσία, η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτές ενός υποστρώματος που μπορεί να οξειδωθεί, καθυστερεί ή εμποδίζει σε σημαντικό βαθμό την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος. Είναι πολύ αποτελεσματικές ενώσεις, καθώς προσφέρουν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια τους, ώστε να σταματήσουν οι αλυσιδωτές αντιδράσεις των ROS.

Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις σχηματίζουν συνολικά τέσσερις γραμμές άμυνας ενάντια στις ελεύθερες ρίζες [Bulkley, 2002].

- Η πρώτη γραμμή άμυνας αποτελείται από αντιοξειδωτικά που καταστέλλουν το σχηματισμό ROS. Σ' αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX), η καταλάση (CAT), οι σεληνιοπρωτεΐνες, η τρανσφερρίνη, φερριτίνη, λακτοφερρίνη, καροτενοειδή.
- Η δεύτερη γραμμή άμυνας απαρτίζεται από ενώσεις που εμποδίζουν την έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων.
- Τα ένζυμα επιδιόρθωσης του DNA αποτελούν την τρίτη γραμμή άμυνας
- Η τέταρτη γραμμή άμυνας είναι η προσαρμογή του οργανισμού να παράγει και να μεταφέρει αντιοξειδωτικές ενώσεις στη σωστή θέση.

## Εισαγωγή

Η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού παρουσιάζει εξειδίκευση ανά ιστό και κυτταρικό τύπο. Για παράδειγμα, τα εξωκυτταρικά υγρά διαθέτουν διαφορετικούς αμυντικούς μηχανισμούς από το εσωτερικό του κυττάρου. Η ενδοκυτταρική αντιοξειδωτική άμυνα περιγράφεται στην εικόνα 5.



Εικόνα 5: Η ενζυμική αντιοξειδωτική απόκριση των κυττάρων στην αύξηση των ROS

[Urso M.L., 2003]

Ανάλογα με τη χημική τους φύση, οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του οργανισμού χωρίζονται σε ενζυμικούς και μη-ενζυμικούς.

### 1.3.1 Ενζυμικοί

#### 1.3.1.1 Υπεροξειδική δισμουτάση

Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού εναντίον των ROS καταλύοντας την αντίδραση



Υπάρχουν τρεις τύποι SOD: η κυτταροπλασματική Cu-Zn SOD, η μιτοχονδριακή Mn-SOD και η εξωκυτταρική SOD [Mylonas and Kouretas, 1999].

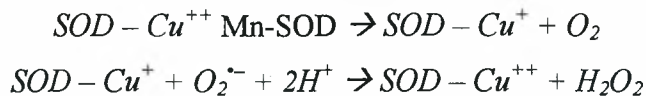
#### *Cu-Zn SOD*

Οι Cu-Zn SOD που έχουν απομονωθεί από ευκαρυωτικούς οργανισμούς εμφανίζουν μοριακό βάρος περίπου 32000kDa. Αποτελούνται από δυο υπομονάδες• η



## Εισαγωγή

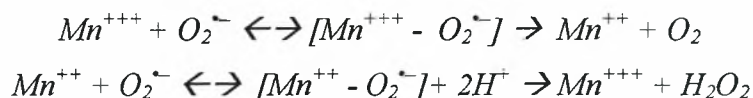
μια φέρει ένα άτομο Cu και η άλλη ένα άτομο Zn αντίστοιχα. Το ιόν Cu παίζει ενεργό ρόλο στην αδρανοποίηση των ROS:



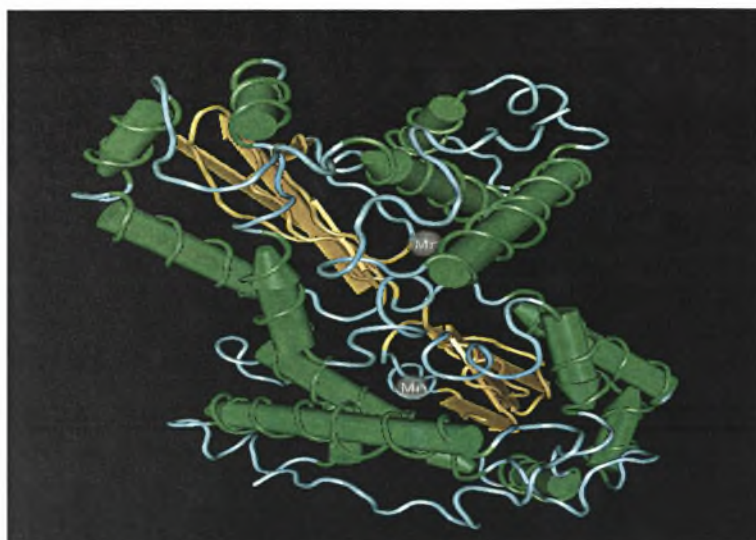
Το ιόν  $Zn^{++}$  δε συμμετέχει στον καταλυτικό κύκλο, συμβάλλει όμως στη σταθερότητα του ενζύμου. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε πως ενώ το  $Cu^{++}$  είναι αναντικατάστατο για τη βιοδραστικότητα του ολοενζύμου, το  $Zn^{++}$  μπορεί αντικατασταθεί από άλλα μέταλλα, όπως το κοβάλτιο, ο υδράργυρος και το κάδμιο [Halliwell and Gutteridge, 1998].

## Mn-SOD

Η Mn-SOD εντοπίζεται σε βακτήρια, φυτά και ζώα, σχεδόν αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια. Το μοριακό της βάρος είναι περίπου 40000 και στο ενεργό κέντρο περιέχει ένα ιόν μαγγανίου.



Σε αντίθεση με την Cu-Zn SOD η δραστηκότητά της μειώνεται σε αλκαλικό pH. Η Mn-SOD των ανώτερων οργανισμών αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες και περιέχει 0,5 – 1,0 ιόν μαγγανίου ανά υπομονάδα (εικόνα 6). Το ιόν μαγγανίου είναι απαραίτητο για τη δραστηκότητα του ενζύμου καθώς η απομάκρυνσή του έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της δραστηκότητας της Mn-SOD [Halliwell and Gutteridge, 1998].



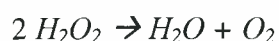
Εικόνα 6: Τρισδιάστατη δομή Mn-SOD

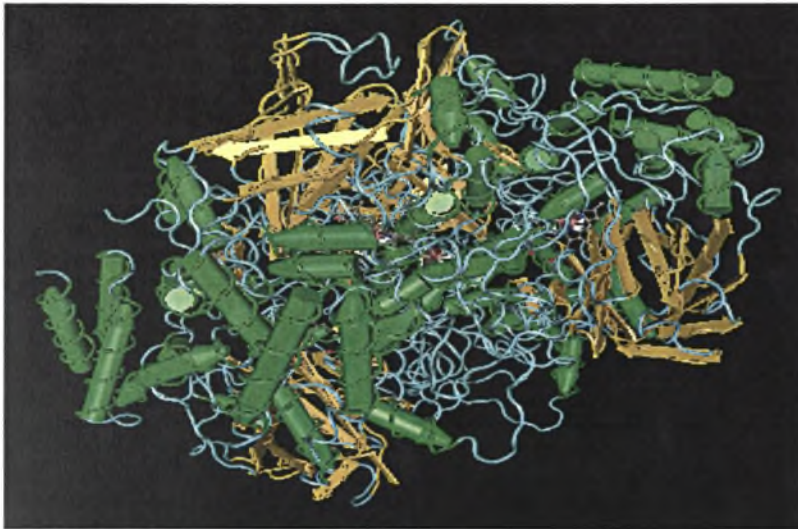
### *Εξωκυτταρική SOD*

Ο τελευταίος τύπος SOD έχει σχετικά μεγάλο μοριακό βάρος (περίπου 135000 kDa). Είναι μια τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη στην οποία κάθε υπομονάδα έχει ένα μόριο χαλκού και ένα άτομο ψευδαργύρου. Υπάρχουν αρκετές μορφές εξωκυτταρικής SOD (A, B, C). Το μεγαλύτερο ποσοστό είναι συνδεδεμένο στην επιφάνεια του κυττάρου μαζί με υδρογονάνθρακες, ιδιαίτερα στους πνεύμονες και στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων [Halliwell and Gutteridge, 1998].

#### *1.3.1.2 Καταλάση*

Στα περισσότερα αερόβια κύτταρα ανιχνεύεται δραστικότητα καταλάσης. Το ένζυμο συνολικά αποτελείται από 4 υπομονάδες (εικόνα 7) , κάθε μια από τις οποίες περιέχει μια ομάδα αίμης στην ενεργή της περιοχή. Επιπλέον, κάθε υπομονάδα φέρει ένα μόριο NADPH [Halliwell and Gutteridge, 1998]. Η καταλάση μετατρέπει το  $H_2O_2$  σε νερό και μοριακό οξυγόνο.

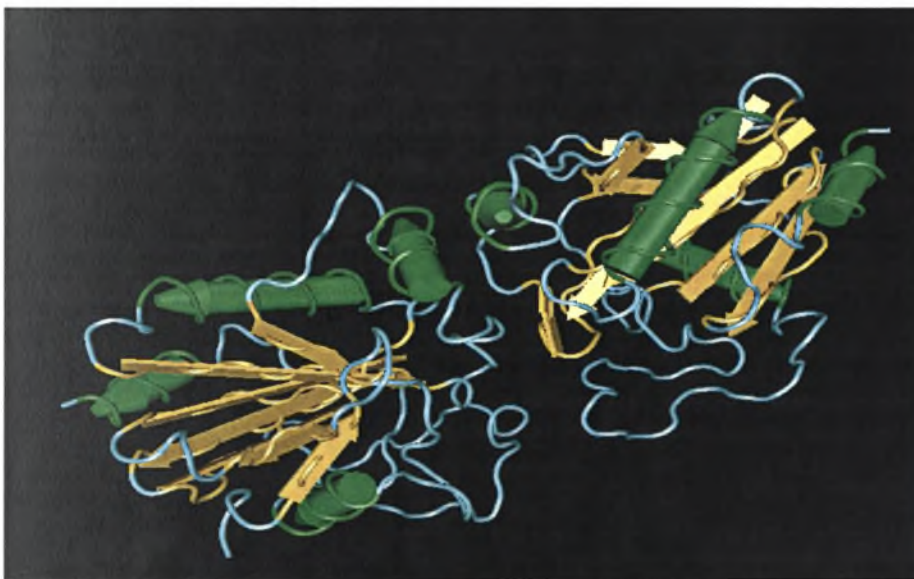




Εικόνα 7: Τρισδιάστατη δομή καταλάσης

### 1.3.1.3 Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH – Px) ανήκει στην οικογένεια των σεληνιοπρωτεϊνών και καταλύει την αναγωγή μιας ποικιλίας υπεροξειδίων. Εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια, στο κυτταρόπλασμα, και στο εξωτερικό του κυττάρου. Βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στην καρδιά, στους πνεύμονες και στον εγκέφαλο. Η GSH-Px αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες κάθε μια από τις οποίες περιέχει ένα μόριο σεληνίου (Se). Το υπόστρωμά της είναι η GSH [Halliwell and Gutteridge, 1998].

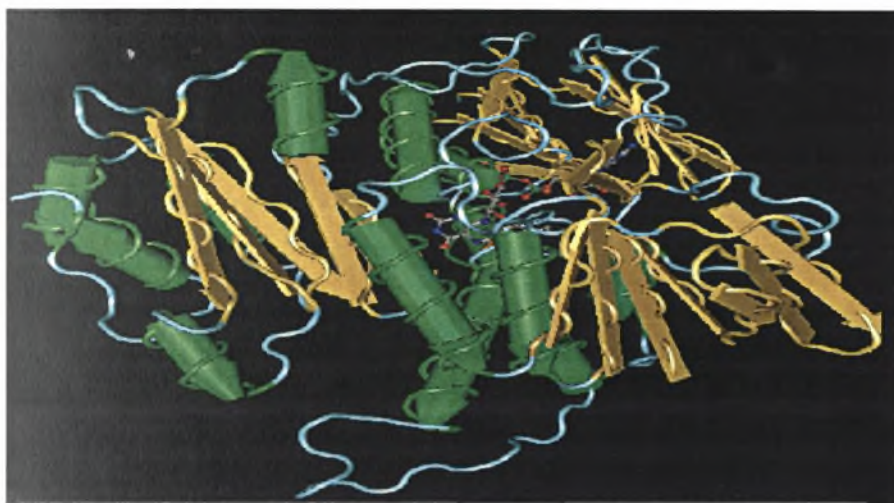


Εικόνα 8: Τρισδιάστατη δομή της GSH-Px

Η GSH-Px καταλύει τη μετατροπή υπεροξειδίων σε νερό οξειδώνοντας τη GSH σε GSSG (εικόνα 12) [Halliwell and Gutteridge, 1998].

#### 1.3.1.4 Αναγωγή της γλουταθειόνης

Στα κύτταρα έχει αναπτυχθεί ένας μηχανισμός ανακύκλωσης της γλουταθειόνης. Η οξειδωμένη μορφή (GSSG) καταλύεται από το ένζυμο αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) σε ανηγμένη γλουταθειόνη (εικόνα 12). Το NADPH παράγεται στο μεταβολικό μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Όσο αυξάνει η κατανάλωση NADPH από τη GR μειώνοντας το λόγο NADPH/NADP<sup>+</sup>, τόσο επιταχύνεται η παραγωγή NADPH.



Εικόνα 9: Τρισδιάστατη δομή της GR

Η GR αποτελείται από δύο υπομονάδες κάθε μία από τις οποίες περιέχει ένα μόριο φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD) στην ενεργό περιοχή της (εικόνα 11). Η GR είναι σημαντικός μηχανισμός για τη διατήρηση του λόγου GSH/GSSG σε φυσιολογικά επίπεδα [Halliwell and Gutteridge, 1998].

#### 1.3.1.6 Συνεργασία των GPx και CAT

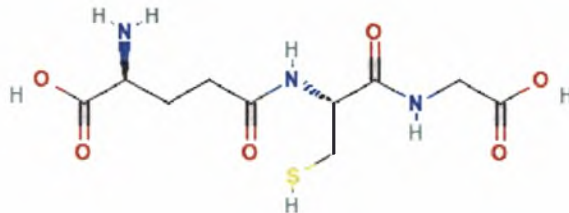
Τα δυο ένζυμα μοιράζονται κοινό υπόστρωμα, διασπούν δηλαδή το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος η διάσπαση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> πραγματοποιείται από τη GPx, σε μεγάλες όμως συγκεντρώσεις η αποικοδόμηση του μορίου πραγματοποιείται κυρίως από την CAT. Αυτό συμβαίνει γιατί η GPx έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [Halliwell and Gutteridge, 1998].

### 1.3.2 Μη ενζυμικοί

Εκτός από τους ενδογενείς ενζυμικούς μηχανισμούς ενάντια στα ROS υπάρχουν και μια σειρά από άλλους παράγοντες, μη ενζυμικούς, που ενισχύουν την αμυντική ικανότητα του οργανισμού.

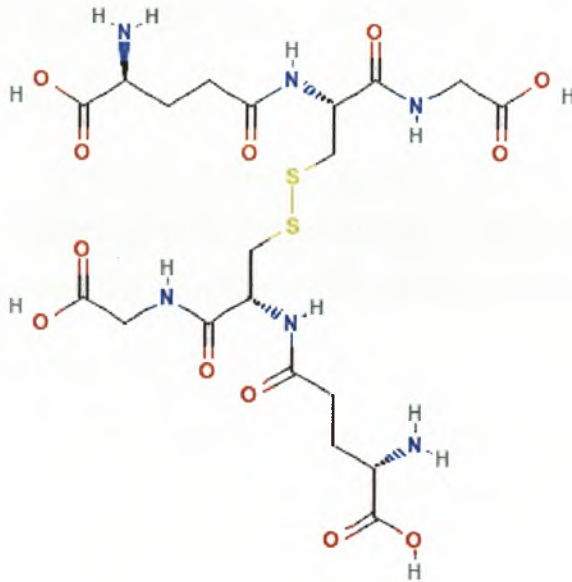
#### 1.3.2.1 Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπίδιο ( $\gamma$  - Glu - Cys - Gly) που περιέχει μια σουλφυδρυλομάδα (εικόνα 10) και προστατεύει τα ερυθροκύτταρα από οξειδωτική βλάβη.



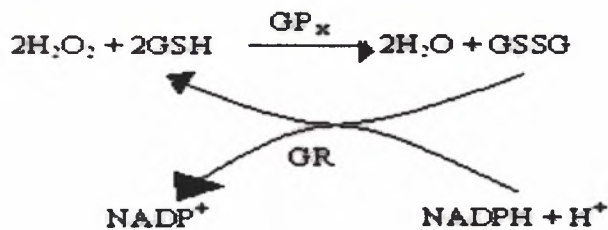
Εικόνα 10: Μοριακός τύπος ανηγμένης γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη συναντάται σε δυο μορφές μέσα στο κύτταρο. Ως ανηγμένη (GSH – εικόνα 10) και ως οξειδωμένη (GSSG – εικόνα 11) όπου δυο μόρια GSH συνδέονται με ένα δισουλφιδικό δεσμό [Halliwell and Gutteridge, 1998].



Εικόνα 11: Μοριακός τύπος οξειδωμένης γλουταθειόνης

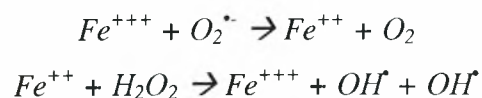
Συνολικά, οι αντιδράσεις στις οποίες εμπλέκονται η γλουταθειόνη φαίνονται στην εικόνα 12:



Εικόνα 12: Κύκλος αντιδράσεων γλουταθειόνης

### 1.3.2.2 Μεταλλικά ιόντα

Ο χαλκός και ο σίδηρος είναι αντιοξειδωτικές ενώσεις, καθώς διαθέτουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια που μπορούν να αδρανοποιήσουν ROS. Τα  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  κυκλοφορούν στον οργανισμό συνδεδεμένα με τις πρωτεΐνες τρανσφερίνη και φερριτίνη, ενώ τα  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$  με την πρωτεΐνη σερούλοπλασμίνη [Halliwell and Gutteridge, 1998]. Εκτός από αντιοξειδωτικά όμως, τα  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  και  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$  μπορούν να δράσουν και ως προοξειδωτικές ουσίες, επάγοντας την αντίδραση Fenton





### *1.3.2.3 Μελατονίνη*

Η μελατονίνη είναι μια ενδογενής ορμόνη του που εκκρίνεται από την επίφυση. Έχει διαπιστωθεί ότι η συγκεκριμένη ορμόνη επάγει την έκφραση ορισμένων αντιοξειδωτικών παραγόντων [Halliwell and Gutteridge, 1998].

### *1.3.2.4 Συνένζυμο Q*

Το συνένζυμο Q βρίσκεται στη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα και προστατεύει τα λίπη από υπεροξείδωση από την ουβισεμικινόνη [Halliwell and Gutteridge, 1998].

### *1.3.2.5 Ουρικό οξύ*

Το ουρικό οξύ αποτελεί το βασικό προϊόν του καταβολισμού των πουρινικών νουκλεοσιδίων, αδενοσίνης και γουανοσίνης. Ταυτόχρονα, το ουρικό οξύ μαζί με το ασκορβικό οξύ αποτελούν τα κυριότερα αντιοξειδωτικά του ορού. Έχει αποδειχθεί ότι το ουρικό οξύ έχει ικανότητα αλληλεπίδρασης με ROS, κυρίως με την υδροξυλική ρίζα και το υποχλωριώδες οξύ. Συναντάται σχεδόν σε όλους τους ιστούς [Noyan και συν., 2002].

### *1.3.2.6 Άλλα αντιοξειδωτικά*

Ορισμένες πρωτεΐνες, όπως η αλβουμίνη του ορού εμφανίζουν αντιοξειδωτικές ικανότητες. Εκτός από τις πρωτεΐνες, και άλλες ουσίες του ορού έχουν αντιοξειδωτική δράση, με κυριότερο εκπρόσωπο τη χολερυθρίνη [Noyan και συν., 2002].

