

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗΣ
ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΜΗΛΟΝΙΚΗΣ ΔΙΑΛΔΕΥΔΗΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΕΠΙΜΥΩΝ

ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2009

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
Αριθ. Πρωτ. 494
Ημερομηνία 29-6-2009

ΤΜΗΜΑ

ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗΣ
ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΜΗΛΟΝΙΚΗΣ ΔΙΑΛΛΕΥΔΗΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΕΠΙΜΥΩΝ**

ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΗΣ

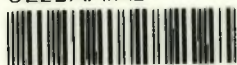
ΛΑΡΙΣΑ 2009



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

Αριθ. Εισ.: 7380/1
Ημερ. Εισ.: 05-10-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΔΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087187

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ

α. ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής



β. ΜΕΛΗ

Κυπάρος Αντώνιος, Διδάσκων ΠΔ.407/80

Στάγκος Δημήτριος, Διδάσκων ΠΔ.407/80



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας ζωικών οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Κουρέτα Δημήτριο για την ευκαιρία που μου έδωσε να διεκπεραιώσω τη διπλωματική μου εργασία καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με αυτή την ανάθεση.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το διδάσκοντα κ. Κυπάρο Αντώνιο για τις συμβουλές του κατά τη διάρκεια του εργαστηριακού πειράματος, τη συγγραφή και για την ευχάριστη συνεργασία.

Ευχαριστώ του υποψήφιο διδάκτορα κ. Βεσκούκη Αριστεΐδη για την υπομονή του και την πολύτιμη βοήθεια κατά την εκπόνηση του εργαστηριακού πειράματος και τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ δικαιωματικά το αφιερώνω στην οικογένειά μου. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για όλα όσα έχουν κάνει ώστε να μου δώσουν τη δυνατότητα στη γνώση. Ευχαριστώ.

| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ | ΣΕΛΙΔΑ |
|--|---------------|
| Περίληψη | 7 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 8 |
| 1.1. Ελεύθερες ρίζες | 8 |
| 1.2. Θετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών | 8 |
| 1.3. Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών | 9 |
| 1.4. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί | 10 |
| 1.5. Οξειδωτικό στρες | 14 |
| 1.6. Άσκηση και οξειδωτικό στρες | 14 |
| 1.6.1. Πηγές παραγωγής ROS κατά την άσκηση | 17 |
| 1.7. Αλοπουρινόλη και άσκηση | 19 |
| 1.8. Μηλονική Διαλδεύδη | 20 |
| 1.9. Αλβουμίνη | 21 |
| 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 25 |
| 2.1. Τρόπος χειρισμού και χαρακτηριστικά των επιμύων | 25 |
| 2.2. Χορήγηση αλοπουρινόλης | 25 |
| 2.3. Εξοικείωση επιμύων | 26 |
| 2.4. Πρωτόκολο κολύμβησης | 26 |
| 2.5. Θανάτωση των επιμύων, συλλογή και ομογενοποίηση των δειγμάτων | 27 |
| 2.6. Πρωτόκολα δεικτών που μελετήθηκαν | 27 |
| 2.7. Στατιστική ανάλυση | 27 |
| 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 28 |
| 3.1. Μηλονική Διαλδεύδη (MDA) | 28 |
| 3.1.1. MDA στον εγκέφαλο | 28 |
| 3.1.2. MDA στον πνεύμονα | 29 |
| 3.1.3. MDA στον σπλήνα | 30 |
| 3.2. Αλβουμίνη | 31 |
| 3.2.1. Αλβουμίνη στον εγκέφαλο | 31 |
| 3.2.2. Αλβουμίνη στον πνεύμονα | 32 |

| | |
|--|----|
| 3.2.3. Αλβουμίνη στον σπλήνα | 33 |
| 4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 34 |
| 5.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ | 37 |
| 5.1. Πρωτόκολα δεικτών που μελετήθηκαν | 37 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 46 |

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

| | |
|--|----|
| Εικόνα 1: Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών | 9 |
| Εικόνα 2: Η χημική δομή της γλουταθειόνης (GSH). | 13 |
| Εικόνα 3: Μονοπάτι της ανασταλτικής δράσης της αλοπουρινόλης. | 19 |
| Εικόνα 4. Κύριες περιοχές στο μόριο της αλβουμίνης που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική της δράση. | 23 |

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

| | |
|--|----|
| Σχήμα 1: Χημική δομής της MDA | 21 |
| Σχήμα 2: Αντίδραση του TBA με την MDA | 23 |

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

| | |
|--|----|
| Διάγραμμα 1. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεύδης στον εγκέφαλο. | 28 |
| Διάγραμμα 2. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεύδης στον πνεύμονα. | 29 |
| Διάγραμμα 3. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεύδης στον σπλήνα. | 30 |
| Διάγραμμα 4. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον εγκέφαλο. | 31 |
| Διάγραμμα 5. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον πνεύμονα. | 32 |
| Διάγραμμα 6. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον σπλήνα. | 33 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Έχει αποδειχθεί ότι η εξαντλητική αερόβια άσκηση αυξάνει σημαντικά την παραγωγή ελευθέρων ριζών, οι οποίες σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες, δηλαδή οξείδωση των μακρομορίων όπως του DNA, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών των ιστών. Η αλοπουρινόλη είναι ένα δομικό ανάλογο της υποξανθίνης και ισχυρός αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης, του σημαντικότερου ίσως ενζύμου παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση. Ωστόσο, η αλοπουρινόλη αναστέλλει και την παραγωγή ουρικού οξέος, ενός ισχυρού αντιοξειδωτικού μορίου με αποτέλεσμα να μειώνεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού. Η αλβουμίνη είναι μια πρωτεΐνη, η οποία μεταξύ άλλων χαρακτηριστικών της παρουσιάζει επίσης και αντιοξειδωτικές ιδιότητες εξαιτίας των ομάδωνθειόλης που υπάρχουν στο μόριό της. Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά την εξαντλητική άσκηση θα μπορούσαν να προκαλέσουν αλλαγές στην δομή της αλβουμίνης και κατά συνέπεια να μειώσουν την ικανότητά της να δεσμεύει τις ελεύθερες ρίζες. Η μηλονική διαλδεϋδη (MDA) είναι προϊόν καταβολισμού των πολυακόρεστων λιπιδίων και αποτελεί έναν από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους δείκτες λιπιδικής υπεροξειδωσης. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξετάσει την επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της MDA και της αλβουμίνης στον εγκέφαλο, τον πνεύμονα και τον σπλήνα επιμύων. Βρέθηκε ότι η άσκηση αύξησε το οξειδωτικό στρες στον πνεύμονα και τον σπλήνα των επιμύων, όπως φάνηκε από την αύξηση της συγκέντρωσης της MDA σε αυτούς τους ιστούς. Ανάλογα αποτελέσματα είχε και η αλοπουρινόλη, η οποία αύξησε την MDA στον εγκέφαλο και τον πνεύμονα των επιμύων. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης δεν επηρεάστηκε από την άσκηση σε κανέναν ιστό, ενώ μειώθηκε στον εγκέφαλο και αυξήθηκε στον πνεύμονα μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο η άσκηση όσο και η αλοπουρινόλη αύξησαν το οξειδωτικό στρες στους ιστούς των επιμύων που μελετήθηκαν. Πιθανολογείται ότι παρόλο που το οξειδωτικό στρες αυξήθηκε κατά την άσκηση, η αύξηση αυτή δεν ήταν σε τέτοιο βαθμό ώστε να ενεργοποιηθεί ο μηχανισμός της αντιοξειδωτικής δράσης της αλβουμίνης.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

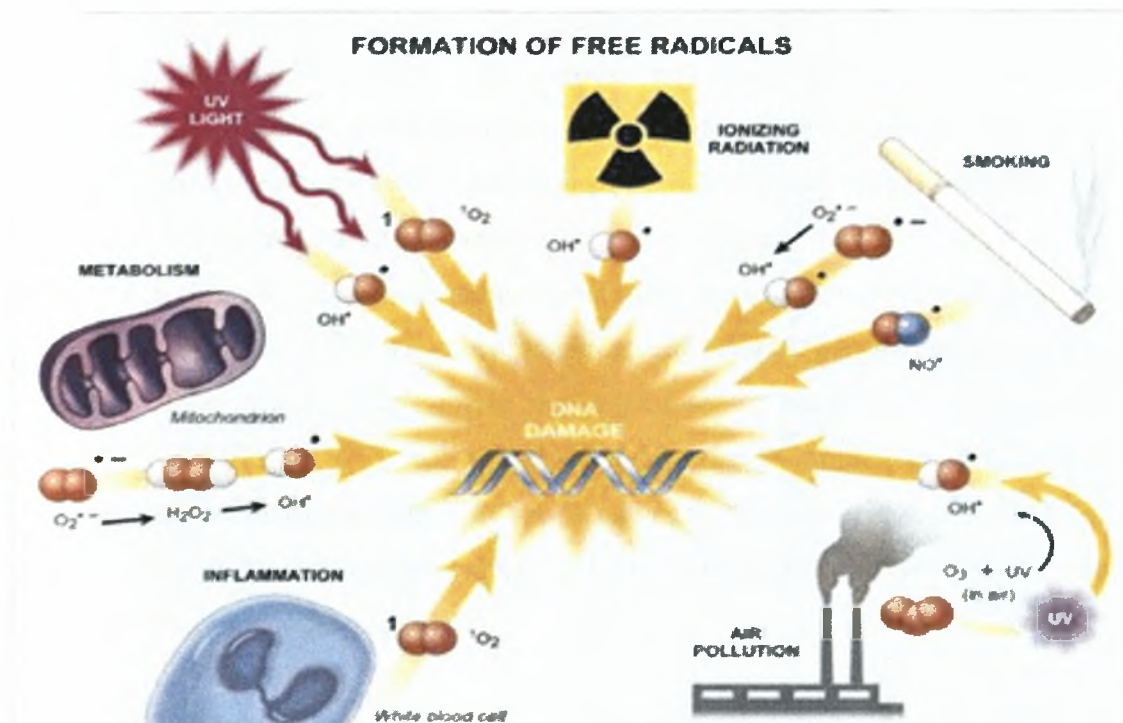
1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στιβάδα (Jenkins 1988). Είναι ιδιαίτερα ασταθή μόρια, πολύ δραστικά, με μικρό χρόνο ζωής και ικανά για ανεξάρτητη ύπαρξη. Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο H με ένα πρωτόνιο κι ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να αντιδρούν μεταξύ τους, αλλά και με μεγάλο αριθμό χημικών μορίων σχηματίζοντας νέες ελεύθερες ρίζες (Cooper et al., 2002).

Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται *in vivo* προέρχονται από το οξυγόνο (reactive oxygen species, ROS). Ελεύθερες ρίζες με βάση το οξυγόνο είναι το O_2^- , OH^\cdot , RO^\cdot , ROO^\cdot και $ROOH$. Εκτός από τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), υπάρχουν και παράγωγα οξυγόνου που δεν είναι ρίζες αλλά είναι αρκετά δραστικά (υπεροξειδίο του υδρογόνου, H_2O_2 και υποχλωριώδες οξύ (HOCl) (Halliwell & Gutteridge 1998). Άλλες οικογένειες ελευθέρων ριζών είναι οι δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS), όπως το NO^\cdot , NO_2^\cdot , οι δραστικές μορφές θείου (reactive sulfur species, RSS) και οι δραστικές μορφές χλωρίου (reactive chlorine species, RCS).

1.2 ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Οι ελεύθερες ρίζες και ειδικότερα οι ROS συμμετέχουν στη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης (Jenkins 1988). Παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση των κυτταρικών σημάτων και στη βιογένεση των κυττάρων, διότι μπορούν να δράσουν σαν αγγελιοφόροι μηνυμάτων στα κύτταρα ή να τροποποιήσουν την οξειδοαναγωγική τους κατάσταση. Εμπλέκονται επίσης, στην ενζυμική ενεργοποίηση (Jenkins 1988), καθώς και στη μυϊκή σύσπαση (Linnane et al., 2002).



Εικόνα 1. Πηγες παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.3 ΑΡΝΗΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ

Οι ROS προκαλούν οξείδωση των πρωτεϊνών, η οποία συνοδεύεται από παραγωγή πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων (Levine 2002). Επίσης, οι ROS προκαλούν σπασίματα στις αλυσίδες του DNA (Jenkins 1988). Ως συνέπεια, προκαλούνται μεταλλάξεις, που μπορούν να οδηγήσουν στην καρκινογένεση και τη γήρανση (Radak et al., 1999). Προκαλούν απόπτωση των υγιών κυττάρων, φλεγμονή και τροποποίηση των κυτταρικών λειτουργιών δημιουργώντας κατά αυτόν τον τρόπο παθολογικές καταστάσεις όπως καταρράκτη, νόσο Alzheimer και νόσο Parkinson. Οι ROS είναι υπεύθυνες για την έναρξη της οξείδωσης των λιποπρωτεϊνών και των πολυακόρεστων ελεύθερων λιπαρών οξέων. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί το εναρκτήριο βήμα για την λιπιδική υπεροξείδωση, η οποία τελικά οδηγεί σε αθηροσκλήρυνση (Young & McEneny 2001).

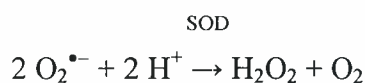
1.4 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

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. Τα αντιοξειδωτικά προέρχονται από ενζυμικές και μη-ενζυμικές πηγές. Στις ενζυμικές πηγές περιλαμβάνονται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) που εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες. Στις μη-ενζυμικές ανήκουν οι βιταμίνες A, C, E, τα φλαβονοειδή, οι θειόλες, το συνένζυμο Q10, το ουρικό οξύ και ιχνοστοιχεία που δρουν σαν ενζυμικοί συμπαράγοντες.

A) Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η SOD αποτελεί έναν από τους κύριους αμυντικούς μηχανισμούς κατά του οξειδωτικού στρες και ειδικότερα της ρίζας σουπεροξειδίου $O_2^{\bullet-}$. Η SOD αποτελεί μέρος μιας ομάδας ενζύμων, που καταλύουν την αντίδραση αυτοοξείδωσης του $O_2^{\bullet-}$ σχηματίζοντας H_2O_2 σύμφωνα με την αντίδραση:

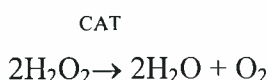


Σε όλα τα κύτταρα, κατά την ηρεμία το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου από τα μιτοχόνδρια $O_2^{\bullet-}$ ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD) ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers & Lennon 2000).

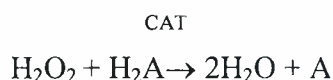
Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι παρούσα σε όλα τα κύτταρα και συγκεκριμένα εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα, κυτταρικές δομές που χρησιμοποιούν το οξυγόνο

προκειμένου να απομακρύνουν τοξικές ουσίες παράγοντας H_2O_2 (Antunes et al., 2002). Η καταλάση μετατρέπει το H_2O_2 σε H_2O και O_2 σύμφωνα με την αντίδραση:

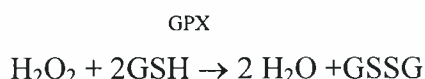


Η καταλάση μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιήσει το H_2O_2 για την αποτοξίνωση ορισμένων ουσιών διαμέσου μίας αντίδρασης υπεροξειδωσής με υποστρώματα, όπως η φαινόλη, η αλκοόλη (A) ή το φορμικό οξύ:



Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Η GPX είναι παρούσα στο κυτταρόπλασμα και στα μιτοχόνδρια και 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:



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 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 αναστέλλει την υπεροξειδωση των λιπιδίων.

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C 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).

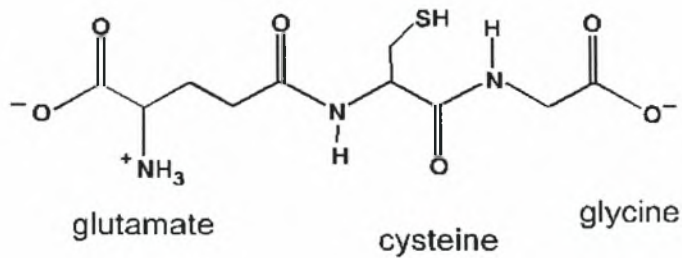
Φλαβονοειδή

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 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 Parkinson και Alzheimer. Οι μειωμένες ποσότητες GSH μπορούν να εξισοροποιηθούν με συμπληρώματα βιταμινών E και C, γεγονός που σημαίνει ότι τα παραπάνω αντιοξειδωτικά έχουν τους ίδιους στόχους (Serbinova et al., 1992).

glutathione (GSH)



Εικόνα 2: Η χημική δομή της γλουταθειόνης (GSH).

Συνένζυμο Q10

Το συνένζυμο Q10 (ουβικινόνη) παίρνει μέρος στις λειτουργίες της αναπνευστικής αλυσίδας, όπου παράγεται ATP. Ακόμη έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση ενώ παράλληλα είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση ενός άλλου πολύ ισχυρού λιπόφιλου αντιοξειδωτικού, της α-τοκοφερόλης.

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 οξειδωσή τους (Hellsten et al., 1998). Είναι υπεύθυνο για πάνω από το 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).

Σε φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών (Halliwell & Gutteridge, 1998). Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί ελέγχουν ή εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες προστατεύοντας τα βιομόρια από τις βλαβερές τους επιδράσεις. Ωστόσο, υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών ή μείωση του επιπέδου των αντιοξειδωτικών οδηγεί σε διαταραχή του ισοζυγίου ελευθέρων ριζών – αντιοξειδωτικών με δυσμενή για τον οργανισμό αποτελέσματα, μια κατάσταση γνωστή ως οξειδωτικό στρες.

1.5 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Οξειδωτικό στρες είναι η διατάραξη της ισορροπίας του ισοζυγίου προοξειδωτικών – αντιοξειδωτικών με αποτέλεσμα την πρόκληση σοβαρών κυτταρικών βλαβών (Sies, 1991).

Το οξειδωτικό στρες δημιουργείται από :

1. Μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών, πχ. μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη δραστικότητα ενζύμων της αντιοξειδωτικής άμυνας.
2. Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών ROS/RNS, πχ. έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα $O_2^{\bullet-}$ ή σε άλλες τοξίνες που δρουν ως ελεύθερες ρίζες (NO_2^{\bullet}) (Halliwell & Whiteman, 2004).

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε μοριακούς στόχους, όπως το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο μέσω των μηχανισμών της νέκρωσης και της απόπτωσης (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες:

Ενδογενείς πηγές οξειδωτικού στρες είναι 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), τα μιτοχόνδρια, τα λευκοκύτταρα, το κυτταρόπλασμα και οι βιολογικές μεμβράνες.

Εξωγενείς πηγές οξειδωτικού στρες είναι κάποιες ξενοβιοτικές ουσίες, παθογόνα βακτήρια και ιοί, το όζον (υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου), η ακτινοβολία, η διατροφή, το κάπνισμα και η εξαντλητική άσκηση. Διάφορες μελέτες έχουν δώσει σαφείς ενδείξεις ότι η εξαντλητική άσκηση αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών, οι οποίες οδηγούν σε κατάσταση οξειδωτικού στρες (Packer, 1997).

1.6 ΑΣΚΗΣΗ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Έχει αναφερθεί ότι η άσκηση αυξάνει την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Davies et al., 1982). Η παραγωγή 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). Όσο μεγαλύτερη είναι η ένταση της άσκησης τόσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή των ελευθέρων ριζών και κατά συνέπεια του οξειδωτικού στρες (Palmer et al., 2003).

Η οξειδωτική βλάβη στις πρωτεΐνες περιλαμβάνει την οξείδωση των αμινοξικών πλευρικών αλυσίδων και την κλασματοποίηση των πολυπεπτιδίων. Η οξείδωση των πρωτεϊνών αντιπροσωπεύει τις περισσότερες φορές τη διαμόρφωση των καρβονυλικών παραγώγων και μπορεί να οδηγήσει στη απώλεια της καταλυτικής ή δομικής λειτουργίας τους, καθιστώντας αυτές τις πρωτεΐνες ευαίσθητες στην πρωτεολυτική αποικοδόμηση (Levine & Stadman, 2001). Στα λιπίδια, τέτοιες οξειδωτικές αλλαγές έχουν ως αποτέλεσμα την λιπιδική υπεροξείδωση, η οποία περιλαμβάνει την αποικοδόμηση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των φωσφολιπιδίων. Όσον αφορά τα ειδικά τελικά προϊόντα της λιπιδικής υπεροξείδωσης έχουν γίνει πολλές μετρήσεις στα TBARS και στην MDA. Η MDA γενικά θεωρείται μια πιο ακριβής μέθοδος μέτρησης της λιπιδικής υπεροξείδωσης συγκριτικά με τα TBARS. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί στη μέθοδο μέτρησης της MDA, καθώς δεν παράγουν MDA όλα τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξείδωσης (Jenkins, 2004).

Πολλές μελέτες τα τελευταία 30 χρόνια έχουν δείξει ότι η άσκηση υψηλής έντασης και μεγάλης διάρκειας αυξάνει την παραγωγή των RONS (δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου), δημιουργώντας ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών με αποτέλεσμα την αύξηση του δείκτη οξειδωτικού στρες (Bloomer 2008). Σε πρόσφατη μελέτη σχετικά με το προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικού στρες αναφέρθηκε άμεση αύξηση της MDA σε άτομα που ασκήθηκαν μέχρι εξάντλησης, ενώ σε άτομα που ασκήθηκαν έως το 70% της μέγιστης κατανάλωσης οξυγόνου (VO_{2max}) δεν φάνηκε κάποια μεταβολή του δείκτη αυτού (Lovlin et al., 1987).

