

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗΣ ΣΕ
ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΓΑΣΤΡΟΚΝΗΜΙΟ ΜΥ
ΕΠΙΜΥΩΝ.

ΚΟΚΚΙΝΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΕΙΣΗΓΗΤΕΣ:

ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΚΥΠΑΡΟΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ

ΚΟΝΤΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2008



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

Αριθ. Εισ.: 6583/1
Ημερ. Εισ.: 12-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΒΒ
2008
ΚΟΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087347

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Κουρέτα Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, την πολύτιμη βοήθειά του και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Ακόμη ευχαριστώ τον κ. Βεσκούκη Άρη για τις συμβουλές του σχετικά με την συγγραφή της συγκεκριμένης εργασίας μου και την συνεργασία του.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κυπάρο Αντώνιο για την ευχάριστη συνεργασία και βοήθειά του στο εργαστήριο καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
Περίληψη	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1. Οξυγόνο	5
1.2. Ελεύθερες ρίζες	5
1.3. Παραγωγή ελευθέρων ριζών	6
1.4. Θετικές επιδράσεις	7
1.5. Αρνητικές επιδράσεις	7
1.6. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	9
1.7. Οξειδωτικό στρές	13
1.8. Άσκηση και οξειδωτικό στρές	14
1.8.1. Πηγές παραγωγής ROS κατά την άσκηση	15
1.9. Αλοπουρινόλη και άσκηση	18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
2.1. Τρόπος χειρισμού και χαρακτηριστικά των επίμυων	20
2.2. Χορήγηση αλοπουρινόλης	21
2.3. Εξοικείωση	21
2.4. Πρωτόκολλο κολύμβησης	21
2.5. Θανάτωση των επίμυων, συλλογή και ομογενοποίηση των δειγμάτων	22
2.6. Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρές που μελετήθηκαν	22
2.7. Στατιστική ανάλυση	24
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	25
3.1. Οξειδάση της ξανθίνης	25
3.2. Πρωτεϊνικά καρβονύλια	26
3.3. Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)	27
3.4. Ανηγμένη γλουταθειόνη	28
3.5. Οξειδωμένη γλουταθειόνη	29
3.6. Λόγος GSH/GSSG	30
3.7. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα	31
3.8. Καταλάση	32

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	33
5.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	36
5.1. Πρωτόκολλα δεικτών οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν	36
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Η χημική δομή της γλουταθειόνης (GSH).	12
Εικόνα 2: Οξειδωτικό στρες, η διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ παραγωγής δραστικών ειδών κι αντιοξειδωτικών, προς όφελος των πρώτων.	14
Εικόνα 3: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από το σύστημα της οξειδάσης της ξανθίνης	16
Εικόνα 4. Η ανασταλτική δράση της αλοπουρινόλης στη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ.	19

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο γαστροκνήμιο μυ.	26
Διάγραμμα 2. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο γαστροκνήμιο μυ.	27
Διάγραμμα 3. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των TBARS στο γαστροκνήμιο μυ.	28
Διάγραμμα 4. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης στο γαστροκνήμιο μυ.	29

Διάγραμμα 5. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης στο γαστροκνήμιο μυ.	30
Διάγραμμα 6. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο λόγο GSH/GSSG στο γαστροκνήμιο μυ.	31
Διάγραμμα 7. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο γαστροκνήμιο μυ.	32
Διάγραμμα 8. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη δραστηριότητα της καταλάσης στο γαστροκνήμιο μυ.	33

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Έχει αποδειχτεί ότι η εξαντλητική αερόβια άσκηση αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η αλοπουρινόλη είναι ένα δομικό ανάλογο της υποξανθίνης και ισχυρός αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης, η οποία είναι ένα ένζυμο που ενεργοποιείται κατά την διάρκεια της άσκησης. Η αλοπουρινόλη αναστέλλει την μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξετάσει τη δράση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης σε δείκτες οξειδωτικού στρες στο γαστροκνήμιο μυ επίμυων. Για το λόγο αυτό προσδιορίστηκαν η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η ανηγμένη (GSH) και η οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), ο λόγος GSH/GSSG, η καταλάση, οι ουσίες που αντιδρούν με το θειοβατβιτουρικό οξύ (TBARS) και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια σε επίμυες μετά από εξαντλητική αερόβια άσκηση ή χορήγηση αλοπουρινόλης. Βρέθηκε ότι η άσκηση αύξησε το οξειδωτικό στρες στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων όπως φάνηκε από την αύξηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των TBARS μετά την άσκηση. Επιπλέον, η συγκέντρωση της GSH αυξήθηκε αμέσως μετά την άσκηση, ενώ η συγκέντρωση της GSSG μειώθηκε 5 ώρες μετά την άσκηση. Η άσκηση δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στη δραστηριότητα της καταλάσης και στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Η χορήγηση αλοπουρινόλης οδήγησε επίσης σε αύξηση του οξειδωτικού στρες όπως φάνηκε από την αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του μύος. Συμπερασματικά τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο η άσκηση όσο και η αλοπουρινόλη αυξάνουν το οξειδωτικό στρες του γαστροκνήμιου μύος στους επίμυες.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Οξυγόνο

Το οξυγόνο παράγεται από τους φυτικούς οργανισμούς κατά τη φωτοσύνθεση και είναι απαραίτητο για την αερόβια αναπνοή. Η εμφάνισή του στην ατμόσφαιρα υπολογίζεται ότι έγινε πριν 2,5 δισεκατομμύρια χρόνια λόγω της φωτοσύνθεσης από τα κυανοβακτήρια. Μέχρι τότε οι ζωντανοί οργανισμοί ήταν αναερόβιοι. Το ατμοσφαιρικό οξυγόνο στη βασική του μορφή έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Αυτό το χαρακτηριστικό κάνει το οξυγόνο παραμαγνητικό και μη δραστικό με οργανικά μόρια, εκτός κι αν «ενεργοποιηθεί» λόγω του ότι τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια του έχουν παράλληλα spin. Με τη διαδικασία της φωτοσύνθεσης η ηλιακή ενέργεια χρησιμοποιούνταν για τη μετατροπή του H₂O και του CO₂ σε υδατάνθρακες με ταυτόχρονη απελευθέρωση O₂ στην ατμόσφαιρα. Έτσι, καθώς τα φωτοσυνθετικά βακτήρια πλήθαιναν, τα ποσά του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα αυξάνονταν συνεχώς με αποτέλεσμα να εμφανιστούν οι πρώτοι αερόβιοι οργανισμοί.

1.2. Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα (Jenkins 1988). Η διαμόρφωση αυτή είναι εξαιρετικά ασταθής με αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες να αντιδρούν ταχύτατα με άλλα μόρια αφαιρώντας τους ένα ηλεκτρόνιο (οξειδωση) (Sen 2001). Σκοπός της αντίδρασης αυτής είναι να συμπληρωθεί η εξωτερική τους στιβάδα. Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο H με ένα πρωτόνιο κι ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν βλαβερές επιδράσεις στα διάφορα βιομόρια αλλά έχει παρατηρηθεί ότι έχουν και συμμετοχή σε φυσιολογικές διαδικασίες.

Ανάμεσα στις ελεύθερες ρίζες, οι ενεργές ρίζες οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) προέρχονται από το οξυγόνο, οι ελεύθερες ρίζες αζώτου (reactive nitrogen species, RNS) από το άζωτο, οι ελεύθερες ρίζες θείου (reactive sulfur species, RSS) από το θείο και οι ελεύθερες ρίζες χλωρίου (reactive chlorine species, RCS) από το χλώριο. Οι τρεις τελευταίες κατηγορίες ριζών μπορούν να προέρθουν από αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles & Jacob 2002). Εκτός από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, όπως είναι το ανιόν σουπεροξειδίου (O₂^{•-}) και το ιόν υδροξυλίου (OH[•]) υπάρχουν και παράγωγα οξυγόνου που δεν είναι

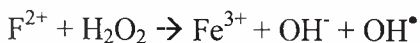
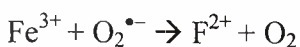
ρίζες αλλά είναι αρκετά δραστικά (υπεροξειδίο του υδρογόνου, H₂O₂ και υποχλωριώδες οξύ (HOCl) (Halliwell & Gutteridge 1998).

1.3. Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Υπάρχουν πολλές πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών, οι οποίες είναι τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς.

Ενδογενείς πηγές

Η σημαντικότερη ενδογενής πηγή ελευθέρων ριζών είναι η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Di Meo & Venditti 2001). Υπολογίζεται ότι στην ηρεμία 2-5% περίπου του οξυγόνου που χρησιμοποιείται για τον αερόβιο μεταβολισμό μετατρέπεται σε ROS (Jenkins & Goldfarb 1993). Ωστόσο, νεώτερες μελέτες έδειξαν ότι το ποσοστό αυτό είναι κατά πολύ μικρότερο (St-Pierre et al. 2002; Hansford et al. 1997). Κατά τη διάρκεια παραγωγής ATP, ηλεκτρόνια διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων. Τα κύρια μέρη παραγωγής ROS στην αναπνευστική αλυσίδα είναι τα σύμπλοκα I και III (Sjodin et al., 1990). Συγκεκριμένα, ένα ποσοστό των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται για την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε O₂^{•-} από την ημικινόνη (UQH) της NADH-αναγωγάσης του συνενζύμου Q (Halliwell & Gutteridge 1998). Ένα μέρος του O₂^{•-} ανάγεται προς H₂O₂, μια αντίδραση που καταλύεται από την υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD). Η παραγωγή των δύο αυτών μορίων μπορεί να προκαλέσει αλυσιδωτές αντιδράσεις παρουσία σιδήρου (αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss).



Μία άλλη ενδογενής πηγή ROS, κυρίως H₂O₂, είναι τα υπεροξειδιοσώματα, μικρά μεμβρανικά κυστίδια που περιέχουν ένζυμα τα οποία συμμετέχουν σε αντιδράσεις οξείδωσης. Επίσης, το σύστημα του κυτοχρώματος P-450 αποτελεί μία σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών. Τα ένζυμα του συστήματος αυτού εμπλέκονται στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών παραγόντων (π.χ. φάρμακα) μεταφέροντας

ηλεκτρόνια από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα (π.χ. φάρμακο).



Η αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης, μέσω μίας αντίδρασης που γίνεται εντονότερα κατά τη διάρκεια της άσκησης, μπορεί επίσης να οδηγήσει στην παραγωγή ROS (Ames et al., 1981; Thomas, 2000) και συγκεκριμένα $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Cooper et al., 2002). Η αυτοοξείδωση της μυοσφαιρίνης μπορεί με ανάλογο τρόπο να απελευθερώσει H_2O_2 (Brandley et al., 1993). Οι φλεγμονώδεις αντιδράσεις μπορεί να αποτελέσουν σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα και τα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν ROS μεταξύ των οποίων H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^\bullet και υποχλωριώδες οξύ (HOCl) (Klebanoff et al., 1988).

Εξωγενείς πηγές

Στις εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών περιλαμβάνονται το κάπνισμα, η ρύπανση του περιβάλλοντος, η κατανάλωση αλκοόλ, η άσκηση, η ηλεκτρομαγνητική και η ηλιακή ακτινοβολία, το άγχος και διάφορα συντηρητικά τροφών.

1.4. Θετικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες και ειδικότερα οι ROS εμπλέκονται στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Jenkins 1988). Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, η οποία μπορεί να προκληθεί και από έντονη φυσική άσκηση που προκαλεί μυϊκό τραυματισμό (έκκεντρη άσκηση) (Malm 2001). Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία (Reid 2001), στην ενεργοποίηση ενζύμων (Jenkins, 1988), στην αποτοξίνωση από φάρμακα καθώς και στη μυϊκή σύσπαση (Linnane et al., 2002). Έτσι, η αναστολή της παραγωγής των ROS μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της συσταλτικότητας ορισμένων μυϊκών ινών. Αντίθετα αύξηση των επιπέδων των ελευθέρων ριζών επιτείνει τη δύναμη συστολής των ινών (Reid, 2001).

1.5. Αρνητικές επιδράσεις

Λιπιδική υπεροξείδωση

Οι ROS προκαλούν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny 2001). Η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών εξαρτάται από την αντιοξειδωτική ικανότητα του αίματος, η οποία μπορεί να αυξηθεί λόγω του προκαλούμενου από την άσκηση οξειδωτικού στρες. Οι ROS προκαλούν επίσης οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA), που είναι δομικά μόρια των κυτταρικών μεμβρανών (Alessio 1993). Η οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου ROO^{*}, συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεύδης (MDA) (Young & McEneny 2001). Η λιπιδική υπεροξείδωση αυξάνει τη ρευστότητα των μεμβρανών και τη διαπερατότητά τους.