## **1.3.3 Διατροφικοί παράγοντες**

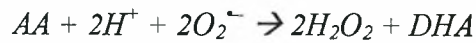
Εκτός από τις ενδογενείς αντιοξειδωτικές ενώσεις, ενζυμικές ή μη ενζυμικές, ορισμένα αντιοξειδωτικά προσλαμβάνονται μέσω διατροφής. Μολονότι δεν παράγονται από τον οργανισμό, συμβάλλουν σημαντικά στην αμυντική ικανότητά του ενάντια στα ROS.

### *1.3.3.1 Ασκορβικό οξύ*

Το ασκορβικό οξύ (AA - βιταμίνη C) είναι μια υδρόφιλη ένωση με πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική δράση [Mylonas and Kouretas, 1999]. Λειτουργεί ως

## Εισαγωγή

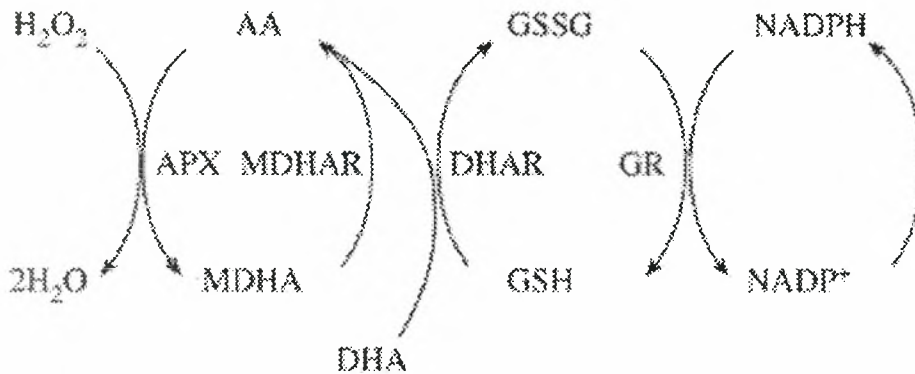
αναγωγικός παράγοντας αντιδρώντας με τις ελεύθερες ρίζες προς σχηματισμό δεϋδροασκορβικού οξέος (DHA). Η δράση του συνοψίζεται στην παρακάτω αντίδραση



Επιπροσθέτως, ανάγει τα  $Fe^{+++}$  σε  $Fe^{++}$ , επάγοντας τις αντιδράσεις Fenton:



Τέλος, το ένζυμο δεϋδροασκορβική ρεδουκτάση καταλύει την επαναδημιουργία του AA με ταυτόχρονη οξείδωση της GSH (εικόνα 15) [Blokina Olga και συν., 2002].



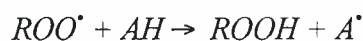
Εικόνα 13: κύκλος ασκορβικού – γλουταθειόνης

*APX = υπεροξειδάση ασκορβικού οξέος, MDHAR = αναγωγή μονοδεϋδροασκορβικού οξέος, DHAR = αναγωγή δεϋδροασκορβικού οξέος*

*DHA = δεϋδροασκορβικό οξύ, MDHA = μονοδεϋδροασκορβικό οξύ [Blokina Olga και συν., 2002]*

### 1.3.3.2 Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E (AH – α-τοκοφερόλη), σε αντίθεση με το ασκορβικό οξύ, είναι μια ιδιαίτερα λιπόφιλη ένωση. Η δράση της ως αντιοξειδωτικό μέσο έγκειται στην ικανότητά της να ενσωματώνεται στην κυτταρική μεμβράνη, σταματώντας την αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσίας των λιπιδίων [Mylonas and Kouretas, 1999]:



Η ρίζα  $A^{\cdot}$  είναι πολύ ασθενέστερη σε σχέση με τη ρίζα  $ROO^{\cdot}$



### *1.3.3.3 Άλλα αντιοξειδωτικά*

Τα καροτενοειδή, οι φυτικές φαινόλες και διάφορα φυτικά εκχυλίσματα εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση [Mylonas and Kouretas, 1999].

## **1.4 Οξειδωτικό stress**

### **1.4.1 Γενικά**

Το οξειδωτικό στρες είναι αδιαμφισβήτητα ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο. Μια σειρά τόσο ενδογενών όσο και εξωγενών παραγόντων μπορούν να επάγουν την εμφάνισή του [Moeller και συν., 1996].

#### *1.4.1.1 Ενδογενείς παράγοντες*

Διάφοροι ενδογενείς παράγοντες δύναται να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες στον οργανισμό. Ανάμεσά τους περιλαμβάνονται η φλεγμονή (που προκαλείται από παροδική μόλυνση ή μακροχρόνια ασθένεια), ο καρκίνος, ο κυτταρικός θάνατος, η ισχαιμία – επανοξυγόνωση, η ψυχολογική επιβάρυνση. Ένας σημαντικός ενδογενής παράγοντας εμφάνισης οξειδωτικού στρες είναι η ίδια η σωματική άσκηση [Moeller και συν., 1996].

#### *1.4.1.2 Εξωγενείς παράγοντες*

Στις εξωγενείς πηγές οξειδωτικού στρες συμπεριλαμβάνονται διατροφικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες. Στην πρώτη κατηγορία συμπεριλαμβάνονται η κατανάλωση προοξειδωτικών ουσιών, αλκοόλ, καφεΐνης και διαφόρων φαρμάκων, πχ ψοραλένιο. Δίαιτα με χαμηλή περιεκτικότητα σε αντιοξειδωτικά και αντίστοιχα μεγάλη σε πρωτεΐνες και λίπη μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση οξειδωτικού στρες.

Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες περιέχονται το κάπνισμα (ενεργητικό ή παθητικό), η ρύπανση του ατμοσφαιρικού αέρα (με SO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, και υδρογονάνθρακες), η έκθεση σε ακτινοβολία (ιονίζουσα, ακτίνες X, υπεριώδης), πολλά εντομοκτόνα, διάφορα φάρμακα που απορροφούνται από το δέρμα (παράγωγα ψοραλενίου), εντομοκτόνα (π.χ. Lindane) [Moeller και συν., 1996].

Όλοι οι παραπάνω παράγοντες δρουν τις περισσότερες φορές ταχύτατα, και έχουν συνεργιστική δράση. Η επίδρασή τους είναι συνήθως αθροιστική και μακροχρόνια.

### 1.4.2 Οξειδωτικό stress και σωματική άσκηση

#### 1.4.2.1 Ιστορική αναδρομή

Το 1978 μελετήθηκε για πρώτη φορά η επίδραση της φυσικής άσκησης στους ανθρώπινους ιστούς [Dillard και συν., 1978]. Παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα πεντανίου (παραπροϊόν της λιπιδιακής υπεροξειδωσης) και ελευθέρων ριζών. Λίγα χρόνια αργότερα, το 1982 οι Davies και συν. διαπίστωσαν μεγάλη αύξηση των ελευθέρων ριζών στους σκελετικούς μύες και στο ήπαρ ασκούμενων ποντικών. Μετά από μια δεκαετία, ο Reid έδειξε ότι το  $H_2O_2$  διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη των ασκούμενων μυϊκών κυττάρων, δημιουργώντας πολλές και καταστροφικές ελεύθερες ρίζες [Reid και συν., 1992]. Το 1997 αναφέρθηκε για πρώτη φορά η μεγάλη ευαισθησία των βιομορίων σε περιβάλλον οξειδωτικού στρες [Okamura και συν., 1997]. Τέλος, το 2000 έγιναν γνωστοί μερικοί από τους βασικούς μηχανισμούς παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση [Chandan και συν., 2000]. Η σχέση μεταξύ φυσικής άσκησης και οξειδωτικού στρες δεν έχει εξακριβωθεί πλήρως και παραμένει αντικείμενο επισταμένης μελέτης.

#### 1.4.2.2 Φυσική άσκηση και οξειδωτικό στρες

Η φυσική άσκηση είναι παράγοντας μακροβιότητας και καλής υγείας. Έχει διαπιστωθεί ότι βελτιώνεται η κατάσταση των σκελετικών μυών και των αγγείων, ενώ η μυϊκή μάζα διατηρείται σε σταθερά επίπεδα. Αντιθέτως, η επίτονη άσκηση σε απροπόνητα άτομα αυξάνει το οξειδωτικό στρες και ενεργοποιεί τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού [Leeuwenburg και συν., 2001]. Η φυσική άσκηση ελαττώνει επίσης την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, ασθένειες που σχετίζονται με την παραγωγή ελευθέρων ριζών [Elosua και συν., 2003].

Η φυσική άσκηση αυξάνει τον οξειδωτικό μεταβολισμό και ενεργοποιεί τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Υπάρχουν διάφορες προσεγγίσεις για τον τρόπο με τον οποίο η άσκηση αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών [Moeller και συν., 1996]. Πάντως, μόνο η έντονη άσκηση μεγάλης χρονικής διάρκειας, φαίνεται να

## Εισαγωγή

υπερνικά την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, οδηγώντας σε οξειδωτικό στρες [Palazzetti και συν., 2003]. Οι μελέτες του θέματος είναι ως ένα σημείο αμφιταλαντευόμενες, καθώς υπάρχουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στη μεθοδολογία των πειραμάτων.

### *1.4.2.3 Μηχανισμοί παραγωγής ROS κατά τη σωματική άσκηση*

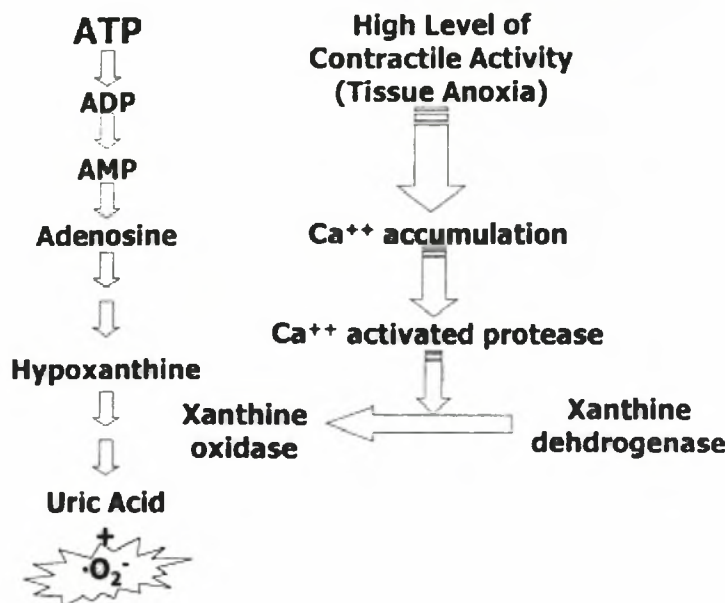
#### **Φυσική άσκηση και αναπνοή**

Κατά την αερόβια αναπνοή ανάγεται το μοριακό οξυγόνο σε νερό. Μικρά ποσοστά  $O_2^{\cdot -}$  και  $H_2O_2$  διαρρέουν από την αναπνευστική αλυσίδα. Ο Leeuwenburg πρότεινε ως σημείο διαρροής την ουβικινόνη [Leeuwenburg και συν., 2001]. Η ουβικινόνη είναι ένας φορέας ηλεκτρονίων, «κρίκος» της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων. Συνυπάρχει ως οξειδωμένη και ως ανηγμένη (ουβικινόλη) μορφή. Η μετάβαση από τη μια μορφή στην άλλη γίνεται με μια ενδιάμεση ένωση, την ημικινόνη. Η ημικινόνη δέχεται ηλεκτρόνια από την NADH-Q αναγωγή και από την succinate-Q αναγωγή. Πολλές φορές, αντί της παραπάνω διαδικασία η ημικινόνη «χάνει» ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, παράγοντας  $O_2^{\cdot -}$  [Moeller και συν 1997]. Η καταλυτική συμβολή της άσκησης έγκειται στο γεγονός ότι αυξάνει ραγδαία την πρόσληψη και κατανάλωση οξυγόνου (περίπου 20 φορές). Στις μυϊκές ίνες η συγκέντρωση οξυγόνου μπορεί να αυξηθεί ακόμα και 100 φορές [Li Li Ji 1999].

#### **Οξειδάση της ξανθίνης**

Το ενζυμικό σύστημα της οξειδάσης της ξανθίνης (XO) καταλύει τον καταβολισμό του ADP, παράγοντας ταυτόχρονα μεγάλες ποσότητες ελευθέρων ριζών. Η επίπονη και εντατική άσκηση ενεργοποιούν το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι [Moeller και συν., 1996].

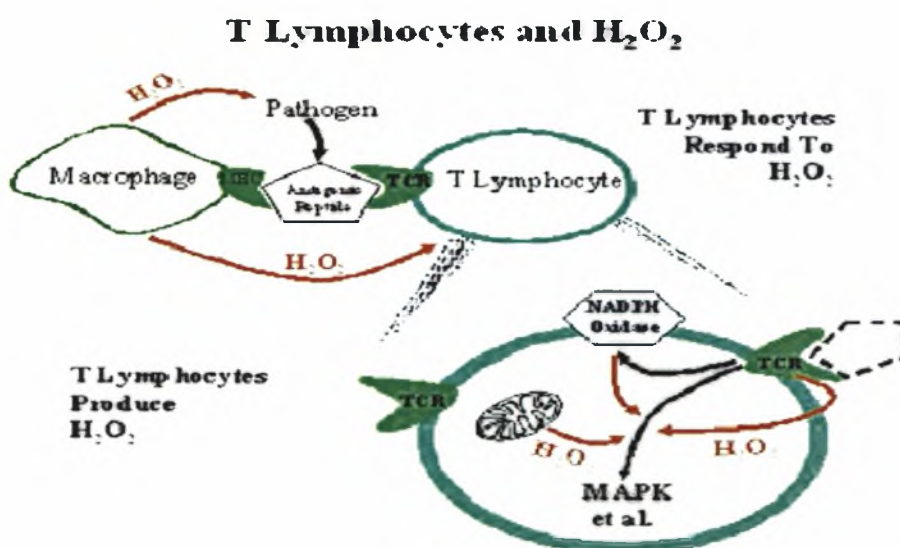
Όπως φαίνεται στην εικόνα 14, τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού του ADP (το οποίο έχει συσσωρευθεί εξαιτίας της κατανάλωσης του ATP κατά τη σωματική άσκηση) είναι το ουρικό οξύ και τα  $O_2^{\cdot -}$ .



Εικόνα 14: Το ενζυμικό σύστημα της οξειδάσης της ξανθίνης κατά τη σωματική άσκηση

### Φλεγμονώδης αντίδραση

Τα T – λεμφοκύτταρα παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού από περιβαλλοντικά παθογόνα [Nidle G., 2004]. Η δράση των T-λεμφοκυττάρων ρυθμίζεται από ROS όπως το  $H_2O_2$  (εικόνα 15). Τα T-λεμφοκύτταρα αποκρίνονται στην έκκριση  $H_2O_2$  από τα μακροφάγα μετά την ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης.



Εικόνα 15: Ο ρόλος του  $H_2O_2$  για τα T-λεμφοκύτταρα

## Εισαγωγή

Η ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων κατά τη σωματική άσκηση οφείλεται είτε στην παραγωγή ROS είτε σε κάποιο ήπιο τραυματισμό του μυός. Η φλεγμονώδης αντίδραση, αν και σημαντική για την απομάκρυνση μορίων που έχουν υποστεί βλάβη, παράγει ROS επεκτείνοντας την καταστροφή του μυϊκού ιστού. Η συνολική σχέση της φυσικής άσκησης με την παραγωγή ROS από τα ουδετερόφιλα δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Μάλλον αποτελεί ένα δευτερεύων μηχανισμό ανάκαμψης του μυός μετά από αγωνίσματα μεγάλης χρονικής διάρκειας αγωνίσματα, όπως ο μαραθώνιος [Moeller και συν., 1996].

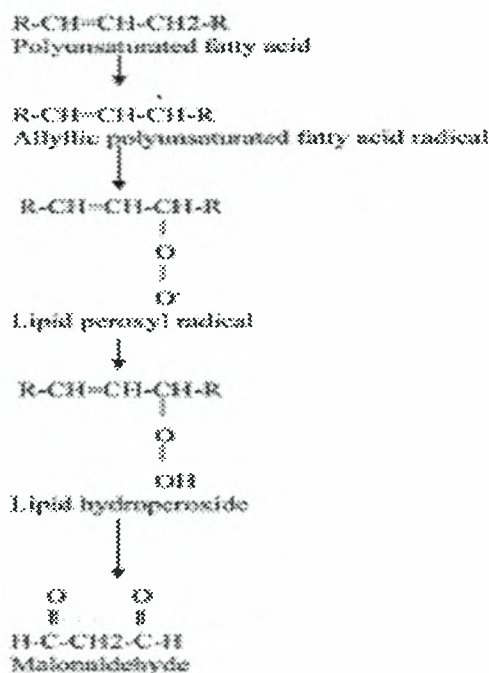
### *Γαλακτικό οξύ*

Στον αναερόβιο μεταβολισμό, η συσσώρευση γαλακτικού οξέος προκαλεί τοπικά πτώση του pH. Η ελάττωση του pH τοπικά στο μυϊκό ιστό οδηγεί στην απελευθέρωση οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη (φαινόμενο Bohr). Η αιμοσφαιρίνη παράγει δηλαδή ROS κατά τη σωματική άσκηση [Banerjee και συν., 2003].

Η πτώση του pH επίσης, οδηγεί στην απελευθέρωση Fe από τις πρωτεΐνες που περιέχουν αίμη, όπως η αιμο- και μυοσφαιρίνη. Επάγονται κατ' αυτόν τον τρόπο οι αντιδράσεις Fenton και η παραγωγή ROS [Banerjee και συν., 2003].

### *Υπεροξείδωση των λιπιδίων*

Τα πιο ευπαθή βιομόρια στα ROS είναι τα λιπίδια, κυρίως των κυτταρικών μεμβρανών. Μετά από σωματική άσκηση έχει παρατηρηθεί αύξηση των υπεροξειδωμένων λιπιδίων [Urso και συν., 2003]. Η λιπιδική υπεροξείδωση είναι ιδιαίτερος καταστροφική για τα κύτταρα, καθώς πυροδοτεί μια αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξείδωσης). Κατά κανόνα, όσο πιο ακόρεστα είναι τα λιπαρά οξέα, τόσο πιο ευαίσθητα είναι στα ROS. Τα υπεροξείδια των λιπιδίων διασπώνται τελικώς σε μαλοναλδεΐδη, η οποία ανιχνεύεται με τη μέθοδο TBARS (εικόνα 16).



Εικόνα 16: Στάδια λιπιδικής υπεροξειδωσης.

### Φωσφοφρουκτικινάση

Η φωσφοφρουκτικινάση, ένα σημαντικό ένζυμο του μεταβολισμού που ρυθμίζει το ρυθμό της γλυκόλυσης, επηρεάζεται σημαντικά από το οξειδωτικό στρες [Sen and Packer, 2000]. Το συγκεκριμένο ένζυμο είναι πλούσιο σε σουλφυδρυλομάδες, οπότε και είναι ευπαθές στα ROS.

#### 1.4.2.3 Σωματική άσκηση και αντιοξειδωτική προσαρμογή

Η φυσική άσκηση έχει ως φυσιολογικό αποτέλεσμα την ανάπτυξη προσαρμοστικών μηχανισμών από τον οργανισμό. Προς το παρόν έχουν διατυπωθεί τέσσερις θεωρίες, για το πώς ο οργανισμός αντιμετωπίζει τα αυξημένα επίπεδα ROS που παράγονται κατά την άσκηση:

### Ενδιάμεσος μεταβολισμός

Ο ενδιάμεσος μεταβολισμός φαίνεται πως προσαρμόζεται στις αυξημένες ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού κατά την άσκηση [Moeller και συν., 1996]. Σε πειραματικά μοντέλα ποντικών παρατηρήθηκε αυξημένη οξειδωτική ικανότητα, συνοδευμένη από αυξημένη συγκέντρωση των ενζύμων της αναπνευστικής αλυσίδας. Αυτό οφειλόταν σε αύξηση του συνολικού αριθμού των μιτοχονδρίων ανά κύτταρο. Η συγκέντρωση των ενζύμων ανά μιτοχόνδριο παρέμεινε σταθερή. Βέβαια, η

## Εισαγωγή

παραπάνω προσέγγιση θεωρείται εξαιρετικά δύσκολο να εφαρμόζεται και στην πράξη, γι' αυτό χρήζει περαιτέρω μελέτης [Moeller και συν., 1996].