Μελέτες σε ζώα, έχουν δείξει ότι η εξαντλητική άσκηση μπορεί να αυξήσει σημαντικά τα επίπεδα οξείδωσης των μακρομορίων (Asami et al. 1998) εξαιτίας της διατήρησης της υψηλής έντασης άσκησης. Αντίθετα άσκηση χαμηλής έντασης έχει ως αποτέλεσμα να μην παρατηρείται καμία ή να έχει μικρή επίδραση στους δείκτες οξειδωτικού στρες (Asami et al. 1998).

Όσον αφορά την χρονική διάρκεια της άσκησης, μόλις μια μελέτη μέχρι σήμερα έχει συγκρίνει το οξειδωτικό στρες (μέτρηση πρωτεϊνικών καρβονυλίων) σε σχέση με διαφορετικής διάρκειας (χρόνο) άσκηση. Σ' αυτήν την μελέτη βρέθηκε ότι η πρωτεϊνική οξείδωση αυξήθηκε με την αύξηση της χρονικής διάρκειας διατηρώντας την ένταση της άσκησης σταθερή (Fisher-Wellman & Bloomer 2009).

Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη ότι η άσκηση πρέπει να είναι υψηλής έντασης για να υπάρξει συσσώρευση των RONS και ως επακόλουθο οξειδωτικό στρες. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα παραπάνω, σε μια πρόσφατη μελέτη παρατηρήθηκε αύξηση της MDA σε αναερόβιες συνθήκες άσκησης (άσκηση με αντιστάσεις) (Fisher-Wellman & Bloomer 2009).

Η αναερόβια άσκηση περιλαμβάνει μια ποικιλία δραστηριοτήτων (άλμα, ασκήσεις αντοχής, sprints). Οι μελέτες που εξετάζουν την παραγωγή των ελευθέρων ριζών ως αποτέλεσμα της αναερόβιας άσκησης δεν είναι τόσες πολλές σε αριθμό συγκρινόμενες με αυτές της αερόβιας άσκησης (Groussard et al., 2003). Μελέτες έχουν δείξει ότι και η αναερόβια άσκηση οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής των RONS (Groussard et al., 2003). Φαίνεται ότι όλες οι μορφές αναερόβιας άσκησης έχουν την δυνατότητα να αυξήσουν το οξειδωτικό στρες. Η αυξημένη παραγωγή των ελευθέρων ριζών στην αναερόβια άσκηση προέρχεται από ποικίλα μονοπάτια επιπρόσθετα της διαρροής των ηλεκτρονίων (McBride et al., 1998; Groussard et al., 2003; Sahlin et al., 1992). Η παραγωγή της οξειδάσης της ξανθίνης, η ισχαιμία επανααιμάτωση, η φαγοκυτταρική αναπνευστική «έκρηξη», η φλεγμονή, ο κυτταρικός τραυματισμός εμπλέκονται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της αναερόβιας άσκησης (Kayatekin et al., 2002; Sahlin et al., 1992).

Σε αθλητές του τριάθλου μετά από αγώνα παρατηρείται αύξηση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) (Palazzetti et al., 2003). Έχει επίσης βρεθεί ότι τα επίπεδα της καταλάσης είναι αυξημένα στο αίμα κολυμβητών των 800 μέτρων (Inal et al. 2001). Ο Alessio et al. (1988) εξέτασε την υπεροξειδωση των λιπιδίων στον σκελετικό μυ επιμύων εφαρμόζοντας sprint ενός λεπτού με ταχύτητα 45m/min. Οι τιμές των TBARS ήταν αυξημένες συγκρινόμενες με αυτές των επιμύων σε κατάσταση ηρεμίας.

Ωστόσο υπάρχουν μελέτες που δεν συμφωνούν με την παραπάνω διαδοχή και δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες δεν αυξάνεται μετά από έντονη αερόβια άσκηση (Vasankari et al., 1997; Vider et al., 2001; Chevion et al., 2003). Αυτά τα αντιφατικά

αποτελέσματα μπορούν να εξηγηθούν από το επίπεδο των αντιοξειδωτικών (το οποίο δεν ελέγχεται πάντα στις μελέτες), την ένταση της άσκησης ή το επίπεδο εκπαίδευσης. Επιπλέον κάποιες διαφορές μπορούν να εξηγηθούν από τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του οξειδωτικού στρες.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από μελέτες αναερόβιων ασκήσεων με αποτελέσματα αερόβιων δεν παρατηρούνται μεγάλες διαφορές. Όπως και με την αερόβια άσκηση, είναι προς το παρόν ασαφής αν η αύξηση της παραγωγής RONS κατά την αναερόβια άσκηση αντιπροσωπεύει μια απαραίτητη φυσιολογική διαδικασία ή αποτελεί ένα ανεπιθύμητο γεγονός για την κυτταρική λειτουργία.

Αυτή τη στιγμή φαίνεται ότι όλες οι μορφές άσκησης, τόσο η αερόβια όσο και η αναερόβια, έχουν τη δυνατότητα να οδηγήσουν στην αύξηση της παραγωγής των RONS και της MDA.

1.6.1. 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). Κατά την υψηλής έντασης άσκηση η συνολική πρόσληψη οξυγόνου αυξάνεται 20 φορές, ενώ τα επίπεδα οξυγόνου σε μια μυϊκή ίνα αυξάνονται έως και 100 φορές (Ji 1999) με αποτέλεσμα την υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών.

Το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Η αναερόβια άσκηση προκαλεί το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, 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 (Vina et al., 2000). Η δράση του ενζύμου αυτού οδηγεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και πιο συγκεκριμένα $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2 (McCord & Fridovich 1968). Κάτω από αερόβιες συνθήκες το ATP αναπληρώνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ γίνεται μέσω της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης και όχι μέσω της οξειδωμένης της μορφής (XO) (Ji 1999).

Φλεγμονώδης αντίδραση

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 μυϊκή 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 μυϊκή καταστροφή εμφανίζεται φλεγμονή έχει επιβεβαιωθεί και με τον προσδιορισμό δύο ακόμη δεικτών της φλεγμονής, της IL-6 και της μυελοϋπεροξειδάσης (Childs et al., 2000).

Δράση των κατεχολαμινών

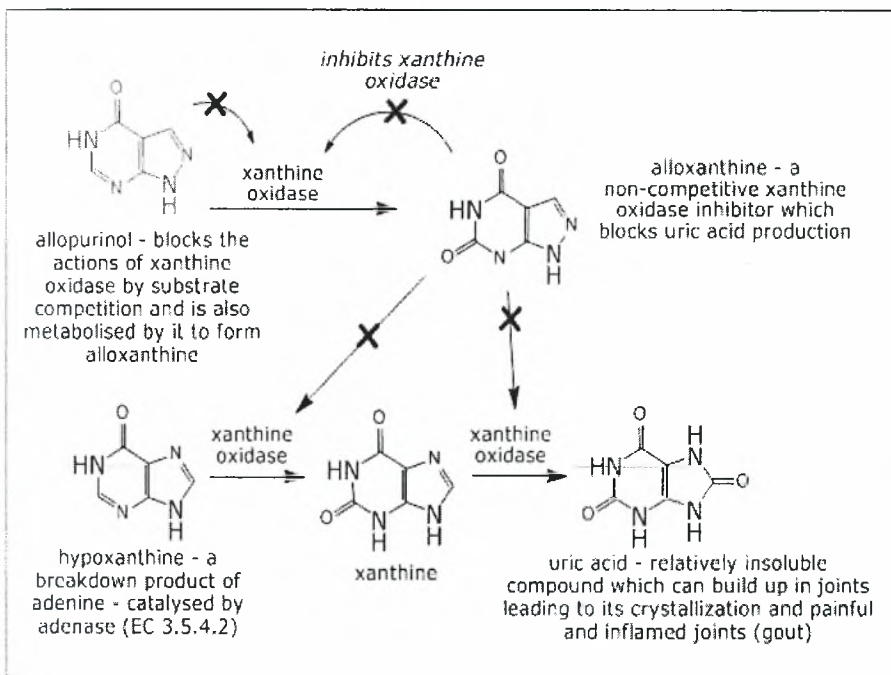
Η συγκέντρωση των κατεχολαμινών αυξάνεται μετά από έντονη άσκηση και ενεργοποιούνται έτσι οι β-αδρενεργικοί υποδοχείς. Οι κατεχολαμίνες επάγουν το μεταβολισμό με αποτέλεσμα την έντονη παραγωγή ROS από τα μιτοχόνδρια.

Υπεροξειδιοσώματα

Τα υπεροξειδιοσώματα είναι οργανίδια, στα οποία συνβαίνει η οξείδωση των λιπαρών οξέων. 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).

1.7 ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗ

Η αλοπουρινόλη είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της χρόνιας ουρικής αρθρίτιδας, ασθένειας προκαλούμενης από την υπερβολική συσσώρευση ουρικού οξέος στους ιστούς. Είναι ένα δομικό ανάλογο της υποξανθίνης και αναστέλλει τη δράση της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης (XDH) και της οξειδάσης της ξανθίνης (XO) (Hoey et al., 1988). Μεταβολίζεται ταχύτατα σε οξυπουρινόλη στον άνθρωπο (Moorthouse et al., 1987). Ο χρόνος ημιζωής της οξυπουρινόλης είναι πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με της αλοπουρινόλης και γι' αυτό το λόγο η οξυπουρινόλη θεωρείται σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνη για τις επιπτώσεις της δράσης της αλοπουρινόλης. Η οξειδάση της ξανθίνης είναι υπεύθυνη για την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη οδηγώντας στην παραγωγή ουρικού οξέος, τελικού προϊόντος του μεταβολισμού των πουρινών.



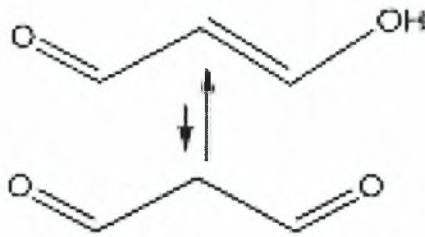
Εικόνα 3. Μονοπάτι της ανασταλτικής δράσης της αλοπουρινόλης.

