



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΕΡΟΒΙΑΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ
ΜΥΙΚΟΥ ΠΡΩΤΕΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΥΠΟΚΝΗΜΙΔΙΟΥ ΜΥΟΣ
(SOLEUS) ΕΠΙΜΥΩΝ

ΟΝΟΜΑ: ΑΓΑΘΑΓΓΕΛΟΥ ΚΥΡΙΑΚΟΣ
Α.Φ.Μ. : 1804325



Λάρισα, 2009

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
 ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΓΕΩΡΓΙΑΣ
 ΤΜΗΜΑ ΠΙΣΧΗΜΕΛΙΑΣ-ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

Αρ.Πρωτ. 154
 Ημερομηνία 19-2-2009

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ

α. ΕΠΙΒΛΕΠΟΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Κουρέτας Δημήτριος

β. ΜΕΛΗ

Κοντού Μαρία

Κυπάρος Αντώνης

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]
[Handwritten signature]



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

Αριθ. Εισ.: 6947/1
 Ημερ. Εισ.: 12-03-2009
 Δωρεά: Π.Θ.
 Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
 2009
 ΑΓΑ



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	2
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	2
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	4
1. Οξυγόνο	4
2. Ελεύθερες ρίζες	5
3. Παραγωγή ελευθέρων ριζών	6
4. Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	7
5. Θετικές επιδράσεις	9
6. Αρνητικές επιδράσεις	10
7. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί	12
8. Οξειδωτικό στρες	13
9. Άσκηση και οξειδωτικό στρες	15
10. Μηχανισμοί επαγωγής οξειδωτικού στρες κατά την άσκηση	16
11. Πρωτεωμική- Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων	20
12. Εφαρμογές πρωτεωμικής	22
13. Πρωτεωμική στην άσκηση - Πρωτεϊνική σύνθεση	25
14. Σκοπός της εργασίας	27
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	28
1. Τρόπος χειρισμού και χαρακτηριστικά των επιμύων	28
2. Εξοικείωση	28
3. Πρωτόκολλο κολύμβησης	29
4. Θανάτωση των επιμύων, συλλογή και ομογενοποίηση των δειγμάτων	29
5. Αρχή της μεθόδου	29
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ- ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	42

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα		Σελίδα
1	Ο κύκλος φωτοσύνθεσης - κυτταρικής αναπνοής: Μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε ATP.	4
2	Παραγωγή ελευθέρων ριζών.	9
3	Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να οξειδώσουν λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA και RNA.	10
4	Ασθένηεις που προκαλούνται από την επίδραση των ελευθέρων ριζών.	12
5	Οξειδωτικό στρες, η διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ παραγωγής δραστικών ειδών και αντιοξειδωτικών, προς όφελος των πρώτων.	14
6	Η ουβικινόνη (Q) ανάγεται προς ουβικινόλη (QH ₂) μέσω μιας ενδιάμεσης ημικινόνης (QH _·).	16
7	Παραγωγή ελευθέρων ριζών από το σύστημα της οξειδάσης της ξανθίνης.	17
8	Παραγωγή H ₂ O ₂ από τα T λεμφοκύτταρα κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση.	18
9	Σχηματική απεικόνιση των κυτταρικών διαδικασιών που συμμετέχουν στη δημιουργία φαινότυπου και η σχέση τους στο πρωτέωμα	20
10	Λίστα οργανιδίων με τον αντιπροσωπευτικό, για το καθένα, αριθμό πρωτεϊνών που έχουν τακτοποιηθεί με τη χρήση των μεθόδων πρωτεωμικής.	22
11	Διαδικασία ελέγχου ασθενούς πρωτεώματος.	23
12	Διαδικασία ανεύρεσης πιθανών φαρμακευτικών στόχων για την καταπολέμηση του καρκίνου.	24
13	Από το DNA στην πρωτεΐνη: Το γονίδιο χρησιμεύει ως ταμπλέτα για τη σύνθεση μίας πρωτεΐνης.	25
14	Διάγραμμα ροής της διαδικασίας ανίχνευσης πρωτεϊνών πηκτώματος 2-DE με τη χρήση προγράμματος υπολογιστή και φασματοσκοπία μάζας.	30
15	Απεικόνιση της ανατομίας μυών των πίσω ποδιών. Είναι ευδιάκριτη η θέση των υποκνημίδων μυών (soleus).	31
16	Τρόπος διαχωρισμού πρωτεϊνών στα πηκτώματα.	32
17	Αποτέλεσμα 2-D ηλεκτροφόρησης A υποκνημίδιου μυός μη ασκούμενου επιμύου.	36
18	Αποτέλεσμα 2-D ηλεκτροφόρησης A υποκνημίδιου μυός ασκούμενου επιμύου.	36
19	Αποτέλεσμα 2-D ηλεκτροφόρησης B υποκνημίδιου μυός μη ασκούμενου επιμύου.	37
20	Αποτέλεσμα 2-D ηλεκτροφόρησης B υποκνημίδιου μυός ασκούμενου επιμύου.	37