Πρωτεϊνική οξείδωση

Οι ROS μπορούν να οξειδώσουν δομικές πρωτεΐνες, των οποίων η δομή και η λειτουργία τροποποιούνται. Η οξείδωση των πρωτεϊνών συνοδεύεται από παραγωγή πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων (Levine 2002), που θεωρούνται δείκτες οξειδωτικού στρες. Η πρωτεϊνική οξείδωση μπορεί να προκληθεί από φλεγμονή, άσκηση ή ισχαιμία-επαναιμάτωση (Levine 2002). Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσοσώματα αλλά τα καρβονύλια δεν εισέρχονται σε αυτή τη διαδικασία με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους σε συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους (Levine 2002).

Οξείδωση του DNA

Οι ROS προκαλούν σπασίματα στις αλυσίδες του DNA και βλάβες στο μηχανισμό επιδιόρθωσης των βάσεων (Jenkins 1988). Ως συνέπεια, προκαλούνται μεταλλάξεις, που οδηγούν στην καρκινογένεση και τη γήρανση (Radak et al., 1999).

Μυϊκός κάματος

Για τη φυσιολογική λειτουργία του μυός απαιτείται ένας μικρός αριθμός ROS (Reid 2001). Το οξειδωτικό στρες, το οποίο έγκειται στην αυξημένη συγκέντρωση ROS στο μυ, σχετίζεται με το μυϊκό κάματο κατά τη διάρκεια της άσκησης και το

μυϊκό τραυματισμό μετά το τέλος της (Cooper et al., 2002). Οι ROS επιδρώντας στο μιτοχονδριακό DNA των μυϊκών κυττάρων προκαλούν μυϊκό κάματο μειώνοντας την μεταφορά ηλεκτρονίων και ATP κατά μήκος της αναπνευστικής αλυσίδας (Reid et al., 1992). Οι συσταλτές πρωτεΐνες του μυός (ακτίνη, μυοσίνη) είναι ευαίσθητες στις αλλαγές της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας, η οποία μεταβάλλεται από την παραγωγή των ROS. Συνεπώς, μεταβάλλεται και η μυϊκή σύσπαση καθώς και ο έλεγχός της (Goldfarb 1999). Οι ROS προκαλούν ενδοκυτταρική αύξηση των ιόντων Ca^{++} και απενεργοποίηση ενδοκυτταρικών αντιοξειδωτικών ενζύμων στα μυϊκά κύτταρα, γεγονότα που συμβάλλουν στην εμφάνιση του μυϊκού κάματος.

1.6. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

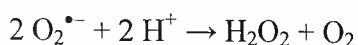
Αντιοξειδωτικό θεωρείται κάθε ουσία, που όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση συγκριτικά με το υπόστρωμά της καθυστερεί ή αναστέλλει σημαντικά την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος (Halliwell and Gutteridge 1998). Τα ενδοκυτταρικά συστατικά είναι ευπαθή απέναντι στη δράση των ελευθέρων ριζών, γεγονός που δικαιολογεί την παρουσία μηχανισμών που εξουδετερώνουν ή ελέγχουν τη δραστηριότητα των ROS. Επιγραμματικά, στους μηχανισμούς αυτούς ανήκουν ένζυμα όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, που απομακρύνουν ελεύθερες ρίζες, πρωτεΐνες που ελαχιστοποιούν τη διαθεσιμότητα προοξειδωτικών παραγόντων όπως η αίμη (τρανσφερίνες, μεταλλοθειονίνες) και μόρια μικρού μοριακού βάρους που απομακρύνουν τις ROS όπως η γλουταθειόνη και το ουρικό οξύ.

A) Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η SOD αποτελεί έναν από τους κύριους αμυντικούς μηχανισμούς απέναντι στο οξειδωτικό στρες και ειδικότερα στις $O_2^{\bullet-}$. Η SOD καταλύει την αυτοοξείδωση του $O_2^{\bullet-}$ σχηματίζοντας H_2O_2 σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

SOD

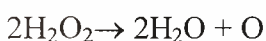


Σε όλα τα κύτταρα, κατά την ηρεμία, το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου από τα μιτοχόνδρια $O_2^{\bullet-}$ ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD) ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers & Lennon 2000). Στα μυϊκά κύτταρα το 65-85% της δραστηριότητας της SOD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα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

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι παρούσα σε όλα τα κύτταρα και συγκεκριμένα εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα, τα οποία είναι κυτταρικές δομές που χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την αποτοξίνωση τοξικών ουσιών και παράγουν H_2O_2 (Antunes et al., 2002). Η καταλάση μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O και O_2 σύμφωνα με την αντίδραση:

CAT



Η καταλάση μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει το H_2O_2 για την αποτοξίνωση ορισμένων ουσιών διαμέσου μίας αντίδρασης υπεροξειδωσής με υποστρώματα όπως η φαινόλη, η αλκοόλη ή το φορμικό οξύ:

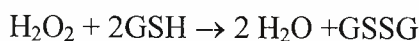
CAT



Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Η GPX, που είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια έχει την ικανότητα να μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O . Αυτή η αντίδραση χρησιμοποιεί τη γλουταθειόνη και τη μετατρέπει στην οξειδωμένη μορφή της:

GPX



Η GPX και η CAT έχουν την ίδια δράση πάνω στο υπεροξείδιο. Ωστόσο, η απόδοση της GPX εξαρτάται από την παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ROS κάτι που δε συμβαίνει για την CAT (Antunes et al., 2002).

B) Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Βιταμίνη E (τοκοφερόλη)

Η βιταμίνη E είναι μία λιποδιαλυτή πρωτεΐνη που αποτελείται από διάφορες ισομορφές τοκοφερολών. Ανάμεσα τους η α-τοκοφερόλη είναι η περισσότερο ενεργή και άφθονη μορφή (Fuchs et al., 2003). Η βιταμίνη E είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό μόριο και αλληλεπιδρά με διάφορα αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη C, η GSH, το β-καροτένιο και το λιποϊκό οξύ. Τα μόρια αυτά έχουν την ικανότητα να την αναγεννούν από την οξειδωμένη της μορφή. Η βιταμίνη E ανστέλλει την υπεροξείδωση των λιπιδίων.

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C είναι μία υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη δραστική τόσο στο εξωκυττάριο υγρό όσο και στο κυτταρόπλασμα. Έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει τις ROS και να ενισχύει τη δράση της βιταμίνης E και της GSH αναγεννώντας τις ενεργές τους μορφές μετά την αλληλεπίδραση τους με τις ROS (Evans 2000).

Φλαβονοειδή

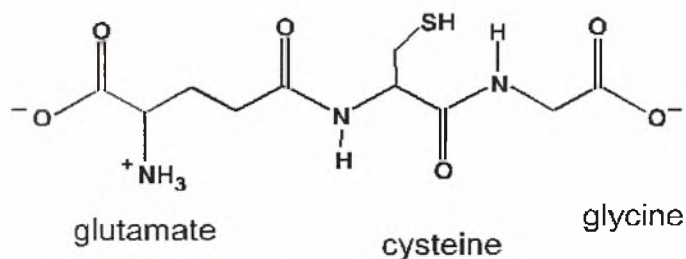
Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες που σχηματίζονται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και μηλονικό οξύ (Willcox et al., 2002). Έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλουν τη δράση προοξειδωτικών ενζύμων *in vitro* ενώ έχουν επίσης την ικανότητα να απενεργοποιούν ορισμένες ROS.

Θειόλες

Οι θειόλες είναι μόρια που διαθέτουν σουλφυδρυλικά κατάλοιπα (-SH) στο ενεργό τους κέντρο. Συντίθενται από τα αμινοξέα κυστεΐνη και μεθειονίνη. Συμμετέχουν στην πρωτεϊνσύνθεση και την ανοσολογική αντίδραση και έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Sen & Packer 2000). Η GSH είναι η μεγαλύτερη παρούσα θειόλη στον οργανισμό. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια και αποτελεί το κυριότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό στα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Δρα ως υπόστρωμα της GPX κι έτσι συμμετέχει στην

αναστολή της παραγωγής των ROS. Η GSH, επίσης, εξουδετερώνει και απευθείας τις ROS ενώ παράλληλα ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών E και C (May et al., 1996). Σε περιβάλλον οξειδωτικού στρες παρατηρείται, συνήθως, μείωση του λόγου της ανηγμένης προς την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH/GSSG) καθώς και μείωση των επιπέδων των ολικών θειολών. Τα φαινόμενα αυτά εμφανίζονται μετά την άσκηση, κατά τη γήρανση καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι οι νόσοι του Parkinson και του Alzheimer. Οι μειωμένες ποσότητες GSH μπορούν να εξισορροπηθούν με συμπληρώματα βιταμινών E και C, γεγονός που σημαίνει ότι τα παραπάνω αντιοξειδωτικά έχουν τους ίδιους στόχους. Το λιποϊκό οξύ είναι μία θειόλη που αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση και συμβάλλει στην αναγωγή των βιταμινών C και E από τις οξειδωμένες μορφές τους (Serbinova et al., 1992).

glutathione (GSH)



Εικόνα 1: Η χημική δομή της γλουταθειόνης (GSH).

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών στον άνθρωπο. Η άσκηση αυξάνει τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green & Fraser 1988). Στη συνέχεια διαχέεται στο εσωτερικό των μυών και λειτουργεί προστατευτικά απέναντι στην προκαλούμενη από ROS οξείδωσή τους (Hellsten et al., 1998). Είναι υπεύθυνο για > 50% της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος ενώ προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες και το DNA από το οξειδωτικό στρες (Wayner et al., 1987).

Πρωτεΐνες θερμικού σοκ (Heat Shock Proteins, HSP)

Οι HSP είναι πρωτεΐνες που η συγκέντρωσή τους αυξάνεται ως απόκριση στη φυσική άσκηση, στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας του σώματος, στη διάρκεια φλεγμονής και στο οξειδωτικό στρες.

Φερριτίνη

Η φερριτίνη, μία από τις σημαντικότερες πρωτεΐνες του μεταβολισμού του σιδήρου. Παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας των επιπέδων του καθώς η υψηλή συγκέντρωσή του έχει προοξειδωτικές συνέπειες μέσω της αντίδρασης Fenton. Αυξημένα επίπεδα φερριτίνης παρατηρούνται κατά την άσκηση και τη φλεγμονή.

1.7. Οξειδωτικό stress

Το οξειδωτικό στρες είναι μία διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών-αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων (Sies 1991). Μπορεί να προκληθεί:

Από μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών

Μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάσουν τη δράση των ενζύμων της αντιοξειδωτικής άμυνας (CuZn-SOD ή GPX).

Από αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών

Έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα οξυγόνου ή λανθασμένη ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων.

Εξωγενείς πηγές πρόκλησης οξειδωτικού στρες:

Ξενοβιοτικές ουσίες

Παθογόνα βακτήρια και ιοί

Όζον και υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου)

Ακτινοβολία

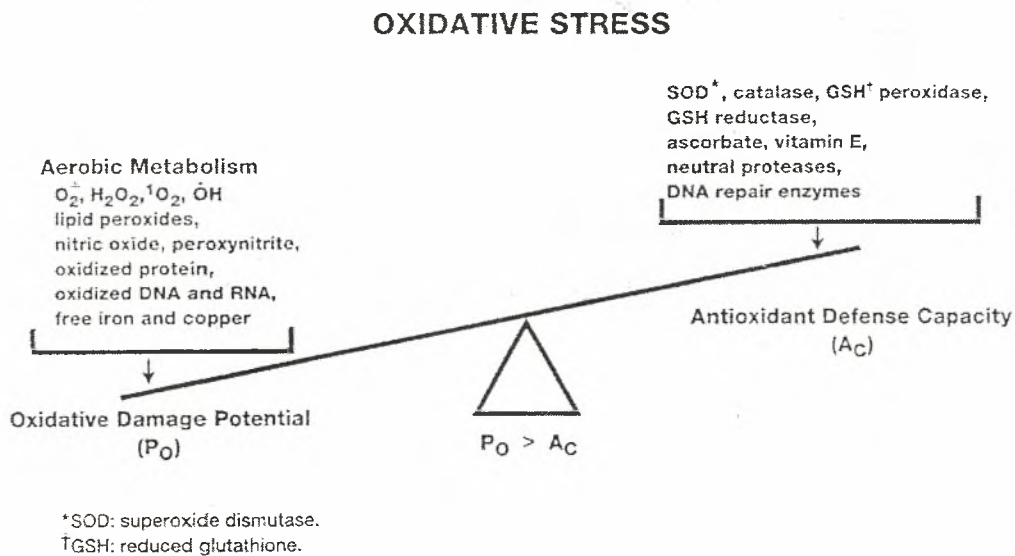
Διατροφή

Κάπνισμα

Ενδογενείς πηγές πρόκλησης οξειδωτικού στρες:

Ένζυμα που παράγουν ελεύθερες ρίζες (π.χ. οξειδάση της ξανθίνης που μετατρέπει την ξανθίνη σε ουρικό οξύ καθώς επίσης και το οξυγόνο σε H_2O_2)

Παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα ουδετερόφιλα



Εικόνα 2: Οξειδωτικό stress, η διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ παραγωγής δραστικών ειδών κι αντιοξειδωτικών, προς όφελος των πρώτων (Mylonas & Kouretas 1999).