### *Αντιοξειδωτικά ένζυμα*

Οι αντιοξειδωτικοί ενζυμικοί μηχανισμοί του οργανισμού φαίνεται πως προσαρμόζονται τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά, με εξειδίκευση ανά ιστό και όργανο [Banerjee και συν 2003]. Πιο συγκεκριμένα, αυξάνεται η συγκέντρωση και δραστηριότητα των SOD, CAT, GPx. Ιδιαίτερο ρόλο στην προσαρμοστική αυτή απόκριση του οργανισμού θεωρείται ότι παίζει το ήπαρ.

### *Μεταβολισμός του Fe*

Η συχνή άσκηση μειώνει τα επίπεδα του χαλαρά συνδεδεμένου στους ιστούς Fe, παρεμποδίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την αντίδραση Fenton και την παραγωγή ROS [Moeller και συν., 1996].

### *Ανοσοποιητικό σύστημα*

Τα ουδετερόφιλα των «προπονημένων» ατόμων παράγουν μικρότερες ποσότητες ROS κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση [Moeller και συν., 1996]. Έτσι, μειώνεται η έκταση των πιθανών βλαβών στους μες.

## **1.5 Αναβολικά**

### **1.5.1 Αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή (AAS)**

#### *1.5.1.1 Ιστορική αναδρομή*

Τα αναβολικά στεροειδή είναι μια κατηγορία φυσικών και συνθετικών στεροειδών ορμονών που επάγουν την κυτταρική αύξηση και διαίρεση, επηρεάζουν την ανάπτυξη του μυϊκού ιστού και μερικές φορές το μέγεθος και δύναμη των οστών [Harttgens F. and Kuipers H. 2004]. Η ορμόνη τεστοστερόνη (εικόνα 17) είναι το πιο γνωστό αναβολικό ανδρογόνο στεροειδές. Η τεστοστερόνη παράγεται στα κύτταρα Leydig στους όρχεις. Από πολύ παλιά ήταν γνωστό ότι ο ευνουχισμός έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια των δευτερογενών αρσενικών χαρακτηριστικών. Στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα έγινε μια πρώτη προσπάθεια για παρασκευή μιας ουσίας με

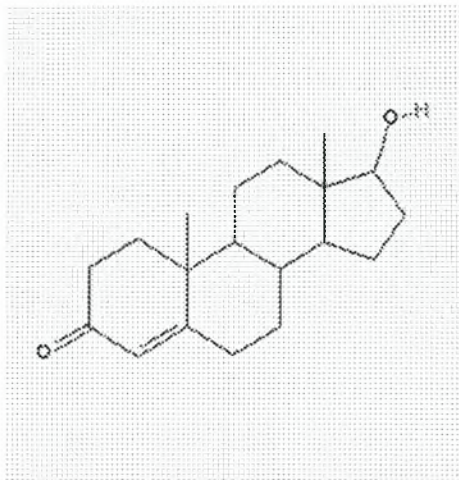
παραπλήσια της τεστοστερόνης δράση το οποίο και επιτεύχθηκε το 1935 [www.nationmaster.com].

Μια ορμόνη με αυξημένη αναβολική επίδραση χωρίς την ταυτόχρονη επίδραση στα χαρακτηριστικά του φύλου είναι το αντικείμενο μελέτης και έρευνας στο πεδίο των αναβολικών. Σήμερα έχουν παρασκευαστεί προϊόντα με περισσότερο αναβολική και άλλα με αντίστοιχα περισσότερο ανδρογονική δράση. Πλήρης διαχωρισμός όμως των δυο δράσεων είναι δύσκολο να πραγματοποιηθεί. Η ανδρογονική δράση περιλαμβάνει κυρίως την ανάπτυξη των δευτερευόντων αρσενικών χαρακτηριστικών, ενώ η αναβολική δράση επηρεάζει το μεταβολισμό των πρωτεϊνών με επαγωγή της πρωτεϊνοσύνθεσης και μείωση του πρωτεϊνικού καταβολισμού [Harttgens F. and Kuipers H. 2004].

Τόσο η από του στόματος όσο και η ενέσιμη χορήγηση εξωγενούς τεστοστερόνης δεν επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη του ανθρώπινου σώματος, καθ' ότι η ορμόνη γρήγορα μεταβολίζεται. Διάφορα χημικά παράγωγα της τεστοστερόνης έχουν αναπτυχθεί με τρεις κυρίως κατηγορίες μεταβολής της χημικής δομής της ορμόνης [Harttgens F. and Kuipers H. 2004]:

- αλκυλίωση στη 17-α με μεθυλ- ή αιθυλική ομάδα. Η αλκυλίωση επιβραδύνει τη διάσπαση της τεστοστερόνης και την καθιστά πιο ανθεκτική στο γαστρικό υγρό όταν χορηγείται δια της στοματικής οδού. Η ουσία απορροφάται από το έντερο, περνάει στη πυλαία κυκλοφορία και στη συνέχεια στο ήπαρ. Τα συγκεκριμένα παράγωγα είναι τα πλέον επικίνδυνα για τη λειτουργία του ήπατος αφού θεωρούνται υπεύθυνα και για πιθανή εμφάνιση καρκίνου του ήπατος.
- εστεροποίηση της τεστοστερόνης και της επιτεστεστορόνης στη θέση 17-β. Η εστεροποίηση βοηθά τα παράγωγα που χορηγούνται απ' ευθείας στην περιφερική κυκλοφορία να έχουν μεγαλύτερο χρόνο ημιζωής, και κατά συνέπεια να επιμηκύνεται χρονικά η δραστητικότητά τους.
- αλλαγές στη δομή του τετραδακτυλικού πυρήνα.

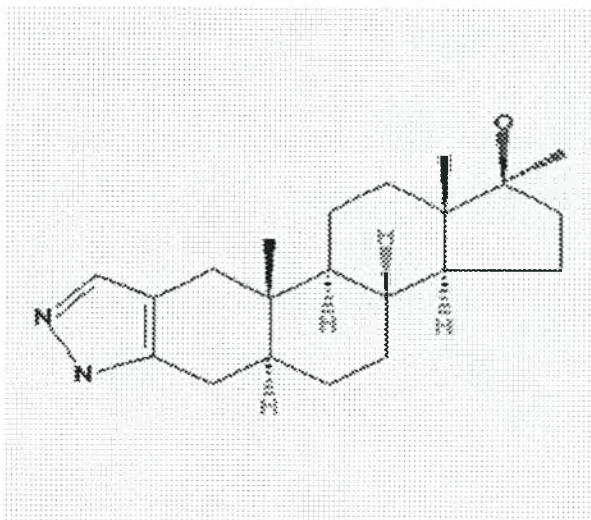




Εικόνα 17: Χημική δομή τεστοστερόνης

Η πρώτη αναφορά χορήγησης ανδρογόνων αναβολικών σε αθλητές εντοπίζεται στη δεκαετία του '50 [www.nationmaster.com]. Στο παγκόσμιο πρωτάθλημα άρσης βαρών στη Βιέννη της Αυστρίας κυκλοφορούσε η φήμη ότι ο γιατρός της σοβιετικής ομάδας χορήγησε στους αθλητές του ανδρογόνα για να βελτιώσει την απόδοσή τους. Στη συνέχεια και ο αθλητίατρος της εθνικής ομάδας των Η.Π.Α. εισήγαγε τη χρήση ανδρογόνων αναβολικών στους δικούς του αθλητές. Τα πρώτα αποτελέσματα ήταν μέτρια, οι επιτυχίες όμως που αργότερα σημείωσαν οι Σοβιετικοί αθλητές οδήγησε στην εξάπλωση των ουσιών αυτών. Η Διεθνής Ολυμπιακή Επιτροπή (Δ.Ο.Ε.) ξεκίνησε την εκστρατεία ενάντια στη χρήση ουσιών από επαγγελματίες αθλητές τη δεκαετία του '60 και εισήγαγε για πρώτη φορά τις δοκιμασίες ελέγχου στους ολυμπιακούς αγώνες στην πόλη του Μεξικού το 1968. Τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή προστέθηκαν στον κατάλογο των απαγορευμένων ουσιών το 1976. Μια δεκαετία αργότερα, η Δ.Ο.Ε. αποφάσισε την εφαρμογή των δοκιμασιών ελέγχου εκτός συναγωνισμού, διότι οι αθλητές ακολουθούσαν θεραπεία με ουσίες κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας την οποία και σταματούσαν κατά τη διάρκεια των αγώνων [www.nationmaster.com]. Για τα επόμενα χρόνια και μέχρι σήμερα τα ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή είναι αυτά που εντοπίζονται με τη μεγαλύτερη συχνότητα από όλο το φάσμα των απαγορευμένων ουσιών. Η χρήση τους δε περιορίζεται μονάχα σε επαγγελματίες αθλητές, αλλά και σε νεαρούς «ανερχόμενους» αθλητές, αλλά και σε χώρους μαζικής άθλησης, όπως τα διάφορα γυμναστήρια. Η κατάχρηση των ουσιών αυτών, ιδιαίτερα σε νεαρές ηλικίες μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές παρενέργειες, άμεσες αλλά κυρίως μακροπρόθεσμες [www.tiscali.co.uk].

Το φάρμακο στανοζολόλη (εικόνα 18), εμπορικά γνωστό ως Winstrol, είναι ένα αναβολικό ανδρογόνο στεροειδές. Το εμπορικό παρασκεύασμα πωλείται ως υδατοδιαλυτό αιώρημα. Το Winstrol προσλαμβάνεται από το στόμα, ενώ κυκλοφορεί και σε μορφή δισκίων. Η χρήση του έχει εξαπλωθεί κυρίως στους αθλητές του bodybuilding [[www.tiscali.co.uk](http://www.tiscali.co.uk), [www.greatvistachemicals.com](http://www.greatvistachemicals.com)].



Εικόνα 18: Χημική δομή στανοζολόλης (Winstrol)

Το Winstrol συμπεριλαμβάνεται στη λίστα απαγορευμένων ουσιών της Δ.Ο.Ε. που περιέχει και τα παρακάτω ανδρογόνα αναβολικά: δροστανολόνη, μεθανανδιενόνη, μεθενελόνη, ναδρολόνη, οξανδρολόνη, οξυμεθολόνη, τεστοστερόνη [[www.ifet.gr](http://www.ifet.gr)].

### 1.5.1.2 Ιατρικές εφαρμογές

Τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή χρησιμοποιούνται από τη δεκαετία του '40 για διάφορους ιατρικούς λόγους [[www.cyclist.gr](http://www.cyclist.gr)]. Η πρώτη αιτία χορήγησής τους ήταν η θεραπεία της υποπλαστικής αναιμίας, καθ' ότι διεγείρουν τη λειτουργία του μυελού των οστών και κατ' επέκταση την ερυθροποίηση. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως υποκινητές της σωματικής αύξησης από ενδοκρινολόγους παιδίατρους για τη θεραπεία παιδιών με καθυστερημένη έως και μηδενική σωματική ανάπτυξη. Η δυνατότητα αύξησης της όρεξης και της μυϊκής μάζας οδήγησε στη χρήση των ουσιών αυτών από ασθενείς που διαβιούν σε συνθήκες χρόνιας καταβολής, όπως καρκινοπαθείς, διαβητικοί και ασθενείς με HIV. Η τεστοστερόνη χορηγήθηκε σε έφηβους με καθυστερημένη εμφάνιση ήβης. Η στανοζολόλη έχει επίσης αγγειοκινητική δράση που είναι χρήσιμη για τη θεραπεία των αγγειακών επιδράσεων της ασθένειας Bechet. Στο κληρονομικό αγγειακό οίδημα τα επίπεδα του αναστολέα

της εστεράσης είναι χαμηλά. Η στανολόλη επιδρά στα επίπεδα της ουσίας αυτής στο αίμα ώστε η συγκέντρωσή της να επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα [www.cyclist.gr].

Παρότι παλιότερα χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα, σήμερα οι ιατρικές εφαρμογές των ανδρογόνων αναβολικών είναι περιορισμένες με σημαντικότερες τη θεραπεία ενδοκρινών δυσλειτουργιών των όρχεων και του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – γονάδων. Τελευταία, μελετάται η δυνατότητα χορήγησης ανδρογόνων αναβολικών σε διάφορες χρόνιες και οξείες κλινικά ασθένειες. Μικρές συγκεντρώσεις των φαρμάκων αυτών φαίνεται να προκαλούν θετικό ισοζύγιο αζώτου σε εγχειρισμένους ασθενείς. Σε πάσχοντες από AIDS φαίνεται να αυξάνουν τη μη λιπώδη (lean) σωματική μάζα. Μελέτες υπέδειξαν επίσης θετικά αποτελέσματα σε ασθενείς με μυϊκή δυσλειτουργία και δερματοπάθειες [Harttgens F. and Kuipers H. 2004].

### *1.4.1.3 Εφαρμογές στον αθλητισμό*

Οι αθλητές χρησιμοποιούν τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή για να βελτιώσουν την αθλητική τους επίδοση και πιο συγκεκριμένα για να αυξήσουν το μέγεθος και την ισχύ των μυών τους [Harttgens F. and Kuipers H. 2004]. Αποκτούν ικανότητα εντονότερης προπόνησης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Μπορεί δηλαδή να αυξηθεί η αντοχή τους και να μειωθεί η προκαλούμενη κόπωση, να αυξηθεί η επιθετικότητά τους και η ανταγωνιστικότητά τους και να προκληθεί ήπιου βαθμού ευφορία. Τα αναβολικά στεροειδή βοηθούν τον αθλητή να προπονείται σκληρότερα και να ανακάμπτει ταχύτερα με αποτέλεσμα την αυξανόμενη ενδυνάμωσή του. Πέρα από τους bodybuilders, τα AAS χρησιμοποιούνται από επαγγελματίες αθλητές μιας μεγάλης ποικιλίας αγωνισμάτων, όπως άρση βαρών, baseball, ποδηλασία, στίβος και κολύμβηση. Ο αθλητής των 100 μέτρων Ben Jonson, μέλος της εθνικής ομάδας στίβου των Η.Π.Α. στους ολυμπιακούς αγώνες στο Los Angeles το 1988, τιμωρήθηκε με αφαίρεση του χρυσού μεταλλίου επειδή βρέθηκε θετικός στο Winstrol στη δοκιμασία μετά την τελική κούρσα [www.natiomaster.com]. Τα τελευταία χρόνια έχει επικίνδυνα εξαπλωθεί η χρήση τους σε χώρους μαζικής άθλησης, ιδιαίτερα στα γυμναστήρια σωματική ανάπτυξης [Harttgens F. and Kuipers H. 2004].

Η χρήση ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών οδηγεί σε ποικίλα αποτελέσματα, ανάλογα με τη χρονική διάρκεια και το σχεδιασμό της θεραπείας.

Επίσης επηρεάζονται οι σωματικές διαστάσεις με τα αποτελέσματα να είναι πιο εμφανή στο θώρακα, στο λαιμό, στους ώμους και στους βραχίονες των χεριών. Ο μηχανισμός περιλαμβάνει υπερτροφία του μυϊκού ιστού και σχηματισμό καινούριων μυϊκών ινών. Χορήγηση αυτών των ουσιών επιδρά στην αύξηση της μη λιπώδους σωματικής μάζας. Μείωση του λίπους δεν επιτυγχάνεται στον άνθρωπο, παρ' ότι ζωικά μοντέλα έδειξαν ότι η θεραπεία με ανδρογόνα αναβολικά οδηγεί σε συρρίκνωση του λιπώδους ιστού. Με το πέρας της θεραπείας οι αλλαγές στη σωματική διάπλαση σιγά σιγά εξαφανίζονται. Το μέγιστο χρονικό όριο διατήρησής τους φαίνεται να είναι οι τρεις μήνες [Harttgens F. and Kuipers H. 2004].

Μακροχρόνια αγωγή με ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή επέδειξε αύξηση στη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης στον ορό του αίματος. Τη δυνατότητα αυτή προσφέρει ένα νέο αναβολικό παρασκεύασμα που περιλαμβάνεται ήδη στις απαγορευμένες ουσίες, η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη ερυθροποιητίνη. Από την εμπειρία των ίδιων των αθλητών εκτιμάται ότι τα ανδρογόνα αναβολικά στεροειδή βοηθούν στη ταχύτερη επαναφορά του οργανισμού μετά από επίπονη προπόνηση. Δυστυχώς, τα πειραματικά δεδομένα και σ' αυτό το θέμα είναι πολύ περιορισμένα [Harttgens F. and Kuipers H. 2004].

### 1.5.1.4 Παρενέργειες

*«Βρες μου τον ευχαριστημένο δεύτερο και θα σου βρω τον αιώνια χαμένο».*

Η παραπάνω ρήση αντικατοπτρίζει τις αιτίες εξάπλωσης της χρήσης αναβολικών (και γενικά απαγορευμένων ουσιών) μέσα στην αθλητική κοινότητα, παρ' ότι μελέτες επιδεικνύουν σημαντικές παρενέργειες στην υγεία. [www.avlonitou.gr]. Οι παρενέργειες διακρίνονται σε αντικειμενικές και υποκειμενικές.

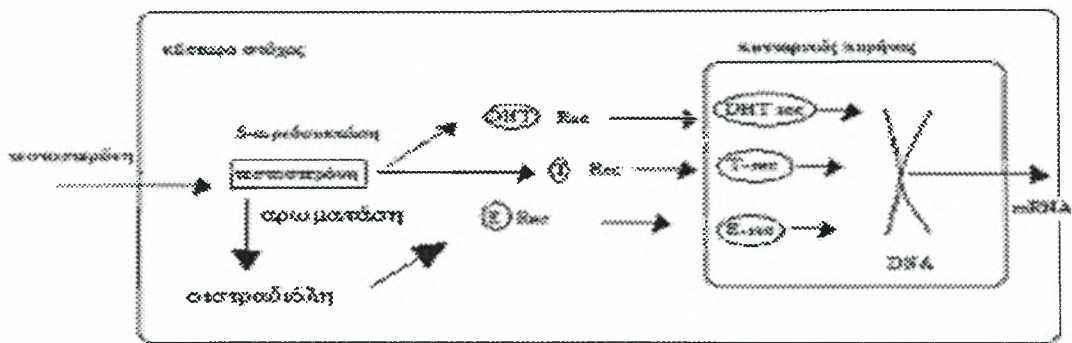
Η πλειοψηφία των χρηστών θα βιώσουν προβλήματα στην υγεία τους όχι μόνο κατά τη θεραπεία, αλλά και μετά το πέρας αυτής [www.cyclist.gr, Harttgens F. and Kuipers H. 2004]. Στους άνδρες η χρήση των ανδρογόνων αναβολικών στεροειδών επηρεάζει ποικιλοτρόπως σχεδόν όλα τα συστήματα του οργανισμού. Ανάμεσα στις παρενέργειες περιλαμβάνονται η αυξημένη πίεση του αίματος και των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα, πρόωπη τριχόπτωση, μειωμένη σεξουαλική λειτουργία και ατροφία των όρχεων. Στους άνδρες επίσης η χορήγηση στεροειδών μπορεί ακόμη να οδηγήσει σε ανώμαλη ανάπτυξη του στήθους (γυναικομαστία) και

αϋπνία. Στα θηλυκά τα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή προκαλούν αρρενοποίηση, που περιλαμβάνει πύκνωση του τριχώματος στο σώμα, βάθεμα της φωνής, σμίκρυνση του στήθους, υπερπλασία της κλειτορίδας, και μείωση του αριθμού των κύκλων εμμηνόρρησης. Οι περισσότερες από τις παραπάνω επιδράσεις είναι μη αντιστρεπτές. Κατάχρηση των ουσιών αυτών κατά την εφηβική ηλικία ενδεχομένως να οδηγήσει σε πρόωρη αναστολή της οστικής επιμήκυνσης. Σοβαρά κλινικά συμπτώματα συνδέονται με την υπερβολική κατανάλωση των ορμονών αυτών, όπως η υπερτροφία του καρδιακού μυός που αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης καρδιακού επεισοδίου κατά την ενηλικίωση [[www.cyclist.gr](http://www.cyclist.gr)].