Η αλοπουρινόλη έχει διπλό ρόλο καθώς μέσω της ανασταλτικής της δράσης απέναντι στην οξειδάση της ξανθίνης αναστέλλει τόσο την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών όσο και την παραγωγή ουρικού οξέος, ενός πολύ ισχυρού αντιοξειδωτικού μορίου. θεωρείται ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο Σε προηγούμενες εργασίες, έχει μελετηθεί ο προστατευτικός ρόλος της αλοπουρινόλης απέναντι στο οξειδωτικό στρες

που προκαλείται από διαφορετικές αιτίες, όπως είναι η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (Heunks et al., 1999), η δυσλειτουργία του μυοκαρδίου (Belboul et al., 2001) και η άσκηση (Gomez-Cabrera et al., 2005; Koyama et al., 1999). Σε περιβάλλον άσκησης βρέθηκε ότι η αλοπουρινόλη αποτρέπει την οξειδωση της γλουταθειόνης και των λιπιδίων στο αίμα, καθώς και τη λιπιδική υπεροξείδωση στο ήπαρ σε άλογα (Mills et al., 1997). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η αλοπουρινόλη μειώνει το παραγόμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες σε επίμυες (Gomez-Cabrera et al., 2005) και στον άνθρωπο (Gomez-Cabrera et al., 2006). Ωστόσο, έχει επίσης βρεθεί ότι η αλοπουρινόλη προκαλεί οξειδωτικό στρες μετά από εξαντλητική άσκηση στο αίμα και το γαστροκνήμιο μυ επιμύων (Veskoukis et al., 2008).

1.8 ΜΗΛΟΝΙΚΗ ΔΙΑΛΔΕΥΔΗ (MDA)

Η μηλονική διαλδεϋδη (MDA) είναι ένα οργανικό σύνθετο με δομή $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$. Το ενεργό αυτό μόριο είναι φυσικό προϊόν του καταβολισμού των πολυακόρεστων λιπιδίων. Η MDA είναι από τους πιο συχνά χρησιμοποιημένους δείκτες της λιπιδικής υπεροξείδωσης (Nielsen et al., 1997). Είναι μια δραστική αλδεϋδη και ως δραστική ηλεκτρόφιλη μορφή προκαλεί τοξικό στρες στα κύτταρα και δημιουργεί ομοιοπολικά πρωτεϊνικά συμπλέγματα που είναι γνωστά ως τελικά προϊόντα της οξειδωσης λιπιδίων (ALE). 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 MDA, η οποία μπορεί να υπολογιστεί ποσοτικά ακολουθώντας μια ελεγχόμενη αντίδραση με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) σε αναλογία 1:2.



Σχήμα 1. Χημική δομή της MDA

Μικρές ποσότητες “ελεύθερης” MDA δημιουργούνται κατά την υπεροξειδωση των περισσότερων μεμβρανικών συστημάτων, ειδικότερα των μικροσωμάτων. Ωστόσο, η ποσότητα της ελεύθερης MDA που παράγεται στα περισσότερα συστήματα λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι χαμηλή, και ανεπαρκής να δώσει ένα ουσιώδες χρωματικό προϊόν (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Σε μελέτες που έγιναν σε υπεροξειδωμένο λάδι ψαριών, δείχθηκε ότι το 98% της MDA που αντιδρά με το TBA δεν ήταν παρούσα στο δείγμα αλλά σχηματίστηκε κατά την αποσύνθεση των λιπιδικών υπεροξειδίων στο στάδιο θέρμανσης με TCA (Halliwell & Gutteridge, 1998). Η αποσύνθεση των υπεροξειδίων παράγει ρίζες RO_2^* που μπορούν να οξειδώσουν περισσότερα λιπίδια. Η παραγωγή της MDA έχει προταθεί ότι εμπλέκει τον σχηματισμό κυκλικών υπεροξειδίων και ενδο-υπεροξειδίων τα οποία υπόκεινται σε κλασματοποίηση. Το σπάσιμο των υπεροξειδίων επιταχύνεται από την παρουσία αλάτων σιδήρου.

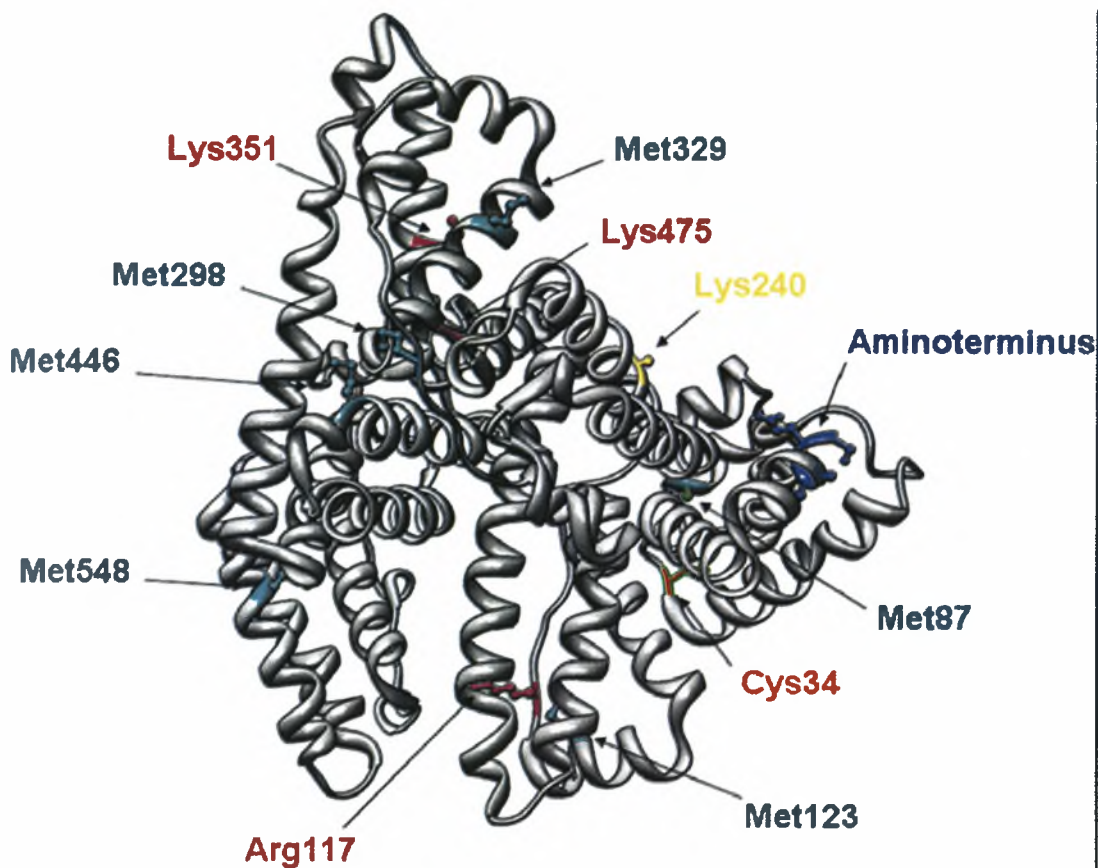
Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η MDA είναι ισχυρά γενotoξική και καρκινογενής, ιδιότητες που μπορεί να προέρχονται από την βιολογική δραστηριότητα μερικώς υδρολυμένων παραγώγων της. Αν και η MDA προσδένεται στο DNA δεν είναι ισχυρά μεταλλαξιγόνο (Halliwell & Gutteridge, 1998).

1.9 ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ

Η αλβουμίνη είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη που συντίθεται στο ήπαρ (Domeiko et al., 1991). Σε υγιή ενήλικα άτομα, η σύνθεση της αλβουμίνης συμβαίνει κυρίως στο πολύσωμα των ηπατοκυττάρων. Η ημίσεια ζωής της είναι περίπου 20 μέρες. Αποτελεί το 50% - 60% των πρωτεϊνών του πλάσματος. Έχει σημαντικό κλινικό ρόλο στη διατήρηση της οσμωτικής πίεσης του πλάσματος και των ιστών και δρά ως

μεταφορέας βιταμινών, ορμονών κ.ά. Το μόριο της αλβουμίνης έχει πολλές θέσεις πρόσδεσης για διαφορετικά μόρια (Kragh-Hansen 1990). Πιο συγκεκριμένα, η αλβουμίνη προσδένεται και μεταφέρει πολλά υποστρώματα όπως, ιόντα μετάλλων και ξενοβιοτικά (Doweiko & Nompoggi 1991). Έχει αντιοξειδωτικές ιδιότητες εξαιτίας των ομάδωνθειόλης που υπάρχουν στο μόριο (Imai et al., 2002; Halliwell & Gutteridge, 1998). Μπορεί επίσης, να δρα ως ένζυμο (Drmanovitz et al., 1999).

Η αλβουμίνη είναι μια πρωτεΐνη μονής αλυσίδας αποτελούμενη από 17 δισουλφιδικούς δεσμούς και μια ελεύθερηθειόλη στην Cys34, που δημιουργεί δισουλφιδικούς δεσμούς με κυστεΐνη και γλουταθειόνη. Οξειδωση της Cys34 οδηγεί στη δημιουργία σουλφενικού οξέος (RSOH), το οποίο οξειδώνεται περαιτέρω σε σουλφινικό οξύ (RSO₂H). Το σουλφινικό οξύ αποτελεί ένα σημαντικό ενδιάμεσο στο μονοπάτι της οξειδοαναγωγικής τροποποίησης των δραστικών μορφών. Ηθειολική ομάδα (-SH) ομάδα της αλβουμίνης αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ενάντια στις δραστικές μορφές αζώτου (RNS) καθώς έχειδειχτεί ότι οξειδώνεται σε σουλφενικό οξύ (Roche et al., 2008). Η αλβουμίνη συναντάται σε 2 μορφές. Στη μία μορφή της έχει μια ελεύθερη ομάδαθειόλης και ονομάζεται μερκαπταλβουμίνη (HMA) και στην άλλη βρίσκεται σε οξειδωμένη μορφή και ονομάζεται μη-μερκαπταλβουμίνη (HNA).



Εικόνα 4. Κύριες περιοχές στο μόριο της αλβουμίνης, που εμπλέκονται στην αντιοξειδωτική της δράση.

Έχει αναφερθεί ότι η άσκηση προκαλεί οξείδωση των μακρομορίων όπως το DNA, τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες των ιστών (Nikolaidis et al., 2006). Τα δραστικά μόρια που παράγονται από την εξαντλητική άσκηση μπορεί να προκαλούν αλλαγές στην δομή της αλβουμίνης. Αυτές οι αλλαγές μπορούν να επηρεάζουν τη διαμόρφωση του μορίου και της ιδιότητες πρόσδεσης του, με συνέπεια τον μείωση της ικανότητας της αλβουμίνης να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες (Halliwell & Gutteridge 1998; Lamprecht et al., 2008). Υπάρχουν πολλοί βιολογικοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τις θετικές επιδράσεις των υψηλότερων συγκεντρώσεων αλβουμίνης στην κυκλοφορία. Στην πραγματικότητα η αλβουμίνη αποτελεί ένα από τα κύρια αντιοξειδωτικά που κυκλοφορούν στο πλάσμα και εκτίθενται σε διαρκές οξειδωτικό στρες (Soriani et al., 1994; Roche et al., 2008).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξετάσει την επίδραση της εξαντλητικής αερόβιας άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεΰδης, ως δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης και της αλβουμίνης, ως ουσίας με αντιοξειδωτικές ιδιότητες, σε διάφορους ιστούς επίμυων. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η συγκέντρωση της MDA και της αλβουμίνης στον εγκέφαλο, τον πνεύμονα και τον σπλήνα επίμυων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΤΡΟΠΟΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ

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 διαβιούσαν σε ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος (εναλλαγή φωτός και σκότους ανά 12 ώρες και θερμοκρασία 20°C). Χωρίστηκαν σε κλουβιά των τριών επιμύων και η τροφή και το νερό διατίθονταν ελεύθερα.