1.8. Άσκηση και οξειδωτικό stress

Έχει αναφερθεί ότι η άσκηση μειώνει τη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου, καρδιαγγειακών παθήσεων και διαβήτη (McCarter 2000) ενώ συνδέεται και με την καθυστερημένη εμφάνιση της γήρανσης σε επίμυες. Στις ευεργετικές επιδράσεις της άσκησης συμβάλλουν κυρίως οι προσαρμογές των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του κάθε ιστού. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί αυξημένη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, GPX) στο σκελετικό μυ, την καρδιά και το ήπαρ μετά από χρόνια άσκηση (Jenkins 1988; Ji 1999). Η αυξημένη δράση των αντιοξειδωτικών ενζύμων λειτουργεί ως ένας μηχανισμός προσαρμογής και προστασίας από τις παραγόμενες κατά την άσκηση ελεύθερες ρίζες. Η ποσότητα παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση είναι άμεσα εξαρτώμενη από την ένταση της άσκησης. Όταν η άσκηση είναι εξαντλητική τα επίπεδα ελευθέρων ριζών που παράγονται είναι πολύ υψηλά με αποτέλεσμα η αντιοξειδωτική άμυνα των ιστών να μην μπορεί να τα εξουδετερώσει.

Τότε εμφανίζεται το παραγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες, το οποίο μπορεί να προκαλέσει την οξειδωτική καταστροφή πρωτεϊνών, λιπιδίων και άλλων βιομορίων (Finaud et al., 2006). Ενώ, λοιπόν, η άσκηση έχει ευεργετικές συνέπειες για την υγεία, οδηγεί ταυτόχρονα στην παραγωγή ελευθέρων ριζών που μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στα μακρομόρια.

Σε προηγούμενες εργασίες έχει παρατηρηθεί ότι η άσκηση σχετίζεται με την αύξηση του οξειδωτικού στρες (Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξάνονται στο πλάσμα και το γαστροκνήμιο μυ μετά από εξαντλητική άσκηση (Alessio et al., 2000; Gomez-Cabrera et al., 2005; Stadtman and Levine 2000; You et al., 2005). Η άσκηση αυξάνει και τη λιπιδική υπεροξείδωση στο πλάσμα και το σκελετικό μυ, όπως έχει αναφερθεί και στο παρελθόν (Ajmani et al., 2003; Alessio et al., 2000; You et al., 2005). Τέλος, ο λόγος GSH/GSSG φαίνεται να μειώνεται μετά από άσκηση (ποδηλασία) στον άνθρωπο (Aguilo et al., 2005). Επιπλέον, όσο πιο μεγάλη είναι η ένταση της άσκησης τόσο πιο έντονη είναι η παραγωγή ελευθέρων ριζών και οξειδωτικού στρες (Palmer et al., 2003).

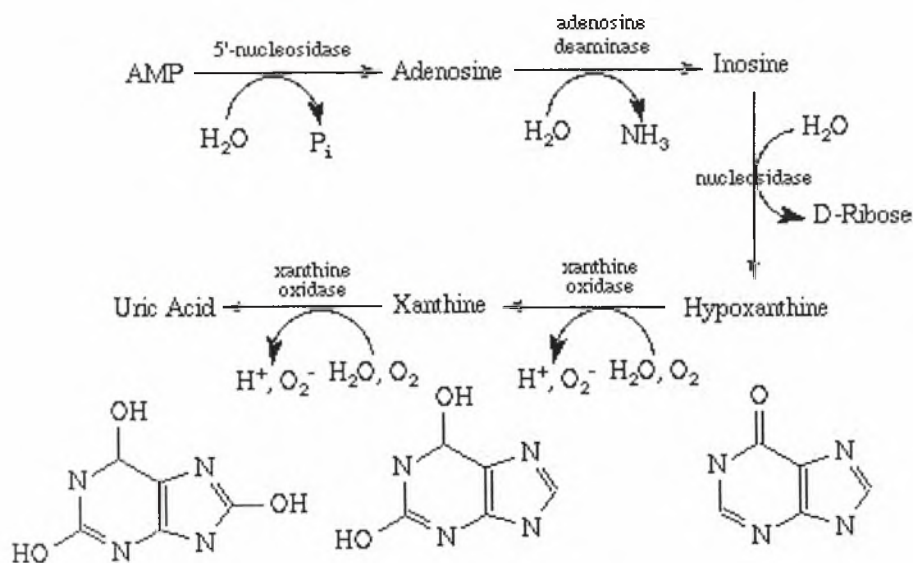
1.8.1. Πηγές παραγωγής ROS κατά την άσκηση

Η αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων

Κατά την αερόβια αναπνοή το μοριακό οξυγόνο ανάγεται σε νερό. Η διαδικασία αυτή, που συμβαίνει στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, περιλαμβάνει μια ροή ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα με τελικό αποδέκτη τους το οξυγόνο. Μικρά ποσοστά (2-5%) $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα και πιο συγκεκριμένα από το σύμπλεγμα της ουβικινόνης (Leeuwenburgh & Heinecke 2001). Η παραγωγή οξειδωτικού στρες, λοιπόν είναι έντονη αν ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι κατά τη μέγιστη άσκηση η συνολική πρόσληψη οξυγόνου αυξάνεται 20 φορές, ενώ τα επίπεδα οξυγόνου σε μια μυϊκή ίνα αυξάνονται έως και 100 φορές (Ji 1999).

Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Η αναερόβια άσκηση προκαλεί το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης (ischemia-reperfusion) κατά το οποίο ενεργοποιείται το μονοπάτι της οξειδάσης της ξανθίνης (XO). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης το ATP διασπάται σε ADP και τελικά AMP λόγω των αυξημένων απαιτήσεων σε ενέργεια. Τότε, η αφυδρογονάση της ξανθίνης οξειδώνεται προς οξειδάση της ξανθίνης και ακολουθεί μετατροπή του AMP σε υποξανθίνη. Μέσω της οξειδάσης της ξανθίνης, η υποξανθίνη μετατρέπεται σε ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα οξειδάσης της ξανθίνης και υποξανθίνης τόσο στο πλάσμα όσο και σε ιστούς μετά από αναερόβια άσκηση (Radak et al., 1996; Vina et al., 2000). Η δράση του ενζύμου αυτού οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 (McCord & Fridovich 1968). Κάτω από αερόβιες συνθήκες το ATP αναπληρώνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ γίνεται μέσω της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης και όχι μέσω της οξειδωμένης της μορφής (XO) (Ji 1999).



Εικόνα 3: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από το σύστημα της οξειδάσης της ξανθίνης

Φλεγμονώδης αντίδραση

Έχει βρεθεί ότι η φλεγμονώδης αντίδραση ενεργοποιείται κατά την άσκηση και ειδικότερα από το είδος της άσκησης που προκαλεί μυϊκή καταστροφή (π.χ.

έκκεντρη άσκηση). Τα πολυμορφοουδετερόφιλα (Polymorphoneutrophils, PMN) είναι η ομάδα κυττάρων που συμμετέχει στη φλεγμονώδη αντίδραση. Μετά τη μυική καταστροφή λόγω της άσκησης, τα PMN προσεγγίζουν την περιοχή της καταστροφής και εκκρίνουν λυσοζύμη και $O_2^{\bullet-}$. Έτσι, κατά την προκαλούμενη από την άσκηση ενεργοποίηση και δράση των PMN παράγονται ελεύθερες ρίζες, οι οποίες συχνά είναι υπεύθυνες για την πρόκληση οξειδωτικού στρες (Leeuwenburgh & Heinecke 2001). Το γεγονός ότι κατά την άσκηση, που προκαλεί μυική καταστροφή εμφανίζεται φλεγμονή έχει επιβεβαιωθεί και με τον προσδιορισμό δύο ακόμη δεικτών της φλεγμονής, της IL-6 και της μυελουπεροξειδάσης (Childs et al., 2000).

Δράση των κατεχολαμινών

Η συγκέντρωση των κατεχολαμινών αυξάνεται μετά από έντονη άσκηση και ενεργοποιούνται έτσι οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς. Οι κατεχολαμίνες επάγουν το μεταβολισμό με αποτέλεσμα την έντονη παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια.

Υπεροξειδιοσώματα

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι οργανίδια που οξειδώνουν τα λιπαρά οξέα. Τα λιπαρά οξέα είναι η κύρια πηγή ενέργειας για το μυοκάρδιο και το σκελετικό μυ κατά την άσκηση και κατά τη διάσπασή τους στα υπεροξειδιοσώματα ελευθερώνονται ROS (Ji 1999).

1.9. Αλοπουρινόλη και άσκηση

Ρόλος και ιατρικές χρήσεις της αλοπουρινόλης

Η αλοπουρινόλη, λόγω της ικανότητάς της να αναστέλλει την παραγωγή ουρικού οξέος, χρησιμοποιείται ως φάρμακο απέναντι στην ουρική αρθρίτιδα (ασθένεια κατά την οποία μεγάλες συγκεντρώσεις ουρικού οξέος συσσωρεύονται στους ιστούς). Εκτός αυτού, χρησιμοποιείται και ενάντια στις παρενέργειες της χημειοθεραπείας.

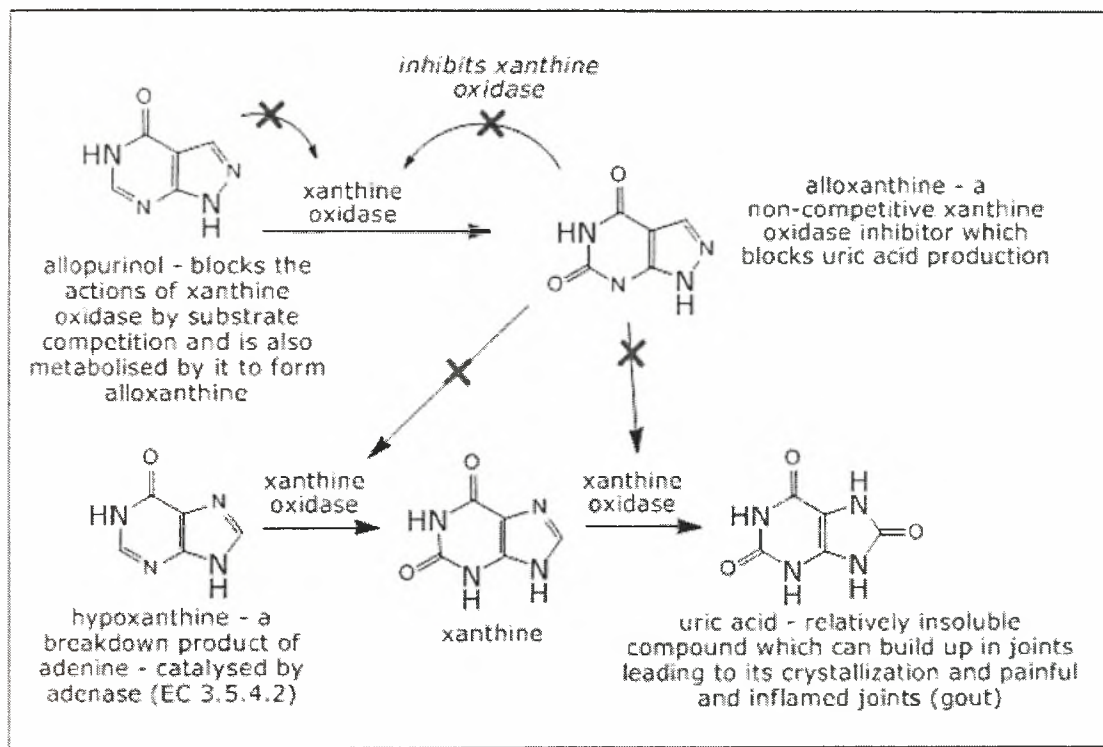
Η αλοπουρινόλη είναι ένα δομικό ανάλογο της υποξανθίνης (Parks and Granger 1986) και αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης (Kelley and Beardmore 1990) και της δευδρογονάσης της ξανθίνης (Hoey et al., 1988). Η οξειδάση της ξανθίνης χρησιμοποιεί ως δέκτη ηλεκτρονίων μοριακό οξυγόνο κατά τη διαδικασία

της διάσπασης των πουρινών με αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) και ανιόντος σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) (McCord and Fridovich 1968). Η αλοπουρινόλη αναστέλλει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ μειώνοντας την παραγωγή ουρικού οξέος. Η αλοπουρινόλη μεταβολίζεται σε οξυπουρινόλη από τη δευδρογονάση της ξανθίνης και την αλδευδική οξειδάση. Τόσο η αλοπουρινόλη όσο και η οξυπουρινόλη έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ρίζες OH^{\cdot} (Moorhouse et al., 1987). Λόγω της ιδιότητας της αλοπουρινόλης να αναστέλλει την παραγωγή $O_2^{\cdot-}$ μέσω της αναστολής της δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης, η αλοπουρινόλη θεωρείται ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο (Gomez-Cabrera et al., 2005; Gomez-Cabrera et al., 2006).