Οι υποκειμενικές παρενέργειες αναφέρονται στις αλλαγές που προκαλούνται στην ψυχосύνθεση του αθλητή. Χαρακτηριστικά είναι τα συμπτώματα σχιζοφρένειας, ψυχωτικών συνδρόμων, παράνοιας, τάσης αυτοκτονονίας, κ.ά. Συνήθως παρατηρείται εθισμός στους αθλητές που κάνουν χρήση, ενώ από πολύ νωρίς διαπιστώνονται συμπτώματα ναρκισσισμού [Harttgens F. and Kuipers H. 2004].

### *1.5.1.5 Μηχανισμός δράσης*

Τα περισσότερα από τα ανδρογόνα στεροειδή δρουν ενεργοποιώντας τους υποδοχείς ανδρογόνων, παράγοντας αναβολική και ανδρογονική επίδραση [Harttgens F and Kuipers H. 2004]. Παραδείγματα αναβολικής επίδρασης είναι η αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης από αμινοξέα, η αύξηση της μυϊκής μάζας, η επιτάχυνση της ανακατασκευής και μεγένθυσης των οστών, η αύξηση της όρεξης για πρόσληψη τροφής, η διέγερση του μυελού των οστών με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής ερυθροκυττάρων. Παραδείγματα ανδρογονικής επίδρασης είναι η υπερτροφία της κλειτορίδας στα θηλυκά και υπερμεγένθυση του πέους στους εφήβους. Επίσης παρατηρείται αυξημένη ανάπτυξη των ανδρογono-εξαρτωμένων τριχών (στο εφηβείο, στο πρόσωπο, στο στήθος και στα άκρα). Παράλληλα επιμηκύνονται οι φωνητικές χορδές που οδηγούν στη βάθυνση της χροιάς της φωνής. Ταυτόχρονα καταστέλλεται η παραγωγή των ενδογενών φυλοκαθοριστικών ορμονών, μειώνεται η σπερματογένεση, ενώ αυξάνεται η λίμπιντο. Πολλά ανδρογόνα μεταβολίζονται σε συστατικά που αλληλεπιδρούν με υποδοχείς οιστρογόνων, επάγοντας επιπλέον αρνητικές (συνήθως) επιδράσεις όπως επιτάχυνση της ωρίμανσης των οστών στην παιδική ηλικία και γυναικομαστία στους άνδρες [Harttgens F. and Kuipers H. 2004].



Εικόνα 19: Μηχανισμός δράσης των στεροειδών μέσα στο κύτταρο.

**T=τεστοστερόνη, DHT= διυδροτεστοστερόνη, E=οιστραδιόλη, Rec=υποδοχέας**

Ο μηχανισμός με τον οποίο τα διάφορα αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή επιδρούν μέσα στο κύτταρο διαφοροποιείται ανάλογα τη χημική δομή κάθε παρασκευάσματος. Η βασική διαφορά έγκειται στη χημική συγγένεια που παρουσιάζουν με τους υποδοχείς στεροειδών και την αλληλεπίδρασή τους με τα ένζυμα μεταβολισμού τους. Για παράδειγμα, η 19-επιτεστοστερόνη έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το στεροειδή ανδρογονικό υποδοχέα σε σχέση με την τεστοστερόνη, και συνεπώς θεωρείται ισχυρότερο ανδρογονικό φάρμακο. Η στανολολόλη, έχει μικρή συγγένεια με αυτούς τους υποδοχείς και γι' αυτό η δράση της είναι κυρίως αναβολική. Τέλος, υπάρχουν και κατηγορίες αναβολικών ανδρογόνων στεροειδών, όπως η οξυμεθολόνη που δε συνδέεται καθόλου με τους ανδρογονικούς υποδοχείς [Harttgens και Kuipers 2004].

Στην εικόνα 19 περιγράφεται η δράση της τεστοστερόνης. Το ένζυμο 5-α ρεδουκτάση μεταβολίζει την ορμόνη σε διυδροτεστοστερόνη (DHT). Και οι δυο μορφές της ορμόνης αλληλεπιδρούν με τους εξειδικευμένους ανδρογονικούς υποδοχείς που εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα περιφερικά της πυρηνικής μεμβράνης. Το σύμπλοκο ορμόνης – υποδοχέα διαπερνά την πυρηνική μεμβράνη και εισέρχεται στο πυρήνιο ενεργοποιώντας την μεταγραφή και μετάφραση του γονιδιώματος. Η δράση του ενζύμου εντοπίζεται κυρίως στα κύτταρα των όρχεων, του δέρματος, των πνευμόνων, του εγκεφάλου, όπως επίσης και στα οστά και στο λιπώδη ιστό [Harttgens και Kuipers].

Η αρωματάση φαίνεται να επηρεάζει σε μικρό βαθμό τη δράση των στεροειδών υπό φυσιολογικές συνθήκες. Το ένζυμο αυτό εντοπίζεται στο

κυτταρόπλασμα και καταλύει τη μετατροπή των AAS σε θηλυκές φυλετικές ορμόνες, οιστραδιόλη και οιστρόνη. Οι θηλυκές φυλετικές ορμόνες συνδέονται με τους υποδοχείς οιστρογόνων και σχηματίζουν το αντίστοιχο σύμπλοκο (εικόνα 19). Το σύμπλοκο αυτό δρα στα κύτταρα των Leydig και Sertoli, στο λιπώδη ιστό και σε ορισμένους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ο μηχανισμός αυτός ενεργοποιείται μόνο όταν το σύστημα των ανδρογονικών υποδοχέων κορεστεί από τα αναβολικά και ανδρογονικά στεροειδή που βρίσκονται στην κυκλοφορία. Η πλεονάζουσα ποσότητα ανδρογονικών αναβολικών στεροειδών συνδέεται με τους υποδοχείς οιστρογόνων και επάγει την εμφάνιση θηλυκών χαρακτηριστικών, χωρίς όμως να είναι απόλυτα προβλέψιμα τα αποτελέσματα [Harttgens και Kuipers 2004].

#### *1.5.1.5 Ανδρογόνα Αναβολικά Στεροειδή και οξειδωτικό stress*

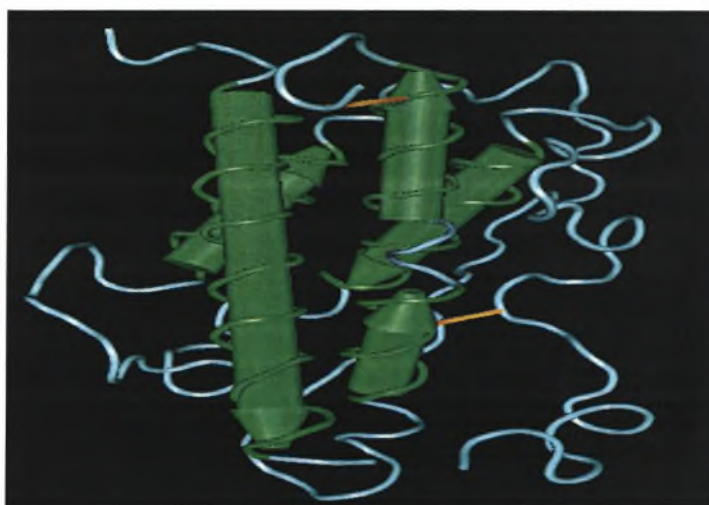
Υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες που να συσχετίζουν αναβολικά ανδρογόνα στεροειδή με το οξειδωτικό στρες. Σε μια απ' αυτές [Pey A., 2003] βρέθηκε πως η μακροχρόνια χορήγηση στανοζολόλης σε αρουραίους (8 εβδομάδες) προκάλεσε σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση των TBARS και στις δραστηριότητες των SOD, CAT και GPx στο ήπαρ. Αντιθέτως, η άθληση από μόνη της δεν αύξησε τα ηπατικά επίπεδα των παραπάνω δεικτών οξειδωτικού στρες. Η αύξηση της δραστηριότητας των SOD, CAT και GPx στο ήπαρ αθλημένων και μη – αθλημένων αρουραίων υποδηλώνει την εμφάνιση οξειδωτικού στρες στα ζώα. Στην ίδια εργασία μετρήθηκαν και αυξημένα επίπεδα του δείκτη TBARS στο ήπαρ ζώων μετά από χορήγηση στανοζολόλης. Καμία αλλαγή δεν παρατηρήθηκε στα επίπεδα TBARS, στον ορό, στον σκελετικό και καρδιακό μυ. Σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα, η συνεχής και μακροχρόνια χορήγηση στανοζολόλης τείνει να αυξήσει το οξειδωτικό στρες στο ήπαρ, γεγονός που ενδεχομένως να εξηγεί την αυξημένη έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων στο όργανο αυτό.

Ο μηχανισμός με τον οποίο η χορήγηση στανοζολόλης δια της στοματικής οδού συνδέεται με την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είναι άγνωστος προς το παρόν. Μελέτες έδειξαν πως θεραπεία 8 εβδομάδων με στανοζολόλη ή άλλα ανδρογόνα αναβολικά δια της στοματικής οδού προκαλεί μείωση στη δραστηριότητα των μιτοχονδριακών συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας. Επιπλέον τα AAS αναστέλλουν *in vitro* την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Αυτή η δυσλειτουργία θα μπορούσε να προκαλέσει αύξηση στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Επειδή όμως η δραστηριότητα της μιτοχονδριακής SOD παραμένει αναλλοίωτη,

κάποιος άλλος μηχανισμός πρέπει να είναι υπεύθυνος για την αύξηση των ελεύθερων ριζών κατά τη θεραπεία με στανοζολόλη. Ο μεταβολισμός από το ηπατικό κυτόχρωμα P450 (CYP) υψηλών δόσεων στανοζολόλης αυξάνει σημαντικά την παραγωγή ελευθέρων ριζών, οδηγώντας από τη μια μεριά στην αύξηση του οξειδωτικού στρες και από την άλλη μεριά στην επαγωγή της έκφρασης των αντιοξειδωτικών ενζύμων και του κυτοχρώματος P450 [Rey A και συν., 2003].

### 1.5.2 Αυξητική ορμόνη (GH)

Η αυξητική ορμόνη (εικόνα 20) εκκρίνεται φυσιολογικά στον ανθρώπινο οργανισμό από την υπόφυση. Από τα τέλη της δεκαετίας του '80 η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη αυξητική ορμόνη χρησιμοποιείται κλινικά για τη θεραπεία των ασθενών με έλλειψη αυξητικής ορμόνης. Η δράση της περιλαμβάνει αναβολική αυξητική επίδραση στη μη λιπώδη μάζα του οργανισμού καθώς και μείωση του σωματικού λίπους. Εξαιτίας των ιδιοτήτων της αυτών διαδόθηκε ταχύτατα ανάμεσα στους αθλητές bodybuilding [Ehrnborg C. και συν., 2000].



Εικόνα 20: Τρισδιάστατη διαμόρφωση της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης

#### 1.5.2.1 Δράση της αυξητικής ορμόνης

Η αυξητική ορμόνη (σωματοτροπίνη) είναι ένα πολυπεπτίδιο που στον άνθρωπο αποτελείται από 191 αμινοξέα. Εκκρίνεται από τα σωματοτρόφα κύτταρα της αδενούποφουσης. Όπως και άλλες πρωτεϊνικές ορμόνες προκύπτει μια προ-ορμόνη με περισσότερα αμινοξέα. Η έκκριση ρυθμίζεται από δυο υποθαλαμικά πεπτίδια, την απελευθερωτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης (GHRH) και τη σωματοστατίνη (GHIH). Η πρώτη διεγείρει την έκκριση GH ενώ η δεύτερη την αναστέλλει. Οι



γυναίκες φαίνεται να έχουν ελαφρώς μεγαλύτερη έκκριση GH σε σχέση με τους άνδρες. Επίσης, η αύξηση της ηλικίας φαίνεται να σχετίζεται με μείωση της έκκρισης GH, 14% περίπου ανά δεκαετία. Επιπλέον, η έκκριση GH ποικίλλει σε διάφορες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Τα επίπεδα GH αυξάνονται κατά τον ύπνο, τη σωματική άσκηση, το στρες, τον πυρετό, την υπογλυκαιμία και την λήψη συγκεκριμένων αμινοξέων (αργινίνη και λευκίνη). Ειδικά φάρμακα, όπως η κλονιδίνη, η l-dopa, *gamma*hydroxybutyrate (GHB) αυξάνουν την έκκριση GH. Η έκκριση GH μειώνεται στην υπεργλυκαιμία και στην παχυσαρκία. Τόσο τα ανδρογόνα όσο και τα οιστρογόνα αυξάνουν την έκκριση αυξητικής ορμόνης. Αύξηση παρατηρείται και κατά τον υπερθυρεοειδισμό [Ehrnborg C. et al.2000].

Η σωματική ανάπτυξη θεωρείται το πιο σημαντικό φυσιολογικό αποτέλεσμα της δράσης της αυξητικής ορμόνης, η οποία επηρεάζει επίσης το μεταβολισμό των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και των λιπιδίων. Η βιοχημική της δράση είναι πολλαπλή και για την υλοποίησή της μεσολαβεί ένα άλλο πεπτίδιο, ο ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1). Ο IGF-1 κυκλοφορεί στο αίμα συνδεδεμένος με ειδικές πρωτεΐνες (IGFBPs) οι οποίες ρυθμίζουν τη βιοδιαθεσιμότητα και βιοδραστικότητά του [De Palo E. F., 2000].

Οι φυσιολογικές δράσεις της GH είναι πολλαπλές. Οι κυριότερες είναι:

- Πρωτεϊνοσύνθεση. Η αυξητική ορμόνη επάγει απ' ευθείας τη σύνθεση πρωτεϊνών και η δράση της είναι τόσο ισχυρή όσο και της τεστοστερόνης. Η αναβολική της δράση οφείλεται στην ενεργοποίηση των μεταφορέων αμινοξέων στην κυτταρική μεμβράνη. Επίσης, η αυξητική ορμόνη επάγει την έκφραση των γονιδίων IGF-1 σε όλους τους ιστούς και ιδιαίτερα στο ήπαρ, αυξάνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη σύνθεση πρωτεϊνών. Τέλος, η αυξητική ορμόνη εμφανίζει συνεργιστική αναβολική δράση με την ορμόνη ινσουλίνη, η οποία εμποδίζει τον καταβολισμό των πρωτεϊνών.
- Λιπόλυση. Διεγείρει τη διασπορά του λίπους σε πιο περιφερικές τοποθεσίες, αυξάνοντας τη συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία.
- Αύξηση των σωματικών υγρών. Προκαλείται με μια σειρά μηχανισμών, όπως: α) ενεργοποίηση της  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  στους νεφρόνες, β) ενεργοποίηση του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης-αλδοστερόνης, και γ) αύξηση της έκκρισης NO από τα κύτταρα του ενδοθηλίου [Ehrnborg C. Et al. 2005].

- Ανοσοποιητικό σύστημα. Η αυξητική ορμόνη αποτελεί ισχυρό ενεργοποιητή του ανοσολογικού συστήματος [Liu W. Et al. 2003].

#### *1.5.2.2 Κλινικές εφαρμογές της αυξητικής ορμόνης*

Η αυξητική ορμόνη χορηγείται για θεραπευτικούς σκοπούς σε παιδιά αλλά και ενήλικες με ανεπάρκεια της ορμόνης, καθώς και σε παιδιά με σύνδρομο Turner [Jenkins 1999]. Η GH χορηγείται επίσης σε πολύ υψηλές, αναβολικές δόσεις σε ασθενείς με εκτεταμένα εγκαύματα και άλλες καταβολικές συνθήκες. Τα κλινικά συμπτώματα της ανεπάρκειας σε GH είναι μειωμένη μη λιπώδη-μάζα (περίπου 9%), αυξημένο λίπος και μειωμένη οστική πυκνότητα [Jenkins 1999]. Θεραπεία με GH σε παιδιά με έλλειψη εφαρμόζεται ήδη από το 1950, με τη χορήγηση ορμόνης που απομονώθηκε από την ανθρώπινη αδενούπόφυση. Το 1989 δημοσιεύονται οι δυο πρώτες εργασίες για χρήση ανασυνδυασμένης GH σε ενήλικες ασθενείς με έλλειψη της ορμόνης. Χορήγηση ανασυνδυασμένης αυξητικής ορμόνης για ένα χρονικό διάστημα από 4 έως 6 μήνες, έχει ευεγερτικές επιδράσεις στη σωματική διάπλαση, καρδιακή λειτουργία, ικανότητα άθλησης και γενικά στην ποιότητα ζωής των ασθενών [Ehnborg και συν.2000].

#### *15.2.3 Αυξητική ορμόνη και σωματική άσκηση*

Η συγκέντρωση της αυξητικής ορμόνης στο πλάσμα του αίματος αυξάνεται κατά τη σωματική άσκηση. Η αύξηση αυτή μπορεί να κυμαίνεται από 5 έως 20 φορές ανάλογα με τη διάρκεια και ένταση της άσκησης. Τα μέγιστα επίπεδα αυξητικής ορμόνης παρατηρούνται 15 με 20 min μετά το πέρας της άσκησης. Επίσης, φαίνεται πως τα εκκρινόμενα επίπεδα αυξητικής ορμόνης συνδέονται περισσότερο με το μέγιστο της έντασης παρά με τη συνολική διάρκεια της άσκησης. Η έκκριση αυξητικής ορμόνης επηρεάζεται επιπλέον από μια σειρά άλλων γεγονότων που συνοδεύουν τη σωματική άσκηση όπως θερμοκρασία και στρες. Ακριβώς αυτή η μεγαλύτερη έκκριση αυξητικής ορμόνης από τον ίδιο τον οργανισμό κατά την άθληση καθιστά πολύ δύσκολη την εξακρίβωση εάν έγινε χορήγηση εξωγενούς ορμόνης [Ehnborg και συν 2000, De Palo. 2000].

Ο μηχανισμός με τον οποίο η σωματική άσκηση επάγει την έκκριση της αυξητικής ορμόνης παραμένει αδιευκρίνιστος. Σε υγιείς, μη αθλημένους άνδρες η απόκριση της GH στην έντονη σωματική άσκηση ενισχύεται από τον οπιούχο ανταγωνιστή, ναλοξόνη. Στους αθλητες έχει την ακριβώς αντίθετη δράση μειώνοντας

την απόκριση σε GH. Αυτές οι διαφοροποιήσεις ίσως προκύπτουν από τις αλλαγές στην νευροενδοκρινή ομοιόσταση εξαιτίας της χρόνιας άθλησης. Κεντρικά χολινεργικά μονοπάτια επίσης εμπλέκονται, με την GH να αυξάνεται από την πυριδοστιγμίνη και να αναστέλλεται από την ατροπίνη. Περιφερικά μεταβολικά σήματα επηρεάζουν επίσης την απόκριση σε αυξητική ορμόνη, η οποία αυξάνεται με την πρόσληψη λίπους και μειώνεται με την πέψη υδατανθράκων [Jenkins P. J. 2001].

#### *1.5.2.4 Χορήγηση αυξητικής ορμόνης σε αθλητές*

Η αυξητική ορμόνη παρουσιάζεται στην αγορά ως εργογενικό φάρμακο από το 1988. Από τότε και κυρίως την τελευταία δεκαετία, χρησιμοποιείται ευρέως ως αναβολικό φάρμακο αρχικά από τους αθλητές bodybuilding (γενικά αθλητές δύναμης), και αργότερα από αθλητές αντοχής (ποδοσφαιριστές, ποδηλάτες και κολυμβητές) [Jenkins 2001]. Η χρήση της GH έχει ως σκοπό την αύξηση της μυϊκής μάζας και της δύναμης των αθλητών. Επίσης, θεωρείται ότι βοηθάει στην ταχύτερη επαναφορά μετά από έντονη σωματική καταπόνηση. Η ανασυνδυασμένη ανθρώπινη GH χορηγείται υποδόρια και οι δόσεις κυμαίνονται κατά μέσο όρο από 2 έως 5 IU/μέρα, ενώ οι ασθενείς με έλλειψη GH λαμβάνουν 1 με 2 IU/μέρα αντίστοιχα. Η GH χορηγείται σε χρονικές περιόδους των 6-12 εβδομάδων. Η θεραπεία με GH παραμένει ακριβή. Το κόστος αλλά και η δυσκολία προμήθευσης του φαρμάκου οδήγησε πολλούς αθλητές σε συμπληρώματα διατροφής με ουσίες, όπως αργινίνη, ορνιθίνη, λυσίνη και τρυπτοφάνη. Η χορήγηση GH είναι πιο διαδεδομένη σε αθλήτριες, καθώς δε παρουσιάζει την ανδρογονική επίδραση των AAS [Ehnborg C. et al.2000].