Οι επιμύες μελετήθηκαν σε τρεις διαφορετικές καταστάσεις: μετά από άσκηση, μετά από χορήγηση αλοπουρινόλης, και μετά από συνδυασμό άσκησης και χορήγησης αλοπουρινόλης. Οι επιμύες χωρίστηκαν σε 8 ομάδες των 10 ατόμων. Η αλοπουρινόλη και το DMSO χορηγήθηκαν 1,5 ώρες πριν την άσκηση. Λήφθηκαν δείγματα πριν την άσκηση, αμέσως μετά την άσκηση και 5 ώρες μετά το πέρας της άσκησης καθώς και τις αντίστοιχες χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Οι επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO και θανατώθηκαν 1,5 ώρες μετά τη χορήγηση είναι η 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 η μέγιστη συγκέντρωσή της στο μυ. Πιλοτικά πειράματα απέδειξαν την ανάγκη για τη χρησιμοποίηση μίας μόνο ομάδας ελέγχου αφού δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στους δείκτες που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια 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 ώρες 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 των επιμύων

Κατά την άφιξη τους οι επίμυες αφέθηκαν για 7 μέρες στο χώρο του πειράματος ώστε να εγκλιματιστούν, χωρίς να υποστούν κάποια μεταχείριση. Στη συνέχεια ξεκίνησε η εξοικείωσή τους με το νερό για 5 μέρες πριν ξεκινήσει η εφαρμογή του πρωτοκόλου 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 πρωτοκόλου.

2.4. Πρωτόκολο κολύμβησης

Οι επίμυες ασκήθηκαν ο καθένας ξεχωριστά μέχρι εξάντλησης σε δεξαμενή διαμέτρου 1m και βάθους 0.7m. Η θερμοκρασία του νερού ρυθμίστηκε στους 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 άλλα, όπως το τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο (Duarte et al. 1994). Έτσι, οποιαδήποτε επίδραση στους δείκτες που μελετήθηκαν αποδίδεται στην άσκηση και όχι στη μυϊκή καταστροφή, η οποία επάγει την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Duarte et al. 1994; Nikolaidis et al. 2008). 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 από τον εγκέφαλο, τον πνεύμονα και τον σπλήνα συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι την ομογενοποίησή τους. Η ομογενοποίηση έγινε με γουδί και γουδοχέρι σε υγρό άζωτο. Ο ιστός ομογενοποιήθηκε σε ένα PBS (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). Τα ομογενοποιημένα δείγματα ανακινήθηκαν στο vortex και μετά χρησιμοποιήθηκε σύστημα των υπερήχων προκειμένου να διασπαστούν καλύτερα οι μεμβράνες. Τα ομογενοποιημένα, τέλος, φυγοκεντρήθηκαν στις 12000 rpm στους 4°C για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο της φυγοκεντρησης ήταν αυτό που συλλέχθηκε. Σε όλη την διάρκεια της ομογενοποίησης των ιστών τα δείγματα διατηρούνταν στον πάγο.

2.6. Πρωτόκολα δεικτών που μελετήθηκαν

Τα πρωτόκολα των δεικτών που μελετήθηκαν στη διπλωματική εργασία παρουσιάζονται αναλυτικά στο παράρτημα. Όλα τα πρωτόκολα ήταν φασματοφωτομετρικά και έγιναν εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε σχέση με την ποσότητα πρωτεΐνης των δειγμάτων. 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

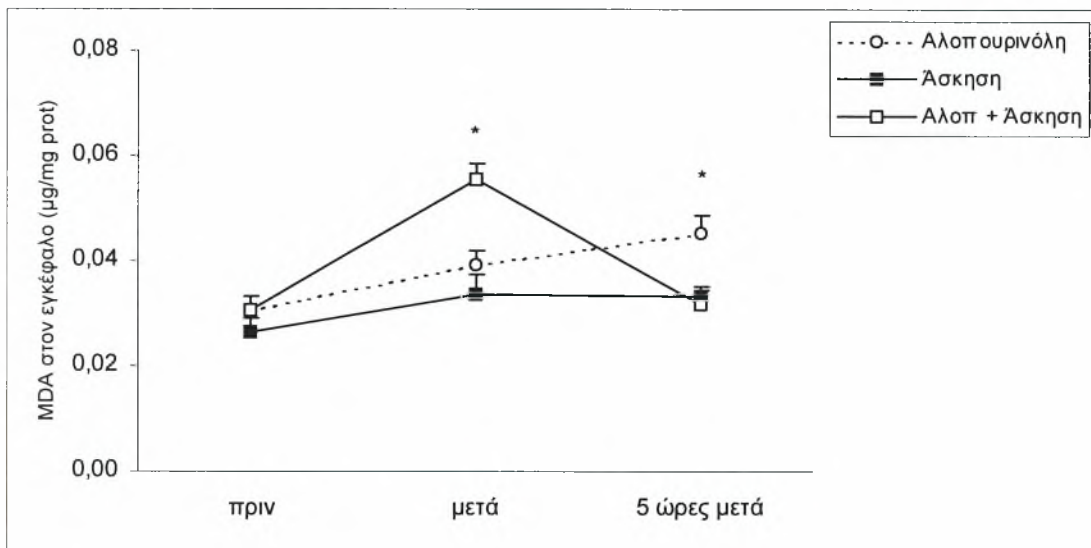
Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω της ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (παρέμβαση \times χρόνος) (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω ανάλυσης απλής κύριας επίδρασης. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0.05$. Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μηλονική Διαλδεΐδη (MDA)

3.1.1 MDA στον εγκέφαλο

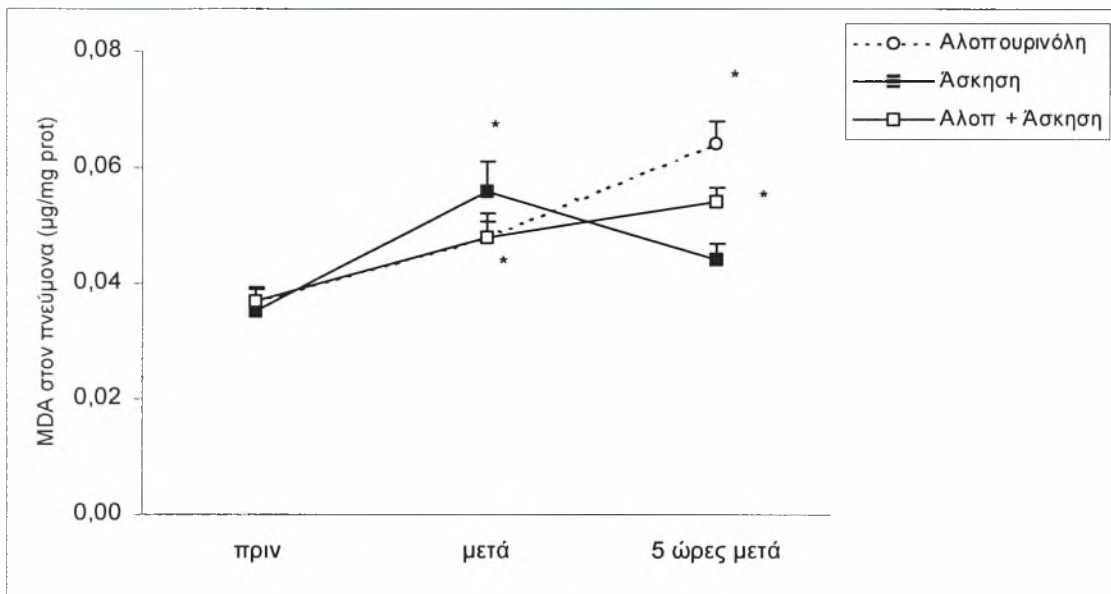
Βρέθηκε κύρια επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου και του συνδυασμού τους. Η μηλονική διαλδεΐδη δεν επηρεάστηκε από την άσκηση ενώ αυξήθηκε μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης τόσο στους επίμυες που έκαναν άσκηση όσο και σε εκείνους που δεν έκαναν.



Διάγραμμα 1. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεΐδης στον εγκέφαλο. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή ηρεμίας (πριν) στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$).

3.1.2 MDA στον πνεύμονα

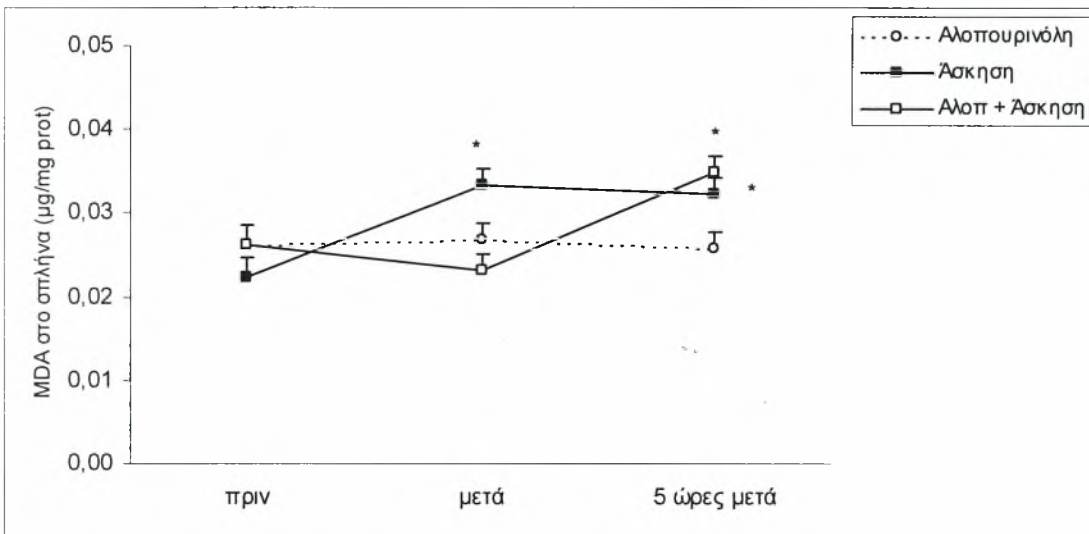
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και του συνδυασμού χρόνου και παρέμβασης. Η MDA αυξήθηκε μετά την άσκηση, μετά την χορήγηση αλοπουρινόλης και μετά το συνδυασμό της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης, του συνδυασμού τους.



Διάγραμμα 2. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεύδης στον πνεύμονα. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή ηρεμίας (πριν) στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$).