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα ένζυμο που συνεισφέρει σημαντικά στην παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση, όπως έχει παρατηρηθεί από προηγούμενες μελέτες (McCord and Fridovich 1968). Ο αριθμός των εργασιών με σκοπό τη μελέτη του προστατευτικού ρόλου της αλοπουρινόλης απέναντι στο προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες είναι σχετικά μικρός (Gomez-Cabrera et al., 2005; Gomez-Cabrera et al., 2006; Gomez-Cabrera et al., 2003; Koyama et al., 1999). Έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση αλοπουρινόλης ανέστειλε τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης μετά από τρέξιμο σε κυλιόμενο τάπητα σε επίμυες (Gomez-Cabrera et al., 2005; Koyama et al., 1999), και μετά από μαραθώνιο (Gomez-Cabrera et al., 2006) και ποδηλασία σε ανθρώπους (Gomez-Cabrera et al., 2003). Στις παραπάνω εργασίες, η αλοπουρινόλη χορηγήθηκε σε δόσεις από $32 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Gomez-Cabrera et al., 2005) έως $44 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ σε επίμυες (Koyama et al., 1999) and περίπου $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ σε ανθρώπους (Gomez-Cabrera et al., 2003; Gomez-Cabrera et al., 2006).

Η αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης μέσω χορήγησης αλοπουρινόλης προκάλεσε μείωση στη συγκέντρωση της μαλονδιαλδεϋδης (MDA) του πλάσματος μετά από μαραθώνιο (Gomez-Cabrera et al., 2006) και ποδηλασία υψηλού επιπέδου (Gomez-Cabrera et al., 2003) σε ανθρώπους. Επίσης, η χορήγηση αλοπουρινόλης μείωσε τη συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων μετά από τρέξιμο μέχρι εξάντλησης σε δαπεδοεργόμετρο (Gomez-Cabrera et al., 2005). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η αλοπουρινόλη μείωσε την αυξημένη από την άσκηση κρεατινική κινάση, η οποία είναι ένας δείκτης μυικής καταστροφής (Gomez-Cabrera et al., 2003). Έχει επίσης εξεταστεί αν οι ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από τη δράση της οξειδάσης της

ξανθίνης οδηγούν σε επαγωγή της έκφρασης σημαντικών ενζύμων, όπως οι Mn-SOD, iNOS και eNOS, για τις προσαρμογές κατά τη διάρκεια της άσκησης. Η Mn-SOD ενεργοποιείται κατά την εξαντλητική άσκηση και η ενεργοποίησή της αποτράπηκε σε επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη (Gomez-Cabrera et al., 2005). Οι συνθάσες του NO ενεργοποιήθηκαν επίσης από την άσκηση και με τη χρήση της αλοπουρινόλης η ενεργοποίησή τους παρεμποδίστηκε (Gomez-Cabrera et al., 2005).



Εικόνα 4. Η ανασταλτική δράση της αλοπουρινόλης στη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξετάσει την επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης σε δείκτες οξειδωτικού στρες στο γαστροκνήμιο μυ επίμυων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Τρόπος χειρισμού και χαρακτηριστικά των επιμύων

Για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν 80 ένηβοι αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar. Οι επίμυες ήταν ηλικίας 8 εβδομάδων και βάρους 220 ± 10 g και αναπτύχθηκαν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος (εναλλαγή φωτός και σκότους ανά 12 ώρες και θερμοκρασία 20°C). Χωρίστηκαν σε κλουβιά των τριών και η τροφή και το νερό διατίθονταν ελεύθερα.

Διαχωρισμός των πειραματικών ομάδων των επιμύων:

Οι επίμυες χωρίστηκαν σε 8 ομάδες των 10 ατόμων ως ακολούθως:

- Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO, ασκήθηκαν και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση.
- Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO, ασκήθηκαν και θανατώθηκαν 5 ώρες μετά την άσκηση.
- Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη, ασκήθηκαν και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση.
- Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη, ασκήθηκαν και θανατώθηκαν 5 ώρες μετά την άσκηση.
- Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη και θανατώθηκαν 1.5 ώρες μετά τη χορήγηση.
- Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη και θανατώθηκαν 2.5 ώρες μετά τη χορήγηση.
- Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη και θανατώθηκαν 7.5 ώρες μετά τη χορήγηση.
- Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO και θανατώθηκαν 1.5 ώρες μετά τη χορήγηση (ομάδα ελέγχου-control group).

Το μοντέλο άσκησης που εφαρμόστηκε ήταν η κολύμβηση μέχρι εξάντλησης. Η αλοπουρινόλη χορηγήθηκε 1.5 ώρες πριν την έναρξη της άσκησης διότι τόσοσ είναι ο απαραίτητος χρόνος έως ότου να παρατηρηθεί μέγιστη συγκέντρωσή της στο μυ. Η θανάτωση των επιμύων στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη έγινε 1.5, 2.5 και 7.5 ώρες μετά τη χορήγηση έτσι ώστε να υπάρξει πλήρης αντιστοιχία με τους επίμυες

στους οποίου χορηγήθηκε DMSO. Πιλοτικά πειράματα απέδειξαν ανάγκη για τη χρησιμοποίηση μίας μόνο ομάδας ελέγχου αφού δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στους δείκτες οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν κατά την διάρκεια των 7.5 ωρών του πειράματος. Επίσης, πιλοτικά πειράματα έδειξαν ότι η χορήγηση DMSO δεν επηρεάζει τις τιμές των προς μελέτη δεικτών σε καμία χρονική στιγμή.

2.2. Χορήγηση αλοπουρινόλης

Χορηγήθηκε μια δόση αλοπουρινόλης των $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ενδοπεριτοναϊκά 1.5 ώρα πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας. Η αλοπουρινόλη διαλύθηκε σε DMSO καθώς δεν ήταν δυνατή η διάλυσή της σε φυσιολογικό ορό ή σε διάλυμα φυσιολογικού ορού και DMSO. Το DMSO είναι καλός διαλύτης της αλοπουρινόλης και έχει χρησιμοποιηθεί και σε προηγούμενα πειράματα με ανθρώπους (Lee & Wang 1999).

2.3. Εξοικείωση

Κατά την άφιξη τους οι επίμυες αφέθηκαν για 7 μέρες στον πειραματικό χώρο ώστε να εγκληματιστούν, χωρίς να υποστούν κάποια μεταχείριση. Στη συνέχεια ξεκίνησε η εξοικείωσή τους με το νερό για 5 μέρες πριν ξεκινήσει η εφαρμογή του πρωτοκόλλου κολύμβησης. Την πρώτη μέρα εξοικείωσης οι επίμυες μπήκαν στο νερό για 10 λεπτά χωρίς βάρος στην ουρά τους. Τις επόμενες δύο μέρες οι επίμυες ασκήθηκαν για 10 λεπτά με εφαρμογή βάρους στη βάση της ουράς τους ισοδύναμο με το 1% του σωματικού τους βάρους. Τις τελευταίες 2 μέρες το βάρος αυξήθηκε στο 2% του σωματικού τους βάρους. Τέλος οι επίμυες αναπαύθηκαν για 3 μέρες πριν ξεκινήσει η εφαρμογή του πρωτοκόλλου.

2.4. Πρωτόκολο κολύμβησης

Οι επίμυες ασκήθηκαν ο καθένας ξεχωριστά μέχρι εξάντλησης σε δεξαμενή διαμέτρου 1 μέτρου και βάθους 0.7 μέτρων. Το νερό ρυθμίστηκε σε θερμοκρασία 33-36°C. Στη βάση της ουράς τους προσδέθηκε βάρος ισοδύναμο με το 4% του σωματικού τους βάρους έτσι ώστε η άσκηση να είναι συνεχής. Το πρωτόκολο της κολύμβησης που εφαρμόστηκε επιλέχθηκε διότι προκαλεί την μικρότερη μυϊκή καταστροφή σε σύγκριση με το τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο) (Duarte et al. 1994). Έτσι, οποιαδήποτε επίδραση στους δείκτες του οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν,

αποδίδεται στην άσκηση και όχι στη μυϊκή καταστροφή, η οποία επάγει την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Duarte et al. 1994; Nikolaidis et al. 2007). Επίσης, όπως έχει αναφερθεί (Leaf et al., 1997; Lovlin et al., 1987), το προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες εξαρτάται από την ένταση της άσκησης γι' αυτό επιλέχθηκε το πρωτόκολο να εφαρμοστεί μέχρι εξάντλησης.

2.5. Θανάτωση των επιμύων, συλλογή και ομογενοποίηση των δειγμάτων

Οι επίμυες θανατώθηκαν με αποκεφαλισμό αφού πρώτα εκτέθηκαν για λίγο σε αιθέρα. Τα δείγματα των μυών από τα πίσω πόδια συλλέχθηκαν με χειρουργική επέμβαση και τοποθετούνταν σε υγρό άζωτο. Η ομογενοποίηση έγινε με γουδί και γουδοχέρι. Ο ιστός ομογενοποιήθηκε σε ένα phosphate buffered saline pH 7.4 που περιείχε 138 mM NaCl, 2,7 mM KCL και 1 mM EDTA καθώς και ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών: Απροτινίνη (10mg/mL), λιουπεπτίνη (1mg/mL) και PMSF (9mg/mL).

2.6. Πρωτόκολα δεικτών οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν

Οξειδάση της ξανθίνης

Η δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Prajda & Weber (1975). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή η δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίστηκε μέσω της παραγωγής ουρικού οξέος έχοντας ως υπόστρωμα την ξανθίνη.

Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)

Η GSH υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Reddy et al. (2004). Η GSH αναφέρεται ως ισοένζυμο μαζί με μια ποικιλία ενζύμων όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η θειολτρανσφεράση. Παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό φαρμάκων, στο μεταβολισμό του ασβεστίου καθώς επίσης και στις λειτουργίες της κυτταρικής μεμβράνης. Ακόμη συμμετέχει σε σημαντικές διαδικασίες για τη ζωή όπως η απομάκρυνση των ξενοβιοτικών, η διατήρηση των επιπέδων των θειολικών ομάδων των πρωτεϊνών, στη μεταφορά ελευθέρων ριζών αλλά και αμινοξέων κατά μήκος των μεμβρανών.

Οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG)

Η GSSG υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Tietze (1969).

Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Για τα TBARS, ο υπολογισμός έγινε σύμφωνα με τους Keles et al. (2001). Το οξειδωτικό στρες στο περιβάλλον του κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή εξαιρετικά ενεργών και ασταθών λιπιδικών υπεροξειδίων. Η αποσύνθεση των ασταθών αυτών υπεροξειδίων καταλήγει στη δημιουργία της μαλονδιαλδεύδης (MDA), η οποία μπορεί να υπολογιστεί ποσοτικά ακολουθώντας μια ελεγχόμενη αντίδραση με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) σε αναλογία 1:2. Η μέτρηση των TBARS είναι μια πολύ καλή μέθοδος για τον έλεγχο της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Patsoukis et al. (2004). Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι επιρρεπή στην οξειδωτική καταστροφή. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αποτελούν δείκτες της πρωτεϊνικής οξειδωσης και χρησιμοποιούνται σε μεγάλη συχνότητα. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεΐδες και κετόνες) παράγονται στις αλυσίδες των Pro, Arg, Lys and Thr και είναι αρκετά σταθερά μόρια. Οι καρβονυλιωμένες πρωτεΐνες καταστρέφονται μη αντιστρεπτά ενώ η καρβονυλίωση οδηγεί στην απώλεια της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Οι καρβονυλικές πρωτεΐνες αποδομούνται από το πρωτεόσωμα αλλά αν έχουν υποστεί σοβαρή βλάβη δεν μπορούν να αποδομηθούν με αποτέλεσμα τον σχηματισμό συσσωματωμάτων μεγάλου μοριακού βάρους. Η οξειδωτική καταστροφή των πρωτεϊνών δεν επιδρά μόνο στη λειτουργικότητά τους αλλά επηρεάζει και τον τρόπο δράσης άλλων βιομορίων. Εάν, π.χ, τα επιδιορθωτικά ένζυμα του DNA υποστούν κάποιου είδους οξειδωτική βλάβη το DNA δε θα μπορέσει να επιδιορθωθεί όπως θα έπρεπε φυσιολογικά να γίνει.

Καταλάση

Η δραστηριότητα της καταλάσης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον Aebi (1984). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή η δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίστηκε μέσω της διάσπασης του υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα.

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Ο υπολογισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszewska and Bartosz (2002). Ο όρος ολική αντιοξειδωτική ικανότητα αναφέρεται στην ικανότητα των συστατικών των ιστών να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες. Κάθε συστατικό του ιστού έχει τη δική του αντιοξειδωτική ικανότητα. Ωστόσο κάθε ένα συνεισφέρει σε διαφορετικό ποσοστό στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του ιστού. Η TAC υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τη ρίζα DPPH. Παρουσία ενός δότη υδρογόνων, η ρίζα DPPH• μετατρέπεται στην αντίστοιχη υδραζίνη.

Τα πρωτόκολα των δεικτών οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν στην διπλωματική εργασία παρουσιάζονται αναλυτικά στο παράρτημα. Όλα τα πρωτόκολα ήταν φασματοφωτομετρικά και έγιναν εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ανά mg πρωτεΐνης. Η ολική πρωτεΐνη υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

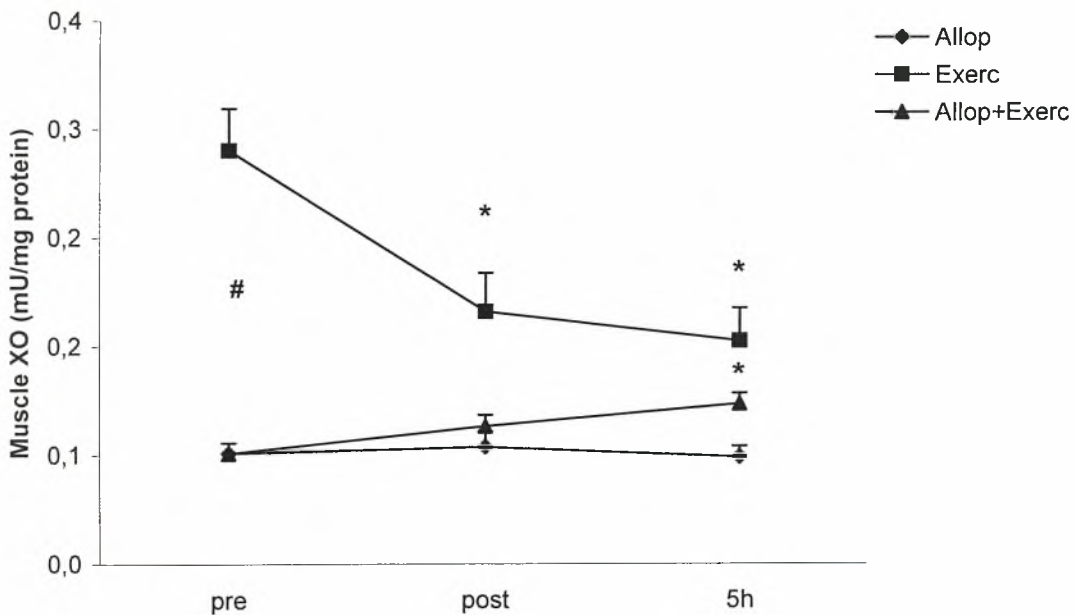
2.7. Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (παρέμβαση × χρόνος) (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω ανάλυσης απλής κύριας επίδρασης. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0.05$. Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill.). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean \pm SEM.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Οξειδάση της ξανθίνης

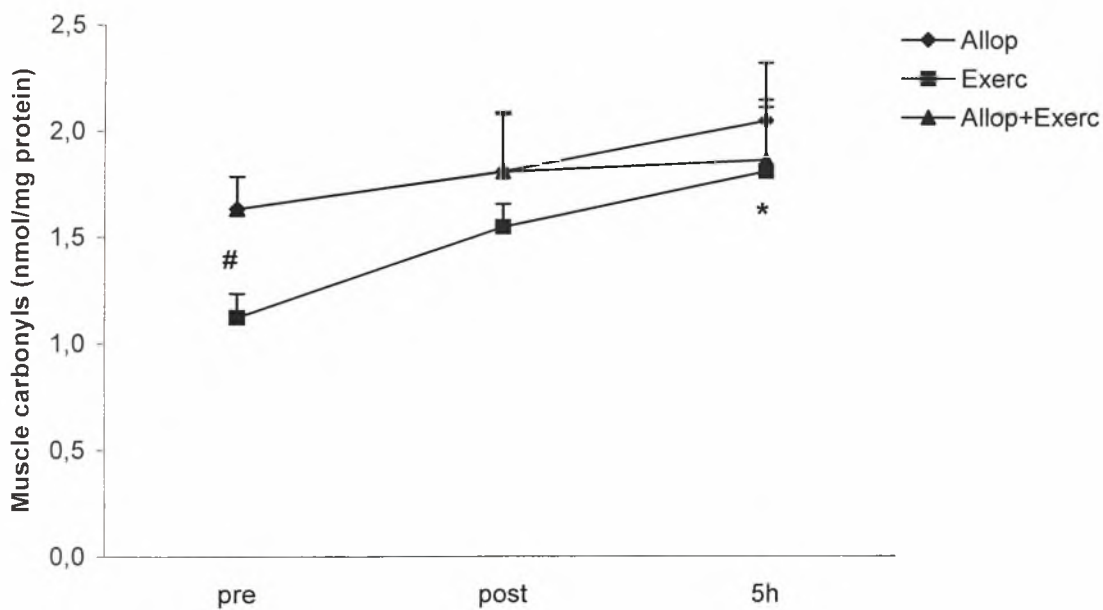
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου και του συνδυασμού τους. Όπως αναμενόταν η οξειδάση της ξανθίνης μειώθηκε σημαντικά μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης (περίπου τρεις φορές κατά ηρεμία). Η οξειδάση της ξανθίνης μειώθηκε αμέσως μετά και 5 ώρες μετά την άσκηση ενώ αυξήθηκε 5 ώρες μετά την άσκηση στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη.



Διάγραμμα 1. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης στο γαστροκνήμιο μυ. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή pre στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και την αλοπουρινόλη κατά την ηρεμία ($P < 0.05$).

3.2. Πρωτεϊνικά καρβονύλια

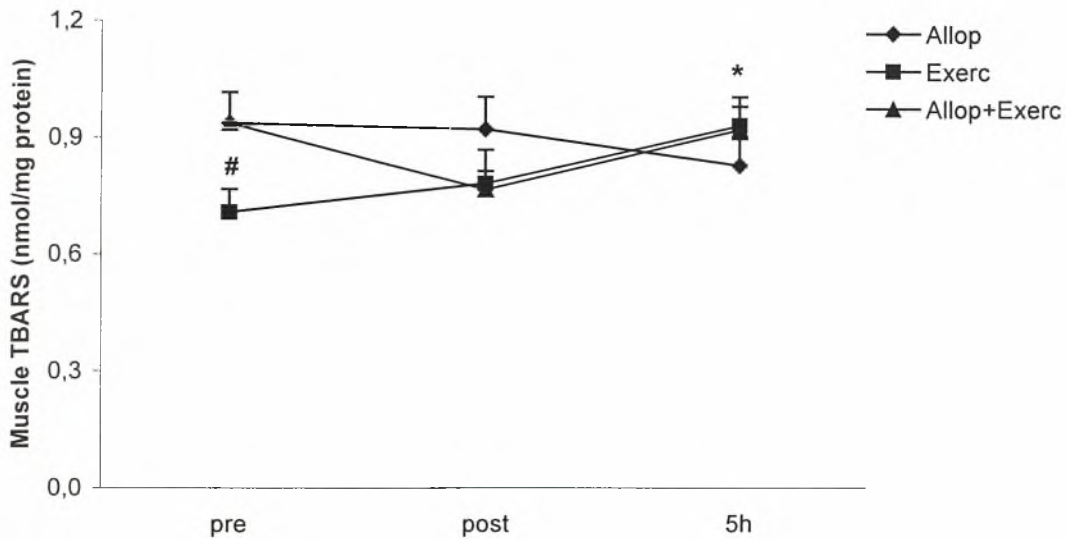
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης και του χρόνου. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξήθηκαν σημαντικά μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης στην ηρεμία σε σχέση με τα control. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξήθηκαν 5 ώρες μετά την άσκηση στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε DMSO. Στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη (τόσο σε εκείνους που ασκήθηκαν όσο και σε εκείνους που δεν ασκήθηκαν) τα πρωτεϊνικά καρβονύλια δε μεταβλήθηκαν.



Διάγραμμα 2. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο γαστροκνήμιο μυ. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή pre στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και την αλοπουρινόλη κατά την ηρεμία ($P < 0.05$).

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

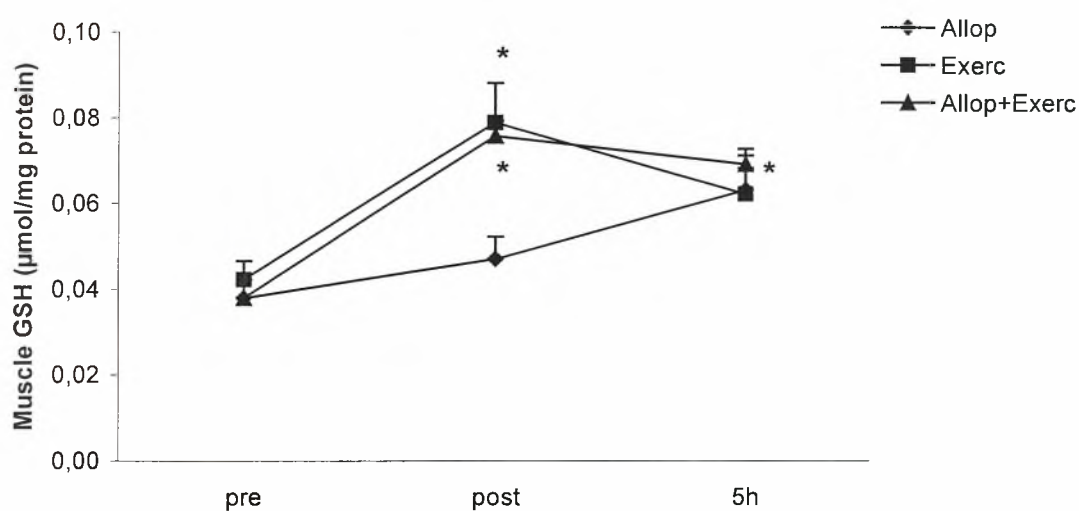
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου και του συνδυασμού τους. Τα TBARS αυξήθηκαν μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης στην ηρεμία σε σχέση με τα control. Τα TBARS αυξήθηκαν 5 ώρες μετά την άσκηση στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε DMSO. Στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη (τόσο σε εκείνους που ασκήθηκαν όσο και σε εκείνους που δεν ασκήθηκαν) τα TBARS δε μεταβλήθηκαν.



Διάγραμμα 3. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση των TBARS στο γαστροκνήμιο μυ. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή pre στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και την αλοπουρινόλη κατά την ηρεμία ($P < 0.05$).