Ωστόσο, ο Jenkins (1999) υποστήριξε ότι η χορήγηση GH σε αθλητές δεν επηρέασε θετικά τη σωματική τους διάπλαση και δύναμη, ακόμα και σε πολύ μεγάλες δόσεις, αντίθετα προκαλούν σημαντικές παρενέργειες. Είναι πιθανό η GH και τα AAS να εμφανίζουν μια συνεργιστική επίδραση στη μυϊκή δύναμη. Ποια είναι ακριβώς η επίδραση της εξωγενούς GH σε αθλητές παραμένει ακόμα αντικείμενο μελέτης.

Προς το παρόν δεν υπάρχει κάποια αξιόπιστη τεχνική ανίχνευσης εξωγενούς GH. Το βασικό πρόβλημα έγκειται στην αδυναμία διάκρισης μεταξύ της ενδογενώς προερχόμενης και εξωγενώς χορηγούμενης GH. Η Δ.Ο.Ε. και η Ε.Ε. δημιούργησαν το ερευνητικό πρόγραμμα *GH 2000*, το οποίο στοχεύει στην ανάπτυξη μιας

ευαίσθητης τεχνικής που θα μπορεί να εφαρμοστεί ενάντια στη χρήση GH ως τεχνική doping [Jenkins 1999, Jenkins 2001, De Palo 2000, McHugh και συν . 2005].

#### *1.5.2.5 Παρενέργειες*

Ασθενείς με ακρομεγαλία, πάθηση που οφείλεται στην υπερέκκριση GH από την αδενούπόφυση, πάσχουν από κατακράτηση υγρών (εξαιτίας της αυξημένης κατακράτησης  $\text{Na}^+$ ), αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σακχαρώδους διαβήτη και υπέρτασης, οστεοαρθρίτιδα, μη φυσιολογικό μεταβολισμό των λιπιδίων. Συνολικά, αυξάνεται ο κίνδυνος πρόωρου θανάτου από καρδιαγγειακά επεισόδια και καρκινοπάθειες. Η χρήση GH από αθλητές ενδεχομένως να προκαλέσει τις ίδιες επιπλοκές. Θεραπεία με GH σε παιδική και εφηβική ηλικία οδηγεί σε γιγαντισμό. Το κόστος της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης ωθεί πολλούς αθλητές στη χρήση παρασκευασμάτων από αδενούπόφυση ανθρώπινων ή άλλων θηλαστικών, αυξάνοντας έτσι τον κίνδυνο εκδήλωσης κάποιας μορφής εγκεφαλοπάθειας. Τέλος, επειδή η GH λαμβάνεται ενδοφλέβια με ένεση, έχει διαπιστωθεί αυξημένη συχνότητα HIV/AIDS στους χρήστες της [Ehrnborg και συν .2000].

#### *1.5.2.6 Αυξητική ορμόνη και οξειδωτικό στρες*

Η παθολογική ανεπάρκεια στην αυξητική ορμόνη δε σχετίζεται με αυξημένο οξειδωτικό στρες. Αντίθετα, οι ασθενείς με ανεπάρκεια παρουσιάζουν μειωμένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και μικρότερη λιπιδική υπεροξείδωση, κάτι που αντιστρέφεται κατά τη χορήγηση GH. Επίσης διαπιστώθηκε μειωμένη παραγωγή  $\text{O}_2^-$  από τα ουδετερόφιλα, γεγονός που εξηγεί τα χαμηλότερα επίπεδα ελευθέρων ριζών στο αίμα των ασθενών αυτών [Smith και συν 2002].

Επιπλέον στοιχεία ενισχύουν την υπόθεση ότι η αυξητική ορμόνη ενεργοποιεί τα μονοκύτταρα, μακροφάγα και ουδετερόφιλα. Η GH είναι μια χημειοτακτική ουσία για τα ανθρώπινα μονοκύτταρα, προκαλώντας τη μετανάστευσή και ενεργοποίησή τους *in vitro*. Η σύνδεση της GH με τους υποδοχείς προλακτίνης στην μεμβράνη των ανθρώπινων ουδετερόφιλων αυξάνει την παραγωγή και απελευθέρωση  $\text{O}_2^-$  [Smith και συν 2002].

Η GH επιδρά επίσης στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού, και ειδικότερα στους ενζυμικούς μηχανισμούς. [Bolzn A. D. et al. 1995]. Σε διαγονιδιακούς για το γονίδιο της ανθρώπινης GH ποντικούς παρατηρείται πρόωρη γήρανση, συνοδευόμενη από μείωση της δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών

ενζυμικών μηχανισμών και μείωση του προσδόκιμου χρόνου ζωής. Αυτό σημαίνει ότι χρόνια έκθεση του οργανισμού σε μεγάλη συγκέντρωση αυξητικής ορμόνης μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού και αυξάνει το οξειδωτικό στρες [Hauck και Bartke 2000].

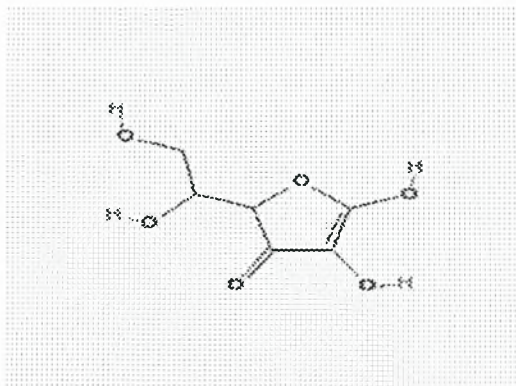
Συνολικά, η αυξητική ορμόνη φαίνεται πως επιδρά στην αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού, αυξάνοντας το οξειδωτικό στρες (ένας από τους παράγοντες που προκαλούν τη γήρανση). Δύο είναι οι μηχανισμοί με τους οποίους προκαλεί το συγκεκριμένο αποτέλεσμα: α) καταστέλλοντας την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, κυρίως επιδρώντας στη συγκέντρωση και δραστηριότητα των ενζύμων που αποτελούν τη πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού και β) αυξάνοντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). [Borg και Rakoczy, 2000].

## ***1.6 Διατροφική ενίσχυση και σωματική άσκηση***

Αρκετές είναι οι μελέτες που προσπάθησαν να συσχετίσουν τη διατροφική ενίσχυση με διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες και την αθλητική επίδοση. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται από τους αθλητές είναι οι βιταμίνες C και E, καροτένιο, ουβικινόνη, n-acetylcysteine (NAC), σελήνιο. Επίσης, μελετήθηκε αν η χορήγηση των παραπάνω αντιοξειδωτικών προστατεύει τους αθλητές από τις αρνητικές επιδράσεις της άσκησης και κυρίως, αν παρεμποδίζει την ανάπτυξη οξειδωτικού στρες στον οργανισμό.

### **1.6.1 Βιταμίνη C**

Οι πρώτες έρευνες της επίδρασης του ασκορβικού οξέος (εικόνα 22) στην αθλητική επίδοση δημοσιεύτηκαν τη δεκαετία του '70. Οι αρχικές εκτιμήσεις δεν έδειχναν κάποια θετική επίδραση. Αργότερα, οι Buzina and Suboticanec το 1985 υποστήριξαν ότι η διατροφική ενίσχυση με βιταμίνη C επιδρά θετικά μόνο σ' αυτούς που έχουν μερική ή πλήρη έλλειψη στη βιταμίνη. Άλλες έρευνες προσπάθησαν να εξακριβώσουν τα αποτελέσματα χορήγησης ασκορβικού οξέος στην ανοσολογική απόκριση κατά την άσκηση και ενάντια στις βλάβες που προκαλούνται στο μυϊκό ιστό από την άθληση. Η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος είναι υψηλή στα ουδετερόφιλα και προφανώς αναγκαία για τη λειτουργία τους κατά την ανοσολογική απόκριση. Και σ' αυτό το θέμα δεν μπορούν να εξαχθούν ακόμη ακριβή συμπεράσματα, καθώς πολλές από τις έρευνες έχουν μεταξύ τους αντιφατικά αποτελέσματα.



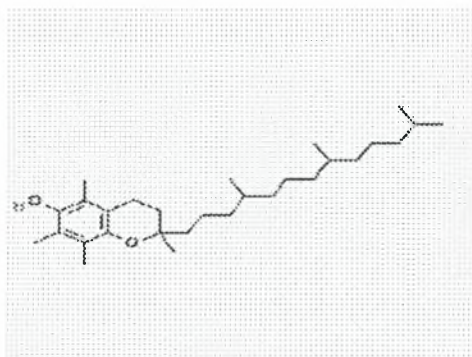
Εικόνα 21: Χημική δομή βιταμίνης C

Ο μυϊκός πόνος αποτελεί εκδήλωση της βλάβης στο μυ ύστερα από σκληρή άθληση. Μέρος της σωματικής προσαρμογής στη συγκεκριμένη βλάβη αποτελεί η διεϊσδυση μακροφάγων κυττάρων στον ιστό που έχει υποστεί τη βλάβη. Τα μακροφάγα απελευθερώνουν ελεύθερες ρίζες που επιτείνουν τη βλάβη. Αυξημένη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών θεωρητικά εξουδετερώνει αυτές τις ρίζες μειώνοντας τη ζημιά στο μυ και κατ' επέκταση ανακουφίζει το μυϊκό πόνο [Urso and Clarkson, 2003]. Οι έρευνες αναφορικά με το θέμα παραμένουν λίγες. Οι Clarkson and Thompson (2000) διαπίστωσαν ότι άτομα που τους έγινε χορήγηση ασκορβικού οξέος επανέκτησαν μυϊκή δύναμη και ικανότητα συστολής σε μικρότερο χρονικό διάστημα. Ενδεχομένως το ασκορβικό οξύ να παίζει κάποιο προστατευτικό ρόλο σε κυτταρικές δομές, όπως το σαρκοπλασματικό δίκτυο, από το οξειδωτικό στρες και τις επιπλοκές που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Η χορήγηση βιταμίνης αυξάνει τις «αντιοξειδωτικές αποθήκες» των μυϊκών ιστών οι οποίες απελευθερώνονται στην κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της άθλησης.

### 1.6.2 Βιταμίνη E

Η έρευνα γύρω από τη βιταμίνη E (εικόνα 22) περιορίστηκε στην επίδρασή της στην αθλητική επίδοση. Οι περισσότερες από τις μελέτες δεν έδειξαν κάποια σημαντική εργογενική επίδραση [Urso and Clarkson 2003]. Από τη στιγμή που η βιταμίνη E προστατεύει τις κυτταρικές μεμβράνες από τη λιπιδική υπεροξείδωση θεωρητικά η χορήγηση βιταμίνης θα μειώνει την μυϊκή βλάβη και το οξειδωτικό στρες που προκαλούνται από την άθληση. Η χορήγηση της βιταμίνης φαίνεται να προστατεύει το μυϊκό ιστό από τις βλάβες εξαιτίας της αθλητικής δραστηριότητας χωρίς να έχει κάποια άλλη ευεγερτική επίδραση στην παραγόμενη επίδοση. Επίσης, η βιταμίνη E πιθανώς προστατεύει τα κύτταρα από βλάβες στο DNA [Mastaloudis A.

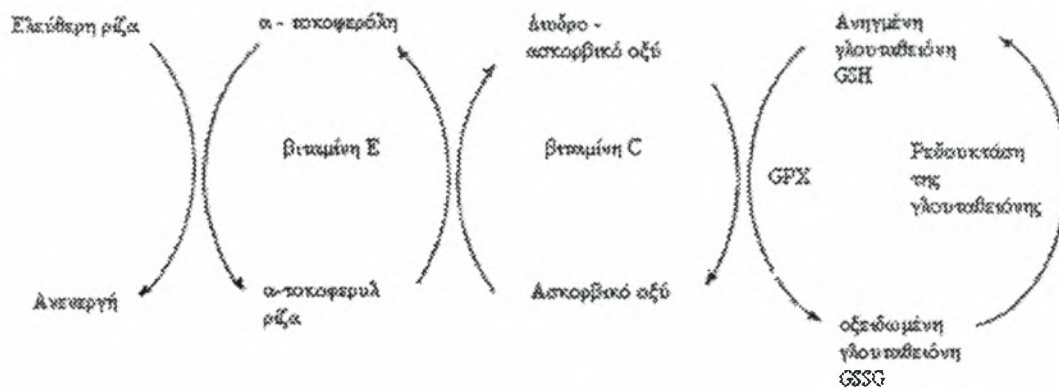
et. al, 2004]. Πάντως, οι έρευνες είναι ακόμη λίγες σε αριθμό και τα αποτελέσματα διφορούμενα [Clarkson and Thompson 2000, Urso and Clarkson 2003].



Εικόνα 22: Χημική δομή βιταμίνης E

### 1.6.3 Συνδυασμός αντιοξειδωτικών ουσιών

Οι βιταμίνες C και E συχνά χορηγούνται ταυτόχρονα ως αντιοξειδωτική ενίσχυση σε αθλητές. Ο συγκεκριμένος συνδυασμός θεωρείται πιο αποτελεσματικός σε σχέση με την ανεξάρτητη χορήγηση κάθε βιταμίνης, καθώς η βιταμίνη C μπορεί να επαναφέρει την βιταμίνη E στην αρχική της κατάσταση (εικόνα 23) [Balakrishnan and Anuradha, 1998].



Εικόνα 23: Αλληλεπίδραση μεταξύ βιταμίνης C, E και GSH

Το 1994 οι Rokitzki et. al χορήγησαν σε αθλητές μακρινών αποστάσεων 400 IU βιταμίνη E και 200 mg βιταμίνη C για 4.5 εβδομάδες πριν από μια μαραθώνια διαδρομή. Η κρεατινική κινάση (CK) μειώθηκε σημαντικά αποδεικνύοντας μικρότερης έκτασης μυϊκή βλάβη στους αθλητές που ακολούθησαν τη θεραπεία. Άλλες όμως μελέτες δεν έδειξαν κάποιο όφελος από τη χορήγηση του συγκεκριμένου συνδυασμού αντιοξειδωτικών [Clarkson και Thompson 2000, Urso και Clarkson 2003].

Χορήγηση βιταμίνης E και ασκορβικού οξέος επέδειξε προστατευτική δράση σε αθλήτριες δρόμων αντοχής μειώνοντας το ποσοστό των κυττάρων με βλάβες στο DNA μια μέρα μετά το αγώνισμα [Mastaloudis A. et. al, 2004]. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι γυναίκες και άνδρες αποκρίνονται διαφορετικά στη θεραπεία με αντιοξειδωτικά, με τους άνδρες να εμφανίζουν μικρότερα «κέρδη». Από τα παραπάνω καταδεικνύεται η ανάγκη οι έρευνες αναφορικά με τη χορήγηση αντιοξειδωτικών σε αθλητές να περιλαμβάνει και τα δυο φύλα.

Σε μια άλλη εργασία επισημαίνεται ότι αφ' ενός η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να εμποδίσει τις παρενέργειες από την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα ουδετερόφιλα κατά τη διάρκεια της άσκησης, σε υψηλές όμως δόσεις έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα. Υπερβολικές δόσεις αντιοξειδωτικών ενδεχομένως να καταστείλουν ή \ και να παρεμποδίσουν τη διοχέτευση των μακροφάγων στον τραυματισμένο ιστό, εμποδίζοντας έτσι την επιδιόρθωσή του [Tauler P. et. al, 2002].

### ***1.7 Σκοπός της εργασίας***

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές που μελετούν τη συσχέτιση της σωματικής άσκησης γενικά και της επαγγελματικής αθλητικής δραστηριότητας ειδικότερα με την εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Οι αναφορές όμως που μελετούν την επίδραση στο οξειδωτικό status επαγγελματιών αθλητών εξαιτίας της χρήσης αναβολικών είναι πολύ λίγες. Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία μελετάται η επίδραση της χορήγησης ενός ανδρογόνου αναβολικού στεροειδούς, της στανοζολόλης στην οξειδωτική κατάσταση των αθλητών. Οι βιβλιογραφικές αναφορές για το συγκεκριμένο φάρμακο είναι ελάχιστες. Επίσης διερευνάται η συνδυασμένη χρήση στανοζολόλης και δυο αντιοξειδωτικών ουσιών, βιταμίνης C και E, σε μεγάλες δόσεις. Τέλος, προσεγγίστηκε η επίδραση της αυξητικής ορμόνης, ένα επίσης ευρέως χρησιμοποιούμενο αναβολικό, σε συνδυασμό με χορήγηση στανοζολόλης και των παραπάνω αντιοξειδωτικών στην οξειδωτική κατάσταση των αθλητών.

Η μεθοδολογία της εργασίας στηρίχτηκε στη μέτρηση έξι βιοχημικών παραμέτρων: συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού έναντι του DPPH, TBARS, δραστηριότητα της καταλάσης του ορού, ποσοτικός προσδιορισμός των GSH, GSSG και του λόγου GSH/GSSG.



## 2 Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Υλικά

#### 2.1.1 Αντιδραστήρια

Η προμήθεια των αντιδραστηρίων για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας έγινε από τις ακόλουθες εταιρείες

- Sigma (Η.Π.Α.): DPPH, DTNB, NADPH, GR, GSSG, GSH.
- Merck (Γερμανία):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Tris,  $\text{H}_2\text{O}_2$
- Pancreac (Ισπανία): Τριχλωροακετικό οξύ (TCA)
- Fluca (Γερμανία):  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 2-vinylpyridine

#### 2.1.2 Πειραματικό Υλικό

Για την παρούσα ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος από 43 αθλητές bodybuilding και οι οποίοι προσφέρθηκαν να δώσουν δείγμα αίματος. Οι αθλητές ταξινομήθηκαν σε 4 κατηγορίες: σε αθλητές που έκαναν χρήση αναβολικών στεροειδών ( $N_1=5$ ), σε αθλητές που έκαναν χρήση αναβολικών με ταυτόχρονη χορήγηση ενισχυτικών διατροφής σε μεγάλες δόσεις (600mg βιταμίνη C και 1g βιταμίνη E,  $N_2=3$ ), σε αθλητές που τους έγινε χορήγηση αναβολικών στεροειδών, αυξητικής ορμόνης και αντιοξειδωτικών σε μεγάλες δόσεις ( $N_3=7$ ). Τέλος, 28 δείγματα προέρχονται από αθλητές που δεν έκαναν χρήση καμίας από τις παραπάνω ουσίες (ομάδα ελέγχου με  $N_4=28$ ).

Από όλα τα άτομα συλλέχθηκε ορός και αιμόλυμα προκειμένου να προσδιοριστούν οι εξής βιοχημικοί παράμετροι: α) ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού έναντι του DPPH, β) TBARS, γ) δραστηριότητα της καταλάσης του ορού, δ) GSH σε αιμόλυμα ε) GSSG σε αιμόλυμα και στ) ο λόγος GSH/GSSG.

Οι φωτομετρικοί προσδιορισμοί διεξήχθησαν σε φασματοφωτόμετρο της εταιρείας Hitachi τύπου U-1500.

### 2.2 Μέθοδοι

#### 2.2.1 Συλλογή ορού αίματος

Το δείγμα αίματος που λαμβάνεται από κάθε αθλητή τοποθετείται αρχικά σε ειδικό σωληνάκι (BD vacumtainer) και αφήνεται σε ηρεμία από 5 έως 10 min ώστε

να πήξει. Στη συνέχεια κάθε δείγμα φυγοκεντρείται για 10min στα 3500rpm (ή 1370g) στους 5°C. Το υπερκείμενο (ορός) συλλέγεται και διαμοιράζεται σε σωλήνες erpendorf. Υπολογίζεται κάθε σωλήνας να περιέχει περίπου 200μl ορού. Στο σημείο αυτό τα δείγματα μπορούν να αποθηκευθούν στους -20°C μέχρι να ξεκινήσουν οι μετρήσεις. Επειδή ο ορός είναι πολύ ευαίσθητο βιολογικό υγρό κάθε δείγμα μπορεί να καταψυχθεί μονάχα μια φορά.