3.1.3 MDA στον σπλήνα

Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου και του συνδυασμού χρόνου και παρέμβασης. Η MDA αυξήθηκε μετά την άσκηση καθώς και με το συνδυασμό άσκησης και χορήγησης αλοπουρινόλης.

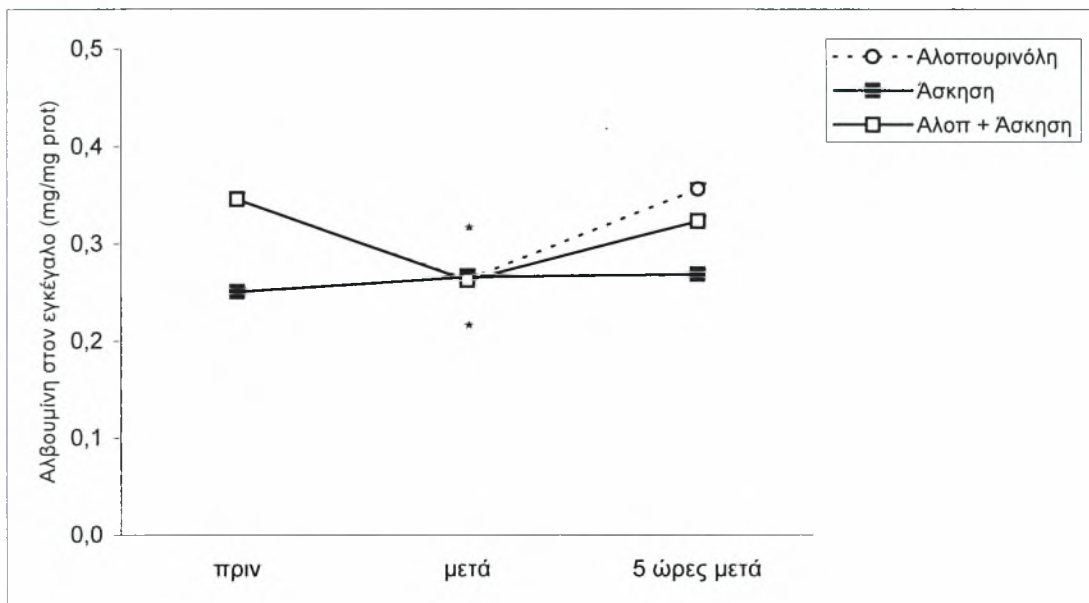


Διάγραμμα 3. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεϋδης στον σπλήνα. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή ηρεμίας (πριν) στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$).

3.2. Αλβουμίνη

3.2.1. Αλβουμίνη στον εγκέφαλο

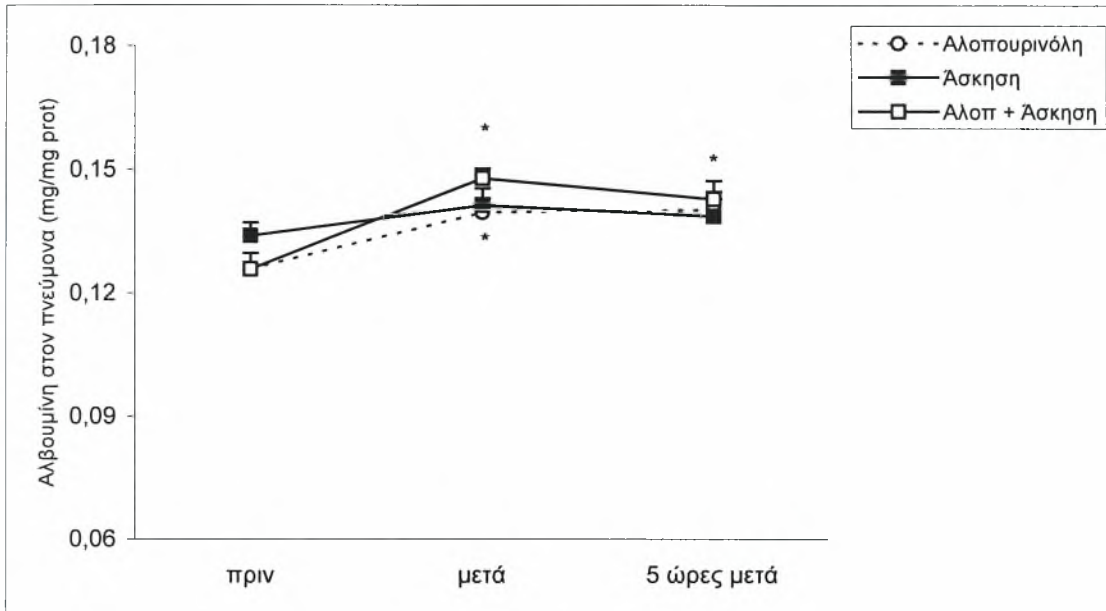
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου, της παρέμβασης και του συνδυασμού τους. Η αλβουμίνη μειώθηκε μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης τόσο στους επίμυες που έκαναν άσκηση όσο και σε εκείνους που δεν έκαναν.



Διάγραμμα 4. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον εγκέφαλο. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή ηρεμίας (πριν) στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$).

3.2.2. Αλβουμίνη στον πνεύμονα

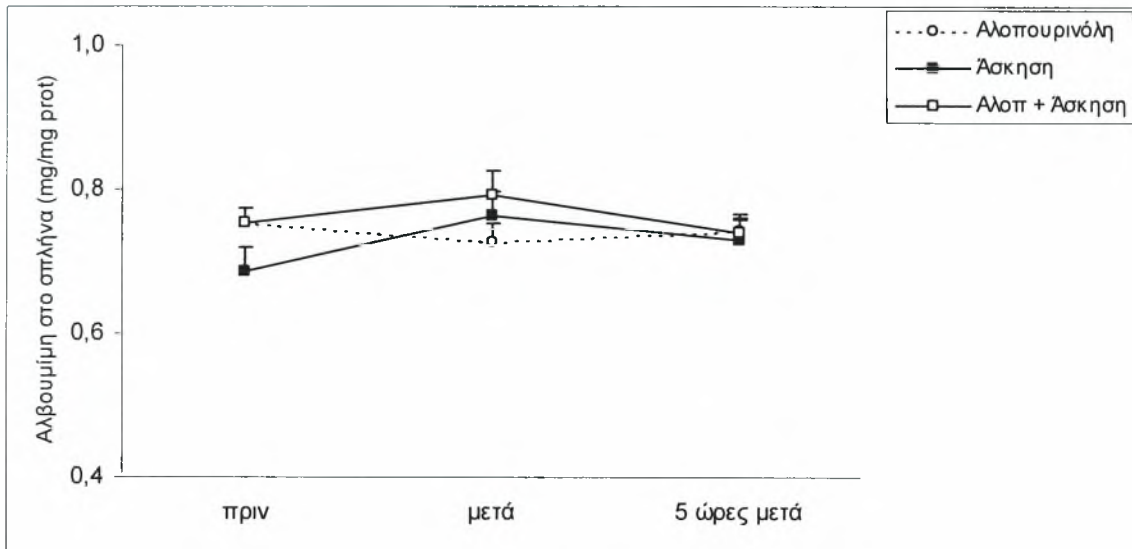
Βρέθηκε κύρια επίδραση του χρόνου. Η αλβουμίνη αυξήθηκε τόσο με τη χορήγηση αλοπουρινόλης όσο και με το συνδυασμό αλοπουρινόλης και άσκησης.



Διάγραμμα 5. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον πνεύμονα. *Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή ηρεμίας (πριν) στην ίδια πειραματική ομάδα ($P < 0.05$).

3.2.3. Αλβουμίνη στον σπλήνα

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



Διάγραμμα 6. Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον σπλήνα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε ότι η εξαντλητική αερόβια άσκηση οδήγησε σε αύξηση του οξειδωτικού στρες στον πνεύμονα και τον σπλήνα των επιμύων, όπως φάνηκε από την αύξηση της συγκέντρωσης της MDA. Ανάλογα αποτελέσματα είχε και η αλοπουρινόλη, η οποία αύξησε την MDA στον εγκέφαλο και τον πνεύμονα των επιμύων. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης δεν επηρεάστηκε από την άσκηση σε κανέναν ιστό ενώ μειώθηκε στον εγκέφαλο και αυξήθηκε στον πνεύμονα μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι η άσκηση επάγει το οξειδωτικό στρες όπως φάνηκε από την αύξηση της MDA και των λιπιδικών υπεροξειδίων στον άνθρωπο (Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2006) και σε επίμυες (Gomez-Cabrera et al., 2005; Koyama et al., 1999;). 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 παρατηρήθηκε και στην παρούσα εργασία επιβεβαιώνοντας τα ανάλογα ευρήματα προηγούμενων εργασιών.

Στην παρούσα εργασία η αλοπουρινόλη προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης της MDA στον εγκέφαλο και τον πνεύμονα των επιμύων, και μείωση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης στον εγκέφαλο και αύξηση της αλβουμίνης στον πνεύμονα. Σε προηγούμενες εργασίες σε επίμυες έχει παρατηρηθεί ο προστατευτικός ρόλος της αλοπουρινόλης σχετικά με το προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες καθώς μείωσε τη συγκέντρωση της MDA (Gomez-Cabrera et al., 2005; Gomez-Cabrera et al. 2006; Koyama et al., 1999; Roche et al., 2008).

Σε μια 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 υπεροξείδωση μετά από την αερόβια υψηλής διάρκειας και έντασης άσκηση, αυξήθηκε όπως φάνηκε από την αύξηση της 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).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω εργασιών δε συμφωνούν με τα δεδομένα της παρούσας εργασίας καθώς η αλοπουρινόλη φαίνεται να επάγει το οξειδωτικό στρες και όχι να προστατεύει τους ιστούς από αυτό.

Υπάρχει μεγάλος αριθμός εργασιών που μελετούν τις επιδράσεις διαφόρων παρεμβάσεων στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στα ζώα και τον άνθρωπο (Lamprecht et al., 2009; Goldwasser & Feldman 1997; Szapacs et al., 2006). Ωστόσο,

υπάρχουν μόνο λίγες εργασίες που αναφέρονται στην αλβουμίνη των ιστών (Wagatsuma & Yamada 2000; Wagatsuma et al., 2001, 2002), ενώ δεν υπάρχουν μελέτες που μετράνε την συγκέντρωση της αλβουμίνης στους ιστούς μετά από εξαντλητική αερόβια άσκηση και χορήγησης αλλοπουρινόλης.

Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η αλβουμίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού (Roche et al., 2008). Στην παρούσα εργασία η συγκέντρωση της αλβουμίνης στον εγκέφαλο μειώθηκε με την χορήγηση αλλοπουρινόλης μετά την άσκηση. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης στον πνεύμονα στην κατάσταση ηρεμίας, μειώθηκε με την χορήγηση αλλοπουρινόλης σε σχέση με την άσκηση στην ίδια κατάσταση. Η αλβουμίνη δεν μεταβλήθηκε στους επίμυες πριν και μετά την άσκηση. Επιπλέον, η συγκέντρωση της αλβουμίνης στον σπλήνα παρέμεινε ανεπηρέαστη. Υποθέτουμε ότι η αλβουμίνη μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα στον εγκέφαλο.