3.4. Ανηγμένη γλουταθειόνη

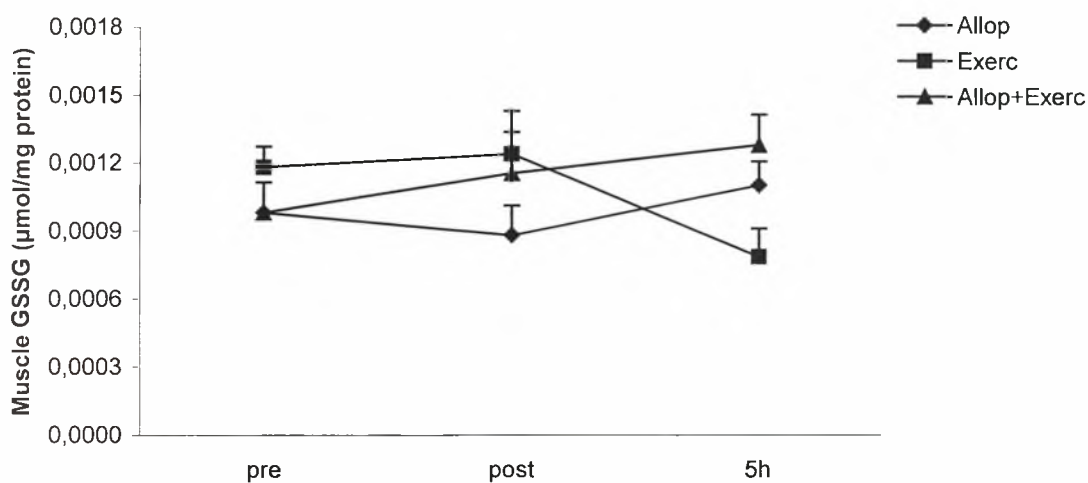
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου και του συνδυασμού τους. Αμέσως μετά την άσκηση η GSH αυξήθηκε τόσο στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε DMSO όσο και σε εκείνους στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη. Επίσης, η GSH αυξήθηκε 7,5 ώρες μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης.



Διάγραμμα 4. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης στο γαστροκνήμιο μυ. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή pre στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$).

3.5. Οξειδωμένη γλουταθειόνη

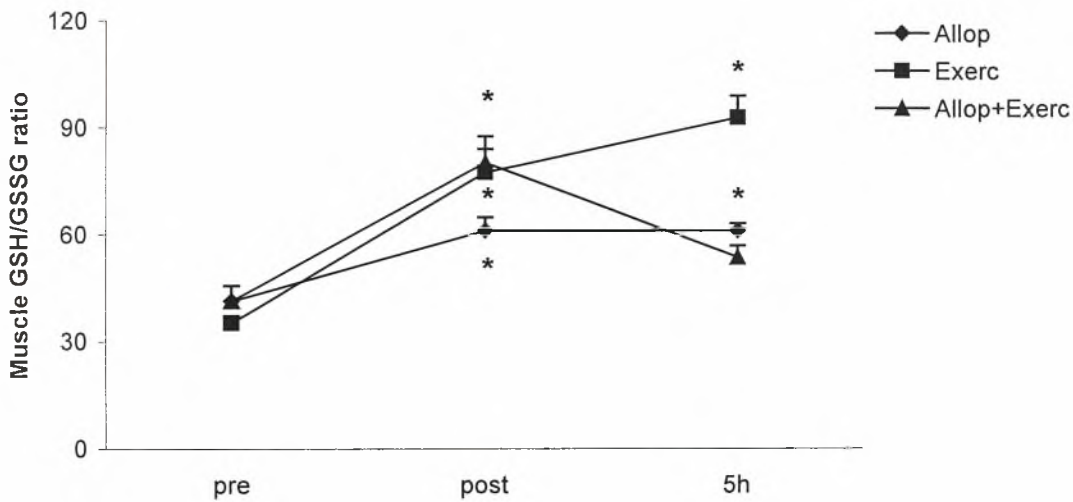
Βρέθηκε κύρια επίδραση του συνδυασμού παρέμβασης και χρόνου. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της GSSG 5 ώρες μετά την άσκηση στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε DMSO.



Διάγραμμα 5. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης στο γαστροκνήμιο μυ.

3.6. ΛΟΓΟΣ GSH/GSSG

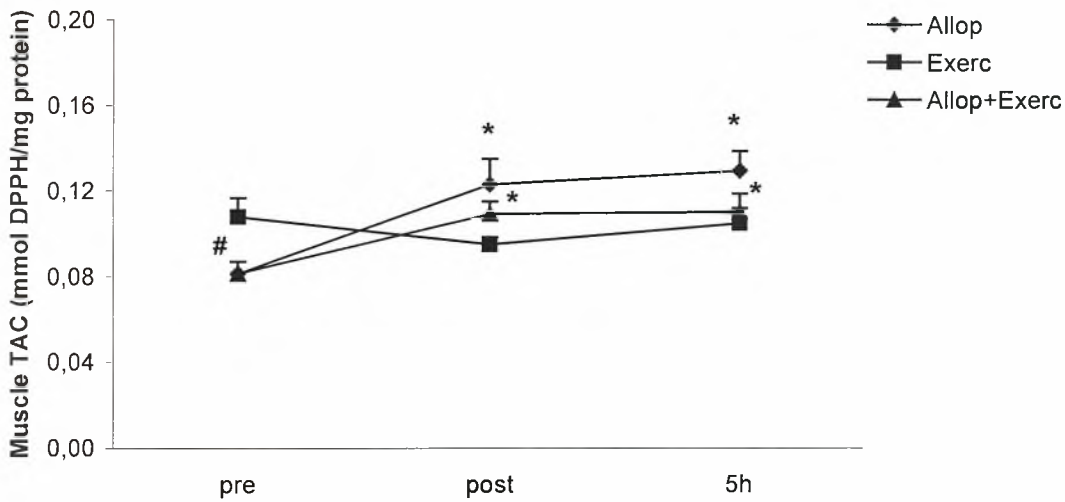
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου και του συνδυασμού τους. Η GSSG αυξήθηκε μετά την άσκηση τόσο στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη όσο και σε εκείνους που χορηγήθηκε DMSO. Επίσης, ο λόγος αυξήθηκε 2.5 και 7.5 ώρες μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης καθώς και 5 ώρες μετά την άσκηση.



Διάγραμμα 6. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο λόγο GSH/GSSG στο γαστροκνήμιο μυ. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή pre στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$).

3.7. Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα

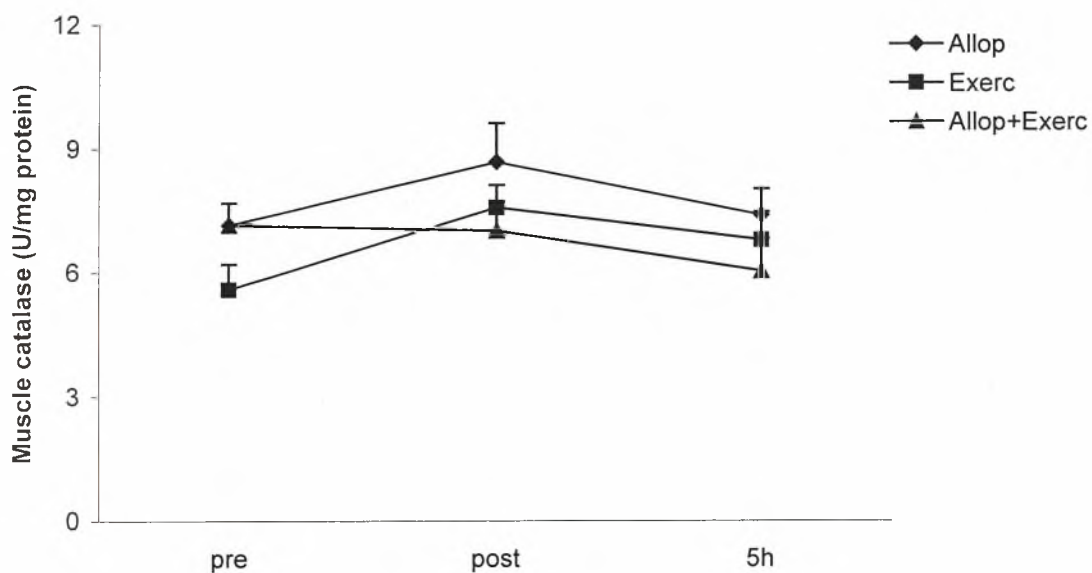
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και του συνδυασμού παρέμβασης και χρόνου. Στην ηρεμία η TAC μειώθηκε μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Η TAC αυξήθηκε 2.5 και 7.5 ώρες μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης καθώς και αμέσως μετά και 5 ώρες μετά την άσκηση στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη.



Διάγραμμα 7. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στο γαστροκνήμιο μυ. * Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή pre στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$). # Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και την αλοπουρινόλη κατά την ηρεμία ($P < 0.05$).

3.8. Καταλάση

Δεν παρατηρήθηκε καμία επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου και του συνδυασμού τους.



Διάγραμμα 8. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στη δραστικότητα της καταλάσης στο γαστροκνήμιο μυ.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε ότι η εξαντλητική αερόβια άσκηση οδήγησε σε αύξηση του οξειδωτικού στρες στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων. Το αποτέλεσμα αυτό φάνηκε από την αύξηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των TBARS 5 ώρες μετά την άσκηση. Επιπλέον, η συγκέντρωση της GSH αυξήθηκε αμέσως μετά την άσκηση, ενώ η συγκέντρωση της GSSG μειώθηκε 5 ώρες μετά την άσκηση. Η άσκηση δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στη δραστικότητα της καταλάσης και στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Η χορήγηση αλοπουρινόλης όπως αναμενόταν μείωσε την δραστικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης ενώ οδήγησε σε αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του μυός. Επιπλέον μετά την χορήγηση αλοπουρινόλης αυξήθηκε τόσο η GSH όσο και ο λόγος GSH/GSSG.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι η άσκηση επάγει το οξειδωτικό στρες όπως φάνηκε από την αύξηση των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2006). Σε αντίθεση με την αναερόβια άσκηση, η ένταση της αερόβιας άσκησης πρέπει να είναι υψηλή ώστε να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες (Leaf et al., 1997; Lovlin et al., 1987). Η αερόβια άσκηση συνοδεύεται από αυξημένη πρόσληψη οξυγόνου η οποία πιθανόν αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την αερόβια άσκηση σχετίζεται με την διαφυγή ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα (Groussard et al., 2003). Η οξειδάση της ξανθίνης σε συνδυασμό με τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος και κατεχολαμινών εμπλέκονται ουσιαστικά στην αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση (Kayatekin et al., 2002).

Σε εργασίες στον άνθρωπο παρατηρήθηκε αύξηση της MDA μετά από μαραθώνιο (Gomez-Cabrera et al., 2006) ενώ η κρεατινική κινάση αυξήθηκε μετά από ποδηλασία υψηλού επιπέδου (Gomez-Cabrera et al., 2003). Μετά από αερόβια άσκηση (800m κολύμβηση) στον άνθρωπο παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της καταλάσης και μείωση της συγκέντρωσης της GSH (Inal et al., 2001), ενώ μετά από τρέξιμο 21km παρατηρήθηκε αύξηση τόσο στη συγκέντρωση της MDA όσο και της κρεατινικής κινάσης στο αίμα (Dawson et al., 2002). Μετά από άσκηση σε δαπεδοεργόμετρο αυξήθηκε η συγκέντρωση των TBARS, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, η καταλάση και η GSH στο αίμα (Vider et al., 2001). Η αύξηση της λιπιδικής υπεροξειδωσης μέσω του μετρούμενου δείκτη TBARS αλλά και της πρωτεϊνικής οξειδωσης μέσω της αύξησης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία επιβεβαιώνοντας τα ανάλογα ευρήματα προηγούμενων εργασιών.

Στην παρούσα εργασία η αλοπουρινόλη είχε την αναμενόμενη δράση όσον αφορά την οξειδάση της ξανθίνης όπως φάνηκε από τη μείωση που προκάλεσε στη δραστηριότητά της. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε πλήρη συμφωνία με τα δεδομένα προηγούμενων εργασιών (Gomez-Cabrera et al., 2005; Gomez-Cabrera et al. 2006; Koyama et al., 1999). Επιπλέον, στις ίδιες εργασίες έχει παρατηρηθεί ο προστατευτικός ρόλος της αλοπουρινόλης σχετικά με το προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες.