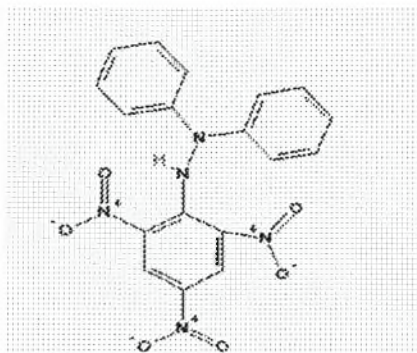
### 2.2.2 Παρασκευή αιμολύματος

2ml από το αίμα κάθε αθλητή συλλέγεται σε ειδικό σωλήνα στο οποίο προηγουμένως έχει προστεθεί ποσότητα EDTA ως αντιπηκτικό (BD vacumtainer, K3E). Το μείγμα αναμειγνύεται καλά. Ακολούθως, σε 1ml δείγματος προστίθεται 1ml TCA 5%. Το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά και φυγοκεντρείται στα 6000rpm (ή 4020g) για 20min στους 5°C. Με το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο απομακρύνεται και διαμοιράζεται σε σωλήνες erpendorf. Υπολογίζεται κάθε σωλήνας να περιέχει περίπου 200μl δείγματος. Στο σημείο αυτό τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους -20°C μέχρι να ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία. Μετά την απόψυξη των δειγμάτων προστίθενται 60μl TCA 5%. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται εκ νέου στα 16000rpm (ή 28620g) για 5 min με τη φυγόκεντρο ρυθμισμένη στους 5°C. Από τα δείγματα συλλέγεται το υπερκείμενο το οποίο χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των GSH και GSSG.

### 2.2.3 Βιοχημικοί παράμετροι

#### 2.2.3.1 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού

Η τεχνική αναπτύχθηκε από τους Janaszewska και Bartosz το 2002 και στηρίζεται στην ικανότητα του DPPH να σχηματίζει μια ελεύθερη ρίζα (DPP<sup>•</sup>). Η αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού εκτιμάται από τη δυνατότητα αδρανοποίησης των συγκεκριμένων ριζών. Η μέθοδος είναι φασματοφωτομετρική· το διάλυμα DPPH από κόκκινο χρωματισμό αποκτά ένα κίτρινο χρώμα.



Εικόνα 24: Χημική δομή του DPPH

Σε 20μl ορού δείγματος προστέθηκαν 480μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 10mM και pH 7,4. Στη συνέχεια προστέθηκαν επιπλέον 500μl διαλύματος DPPH 0,1mM σε μεθανόλη. Τα δείγματα αναδεύτηκαν και κατόπιν επώαστηκαν για 30min σε σκοτεινό περιβάλλον και θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 520nm.

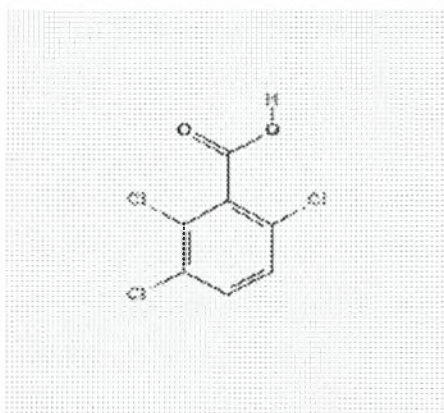
Τα δείγματα ελέγχου περιείχαν 500μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 10mM και pH 7,4 και 500μl διαλύματος DPPH 0,1mM σε μεθανόλη. Επιπρόσθετα χρησιμοποιήθηκαν θετικοί μάρτυρες που περιείχαν 5μl διαλύματος ασκορβικού οξέος 10mM σε τελική συγκέντρωση 50μM. Όλες οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τρεις φορές.

Η συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων εκφράζεται ως η επί της εκατό μείωση της απορρόφησης του δείγματος αρνητικού ελέγχου.

$$\% \text{ μείωση} = \frac{\text{Απορρόφηση δείγμα αρνητικού ελέγχου} - \text{Απορρόφηση δείγματος}}{\text{Απορρόφηση δείγμα αρνητικού ελέγχου}} \times 100$$

#### 2.2.4.2 TBARS

Η τεχνική αναπτύχθηκε το 2001 από τους Keles et al. Κατά την υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων σχηματίζονται οι μελανοδουαλδεύδες (MDAs) οι οποίες χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού stress. Πιο συγκεκριμένα, τα MDAs αντιδρούν με το θειοαρβιτουρικό οξύ (TBA), προσδίνοντας στο δείγμα ένα έντονο κίτρινο χρωματισμό.



Εικόνα 25: Δομή TBA

Η διαδικασία περιλάμβανε τα εξής: σε 100μl ορού δείγματος προστέθηκαν 500μl διαλύματος TCA 35%. Στο δείγμα αρνητικού ελέγχου αντί ορού προστίθενται 100μl ddH<sub>2</sub>O. Το δείγμα αναδεύτηκε ισχυρά και στη συνέχεια προστέθηκαν 500μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris – HCl 50mM, με pH 7,4. Το δείγμα αναδεύτηκε και αφέθηκε να ηρεμήσει σε θερμοκρασία δωματίου για 10min. Ακολούθως προστέθηκε 1,00ml διαλύματος TBA 0,75% - Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M. Το διάλυμα θερμάνθηκε για 45min σε υδατόλουτρο, ρυθμισμένο στους 95°C. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν 5min στον πάγο πριν επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν προστέθηκε 1,00ml TCA 70% και το διάλυμα αναδεύτηκε ισχυρά. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στα 10000rpm (ή 5580g) για 10min στους 25 °C. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε στα 530nm. Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης για την MDA είναι  $1,56 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές. Η ποσότητα των ενεργών υποστρωμάτων θειοβαρβιτουρικού οξέος υπολογίζεται από τη σχέση

$$\text{Ποσότητα TBARS} = \frac{\text{Απορρόφηση}_{\text{δείγματος}}}{1,56 \cdot 10^5} \cdot 310 \text{ nmoles ορού/ml}$$

#### 2.2.4.3 Δραστικότητα καταλάσης του ορού

Η τεχνική αναπτύχθηκε από τους Aebi et al. το 1984. Η καταλάση, όπως προαναφέρθηκε, καταλύει την αντίδραση:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

Σε 20μl ορού προστέθηκαν 2,975μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου και το διάλυμα επώασθηκε στους 37°C για 5 – 10min. Στη συγκεκριμένη θερμοκρασία το ένζυμο εμφανίζει τη μεγαλύτερη δραστικότητα. Κατόπιν

προστέθηκαν 5μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (ή 8,82M) και μετά από σύντομη ανάδευση μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 240nm. Η απορρόφηση των δειγμάτων μετρήθηκε για συνολικά 300sec ανά χρονικά διαστήματα των 5sec. Η κυψελίδα που χρησιμοποιείται είναι από χαλαζία καθ' ότι οι μετρήσεις πραγματοποιούνται στην υπέρυθρη ακτινοβολία (UV). Οι μετρήσεις πρέπει να ξεκινήσουν ταχύτατα μετά την προσθήκη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, του οποίου η τελική συγκέντρωση μέσα στη κυψελίδα είναι 15mM. Στο δείγμα αρνητικού ελέγχου προστέθηκαν 20μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών έναντι του ορού. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Η δραστηριότητα του ενζύμου (a) υπολογίζεται από τη διαφορά στην απορρόφηση των δειγμάτων (Δ<sub>OD</sub>) στο χρονικό διάστημα των 300 sec. Πιο συγκεκριμένα η δραστηριότητα του ενζύμου προκύπτει από την ακόλουθη σχέση:

$$a = \frac{\Delta_{OD}}{62,4} \cdot \frac{3}{20} \cdot 10^6 \frac{\mu\text{moles} \cdot \text{ml}}{\text{min}}$$

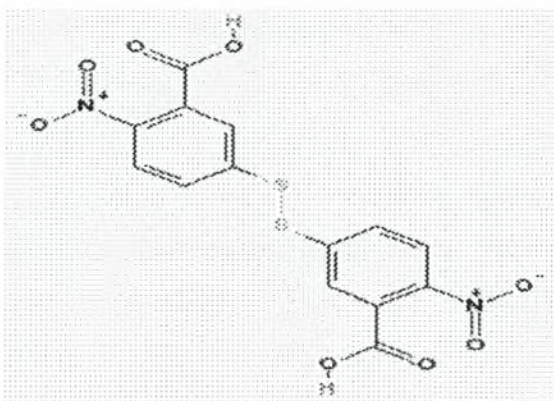
#### 2.2.4.4 Ποσοτικός προσδιορισμός της GSH

Ο υπολογισμός της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική των Reddy et al. (2004). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στην Παρασκευή έγχρωμου προϊόντος από το DTNB Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό οξειδώνοντας δυο μόρια ανηγμένης γλουταθειόνης [Halliwell και συν., 1998]:



Το ένζυμο ρεδοκτάση (GR) της γλουταθειόνης καταλύει την ακριβώς αντίστροφη αντίδραση και οξειδώνει την ανηγμένη γλουταθειόνη [Halliwell και συν., 1998]. Η GR χρησιμοποιεί την αναγωγική ισχύ του NADPH:





Εικόνα 26: Χημική δομή DTNB

Σε 20μl αιμολύματος, που προηγουμένως φυγοκεντρήθηκε και συλλέχθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 660μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 67mM, pH 7,95 και 330μl διαλύματος DTNB (εικόνα 26). Το διάλυμα DTNB παρασκευάστηκε διαλύοντας 39,6mg DTNB σε 100ml κιτρικού νατρίου 1%. Στο δείγμα αρνητικού ελέγχου έναντι αιμολύματος προστέθηκαν 20μl ddH<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αφού αναδεύτηκε ήπια τοποθετήθηκε σε σκοτεινό περιβάλλον και επώασθηκε 15min. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η απορρόφηση των δειγμάτων στα 412nm.

Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων στηριζόμαστε στους Khygian και συν. σύμφωνα με τους οποίους η σύνδεση GSH – DTNB δίνει έγχρωμο προϊόν με συντελεστή μοριακής απορρόφησης  $13,6\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [Khygian και συν., 2003]. Η ποσότητα της GSH υπολογίζεται με βάση τη σχέση:

$$\frac{\text{Απορρόφηση δείγματος}}{13,6} \cdot 131,3 \text{ } \mu\text{moles/ml}$$

#### 2.2.4.5 Ποσοτικός προσδιορισμός της GSSG

Η συγκεκριμένη μέθοδος αναπτύχθηκε από τους Tietze και συν. το 2004. Η αρχή της μεθόδου είναι η ίδια με την αντίστοιχη για τον προσδιορισμό της GSH. Σε 260μl αιμολύματος κατόπιν φυγοκέντρωσης προστέθηκε ποσότητα NaOH 1M (περίπου 10 – 15μl) και το pH ρυθμίστηκε σε τιμές 7,0 – 7,5 με τη χρήση pHμετρικού χαρτιού ώσπου να αποκτήσει μια κιτρινοπράσινη απόχρωση. Το pH 7,5 είναι αυστηρώς το ανώτατο όριο. Στη συνέχεια προστέθηκαν 4μl 2-VP και τα δείγματα επώασθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Το 2-VP λειτουργεί ως «μάσκα», δεσμεύοντας την GSH ώστε να είναι εφικτός ο ποσοτικός προσδιορισμός της GSSG.

Εξ' ακολούθως, σε 5μl επεξεργασμένου αιμολύματος προστίθενται 100μl NADPH. Το NADPH διαλύθηκε σε 143mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου, 6,3mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100μl διαλύματος DTNB (0,04gr DTNB σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος 143mM, 6,3mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5) 600μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου (143mM, 6,3mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5) και 194μl ddH<sub>2</sub>O. Τα δείγματα επώασθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 – 10min και στη συνέχεια προστέθηκε το ένζυμο. Οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων είναι NADPH 0.3M, DTNB 1mM, GR 0,330 units.

Τα δείγματα επώασθηκαν για 5 – 10min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκε 1μl του ενζύμου ρεδοκτάση της γλουταθειόνης. Μετά από ταχύτατη ανάδευση μετρήθηκε η απορρόφηση στα 412nm για χρονικό διάστημα διάρκειας 250sec. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Αρχικά κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με βάση γνωστές συγκεντρώσεις GSSG. Το διάλυμα GSSG προέκυψε από τη διάλυση 0,0061gr GSSG σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου 143mM, 6,3mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5. Το διάλυμα αραιώθηκε 100 φορές σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 143mM, 6,3mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5. Το τελικό διάλυμα έχει συγκέντρωση 10nmoles/ml. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζονται οι ποσότητες σε μl που χρησιμοποιούνται από κάθε αντιδραστήριο.

	αρνητικός έλεγχος	0,05nmoles	0,12nmoles	0,25nmoles	0,75nmoles	1,5nmoles
GSSG	-	5	12	25	75	150
NADPH	100	100	100	100	100	100
DTNB	100	100	100	100	100	100
ρυθμιστικό διάλυμα*	600	600	600	600	600	600
dH <sub>2</sub> O	199	194	187	174	124	49

\*ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου 143mM, 6,3mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,5

Ο ακριβής προσδιορισμός της GSSG προκύπτει από την συνάρτηση της καμπύλης αναφοράς και αφού πολλαπλασιαστεί επί 400, που είναι ο συντελεστής αραιώσης.

### 2.2.5 Στατιστική ανάλυση

Ο έλεγχος για τη την ύπαρξη αποκλίσεων που είναι στατιστικά σημαντικές μεταξύ των τριών ομάδων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μη – παραμετρικής δοκιμασίας ANOVA, για στάθμη σημαντικότητας  $P=0.05$ .



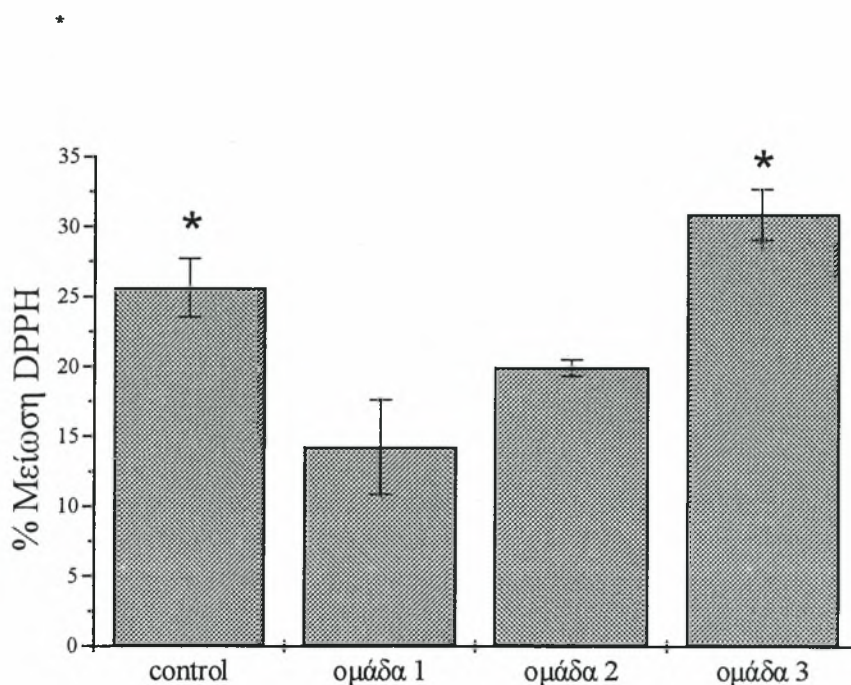
### 3 Αποτελέσματα

Παρακάτω παρατίθενται με τη μορφή ραβδογραμμάτων τα συγκριτικά αποτελέσματα των βιοχημικών παραμέτρων μεταξύ των τεσσάρων ομάδων. Ο διαχωρισμός των αθλητών πραγματοποιήθηκε με βάση τις ουσίες που τους έγινε χορήγηση. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη περιείχε τις παρακάτω κατηγορίες

- Control = ομάδα ελέγχου (28 άτομα)
- Ομάδα 1 = στανοζολόλη (5 άτομα)
- Ομάδα 2 = στανοζολόλη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις (3 άτομα)
- Ομάδα 3 = στανοζολόλη, αυξητική ορμόνη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις (7 άτομα).

#### *3.1 Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού*

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού των αθλητών εκτιμήθηκε με την μέθοδο DPPH. Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 1, στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ της ομάδας ελέγχου (control) και της ομάδας που έλαβε στανοζολόλη (ομάδα 1). Επιπλέον, στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ της ομάδας 3 (στανοζολόλη + αντιοξειδωτικά + αυξητική ορμόνη) και της ομάδας 1. Με άλλα λόγια, οι αθλητές που τους έγινε χορήγηση στανοζολόλης εμφανίζουν μειωμένη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, αλλά και με τους αθλητές που έκαναν χρήση στανοζολόλης ταυτόχρονα με αυξητική ορμόνη και αντιοξειδωτικά.



**Διάγραμμα 1:** Ραβδόγραμμα της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού μεταξύ των τριών ομάδων και της ομάδας ελέγχου.

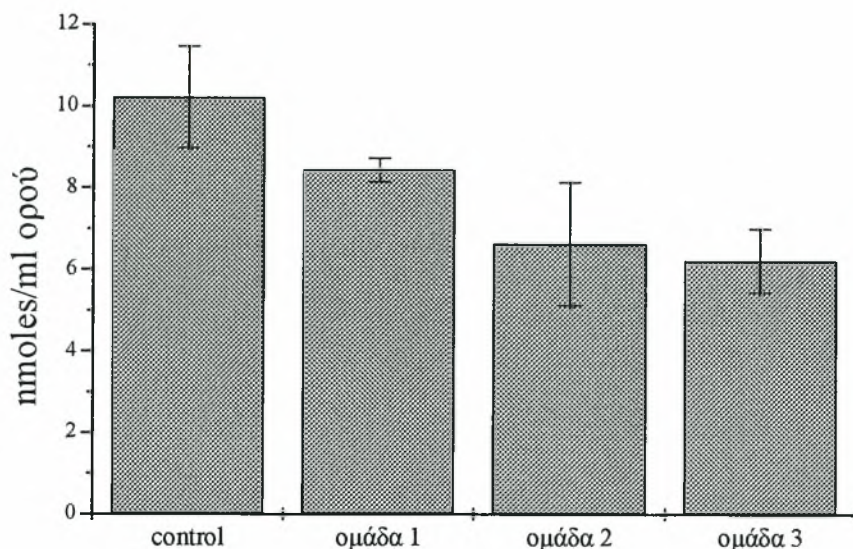
Control = ομάδα ελέγχου, ομάδα 1 = στανοζολόλη, ομάδα 2 = στανοζολόλη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις, ομάδα 3 = στανοζολόλη, αυξητική ορμόνη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις. Οι ευθείες γραμμές συμβολίζουν τα sem (standard errors of means).

\* = στατιστικώς σημαντική διαφορά από την ομάδα 1.

Συμπερασματικά, οι αθλητές που έκαναν θεραπεία με στανοζολόλη παρουσίασαν τη μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τις άλλες τρεις ομάδες αθλητών

### 3.2 TBARS

Στο διάγραμμα 2 απεικονίζεται γραφικά η συνολική ποσότητα TBARS που εκτιμήθηκε και στις τέσσερις ομάδες αθλητών. Όπως φαίνεται, μικρή μείωση της ολικής συγκέντρωσης TBARS παρατηρήθηκε και στις τρεις ομάδες αθλητών, στους οποίους έγινε χορήγηση ουσιών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όμως η παραπάνω μείωση δεν είναι στατιστικώς σημαντική.