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας		Σελίδα
1	Δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS).	6
2	Παράγοντες που επάγουν το οξειδωτικό στρες.	14

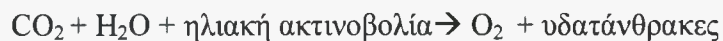
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι η εξαντλητική αερόβια άσκηση αυξάνει το οξειδωτικό στρες στο σκελετικό μυ. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν τις πρωτεΐνες με αποτέλεσμα να αλλάζει η δομή και η λειτουργία τους. Πιθανές λοιπόν ποιοτικές και ποσοτικές πρωτεωμικές διαφορές θα μπορούσαν να εντοπιστούν σε ασκούμενο σκελετικό μυ. Εν τούτοις, δεν έχει πραγματοποιηθεί, σε μεγάλο βαθμό, πειραματική προσέγγιση για την εξέταση του σκελετικού μυϊκού πρωτεώματος ως απόκριση στην άσκηση. Είναι γενικά αποδεκτό ότι κατά τη διάρκεια αερόβιας άσκησης το ποσοστό σύνθεσης μυϊκών πρωτεϊνών μειώνεται ελαφρώς, αλλά όχι σημαντικά. Αντίθετα, μετά από 4 ώρες αποκατάστασης από τη μυϊκή άσκηση η πρωτεϊνική σύνθεση αυξάνεται σημαντικά σε επίμυες μετά από εξαντλητική αερόβια άσκηση. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξετάσει την επίδραση της εξαντλητικής αερόβιας άσκησης στην έκφραση πρωτεϊνών στον υποκνημίδιο μυ επιμύων. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων σε ομογενοποιημένο μυϊκό ιστό, τόσο ασκούμενων όσο και μη ασκούμενων επιμύων, των οποίων τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν για τον εντοπισμό πιθανών διαφορών. Εξετάστηκαν συνολικά οκτώ πηκτώματα 2-D ηλεκτροφορήσεων (4 ασκούμενοι και 4 μη ασκούμενοι επίμυες). Παρατηρήθηκαν ορισμένες πιθανές ποιοτικές διαφορές στην έκφραση πρωτεϊνών μεταξύ ασκούμενων και μη ασκούμενων επιμύων με την εμφάνιση των πρωτεϊνών αυτών να επικεντρώνεται στην περιοχή του πηκτώματος των πρωτεϊνών με $pI \approx 5$ και $MW 30-75$. Ωστόσο δεν εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που να παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση με επαναλήψιμο τρόπο στην πλειοψηφία του συνόλου των πηκτωμάτων. Για το λόγο αυτό και έως ότου επιβιβαιωθούν οι πιθανές διαφορές, καμία πρωτεϊνική κηλίδα δεν αποκόπηκε από τα πηκτώματα ώστε να ταυτοποιηθεί με φασματοσκοπία μάζας. Συμπερασματικά, με τη χρήση αυτής της μεθόδου έχουμε εντοπίσει πρωτεΐνες που εκφράστηκαν μόνο μετά από την εξαντλητική αερόβια άσκηση. Εν τούτοις, η έκφραση τους δεν επαναλαμβανόταν στην πλειοψηφία του συνόλου των οκτώ πηκτωμάτων και γι'αυτό δεν επιβεβαιώθηκε η αλλαγή στην έκφραση τους. Δεδομένου ότι με την παρούσα εργασία εξετάστηκε ένα μικρό δείγμα μυϊκών πρωτεϊνών, η αξιολόγηση αυτών των αποτελεσμάτων θα εξαρτηθεί από τη μελέτη της απόκρισης ενός μεγαλύτερου συνόλου μυϊκών πρωτεϊνών στην εξαντλητική αερόβια άσκηση.