Ωστόσο, το γεγονός ότι δεν βρέθηκε κάποια επίδραση της αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στους δύο ιστούς (πνεύμονα, σπλήνα) μετά την άσκηση, μπορεί να δείχνει ότι υπήρξε μία ισορροπία μεταξύ της προοξειδωτικής και της οξειδωτικής δράσης της αλοπουρινόλης έτσι ώστε οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί της αλβουμίνης να μην ενεργοποιήθηκαν. Η αλοπουρινόλη μπορεί να ανέστειλε τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης, δηλαδή του ενζύμου παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση, παράλληλα όμως ανέστειλε και την παραγωγή του ουρικού οξέος, δηλαδή ενός ισχυρού αντιοξειδωτικού μορίου, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού.

Όπως φαίνεται από την προηγούμενη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, η άσκηση αυξάνει το οξειδωτικό στρες. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώθηκε 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.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πρωτόκολα δεικτών που μελετήθηκαν

5.1. Πρωτόκολο καμπύλης MDA

TEP (1,1,3,3-tetraethoxy-propane)

Διαλύουμε 75μL TEP σε 10mL HCl 0.1N. Θερμαίνουμε σε υδατόλουτρο για 30min στους 70°C και μετά κρύνουμε το διάλυμα στον πάγο. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος. Το TEP είναι ένα πρόδρομο μόριο της MDA. Με αυτή τη διαδικασία παράγεται τελικά ένα διάλυμα stock με συγκέντρωση MDA 239μg/mL.

HCl 0.1N

Για να φτιάξουμε HCl 0.1N αραιώνουμε 10 φορές από ένα διάλυμα HCl 1N (Για τελικό όγκο 30mL HCl 0.1N προσθέτουμε 3 mL HCl 1N και 27 mL H₂O).

TBA (Thiobarbituric acid) 0.8%

Για να φτιάξουμε 100mL TBA 0.8% διαλύουμε 0.8gr TBA σε 100mL H₂O. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος και για να διαλυθεί χρειάζεται χαμηλή θέρμανση και ανάδευση.

Πειραματική διαδικασία

1. Σε ένα falcon όγκου 15mL προσθέτουμε 75μL TEP stock συγκέντρωσης 239μg/mL και αραιώνουμε σε τελικό όγκο 10mL με την προσθήκη 9.925μL HCl 0.1N. Αναδεύουμε το διάλυμα στο vortex, το βράζουμε στο υδατόλουτρο σε 100°C για 5min και μετά μεταφέρουμε το falcon σε πάγο για άλλα 5min. Σε ογκομετρική φιάλη των 100ml μεταφέρουμε το περιεχόμενο του falcon και προσθέτουμε H₂O μέχρι να πληρωθεί η φιάλη.

2. Ετοιμάζουμε τις αραιώσεις της MDA.

C₁: i) 20μl stock + 180μl H₂O = 200μl

ii) 5μl stock + 995μl H₂O = 1000μl (C₁=119.5ng/mL)

C₂: i) 20μl stock + 80μl H₂O = 200μl

ii) 10μl stock + 990μl H₂O = 1000μl (C₂=239ng/mL)

C₃: i) 20μl stock + 180μl H₂O = 200μl

ii) 20μl stock + 980μl H₂O = 1000μl (C₃=478ng/mL)

C₄: i) 20μl stock + 180μl H₂O = 500μl

ii) 20μl stock + 646μl H₂O = 666μl (C₄=717ng/mL)

C₅: 5μl stock + 995μl H₂O = 1000μl (C₅=1.195μg/mL)

C₆: 10μl stock + 1420μl H₂O = 500μl (C₆=1.673μg/mL)

C₇: 10μl stock + 990μl H₂O = 1000μl (C₇=2.39μg/mL)

C₈: 10μl stock + 660μl H₂O = 670μl (C₈=3.585μg/mL)

3. Προσθέτουμε τα αντιδραστήρια σε φιαλίδια erpendorf όγκου 2mL, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

| | Τυφλό | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ | C ₇ | C ₈ |
|---------------|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| MDA (μL) | — | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 5% TCA (μL) | 625 | 525 | 525 | 525 | 525 | 525 | 525 | 525 | 525 |
| 0.8% TBA (μL) | 375 | 375 | 375 | 375 | 375 | 375 | 375 | 375 | 375 |
| Τελικός όγκος | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml | 1ml |

4. Τοποθετούμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 70°C για 30min.

5. Μεταφέρουμε τα δείγματα για 5min στον πάγο.

6. Ρίχνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά σε πλαστική κυψελίδα και φωτομετρούμε στα 521,5nm.

5.1.1. MDA (Malondialdehyde) in brain

Αντιδραστήρια

BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) 0.8%

Για να φτιάξουμε 100mL BHT 0.8% διαλύουμε 0.8gr BHT σε 100mL εξάνιο. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

TCA (Trichloroacetic acid) 5%

Για να φτιάξουμε 100mL TCA 5% διαλύουμε 5gr TCA σε 100mL H₂O. Αν έχουμε διάλυμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης TCA, τότε αραιώνουμε για να πάρουμε το TCA 5%.

TBA (Thiobarbituric acid) 0.8%

Για να φτιάξουμε 100mL TBA 0.8% διαλύουμε 0.8gr TBA σε 100mL H₂O. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος και για να διαλυθεί χρειάζεται χαμηλή θέρμανση και ανάδευση.

BRAIN (1/2 diluted)

Για να φτιάξουμε 50μl δείγματος εγκεφάλου (1/2 diluted) διαλύουμε 80μl δείγματος εγκεφάλου σε 80μl H₂O. Για να διαλυθεί αναδεύουμε για λίγο στο vortex.

Πειραματική διαδικασία

1. Προσθέτουμε τα αντιδραστήρια σε φιαλίδια erpendorf όγκου 2mL όπως φαίνεται στον πίνακα.

| | Δείγμα 1 |
|--------------------------|----------|
| Brain | 50μL |
| TCA 5% | 924μL |
| BHT 0.8% | 576μL |
| Τελικός όγκος αντίδρασης | 1600μL |

2. Αναδεύουμε στο vortex για 30sec.

3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3min στα 3000g στους 4 °C.

4. Απομακρύνουμε το εξάνιο, το οποίο είναι το ανώτατο στρώμα του υπερκειμένου.

5. Προσθέτουμε 900μL TCA 5% και αναδεύουμε στο vortex.

6. Αριθμούμε νέα φιαλίδια erpendorf όγκου 1.5mL και προσθέτουμε τα αντιδραστήρια όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

| | Τυφλό | Δείγμα |
|---------------|-------|--------|
| Δείγμα 1 | — | 625 |
| TBA 0.8% | 375 | 375 |
| TCA 5% | 625 | — |
| Τελικός όγκος | 1ml | 1ml |

7. Τοποθετούμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 70°C για 30min.
8. Μεταφέρουμε τα δείγματα για 10min στον πάγο.
9. Φυγοκεντρούμε για 3min στα 3000g στους 4 °C.
10. Ρίχνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά σε πλαστική κυψελίδα και φωτομετρούμε στα 521,5nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση της MDA υπολογίζεται με βάση την εξίσωση που προκύπτει από την καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων MDA.

5.1.2. MDA (Malondialdehyde) in lung

Αντιδραστήρια

BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) 0.8%

Για να φτιάξουμε 100mL BHT 0.8% διαλύουμε 0.8gr BHT σε 100mL εξάνιο. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

TCA (Trichloroacetic acid) 5%

Για να φτιάξουμε 100mL TCA 5% διαλύουμε 5gr TCA σε 100mL H₂O. Αν έχουμε διάλυμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης TCA, τότε αραιώνουμε για να πάρουμε το TCA 5%.

TBA (Thiobarbituric acid) 0.8%

Για να φτιάξουμε 100mL TBA 0.8% διαλύουμε 0.8gr TBA σε 100mL H₂O. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος και για να διαλυθεί χρειάζεται χαμηλή θέρμανση και ανάδευση.

LUNG (1/2 diluted)

Για να φτιάξουμε 100μl δείγματος πνεύμονα (1/2 diluted) διαλύουμε 160μl δείγματος πνεύμονα σε 160μl H₂O. Για να διαλυθεί αναδεύουμε για λίγο στο vortex.

Πειραματική διαδικασία

1. Προσθέτουμε τα αντιδραστήρια σε φιαλίδια erpendorf όγκου 2mL όπως φαίνεται στον πίνακα.

| | Δείγμα 1 |
|--------------------------|----------|
| lung | 50μL |
| TCA 5% | 924μL |
| BHT 0.8% | 576μL |
| Τελικός όγκος αντίδρασης | 1600μL |

2. Αναδεύουμε στο vortex για 30sec.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3min στα 3000g στους 4 °C.
4. Απομακρύνουμε το εξάνιο, το οποίο είναι το ανώτατο στρώμα του υπερκειμένου.
5. Προσθέτουμε 900μL TCA 5% και αναδεύουμε στο vortex.
6. Αριθμούμε νέα φιαλίδια erpendorf όγκου 1.5mL και προσθέτουμε τα αντιδραστήρια όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

| | Τυφλό | Δείγμα |
|---------------|-------|--------|
| Δείγμα 1 | — | 625 |
| TBA 0.8% | 375 | 375 |
| TCA 5% | 625 | — |
| Τελικός όγκος | 1ml | 1ml |

7. Τοποθετούμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 70°C για 30min.
8. Μεταφέρουμε τα δείγματα για 10min στον πάγο.
9. Φυγοκεντρούμε για 3min στα 3000g στους 4 °C.
10. Ρίχνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά σε πλαστική κυψελίδα και φωτομετρούμε στα 521,5nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση της MDA υπολογίζεται με βάση την εξίσωση που προκύπτει από την καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων MDA.

5.1.3. MDA (Malondialdehyde) in spleen

Αντιδραστήρια

BHT (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol) 0.8%

Για να φτιάξουμε 100mL BHT 0.8% διαλύουμε 0.8gr BHT σε 100mL εξάνιο. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

TCA (Trichloroacetic acid) 5%

Για να φτιάξουμε 100mL TCA 5% διαλύουμε 5gr TCA σε 100mL H₂O. Αν έχουμε διάλυμα μεγαλύτερης συγκέντρωσης TCA, τότε αραιώνουμε για να πάρουμε το TCA 5%.

TBA (Thiobarbituric acid) 0.8%

Για να φτιάξουμε 100mL TBA 0.8% διαλύουμε 0.8gr TBA σε 100mL H₂O. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος και για να διαλυθεί χρειάζεται χαμηλή θέρμανση και ανάδευση.