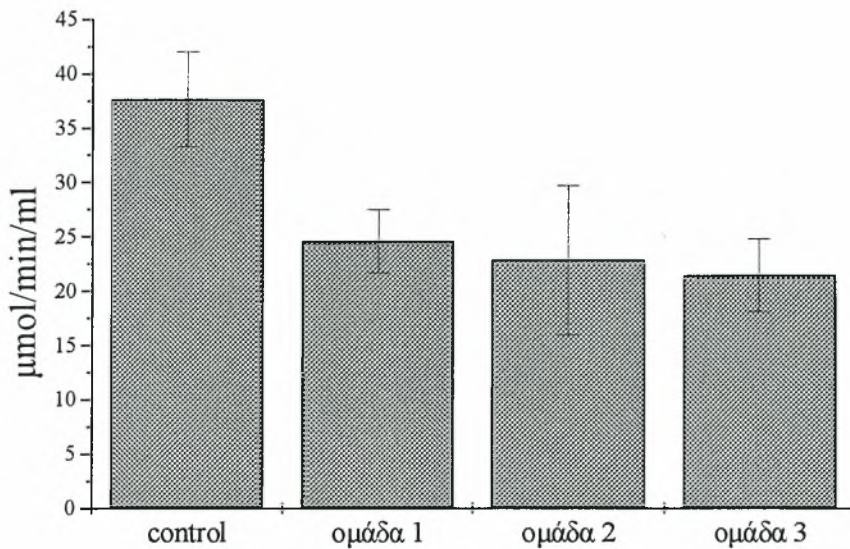


Διάγραμμα 2: Ραβδόγραμμα TBARS του ορού μεταξύ των τριών ομάδων και της ομάδας ελέγχου.

Control = ομάδα ελέγχου, ομάδα 1 = στανοζολόλη, ομάδα 2 = στανοζολόλη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις, ομάδα 3 = στανοζολόλη, αυξητική ορμόνη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις. Οι ευθείες γραμμές συμβολίζουν τα sem (standard errors of means).

### 3.3 Δραστικότητα καταλάσης του ορού

Ομοίως με την εκτίμηση για τη συνολική ποσότητα TBARS, η δραστικότητα της καταλάσης του ορού έτεινε να είναι μειωμένη και στις τρεις ομάδες αθλητών που τους έγινε χορήγηση ουσιών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (διάγραμμα 3). Σύμφωνα με τη δοκιμασία ANOVA η τάση μείωσης της ενζυμικής δραστικότητας ήταν σε πιθανότητα  $P = 0,083 < 0,1$ .



**Διάγραμμα 3: Ραβδόγραμμα για τη δραστηριότητα της καταλάσης του ορού μεταξύ των τριών ομάδων και της ομάδας ελέγχου.**

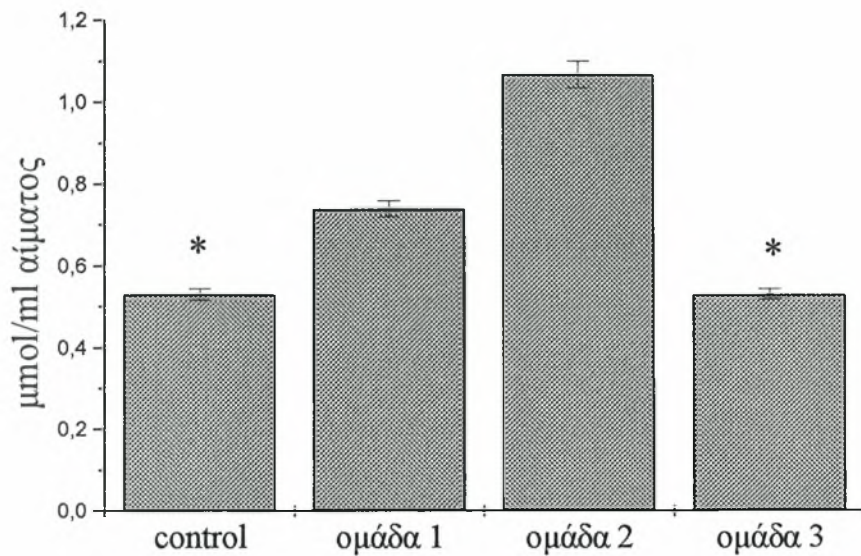
Control = ομάδα ελέγχου, ομάδα 1 = στανοζολόλη, ομάδα 2 = στανοζολόλη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις, ομάδα 3 = στανοζολόλη, αυξητική ορμόνη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις. Οι ευθείες γραμμές συμβολίζουν τα sem (standard errors of means).

Οι ομάδες 1 – 3 τείνουν να έχουν χαμηλότερη τιμή από την ομάδα ελέγχου ( $P < 0,01$ )

### **3.4 Συγκέντρωση της GSH αιμόλυματος**

Στο διάγραμμα 4 αναπαριστάται η συνολική συγκέντρωση της γλουταθειόνης στο αιμόλυμα των αθλητών. Η ομάδα 2 (στανοζολόλη + αντιοξειδωτικά) παρουσίασε μεγαλύτερη συγκέντρωση γλουταθειόνης σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες. Ωστόσο, στατιστικώς σημαντική διαφορά βρέθηκε μόνο μεταξύ της ομάδας 3 και της ομάδας ελέγχου.

## Αποτελέσματα



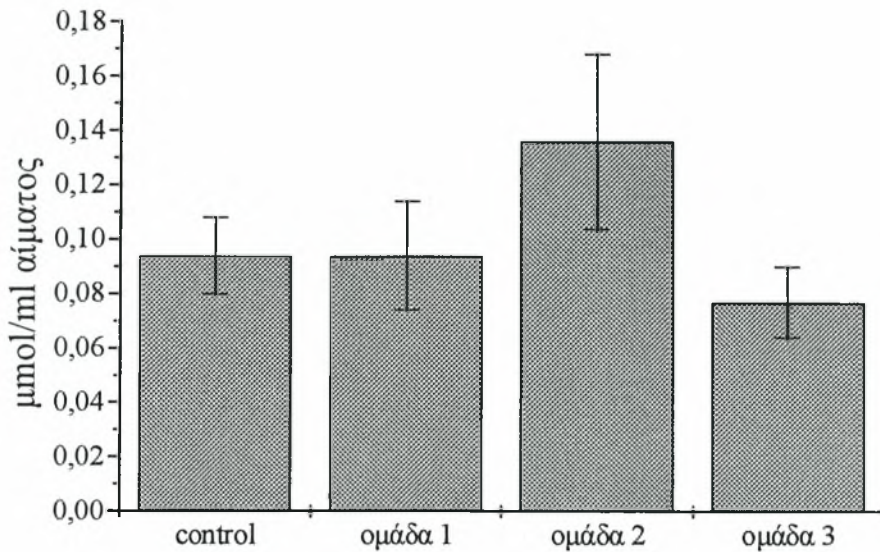
**Διάγραμμα 4:**Ραβδόγραμμα για τη GSH αιμολύματος μεταξύ των τριών ομάδων και της ομάδας ελέγχου.

Control = ομάδα ελέγχου, ομάδα 1 = στανοζολόλη, ομάδα 2 = στανοζολόλη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις, ομάδα 3 = στανοζολόλη, αυξητική ορμόνη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις.

\* = στατιστικώς σημαντική διαφορά από την ομάδα 2

### 3.5 Συγκέντρωση της GSSG αιμολύματος

Όμοια με τον ποσοτικό προσδιορισμό της GSH στο αιμόλυμα των αθλητών, η συγκέντρωση της GSSG των αθλητών που έλαβαν στανοζολόλη και αντιοξειδωτικά (ομάδα 2) ήταν αυξημένη. Η συγκεκριμένη όμως διαφοροποίηση δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (διάγραμμα 5).



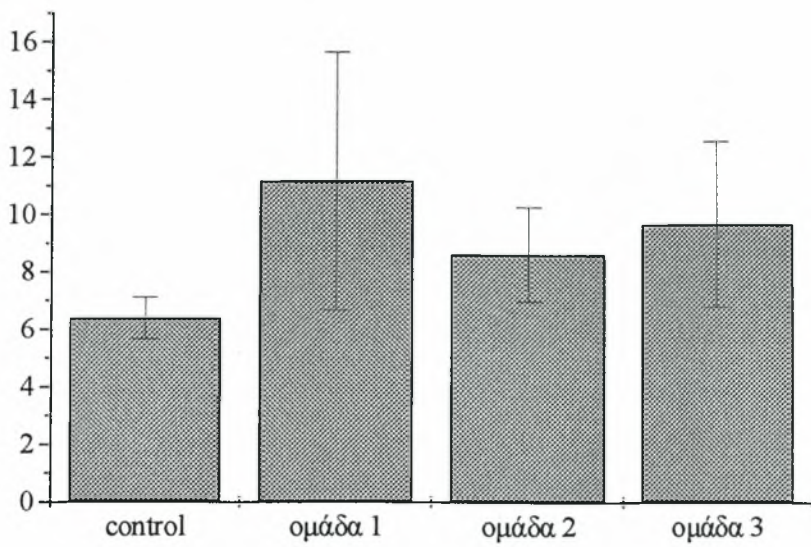
Διάγραμμα 5: Ραβδόγραμμα για τη GSSG αιμόλυματος μεταξύ των τριών ομάδων και της ομάδας ελέγχου.

Control = ομάδα ελέγχου, ομάδα 1 = στανοζολόλη, ομάδα 2 = στανοζολόλη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις, ομάδα 3 = στανοζολόλη, αυξητική ορμόνη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις

### 3.6 Προσδιορισμός του λόγου GSH/GSSG

Με βάση τον ποσοτικό προσδιορισμό των GSH και GSSG αιμόλυματος αθλητών υπολογίστηκε ο λόγος GSH/GSSG (διάγραμμα 6). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ καμιάς ομάδας.

## Αποτελέσματα



**Διάγραμμα 6: Ραβδόγραμμα του λόγου GSH/GSSG αιμολύματος μεταξύ των τριών ομάδων και της ομάδας ελέγχου.**

Control = ομάδα ελέγχου, ομάδα 1 = στανοζολόλη, ομάδα 2 = στανοζολόλη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις, ομάδα 3 = στανοζολόλη, αυξητική ορμόνη και αντιοξειδωτικά σε μεγάλες δόσεις.

## 4 Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση ανδρογόνων αναβολικών, και συγκεκριμένα της στανοζολόλης, σε ορισμένες βιοχημικές παραμέτρους του αίματος που αποτελούν δείκτες οξειδωτικού στρες σε αθλούμενους. Επιπλέον, εξετάστηκε η επίδραση της συνδυασμένης χορήγησης στανοζολόλης, αυξητικής ορμόνης (επίσης ευρέως χρησιμοποιούμενο αναβολικό) και διατροφικών αντιοξειδωτικών (βιταμίνη C και E) σε υψηλές δόσεις στους ίδιους δείκτες. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε επειδή υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες στη βιβλιογραφία για τη σχέση αναβολικών και οξειδωτικού στρες σε αθλούμενους.

Σε μία μελέτη βρέθηκε ότι η στανοζολόλη είναι τοξική για το ήπαρ προκαλώντας δομικές και υποκυτταρικές αλλαγές σε αθλημένους αρουραίους που είχαν λάβει στανοζολόλη για μεγάλο χρονικό διάστημα (8 εβδομάδες) [Pey Angel και συν. 2003]. Στην ίδια μελέτη παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση TBARS και στη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων SOD, CAT και GPx στο ήπαρ των ζώων ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού του φαρμάκου. Επιπλέον παρατηρήθηκε αύξηση της GSH και μια τάση αύξησης της GSSG. Κατ' επέκταση ο λόγος GSH/GSSG στο ήπαρ των ζώων παρέμεινε σταθερός. Στην ίδια εργασία, σε αντίθεση με το ήπαρ, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στην περιεκτικότητα του ορού σε TBARS και GSH στα ζώα που τους χορηγήθηκε στανοζολόλη. Επίσης, καμιά μεταβολή της συνολικής ποσότητας TBARS δε βρέθηκε στο καρδιακό και σκελετικό μυ των ζώων που ακολούθησαν θεραπεία με στανοζολόλη. Το συμπέρασμα των μελετητών από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ότι η στανοζολόλη προκαλεί τοπικά στο ήπαρ αύξηση του οξειδωτικού στρες, χωρίς να επιδεικνύει παρόμοιο αποτέλεσμα στον ορό ή σε κάποιον άλλο ιστό των ζώων [Pey Angel και συν., 2003]. Δυο παλαιότερες μελέτες σε αθλητές που χρησιμοποίησαν στανοζολόλη σε μεγάλες δόσεις έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα [Hickson και συν 1989, Hartgens και συν 1996].

Τα παραπάνω ευρήματα συμφωνούν με τα αποτελέσματα της εργασίας. Συγκεκριμένα, οι αθλητές που έλαβαν στανοζολόλη έχουν μειωμένη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα ορού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επιπλέον, η καταλάση είναι μειωμένη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου παρόλο που η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα άτομα που έλαβαν στανοζολόλη παρουσίασαν αυξημένο οξειδωτικό στρες. Προφανώς, ο



μεταβολισμός του φαρμάκου στο ήπαρ οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών «εξουδετερώνοντας» τα ενδογενή αντιοξειδωτικά του ορού. Κατ' επέκταση, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού έναντι του DPPH εμφανίζεται μειωμένη. Ταυτόχρονα, δεν αποκλείεται η εμφάνιση οξειδωτικού στρες και σε άλλους ιστούς ή όργανα.

Όσον αφορά την αυξητική ορμόνη, η επίδρασή της στην αντιοξειδωτική άμυνα μελετήθηκε σε ποντίκια της φυλής Dwarf που παρουσιάζουν έλλειψη στην ορμόνη αυτή [Borg και Rakoczy, 2003]. Είναι γνωστό ότι τα συγκεκριμένα ζώα παρουσιάζουν αξιοσημείωτη επιμήκυνση του προσδόκιμου χρόνου ζωής [Bartke και Turgn 2001, Brown και συν. 1996]. Επίσης, εμφανίζουν αυξημένη έκφραση και δραστηριότητα της καταλάσης σε αρκετούς ιστούς, όπως στο ήπαρ και τους νεφρούς [Borg 1999]. Επιπλέον, η μιτοχondριακή παραγωγή  $H_2O_2$  είναι σημαντικά μικρότερη [Borg 2001]. Η οξειδωτική ζημιά των πρωτεϊνών και του DNA στα ίδια ποντίκια είναι επίσης σημαντικά μικρότερη [Borg 2001].

Γενετικά τροποποιημένοι ποντικοί με το γονίδιο της GH από βόδι εμφανίζουν μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα. Η καταλάση και η GPx είναι μειωμένες σε διαγονιδιακά ποντίκια για την GH [Borg και Rakoczy 2000, Hauck και Bartke 2001]. Μάλιστα, τα συγκεκριμένα ζώα επιβιώνουν σχεδόν το μισό σε σχέση με τους “άγριους” συγγενείς τους [Borg και συν 2001].

Ενήλικοι ασθενείς με ανεπάρκεια σε GH (Growth Hormone Deficiency - GHD) εμφανίζουν μειωμένη λιπιδική υπεροξειδωση με ταυτόχρονη μειωμένη παραγωγή ROS. Οι Smith και συν. (2001) έδειξαν ότι η παραπάνω ασθενείς έχουν μειωμένα επίπεδα LOO<sup>•</sup> στην κυκλοφορία. Οι ανωμαλίες στη λειτουργία των ουδετερόφιλων που συνοδεύουν την GHD πιθανώς συμβάλλουν στη μείωση του οξειδωτικού στρες που παρατηρείται στους συγκεκριμένους ασθενείς [Smith και συν. 2001]. Η GH λειτουργεί ως ενεργοποιητής των μονοκύτταρων, μακροφάγων και ουδερόφιλων, αυξάνοντας την παραγωγή και απελευθέρωση ROS στην κυκλοφορία [Fu και συν 1992, Edwards και συν 1998].

Στοιχεία από *in vitro* έρευνες δείχνουν ότι η GH εξουδετερώνει ενδογενή αντιοξειδωτικά. Χορήγηση GH σε φυσιολογικά ηπατοκύτταρα ποντικών μείωσε τη δραστηριότητα της καταλάσης, την έκφραση και δραστηριότητα της GPx και την έκφραση της Mn-SOD [Borg και Rakoczy, 2003]. Η επίδραση της GH σε ποντίκια της φυλής Dwarf επικεντρώνεται κυρίως στο ήπαρ και τους νεφρούς, αντικατοπτρίζοντας την ικανότητα των ιστών αυτών να αποκρίνονται σε αυξητικούς

παράγοντες [Borg και Rakoczy, 2003]. Πιθανολογείται ότι η GH εμπλέκεται άμεσα ή έμμεσα στη ρύθμιση της έκφρασης και της δραστικότητας της SOD.

Ο κύκλος της GSH σε ποντικούς Dwarf που τους χορηγείται GH εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Τρεις ιστοί, ο εγκεφαλικός, ο μυϊκός και το ήπαρ έδειξαν αυξημένα επίπεδα GSH και του λόγου GSH/GSSG. Η εξωγενής GH επηρεάζει την ανακύκλωση της GSH, ρυθμίζοντας τη συγκέντρωση και δραστικότητα των GPx και GR. Στο ήπαρ, η GH εκτιμάται ότι έχει εξειδικευμένη δράση για τη GPx, χωρίς να επηρεάζει τη GR. Έτσι, αυξάνεται τοπικά στο ήπαρ των ποντικών Dwarf η GSH [Borg και Rakoczy, 2003]. Στα νεφρούς των ίδιων ζώων, η GPx καταστέλλεται παρόμοια, όμως ταυτόχρονα η GH παρεμποδίζει και τη δράση της GR, διατηρώντας τη συγκέντρωση της GSH σταθερή [Borg και Rakoczy, 2003].

Η σύνθεση, ανακύκλωση και διάσπαση της GSH είναι σημαντικές για τη διατήρηση της GSH σε σταθερά επίπεδα. Η GH φαίνεται ότι μεταβάλλει το μεταβολισμό τόσο της γλουταθειόνης όσο και της μεθειονίνης. Τα δυο συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια εμπλέκονται στη «μάχη» ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Η GH επηρεάζει τα συγκεκριμένα μονοπάτια, μεταβάλλοντας την έκφραση ενζύμων και υποστρωμάτων, και γενικά του μεταβολικού συστήματος της GSH σε ολόκληρο τον οργανισμό [Borg και Rakoczy, 2004]. Η επίδραση της αυξητικής ορμόνης στο μεταβολισμό της γλουταθειόνης σε ποντικούς που τους έγινε θεραπεία με GH ποικίλλει από ιστό σε ιστό. Η αυξητική ορμόνη δεν επηρεάζει άμεσα τη σύνθεση γλουταθειόνης στο ήπαρ, όμως καταστέλλει τη δράση του ενζύμου τρανσαμινάση της γλουταθειόνης και συνεπώς εμποδίζει τη χρησιμοποίησή του ως ένα αντιοξειδωτικό μηχανισμό στο ήπαρ. Στον εγκέφαλο δεν εμποδίζει τη σύνθεση αλλά τη χρήση της GSH, γεγονός που οδηγεί σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της GSH. Η σύνθεση, ανακύκλωση και η διάσπαση της GSH είναι διαδικασίες πολύ σημαντικές για τη διατήρηση της αναγκαίας συγκέντρωσης και αποτελεσματικής λειτουργίας της ως αντιοξειδωτικού [Borg και συν., 2005].

Η άθληση σήμερα αναγνωρίζεται ως μια δραστηριότητα η οποία προσδίδει συγκριτικά πλεονεκτήματα στον οργανισμό, ιδιαίτερα σε παθολογικές καταστάσεις όπως ο διαβήτης και η υπέρταση. Αποτελεί όμως ταυτόχρονα και πηγή οξειδωτικού στρες. Η αύξηση των ROS στην κυκλοφορία αντανakλάται σε υψηλή συγκέντρωση TBARS και GSSG [Laaksonen και συν 1999]. Γι' αυτό, αποτελεί σήμερα αντικείμενο μελέτης η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών σε άτομα που αθλούνται.