Σε μία μελέτη όπου ο τύπος της αερόβιας άσκησης ήταν το τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο χρησιμοποιήθηκαν άλογα, τα οποία υποβλήθηκαν σε άσκηση συνολικού χρόνου 23min. Επιπλέον, τους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη 12h και 2h πριν την άσκηση. Σε δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν 5min και 20min μετά το τέλος της άσκησης δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στη συγκέντρωση της GSH στα άλογα που τους είχε χορηγηθεί αλοπουρινόλη ενώ στα ίδια ζώα παρατηρήθηκε μείωση στα επίπεδα της GSSG (Mills et al. 1997). Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν από τα ευρήματα της παρούσας εργασίας καθώς η αλοπουρινόλη βρέθηκε να αυξάνει τη συγκέντρωση της GSH και να διατηρεί σταθερά τα επίπεδα της GSSG.

Μετά από εξαντλητική άσκηση διάρκειας 40min σε δαπεδοεργόμετρο δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στη συγκέντρωση των TBARS αμέσως μετά την άσκηση στο ήπαρ επιμύων (Koyama et al., 1999). Ωστόσο, η συγκέντρωσή τους αυξήθηκε 3h μετά την άσκηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και η αύξηση αυτή ήταν πολύ μικρότερη μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης (Koyama et al., 1999). Σε άλλη εργασία μελετήθηκε η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στην ποδηλασία στον άνθρωπο (Gomez-Cabrera et al., 2005). Μετά την άσκηση παρατηρήθηκε αύξηση της MDA στο αίμα ενώ η αύξηση αυτή μετριάστηκε μετά από χορήγηση αλοπουρινόλης. Επίσης, η αλοπουρινόλη μείωσε τη μυϊκή καταστροφή που προκλήθηκε από την άσκηση, όπως φάνηκε από τις υψηλές συγκεντρώσεις της κρεατινικής κινάσης και της αμινοτρανσφεράσης του ασπαραγινικού οξέος (Gomez-Cabrera et al., 2005).

Ακόμα μία εργασία μελέτησε την επίδραση της αλοπουρινόλης στον άνθρωπο και συγκεκριμένα μετά από μαραθώνιο (Gomez-Cabrera et al., 2006). Παρατηρήθηκε ότι η λιπιδική υπεροξειδωση μετά από την αερόβια υψηλής διάρκειας και έντασης

άσκηση, αυξήθηκε όπως φάνηκε από την αύξηση στις MDA στο πλάσμα. Αντίθετα, η αλοπουρινόλη δεν επέτρεψε την αύξηση της MDA μετά την άσκηση καθώς τη διατήρησε στα επίπεδα που βρισκόταν πριν από αυτή (Gomez-Cabrera et al., 2006). Επιπλέον, σε εργασία της ίδιας ερευνητικής ομάδας σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (COPD) παρατηρήθηκε εκ νέου ότι η αλοπουρινόλη προστατεύει τους ιστούς από το προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες (Vina et al., 2000). Μετά από άσκηση σε κυκλοεργόμετρο βρέθηκε ότι η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης στο αίμα αυξήθηκε 3min μετά την άσκηση και η αλοπουρινόλη ανέστειλε την αύξηση αυτή. Καμία μεταβολή δε βρέθηκε στον ίδιο δείκτη 60min μετά την άσκηση (Vina et al., 2000).

Όπως φαίνεται από την προηγούμενη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, η άσκηση αυξάνει το οξειδωτικό στρες. Το συμπέρασμα αυτό βγήκε και από τα ευρήματα της παρούσας έρευνας. Ωστόσο, το γεγονός ότι η αλοπουρινόλη έχει προστατευτικό ρόλο απέναντι στο επαγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες δε φαίνεται να επιβεβαιώνεται. Αντίθετα, η αλοπουρινόλη μέσω της μείωσης της TAC φαίνεται να αυξάνει το οξειδωτικό στρες χωρίς την παρουσία άσκησης.

Ο δείκτης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC) αναφέρεται σε ένα σύνολο μορίων, τα οποία έχοντας αντιοξειδωτική δράση, αντιμετωπίζουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών που προκαλείται από την άσκηση. Έχει παρατηρηθεί ότι το ουρικό οξύ συμμετέχει κατά 58% στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Wayner et al. 1987). Είναι επίσης γνωστό ότι η αλοπουρινόλη δρα ως αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης μειώνοντας τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος στο μυ. Τα στοιχεία αυτά σε συνδυασμό με τη μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας λόγω της χορήγησης αλοπουρινόλης αλλά και της υψηλής δόσης της αλοπουρινόλης που χορηγήθηκε ίσως αποτελούν μία αιτία εξαιτίας της οποίας η αλοπουρινόλη προκαλεί οξειδωτικό στρες.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

5.1. Πρωτόκολα δεικτών οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν

Οξειδάση της ξανθίνης

Η δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Prajda & Weber (1975). Είκοσι μL ομογενοποιημένου μυός προστέθηκαν σε $430\mu\text{L}$ 33mM ρυθμιστικού διαλύματος (pH 7.5) και $50\mu\text{L}$ ξανθίνης 1.7mM και η αντίδραση διακόπηκε προσθέτοντας $50\mu\text{L}$ 100% TCA. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα $10,000g$ για 15 min και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 293nm . Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε, ωστόσο το TCA προστέθηκε αφού το δείγμα επωάστηκε για 20min στους 37°C . Η ίδια φυγοκέντρηση ακολούθησε και η απορρόφηση του δείγματος μετρήθηκε στα 293nm . Η δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης υπολογίστηκε αφαιρώντας την δραστηριότητα του πρώτου δείγματος από το δεύτερο.

Υπολογισμοί

Δραστηριότητα οξειδάσης της ξανθίνης (U/mL) = (Abs sample 20 min - Abs sample 0 min / 20 / 12.2) * 27,5 * 3 (U is $\mu\text{mol}/\text{min}$).

Όπου 12.2 (mmol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του ουρικού οξέος στα 293nm , $27,5$ είναι ο συντελεστής αραίωσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο στην κυψελίδα ($550\mu\text{L}$) με τον όγκο του ιστού ($20\mu\text{L}$) ($550 / 20 = 27,5$). Πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν $1/3$ και διαιρούμε με 20 για τον υπολογισμό της δραστηριότητας του ενζύμου σε ένα λεπτό. Η μεταβολή της απορρόφησης του τυφλού είναι μηδενική κι έτσι δε χρειάζεται να μετρηθεί.

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

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

Δραστηριότητα οξειδάσης της ξανθίνης /Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης

Δραστικότητα οξειδάσης της ξανθίνης (U/mg total prot.)

Προετοιμασία του ιστού για τον υπολογισμό της ανηγμένης και της οξειδωμένης γλουταθειόνης.

100μL ιστού προστέθηκαν σε 100μL TCA 5 % και φυγοκεντρήθηκαν στα 28620g για 5 λεπτά στους 5°C. Το υπερκείμενο συλλέχτηκε και διατηρήθηκε σε δύο σωληνάρια erpendorf (100μL για την ανηγμένη και 50μL για την οξειδωμένη γλουταθειόνη).

Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)

Η GSH υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Reddy et al. (2004). 20μL ιστού (αραιωμένου 1/2) αναμίχθηκαν με 660μL ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 8.0) και 330μL DTNB. Τα δείγματα επώαστηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 412nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση της GSH (mmol/L or μmol/mL) = (Abs_{sample} - Abs_{blank} / 13.6) ' 3 ' 2 ' 50.5.

Όπου 50.5 είναι ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο στην κυψελίδα (1010μL) με τον όγκο του ιστού (20μL) (1010 / 20 = 50.5), πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραιώση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν 1/3 και πολλαπλασιάζουμε με 2 λαμβάνοντας υπόψη την 1/2 αραιώση του δείγματος κατά τη μέτρηση. Το 13.6 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DTNB.

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

GSH/Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης

Συγκέντρωση GSH (μmol/mg total prot.) = μmol/mL / mg/mL total protein

Οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG)

Η GSSG υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Tietze (1969). Σε πενήντα μL ιστού ρυθμίστηκε το pH στο 7.0–7.5 με NaOH. Ένα μL από το 2-vinyl pyridine προστέθηκε και τα δείγματα επώαστηκαν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Πέντε μL ιστού (αραιωμένου 1/2) αναμίχθηκαν με 600μL ρυθμιστικού διαλύματος 143mM (pH 7.5), 100μl NADPH 3mM, 100μL DTNB 10mM και 194μL

απιονισμένο νερό. Τα δείγματα επωάστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την προσθήκη 1μL αναγωγάσης της γλουταθειόνης υπολογίστηκε η μεταβολή της απορρόφησης στα 412nm για 70 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση της GSH (mmol/L or μmol/mL) = $[(\text{Abs}_{\text{sample}} - \Delta\text{A}_{\text{blank}}) \cdot 0,75] / [\Delta\text{A}_{\text{standard}} - \Delta\text{A}_{\text{blank}}] \cdot 3 \cdot 2 \cdot 200 \cdot 0,9] / 2/1000$.

Όπου 200 είναι ο συντελεστής αραίωσης που προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο στην κυψελίδα (1000μL) με τον όγκο του ιστού (5μL) ($1000 / 5 = 200$), πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν 1/3, πολλαπλασιάζουμε με 2 λαμβάνοντας υπόψη την 1/2 αραίωση του δείγματος κατά τη μέτρηση, πολλαπλασιάζουμε με 0.9 λαμβάνοντας υπόψη την αραίωση από την προσθήκη 5μL NaOH για τη διόρθωση του pH (συν το 1μL του 2-vinyl pyridine. Διαιρούμε με 2 για να λάβουμε υπόψη τη στοιχειομετρία της αντίδρασης 2 GSHθ 1 GSSG) και τέλος διαιρούμε με 1000 να μετατρέψουμε τα μmol σε mmol. Το 0.75 είναι η συγκέντρωση του standard διαλύματος της GSSG.

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

GSSG/Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης

Συγκέντρωση GSSG (μmol/mg total prot.) = $\mu\text{mol/mL} / \text{mg/mL total protein}$

Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

Για τα TBARS, ο υπολογισμός έγινε σύμφωνα με τους Keles et al. (2001). Πενήντα μL μυός αραιωμένου (1/2) αναμίχθηκαν με 500μL TCA 35% και 500μL Tris-HCl 200mM (pH 7.4) και επωάστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Χίλια μL διαλύματος Na₂SO₄ 2M και 55mM θειοβαρβιτουρικού οξέος προστέθηκαν και τα δείγματα επωάστηκαν σε υδατόλουτρο στους 95°C για 45 λεπτά. Ακολούθως, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στον πάγο για 5 λεπτά και προστέθηκαν 1000μL από TCA 70%. Στην συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000g για 3 λεπτά και η απορρόφηση του υπερκείμενου μετρήθηκε στα 530nm.

Υπολογισμοί

$$\text{Συγκέντρωση των TBARS } (\mu\text{mol/L}) = (\text{Abs δείγματος} - \text{Abs τυφλού}) / 0.156 \cdot 31 \cdot 3 \cdot 2$$

Όπου το 31 είναι ο συντελεστής αραίωσης, που προέρχεται από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3100μL) με τον όγκο του πλάσματος (100μL) (3100 / 100 = 31). Το 0.156 προέρχεται από το συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA που είναι 156000 (mol/L) διαιρούμενου με 10⁻⁶ με σκοπό να μετατραπούν τα mol/L το μmol/L. Πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν 1/3 και με 2 λαμβάνοντας υπόψη την 1/2 αραίωση του δείγματος κατά τη μέτρηση.

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

TBARS/Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης

$$\text{Συγκέντρωση TBARS (nmol/mg total prot.)} = \text{TBARS conc. nmol/mL} / \text{total protein conc. mg/mL}$$

Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Patsoukis et al. (2004). Πενήντα μL TCA 20% προστέθηκαν σε 50μL ιστού (αραιωμένου 1/2), το μίγμα επώαστηκε στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στα 15,000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και 500μL DNPΗ 10 mM (διαλυμένης σε 2.5N HCL) για το δείγμα ή 500μL 2.5 N HCL για το τυφλό, προστέθηκαν στο ίζημα. Τα δείγματα επώαστηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανακίνηση κάθε 15 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, προστέθηκαν 1000μL TCA 10% , και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, προστέθηκαν 1000μL μίγματος αιθανόλης και οξικού αιθυλεστέρα (1/1) και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000g για 5 λεπτά στους 4°C. Το βήμα αυτό της πλύσης επαναλήφθηκε δύο ακόμη φορές. Το υπερκείμενο κατόπιν απομακρύνθηκε, προστέθηκαν 1000μL ουρίας 5M

(pH 2.3), τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C για 15 λεπτά, φυγοκεντρήθηκαν στα 15,000g για 5 λεπτά στους 4°C και καταγράφηκε η απορρόφηση στα 375nm.