SPLEEN (1/2 diluted)

Για να φτιάξουμε 50μl δείγματος σπλήνας (1/2 diluted) διαλύουμε 80μl δείγματος σπλήνας σε 80μl H₂O. Για να διαλυθεί αναδεύουμε για λίγο στο vortex.

Πειραματική διαδικασία

1. Προσθέτουμε τα αντιδραστήρια σε φιαλίδια erpendorf όγκου 2mL όπως φαίνεται στον πίνακα.

| | Δείγμα 1 |
|--------------------------|----------|
| Spleen | 50μL |
| TCA 5% | 924μL |
| BHT 0.8% | 576μL |
| Τελικός όγκος αντίδρασης | 1600μL |

2. Αναδεύουμε στο vortex για 30sec.

3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3min στα 3000g στους 4 °C.

4. Απομακρύνουμε το εξάνιο, το οποίο είναι το ανώτατο στρώμα του υπερκειμένου.
5. Προσθέτουμε 900μL TCA 5% και αναδεύουμε στο vortex.
6. Αριθμούμε νέα φιαλίδια erpendorf όγκου 1.5mL και προσθέτουμε τα αντιδραστήρια όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

| | Τυφλό | Δείγμα |
|---------------|-------|--------|
| Δείγμα 1 | — | 625 |
| TBA 0.8% | 375 | 375 |
| TCA 5% | 625 | — |
| Τελικός όγκος | 1ml | 1ml |

7. Τοποθετούμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 70°C για 30min.
8. Μεταφέρουμε τα δείγματα για 10min στον πάγο.
9. Φυγοκεντρούμε για 3min στα 3000g στους 4 °C.
10. Ρίχνουμε το υπερκείμενο προσεκτικά σε πλαστική κυψελίδα και φωτομετρούμε στα 521,5nm.

Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση της MDA υπολογίζεται με βάση την εξίσωση που προκύπτει από την καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων MDA.

5.2. Πρωτόκολο Bradford

Αραιώνουμε το δείγμα 1/20 με νερό.

Σε ένα σωληνάκι erpendorf προσθέτουμε:

| | Blank | Δείγμα |
|-------------------------|-------|--------|
| H ₂ O (μL) | 20 | - |
| Sample diluted 1/20(μL) | - | 20 |
| Bradford reagent (μL) | 1000 | 1000 |

Κάνουμε Vortex και αφήνουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.

Μετράμε την απορρόφηση στα 595 nm.

Η ολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης που υπάρχει στο δείγμα υπολογίζεται με βάση την εξίσωση που προκύπτει από την καμπύλη Bradford:

για εγκέφαλο και σπλήνα: $\psi = 0,4489\chi - 0,0337$

και για πνεύμονα : $\psi = 0,4195\chi + 0,0219$

5.3 Πρωτόκολο αλβουμίνης

Αρχή της μεθόδου

Η προσθήκη αλβουμίνης σε ένα διάλυμα με πράσινο της βρωμοκρεσόλης και σε 0.075M succinate buffer, με pH 4.20, έχει ως αποτέλεσμα στην αύξηση της απορρόφησης στα 628 nm. Bilirubin, moderate lipaemia, και salicylate δεν εμπλέκονται στην ανάλυση. Η χρήση ενός μη-ιονικού επιφανειοδραστικού παράγοντα (Brij-35) μειώνει την απορρόφηση του τυφλού, μειώνει την νεφελομετρία και παρέχει γραμμικότητα.

Αντιδραστήρια

Succinate buffer 0.1M, pH 4. (MW): 118.1

Διαλύουμε 11.9g σουκινικού οξέος σε περίπου 800mL νερού; ρυθμίζουμε το pH στο 4.0 με NaOH και το αραιώνουμε σε 1L με νερό. Αποθηκεύουμε στους 4°C.

Bromocresol green solution: Stock 0.6mM. (MW): 698.02

Διαλύουμε 419mg BCG σε 10mL 0.1N NaOH σε 1L ογκομετρική φιάλη. Αραιώνουμε με νερό και αποθηκεύουμε στους 4°C.

Working dye solution.

Αραιώνουμε έναν όγκο από στοκ διάλυμα BCG με τρεις όγκους 0.1M succinate buffer, προσθέτουμε 4mL 30% Brij-35 per litre, και προσεκτικά προσαρμόζουμε το pH στο 4.2. Αποθηκεύουμε στους 4°C.

Brij-35 solution 30%.

Διαλύουμε 30g Brij-35 σε 100mL νερό.

Albumin standard solution. Stock 10g/dL.

Διαλύουμε 10g of BSA και 50mg sodium azide σε νερό σε μια 100mL ογκομετρική φιάλη. Αραιώνουμε με νερό και αποθηκεύουμε στους 4°C.

Albumin standard solutions: Working 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0 g/dL.

Κατάλληλες αραιώσεις από το στοκ αλβουμίνης. Standard διαλύματα φτιάχνονται με 50mg/dL aqueous sodium azide solution. Αποθηκεύουμε στους 4°C.

Διαδικασία

Πέντε μL από ομογενοποιημένο ιστό προσθέτονται σε 995 μL of working dye solution. Το διάλυμα ανακινείται έντονα σε vortex, αναμιγνύεται και αφήνεται για 10 λεπτά στους 25°C. Η απορρόφηση μετράται στα 628nm αφού μηδενίσουμε αρχικά το φωτόμετρο με το τυφλό (working dye solution, blank). Η συγκέντρωση της αλβουμίνης του ορού λαμβάνετε από ένα absorbance-concentration plot.

Προσθέτουμε τα ακόλουθα σε σωληνάκια erpendorf

| | Blank | Sample |
|----------------------|--------------------|-------------------|
| Working dye solution | 1000 μL | 995 μL |
| tissue homogenate | - | 5 μL |

Υπολογισμοί

Πολλαπλασιάζουμε επι 3 για να υπολογίσουμε την αραιώση κατά την ομογενοποίηση των ιστών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. 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.
2. Asami S, Hirano T, Yamaguchi R, Tsurudome Y, Itoh H, Kasai H. Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem Biophys Res Comm* 1998; 243:678-682.
3. Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Leeuwenburgh C. *Free Rad. Biol. Med.* 2000, 29 (suppl. 1), 531.
4. Cooper CE, Vollaard NBJ, Choueiri T, et al. Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 2002; 30 (2): 280-5.
5. 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.
6. 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.
7. Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72 (S): 647-52.
8. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006;36(4):327-58.
9. Goldwasser P, Feldman J. Association of serum albumin and mortality risk. *J Clin Epidemiol.* 1997. Jun; 50(6):693-703.
10. 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.

11. Gomez-Cabrera MC, Martinez A, Santangelo G, Pallardo FV, Sastre J Vina J. Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr* 96 Suppl 1:S31-33; 2006.
12. 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.
13. Green HJ, Fraser IG. Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 1988; 20(2): 55-9.
14. 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.
15. Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry*. New York: Oxford Science Publications.
16. Halliwell B, Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. May; 142(2):231-55.
17. Hellsten Y, Sjodin B, Richter EA, et al. Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensityintermittent exercise. *Am J Physiol* 1998; 274: E600-6.
18. Hoey BM, Butler J, Halliwell B. On the specificity of allopurinol and oxypurinol as inhibitors of xanthine oxidase. A pulse radiolysis determination of rate constants for reaction of allopurinol and oxypurinol with hydroxyl radicals. *Free Radic Res Commun*. 1988. 4(4):259-63.
19. 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.
20. Jenkins RR. Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156 70.
21. Ji LL. 1999. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 222:283-292.
22. 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.

23. 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.
24. Lamprecht M, Greilberger JF, Schwabberger G, Hofmann P, Oettl K. Single bouts of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups on plasma protein of trained men in a workload-dependent manner. *J Appl Physiol* 2008. 104: 1611–1617.
25. Lamprecht M, Oettl K, Schwabberger G, Hofmann P, Greilberger JF. Protein modification responds to exercise intensity and antioxidant supplementation. *Med Sci Sports Exerc.* 2009. Jan; 41(1):155-63.
26. 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.
27. Lee DK, Wang DP. Formulation development of allopurinol suppositories and injectables. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999; 25: 1205-1208.
28. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem.* 2001 Jun;8(7): 829-38.
29. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32 (9): 790-6.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. McCord, JM, and Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 1968. 243: 5753-5760.
34. 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* 2007. 39:1107-1113.

35. 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* 1997. 62:11-16.
36. Moorhouse, PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, and Gutteridge JM. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett.* 1987. 213: 23-28.
37. 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.
38. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, and Kouretas D. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc.* 2006. 38: 1443-1450.
39. Packer L. Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete.. *J Sports Sci.* 1997. Jun;15(3):353-63.
40. Palazzetti S, Richard MJ, Favir A (2003). Overload training increase exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol* 28(4):588-604.
41. 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.
42. Powers SK, Lennon SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 2000; 58: 1025-33.
43. 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.
44. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* 2008 Jun 11;582(13):1783-7.
45. Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 653S-69S.

46. Serbinova E, Reznick SKAZ, Packer L. Thiocctic acid protects against ischemia reperfusion injury in the isolated langendorffheart. *Free Radic Res Commun* 1992; 17: 49-58.
47. Szapacs ME, Riggins JN, Zimmerman LJ, Liebler DC. Covalent adduction of human serum albumin by 4-hydroxy-2-nonenal: kinetic analysis of competing alkylation reactions. *Biochemistry*. 2006. Sep 5; 45(35):10521-8.
48. Sies, H. (1991). *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*. New York: Academic Press.
49. Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, et al (1997). Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defences. *Free Radic Biol Med* 22(3): 509-13.
50. Veskokoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, Kouretas D. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2008. Dec;33(6):1140-54.
51. Vider J, Lehtmaa J, Kullisaar T, et al. Acute immune response in respect to exercise induced oxidative stress. *Pathophysiology* 2001;7(4):263-270.
52. 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.
53. Wagatsuma A, Yamada S. Specific protein alteration in the soleus following immobilization-atrophy. *Scand J Med Sci Sports*. 2000 Aug; 10(4):205-10.
54. Wagatsuma A, Yamazaki Y, Mizuno K, Yamada S. Molecular properties and gene expression of albumin in the skeletal muscle following hindlimb immobilization in a shortened position. *Acta Neuropathol*. 2001 Jun; 101(6):540-6.
55. Wagatsuma A, Fujimoto K, Yamada S. Alteration in albumin level during modified muscular activity. *Scand J Med Sci Sports*. 2002 Jun; 12(3):143-9.
56. 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.

57. 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.
58. Young IS, McEneny J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29 (2): 358-62.
59. Kragh-Hansen U, Pedersen AO, Galliano M, Minchiotti L, Brennan SO, Tarnoky AL et al. (1996). High-affinity binding of laurate to naturally occurring mutants of human serum albumin and proalbumin. *Biochem J* 320:911–916.