Οι πρώτες έρευνες για την κατανόηση της επίδρασης των βιταμινών E και C χρονολογούνται στο 1994. Αθλητές μεγάλων αποστάσεων κατανάλωσαν 400IU βιταμίνης E και 200mg βιταμίνης C για 4,5 εβδομάδες πριν τον αγώνα. Η κρεατινική κινάση των αθλητών που έκαναν χρήση αντιοξειδωτικών αυξήθηκε πολύ λιγότερο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, υποδηλώνοντας πολύ μικρότερη μυϊκή βλάβη [Rokitzki και συν 1994]. Το 1993 οι Kanter και συν χορήγησαν 592 mg βιταμίνης E, 1000 mg βιταμίνης C και 30 mg β-καροτένιο, βρίσκοντας μικρότερη αύξηση στο εκπνεόμενο πεντάνιο και στη συγκέντρωση της MDA στην κυκλοφορία, γεγονός που καταδεικνύει μικρότερη αύξηση του οξειδωτικού στρες [Kanter και συν 1993]. Οι Schroeder και συν χορήγησαν 600 mg βιταμίνης E, 1000 mg βιταμίνης C και 32 mg β-καροτένιο σε επαγγελματίες καλαθοσφαιριστές κατά τη διάρκεια της αγωνιστικής περιόδου μειώνοντας το οξειδωτικό στρες και πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα των LOO<sup>·</sup> στην κυκλοφορία κατά 27,7% [Schroeder και συν 2000]. Χορήγηση 500 mg βιταμίνης E, 30 mg β-καροτένιο για 90 ημέρες σε συνδυασμό με χορήγηση 1 g βιταμίνης C τις τελευταίες 15 ημέρες αύξησε σημαντικά την GSH και τη σχέση GSH/GSSG στα ουδετερόφιλα των αθλητών [Tauler και συν 2001]. Οι Makoto και συν μελέτησαν τα αποτελέσματα κατάδυσης στην οξειδωτική κατάσταση του ήπατος δυτών με ταυτόχρονη χορήγηση 600 mg βιταμίνης C, 150 mg βιταμίνης E και 600 mg κατεχινών και βρήκαν σημαντική μείωση των TBARS στην κυκλοφορία των δυτών. Γι' αυτό και προτείνουν την κατανάλωση των παραπάνω δόσεων από επαγγελματίες δύτες [Makoto και συν, 2004]. Σε αντίθεση με τις προηγούμενες εργασίες, όταν χορηγήθηκαν 500mg βιταμίνης C και 400mg βιταμίνης E για 14 ημέρες πριν από ένα αγώνα βάρη δεν εντοπίστηκε κάποιο πλεονέκτημα [Peterson και συν 2001]. Παρομοίως, η χορήγηση συνδυασμού 270 mg βιταμίνης E, 600 mg βιταμίνης C και 100 mg ουβικινόνης (συνένζυμο Q<sub>10</sub>) σε αθλητές τρίαθλου χωρίς να βρεθεί κάποια αλλαγή στο οξειδωτικό status των αθλητών [Nielson και συν 1999].

Συμπερασματικά, αν και η χρήση μειγμάτων αντιοξειδωτικών ουσιών διαφημίζεται από τους προμηθευτές ως ο ιδανικός τρόπος ελαχιστοποίησης της μυϊκής βλάβης και ταχείας ανάνηψης του μυός, τα ερευνητικά δεδομένα είναι αντικρουόμενα. Επιπλέον, υπάρχει ακόμη ασάφεια στο αν οι αντιοξειδωτικές ουσίες βοηθούν την αθλητική επίδοση ή επιταχύνουν την επαναφορά των αθλητών. Μάλιστα, ερευνητές πρότειναν ότι η κατανάλωση αυτών των ουσιών σε μεγάλες δόσεις μπορεί να προκαλέσει επιπλοκές στην υγεία των αθλητών. Υψηλές συγκεντρώσεις υδατοδιαλυτών αντιοξειδωτικών, όπως το ασκορβικό οξύ και το β-

## Συζήτηση

καροτένιο, οξειδώνουν τον  $Fe^{++}$  επάγοντας την αντίδραση Fenton. Συνεπώς, η χορήγηση πλεονάζουσας ποσότητας αντιοξειδωτικών μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες.

Δεν υπάρχει καμία γνωστή μελέτη για τη σχέση οξειδωτικού στρες και συνδυασμένης χορήγησης στανοζολόλης, αντιοξειδωτικών και αυξητικής ορμόνης. Γνωρίζουμε ότι η στανοζολόλη από μόνη της δεν αυξάνει τη συγκέντρωση των ROS στην κυκλοφορία τόσο σε αθλητές όσο και σε αθλημένους αρουραίους, αυξάνει όμως το οξειδωτικό στρες τοπικά στο ήπαρ [Pey Angel και συν., 2003]. Δεν έχει όμως μελετηθεί η επίδραση των αντιοξειδωτικών και της αυξητικής ορμόνης στο παραπάνω αποτέλεσμα. Όπως φαίνεται από την παρούσα μελέτη η ομάδα που έκανε χρήση στανοζολόλης έχει μειωμένη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι του DPPH (διάγραμμα 1). Η χορήγηση αυξητικής ορμόνης αυξάνει την ικανότητα αυτή και την επαναφέρει στα φυσιολογικά επίπεδα. Τα υπόλοιπα αποτελέσματα (TBARS, καταλάση, GSH, GSSG και GSH/GSSG) δεν μαρτυρούν κάποια σημαντική μεταβολή της οξειδωτικής κατάστασης των αθλητών από τη χρήση στανοζολόλης, γεγονός που συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Προφανώς η μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού έναντι του DPPH εκφράζει την «εξουδετέρωση» των αντιοξειδωτικών του ορού από την αυξημένη ηπατική παραγωγή ελευθέρων ριζών.

Η ομάδα 2 (στανοζολόλη + αντιοξειδωτικά) παρουσιάζει μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα, που σημαίνει ότι τα αντιοξειδωτικά βοηθούν την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Η βιβλιογραφία γενικά μαρτυρά μια μικρή θετική επίδραση στην οξειδωτική ικανότητα των οργανισμών. Οι μελέτες όμως έχουν κυρίως εστιαστεί στο ήπαρ, ενώ για την επίδραση στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του αίματος λίγα είναι γνωστά. Όπως προαναφέρθηκε, η χρήση στανοζολόλης αυξάνει τοπικά στο ήπαρ την παραγωγή ελευθέρων ριζών μειώνοντας την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού. Η GSH των ερυθροκυττάρων αποτελεί ένα ενδογενές αντιοξειδωτικό του αίματος, εξουδετερώνοντας σημαντικό μέρος των ελευθέρων ριζών. Η χορήγηση αντιοξειδωτικών ενισχύει την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού αυξάνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο την συγκέντρωση της GSH των ερυθροκυττάρων (διάγραμμα 4).

Τέλος, η χορήγηση GH ταυτόχρονα με στανοζολόλη και αντιοξειδωτικά αυξάνει την ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού έναντι του DPPH και μάλιστα την επαναφέρει στα επίπεδα της ομάδας ελέγχου (διάγραμμα 1). Επιπλέον, μειώνει την GSH των ερυθροκυττάρων, που εμφανίζεται αυξημένη στην ομάδα 2

## Συζήτηση

(στανοζολόλη + αντιοξειδωτικά - διάγραμμα 4). Προφανώς, με ένα μηχανισμό που μας είναι άγνωστος, η αυξητική ορμόνη σε συνδυασμό με τα συγκεκριμένα αντιοξειδωτικά μειώνει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τη χορήγηση στανοζολόλης.

## 5 Βιβλιογραφικές αναφορές

- 1) Aebi et al. *Catalase in vitro*, *Methods Enzymol* 105:121-126, 1984
- 2) Askew E. W., *Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients*, *Toxicology* 180: 107-119, 2002
- 3) Balakrishnan S. D. And Anuradha C. V., *Exercise, Depletion of Antioxidants and Antioxidant Manipulation*, *Cell Biochemistry and Function* 16: 269-275, 1998
- 4) Banerjee A.K. et al, *Oxidant, antioxidant and physical exercise*, *Mol Cel Biochem*, 253:307-312, 2003
- 5) Beckman K. B., Ames B. N., *The free radical theory of aging matures*, *Physiol Rev*, 78(2):547-581
- 6) Bolzan D. Alexandro et al., *Hormonal Modulation of antioxidant enzyme Activities in young and old Rats*, *Experimental Gerontology* vol 30, no 2, pp 169-175, 1995
- 7) Boveris Alberto and Cadenas E., *Cellular Sources and Steady-state Levels of Reactive Oxygen Species*, *Oxygen, Gene Expression and Cellular Function*, pp:1-25
- 8) Boveris Alberto et al. *Regulation of mitochondrial Respiration by Adenosine diphosphate, oxygen and Nitric Oxide*, *Meth Enzymol*, 301:188-198, 1999b
- 9) Brown-Borg M. Holly, Rakoczy G. Sharlene, *Catalase Expression in delayed and premature aging mouse models*, *Experimental Gerontology* 35, 199-212, 2000
- 10) Brown-Borg M. Holly, Rakoczy G. Sharlene, *Growth hormone administration to long-living dwarf mice alters multiple components of the antioxidant defence system*, *Mechanisms of Aging and Development* 124, 1013-1024, 2003
- 11) Brown-Borg M. Holly, Rakoczy G. Sharlene, Romanick A. Marck, Kennedy A. Melissa, *Effects of Growth hormone and insulin-like growth factor-1 on hepatocyte antioxidant enzymes*, *Exp Biol Med* vol 227(2): 94-104, 2002
- 12) Brown-Borg M. Holly, Rakoczy G. Sharlene, Uthus O. Eric, *Growth hormone alters methionine and glutathione metabolism in Ames dwarf mice*, *Mechanisms of Aging and Development* 126, 389-398, 2005
- 13) Bulkley Gregory, *Free Radicals and Reactive Oxygen Species. The evolution of a scientific concept*, *Cosmos Journals*, 2002
- 14) Cavas Levent and Tarhan Leman, *Effects of Vitamin-Mineral Supplementation on Cardiac Marker and Radical Scavenging Enzymes, MDA Levels in Young Swimmers*, *Int J of Sport Nutrition and Exer Metabolism* 14: 133-146, 2004

- 15) Chandan Sen K, Packer Lester, Thiol homeostasis and supplements in physical exercise, *Am J Clin Nutr*, 72: 653-669, 2000
- 16) Chandan Sen K. and Sashawati Roy, *Antioxidant regulation of cell adhesion, Medicine & Science in Sports and Exercise*, 2000
- 17) Clarkson M. Priscilla and Thomson S. Heather, *Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?*, *Am J Clin Nutr* 72: 637S-646S, 2000
- 18) Cleeter et al., *Reversible Inhibition of Cytochrome C Oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases*, *FEBS Lett* 345: 50-54
- 19) De Palo Elio. F et al., *Correlations of growth hormone (GH) and insuline-like growth factor 1 (IGF-1): effects of exercise and abuse by athletes*, *Clinica Chimica Acta* 305, 1-17. 2001
- 20) Dillard et al., *Effects of Exercise, Vitamin E, and Ozon on pulmonary function and lipid peroxidation*, *J Appl Physiol*, 45:927-932, 1978
- 21) Druge W. *Free Radivals in the physiology control of cell Function*, *Physiol Rev*, 82(1): 47-95, 2002
- 22) Ehrnborg Ch., Bengtsson B., Rosen T., *Growth Hormone Abuse*, *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol 14, no 1, pp 71-77, 2000
- 23) Ehrnborg Ch. et al. *Supraphysiological growth hormone: less fat, more extracellular fluid but uncertain effects on muscles in healthy, active young adults*, *Clinical Endocrinology* 62, 449-457, 2005
- 24) Elosua et al., *Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program and to acute phase physical activity, in healthy young men and women*, *Atherosclerosis*, 167: 327-334, 2003
- 25) Fenster P. Catherine et al., *Obesity, Aerobic Exercise, and Vascular Disease: The Role of Oxidant Stress*, *Obesity Research*, vol.10, No. 9, 2002
- 26) Gabi Nidl, *Hydrogen peroxide-form oxidative stressor to redox regulator*, *Cell Science Reviews* 1 (2), 2004
- 27) Halliwell Barry and Carroll E Cross, *Oxygen Derived-Species: Their Relation to Human Disease and Enviromental Stress*, *Enviromental Health Perspectives*, 102, supplement 10, 1994
- 28) Halliwell Barry and Gutteridge John M.C., *Free Radicals in Biology and Chemistry*, *Oxford Science Publications*, 1998

- 29) Hartgens F. And Kuipers H., *Effects of Androgenic-Anabolic Steroids in Athletes, Sports Med, 2004*
- 30) Hartgens F. and Kuipers H., Wiinen J.A., Keizer H.A., *Body composition, cardiovascular risk factors and liver function in long-term androgenic - anabolic steroids using bodybuilders three months after drugwithdrawals, Int J Sports Med 17: 429-433, 1996*
- 31) Hauck J. Steven and Bartke Andrzej, *Effects of growth hormone on hypothalamic catalase and Cu/Zn superoxide dismutase, Free Radical Biology & Medicine, vol 28, no 6, pp 970-978, 2000*
- 32) Hickson R. C., Ball K.I., Falduto M.T., *Adverse effects of anabolic steroids, Med Toxicol Adverse Drug Exp 4:254-271, 1989*
- 33) Ikeda Makoto et al., *Supplementation of Antioxidants Prevents Oxidative Stress during a Deep Saturation Dive, Tohoku J Exp Med 203: 353-357, 2004*
- 34) Janaszewska A and Bartosz G., *Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma, Scand J Clin Invest 62: 231-236, 2002*
- 35) Jenkins Paul J., *Growth hormone and exercise Clinical Endocrinology 50, 663-689, 1999*
- 36) Jenkins Paul J., *Growth hormone and exercise: physiology, use and abuse, Growth Hormone & IGF Research, Supplement A, S71-S77, 2001*
- 37) Johnson Peter, *Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension, Comparative Biochemistry and Physiology Part C 133: 493-505, 2002*
- 38) Keles M.S et al., *Effects of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis, Can J Neurol Sci 28: 141-143*
- 39) Kenneth B. Beckman and Bruce The Free Radical Theory of Aging Matures N. Ames, *The Free Radical Theory of Aging Matures, The American Physiological Society, 1998*
- 40) Koppenol WH, *The basic chemistry of Nitrogen Monoxide and Peroxynitrite, Free Rad Biol Med 25: 385-391, 1998*
- 41) Lamprect M., Greilberger J., Oettl K., *Analytical Aspects of Oxidatively Modified Substances in Sports and Exercises, Nutrition 20: 728-730, 2004*
- 42) Leewenburg C., Heinecke J.W., *Oxidative stress and antioxidants in exercises, Current Medical Chemistry, 8: 829-838, 2001*
- 43) Li Li Ji, *Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise, P.S.E.B.M., 222:283-292, 1999*



- 44) Liu Wei et al., *Impact of Perioperative Treatment of Recombinant Human Growth Hormone on Cell Immune Function and Intestinal Barrier Function: Randomized, Double-Blind, Controlled Trial*, *World Journal of Surgery* 27, 412-415, 2003
- 45) Mastaloudis Angela et al., *Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay*, *Free Radical Biology & Medicine*, vol 36, no 8, pp 966-975, 2004
- 46) Mc Hugh Cathy M., *Challenges in Detecting the Abuse of Growth Hormone in Sports*, *Clinical Chemistry* 51:9, 2005
- 47) Moeller Peter et al., *Oxidative Stress associated with Exercise, physiological stress and life-style factors, hemicobiological interactions*, 102:17-36, 1996
- 48) Mylonas and Kouretas, *Lipid Peroxidation and Tissue Damage, In Vivo* 13: 295-310, 1999
- 49) Nabil M. Elsayed, *Antioxidant Mobilization in Response to Oxidative Stress: a dynamic environmental-nutritional interaction*, *Nutrition* 17: 828-834, 2001
- 50) Nieman C David et al., *Influence of vitamin C supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon*, *Journal of Applied Physiology* 92: 1970-1977, 2002
- 51) Okamura et al., *Effect of repeated exercise on urinary 8-hydroxy-deoguanosine excretion in humans*, *Free Radicals Reviews*, 26:507-514, 1997
- 52) Olga Blokhina et al., *Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review*, *Annals of Botany Company*, 2003
- 53) Palazzetti et al., *Overloaded training increases exercise-induced oxidative stress and damage*, *Can J Appl Physiol*, 28(4): 558-604
- 54) Pey Angel et al., *Effects of prolonged stanozolol treatment on antioxidant enzyme activities, oxidative stress markers, and heat shock protein HSP72 levels in rat liver*, *The Journal of STEROID BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY*, 2003
- 55) Reddy Y. N. et al., *Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients*, *Indian J Tuberc* 51: 213-218, 2004
- 56) Reid M.B. et al., *Reactive oxygen in skeletal muscle 2, Extracellular release of free radicals*, *J Appl Physiol*, 73: 1805-1809, 1992
- 57) Rokitzki L et al., *Lipid peroxidation and antioxidative vitamins under extreme endurance stress*, *Acta Physiol Scand* 151(2): 149-158, 1994
- 58) Rovira Ilsa I., Finkel Toren, *Surviving aerobic environment: aging under oxidative stress*, *Geriatric times*, 3(4), 2002
- 59) Satchek M. Jennifer and Blumberg B. Jeffrey, *Role of vitamin E and oxidative stress in exercise*, *Nutrition* 17:809-814, 2001

- 60) Sanz A et al. *Effect of insuline amd gowth hormone on rat heart and liver oxidative stress in control and caloric restricted animals*, *Biogerontology* 6: 15-26, 2005
- 61) Schroeder H., Navarro E., Mora J., Galiano D., Tramullas A., *Effects of  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene and ascorbic acid on oxidative, hormonal and enzymatic exercise stress markers in habitual training activity of professional basketball players*, *Eur J Nutr* 40: 178-184, 2001
- 62) Smith J. C et al., *Effects of GH on lipidperoxidation and neutrophil superoxide anion-generating capacity in hypopituitary adults with GH deficiency*, *Clinical Endocrinology* 56: 449-455, 2002
- 63) Sureda Antoni et al., *Hypoxia/Reoxygenation and vitamin C intake influence NO synthesis and antioxidant defences of neutrophils*, *Free Radical Biology & Medicine* vol 37, no 11, pp 1744-1755, 2004
- 64) Tauler P., Aguilo A., Fuentespina J. E., Tur J. A., Pons A., *Diet supplementation with vitamin E, vitamin C and  $\beta$ -carotene cocktail enhances basal neutrophil antioxidant enzymes in athletes*, *Pflugers Arch -Eur J Physiol* 443: 791-797, 2002
- 65) Tefvik Noyan et al., *The Serum Vitamin C Levels in Behcet's disease*, *Yonsei Med J* vol.44: no. 5, 2003
- 66) Tietze F., *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amountsof total and oxidized glutatione: applications to mammalian blood and other tissues*, *Analyt Biochem* 27: 502-522, 2004
- 67) Urso Maria L., Clarkson Priscilla, *Oxidative Stress, Exercise and antioxidant Supplementation*, *Toxicology*, 189:41-54, 2003
- 68) Wissam Ibrahim et al., *Oxidative stress and antioxidant status in mouse kidney: Effects of dietary lipid and vitamin E plus iron*, *J Nutr Biochem* 10: 674-678, 1999
- 69) [www.avlonitou.gr/DopSP-1.html](http://www.avlonitou.gr/DopSP-1.html)
- 70) [www.cyclist.gr/anabolic\\_steriods.html](http://www.cyclist.gr/anabolic_steriods.html)
- 71) [www.efet.gr/doping/sub\\_4.htm](http://www.efet.gr/doping/sub_4.htm)
- 72) [www.greatvistachemicals.com](http://www.greatvistachemicals.com)
- 73) [www.nationmaster.com/encyclopedia/Stanozolol](http://www.nationmaster.com/encyclopedia/Stanozolol)
- 74) [www.tiscali.co.uk/lifestyle/healthfitness/health\\_advice/netdoctor/archive/100004162.html](http://www.tiscali.co.uk/lifestyle/healthfitness/health_advice/netdoctor/archive/100004162.html)