Υπολογισμοί

Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mL) = $A_{\text{δείματος}} - A_{\text{τυφλού}} / 0.022 \cdot 1000/50 \cdot 3 \cdot 2$.

Ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH είναι 22 mM · cm⁻¹. Το 1000/50 είναι ο συντελεστής αραίωσης (1000μL στην κυψελίδα /50μL δείματος). Πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραίωση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν 1/3 και με 2 λαμβάνοντας υπόψη την 1/2 αραίωση του δείματος κατά τη μέτρηση.

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

Συγκέντρωση πρ. καρβονυλίων/Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης

Συγκέντρωση πρ. καρβονυλίων (nmol/mg total prot.) = $\text{carbonyl conc. nmol/mL} / \text{total protein conc. mg/mL}$

Καταλάση

Η δραστηκότητα της καταλάσης υπολογίστηκε σύμφωνα με τον Aebi (1984).

Συνοπτικά, 40μL ιστού (αραιωμένου 1/2) προστέθηκαν σε 2955μL ρυθμιστικού διαλύματος 67mM (pH 7.4) και τα δείγματα επωάστηκαν στους 37°C για 10 λεπτά. Πέντε μL υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% προστέθηκαν και η μεταβολή της απορρόφησης στα 240nm μετρήθηκε για 130 δευτερόλεπτα.

Υπολογισμοί

Δραστηκότητα της καταλάσης (U/mg total protein) = $(\Delta A_{\text{sample per min}} / 40) \cdot (75 \cdot 1000 \cdot 3 \cdot 2) / \text{Conc. Protein (mg/mL)}$.

Όπου, το 40 (mol/L) είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του H₂O₂ πολλαπλασιαζόμενος με 1000 για τη μετατροπή του σε μmol/mL. Το 75 είναι ο παράγοντας αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του κυλίνδρου (3000μL) με τον όγκο του αιμολύματος (40μL) (3000 / 40 = 75).

Πολλαπλασιάζουμε με 3 διότι η αραιώση του ιστού κατά την ομογενοποίησή του ήταν 1/3 και με 2 λαμβάνοντας υπόψη την 1/2 αραιώση του δείγματος κατά τη μέτρηση.

Η απορρόφηση του φφλού είναι μηδενική και γι' αυτό δε χρειάζεται να μετρηθεί.

Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC)

Ο υπολογισμός της TAC βασίστηκε στη μέθοδο των Janaszewska and Bartosz (2002). Σαράντα μL ιστού (αραιωμένα 1/10) προστέθηκαν σε 460 μL ρυθμιστικού διαλύματος 10mM (pH 7.4) και 500 μL της ελεύθερης ρίζας DPPH και τα δείγματα επώαστηκαν στο σκοτάδι για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 20,000g και καταγράφηκε η απορρόφησή τους 520nm.

Υπολογισμοί

$\mu\text{mol DPPH που απομακρύνθηκαν} / \text{mL ιστού} = [(\% \text{ Abs μείωση} / 100) \cdot 50 \cdot 25 \cdot 3 \cdot 10] / 1000$

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

β) Πολλαπλασιάζουμε με το 50 διότι η συγκέντρωση του DPPH στην κυψελίδα είναι 50 $\mu\text{mol/L}$ της κυψελίδας.

γ) Πολλαπλασιάζουμε με το 25 διότι η αραιώση του πλάσματος στην κυψελίδα είναι 25-πλάσια (1000 μL στην κυψελίδα / 40 μL πλάσματος του δείγματος στην κυψελίδα = 25).

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

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

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

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

mmol DPPH/Συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης

$\text{mmol DPPH (mmol/mg total prot.)} = \text{mmol DPPH nmol/mL} / \text{total protein conc. mg/mL}$

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
2. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25 (2): 218-24.
3. Ames BN, Catchcart R, Schwiers E, et al. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant and radical caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6858-62.
4. Antunes F, Derick H, Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 2002; 33 (9): 1260-7.
5. Brantley RE, Smerdon SJ, Wilkinson AJ, et al. The mechanism of autoxidation of myoglobin. *J Biol Chem* 1993; 268 (10): 6995-7010.
6. Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Leeuwenburgh C. *Free Rad. Biol. Med.* 2000, 29 (suppl. 1), 531.
7. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2002; 30 (2): 280-5.
8. Das KC, Lewis-Molock Y, White CW. Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 713-26.
9. Dawson B, Henry GJ, Goodman C, et al. Effect of vitamin C and E supplementation on biochemical and ultrastructural indices of muscle damage after 21 km run. *Int J Sports Med* 2002;41(6):872-84.
10. Dawson B, Henry GJ, Goodman C, et al. Effect of vitamin C and E supplementation on biochemical and ultrastructural indices of muscle damage after 21 km run. *Int J Sports Med* 2002; 29(8):1036-9.
11. Di Meo S, Venditti P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 2001; 10: 125-40.
12. Duarte JA, Carvalho F, Bastos ML, Soares JM, Appell HJ. Do invading leucocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1994; 68: 48-53.

13. Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72 (S): 647-52.
14. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*. 2006;36(4):327-58.
15. Fuchs J, Weber S, Podda M, et al. HPLC analysis of vitamin E isoforms in human epidermis: correlation with minimal erythema dose and free radical scavenging activity. *Free Radic Biol Med* 2003; 34 (3): 330-6.
16. Giles GI, Jacob C. Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem* 2002; 383: 375-88.
17. Goldfarb AH. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. *Can J Appl Physiol* 1999; 24 (3): 249-66.
18. Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL, Vina J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 567:113-120; 2005.
19. Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL, Vina J. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 567:113-120; 2005.
20. Gomez-Cabrera MC, Martínez A, Santangelo G, Pallardo FV, Sastre J Vina J. Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr* 96 Suppl 1:S31-33; 2006.
21. Gomez-Cabrera MC, Martínez A, Santangelo G, Pallardo FV, Sastre J, Vina J. Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr* 96 Suppl 1:S31-33; 2006.
22. Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV, Sastre J, Vina J, Garcia-del-Moral L. Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA* 289:2503-2504; 2003.
23. Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV, Sastre J, Vina J, Garcia-del-Moral L. Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA* 289:2503-2504; 2003.
24. Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20(2): 55-9.

25. Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003;89(1):14-20.
26. Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, et al. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 2003;89(1):14-20.
27. Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications.
28. Hansford R, Hogue BA and Mildaziene, V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *Bioenerg Biomembr.* 1997; 29: 89-95.
29. Hellsten Y, Sjodin B, Richter EA, et al. Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensity intermittent exercise. *Am J Physiol* 1998; 274: E600-6.
30. Inal M, Akyuz F, Turgut A, et al. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33(4):564-7.
31. Inal M, Akyuz F, Turgut A, et al. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33(4):564-7.
32. Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest.* 2002 62: 231 236.
33. Jenkins RR, Goldfarb A. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. *Med Sci Sport Exerc* 1993; 25 (2): 210-2.
34. Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156 70.
35. Ji LL. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222:283-292.
36. Kayatekin BM, Gonenc S, Acikgoz O, et al. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur J Appl Physiol* 2002;87(2):141-4.

37. Kayatekin BM, Gonenc S, Acikgoz O, et al. Effects of sprint exercise on oxidative stress in skeletal muscle and liver. *Eur J Appl Physiol* 2002;87(2):141-4.
38. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akcay F. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci.* 2001; 28: 141-143.
39. Klebanoff SJ. Phagocytic cells: products of oxygen metabolism. In: Gallin, J. I.; Goldstein, I. M.; Snyderman, R., eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates.* New York: Raven; 1988:391– 444.
40. Koyama K, Kaya M, Ishigaki T, Tsujita J, Hori S, Seino T, Kasugai A. Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80:28-33; 1999.
41. Koyama K, Kaya M, Ishigaki T, Tsujita J, Hori S, Seino T, Kasugai A. Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80:28-33; 1999.
42. Leaf DA, Kleinman MT, Hamilton M, and Barstow TJ. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med. Sci. Sports Exerc* 1997;29(8):1036-9.
43. Leaf, DA, Kleinman MT, Hamilton M, and Barstow TJ. The effect of exercise intensity on lipid peroxidation. *Med. Sci. Sports Exerc.*1997;29(8):1036-9.
44. Lee DK, Wang DP. Formulation development of allopurinol suppositories and injectables. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999; 25: 1205-1208.
45. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem.* 2001 Jun;8(7): 829-38.
46. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (9): 790-6.
47. Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, et al. Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 396-411.
48. Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, and Belcastro AN. 1987. Are indices of free radical damage related to exercise intensity? *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 1987; 56(3):313-6.
49. Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, and Belcastro AN. Are indices of free radical damage related to exercise intensity? *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 1987; 56(3):313-6.

50. Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. *Acta Physiol Scand* 2001; 171: 233-9.
51. May JM, Qu Z, Whitesell RR, et al. Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med* 1996; 20 (4): 543-51.
52. McCarter RJM. In *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Eds, Sen C, Packer L, Hanninen O, Amsterdam, 2000, pp 797-830.
53. McCord, JM, and Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1968. 243: 5753-5760.
54. Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis, Y, Papassotiriou I, Kouretas D. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 39:1107-1113; 2007.
55. Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis, Y, Papassotiriou I, Kouretas D. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 39:1107-1113; 2007.
56. Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG., Koutedakis Y, Papassotiriou I, and Kouretas D. 2007. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 39: 1107-1113.
57. Mills PC, Smith NC, Harris RC, Harris P. Effect of allopurinol on the formation of reactive oxygen species during intense exercise in the horse. *Res Vet Sci* 62:11-16; 1997.
58. Mills PC, Smith NC, Harris RC, Harris P. Effect of allopurinol on the formation of reactive oxygen species during intense exercise in the horse. *Res Vet Sci* 62:11-16; 1997.
59. Moorhouse, PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, and Gutteridge JM. 1987. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett.* 213: 23-28.
60. Mylonas C, and Kouretas D. 1999. Lipid peroxidation and tissue damage. In *Vivo*. 13: 295-309.

61. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.* 2008;38(7):579-606.
62. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, and Kouretas D. 2006. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc.* 38: 1443-1450.
63. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc* 38:1443-1450; 2006.
64. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc* 38:1443-1450; 2006.
65. Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, et al. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol* 2003; 89: 100-7.
66. Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, McAnulty SR, McAnulty L, Swick NS, Utter AC, Vinci DM, Morrow JD. Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol.* 2003; 89: 100 107.
67. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett.* 2004; 357: 83-86.
68. Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 2000; 58: 1025-33.
69. Prajda N, Weber G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett.* 1975; 59: 245-249.
70. Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, and Ohno, H. (1996). Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol* 72: 189-194.

71. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (1-2): 69-74.
72. Reddy YN, Murthy SV, Krishna DR, Prabhakar MC. Role of free radicals and antioxidants in tuberculosis patients. *Indian J Tuberc.* 2004; 213-218.
73. Reid MB, Haack KE, Franchek KM, et al. Reactive oxygen in muscle I: intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. *J Appl Physiol* 1992; 73 (5): 1797-804.
74. Reid MB. Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 2001; 90: 724-31.
75. Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 653S-69S.
76. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 368-70.
77. Serbinova E, Reznick SKAZ, Packer L. Thiocetic acid protects against ischemia reperfusion injury in the isolated langendorff heart. *Free Radic Res Commun* 1992; 17: 49-58.
78. Sies, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press.
79. Sjodin B, Hellsten Westing Y, et al. Biochemical mechanism for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med* 1990; 10: 236-54.
80. St-Pierre J, Buckingham, JA, Roebuck SJ, and Brand MD. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 2002; 277: 44784-44790.
81. Thomas MJ. The role of free radicals and antioxidants. *Nutrition* 2000; 16 (7-8): 716 8.
82. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969 27: 502-522.
83. Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T, et al. Acute immune response in respect to exercise induced oxidative stress. *Pathophysiology* 2001;7(4):263-270.

84. Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T, et al. Acute immune response in respect to exercise induced oxidative stress. *Pathophysiology* 2001; 7(4):263-270.
85. Vina J, Gimeno A, Sastre J, Desco C, Asensi M, Pallardo FV, Cuesta A, Ferrero JA, Terada LS, and Repine JE. *IUBMB Life* 49: 539-544 (2000).
86. Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50:271-277; 2000.
87. Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 50:271-277; 2000.
88. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta*. 1987;924(3):408-19.
89. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta*. 1987;924(3):408-19.
90. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, et al. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 408-19.
91. Willcox JK, Catignani GL, Roberts LJ. Dietary flavonoids fail to suppress F2 isoprostane formation in-vivo. *Free Radic Biol Med* 2002; 34 (7): 795-9.
92. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29 (2): 358-62.