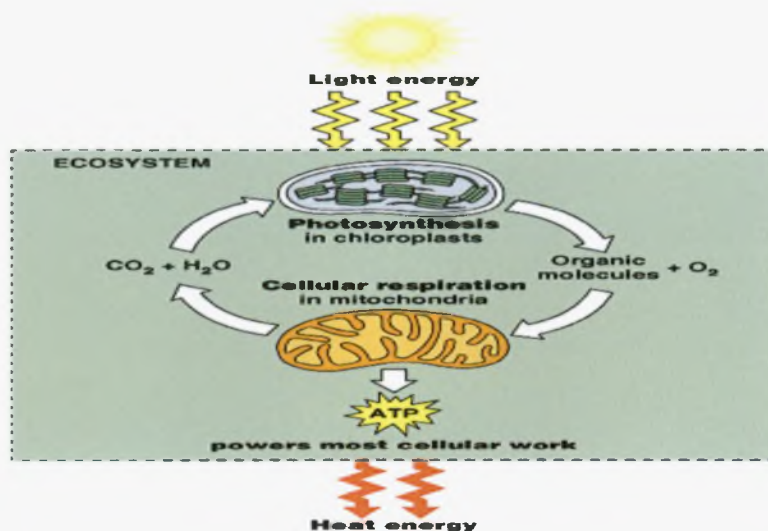
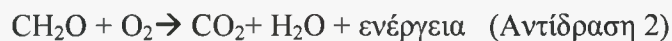
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Οξυγόνο

Η εξέλιξη της φωτοσυνθετικής διαδικασίας από τα κυανοβακτήρια οδήγησε στην εμφάνιση του οξυγόνου σε σημαντικά ποσοστά στην ατμόσφαιρα της γης 2,5 δισεκατομμύρια χρόνια πριν, καθώς με τη διαδικασία αυτή παγιδεύουν την ηλιακή ενέργεια και τη χρησιμοποιούν. Με τη φωτοσύνθεση, η ηλιακή ενέργεια χρησιμοποιείται για τη μετατροπή του H_2O και του CO_2 σε υδατάνθρακες με ταυτόχρονη απελευθέρωση O_2 στην ατμόσφαιρα σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



Καθώς τα φωτοσυνθετικά βακτήρια πλήθαιναν, τα ποσά του οξυγόνου στην ατμόσφαιρα αυξάνονταν συνεχώς. Ως εκ τούτου, εμφανίστηκαν οι οργανισμοί που χρησιμοποιούσαν αυτό το στοιχείο στη διαδικασία μετατροπής της τροφής σε ενέργεια υπό τη μορφή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Ο κύκλος φωτοσύνθεσης - κυτταρικής αναπνοής: Μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε ATP.

Η διαδικασία που αντιπροσωπεύει η πιο πάνω αντίδραση είναι η αναπνοή και εξελικτικά επικράτησε στους περισσότερους αερόβιους οργανισμούς, καθώς η ενέργεια που παράγεται κατά την αναπνοή είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή της ζύμωσης. Η ανάπτυξη προσαρμοστικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών πιστεύεται ότι εξελίχθηκε προγενέστερα, συγκριτικά με το μηχανισμό της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, ο αερόβιος μεταβολισμός πέρα από τα μεγάλα ποσά ενέργειας συνεπάγεται και την παραγωγή τοξικών προϊόντων, όπως των ελευθέρων ριζών. Οι αερόβιοι οργανισμοί επιζούν λόγω του ότι διαθέτουν αντιοξειδωτικές άμυνες που τους προστατεύουν από τη δράση τους (Halliwell & Gutteridge 1998).

2. Ελεύθερες ρίζες

Ελεύθερη ρίζα είναι ένα χημικό μόριο ή ένωση που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους. Η διαμόρφωση αυτή, η οποία είναι εξαιρετικά ασταθής, προκύπτει είτε από την απώλεια είτε από την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στην εξωτερική στιβάδα σθένους (Mylonas & Kouretas 1999). Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας μένει μονήρες, το μόριο γίνεται ασταθές και έτσι τείνει να αντιδράσει με άλλα μόρια (Bulkley 1990). Εξαιτίας της αυξημένης χημικής τους δραστηριότητας, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν ταχύτατα με μόρια ή άλλες ελεύθερες ρίζες προκειμένου να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στιβάδα. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν βλαβερές επιδράσεις στα διάφορα βιομόρια αλλά συμμετέχουν και σε φυσιολογικές διαδικασίες.

Η πιο σημαντική κατηγορία ελευθέρων ριζών είναι τα δραστικά είδη οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), τα οποία προέρχονται από το οξυγόνο. Εκτός από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου υπάρχουν και παράγωγα του οξυγόνου που αν και δεν είναι ρίζες, είναι αρκετά δραστικά (Deaton et al., 2003). Η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου δίνει μία μεγάλη ποικιλία ROS, τα οποία είναι γενικά βραχύβια και ιδιαίτερα δραστικά (πίνακας 1). Ενδεικτικά αναφέρονται το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το ιόν υδροξυλίου (OH) και το ανιόν του σουπεροξειδίου (O_2^-). Εκτός από τα ROS, υπάρχουν τα δραστικά είδη αζώτου (reactive nitrogen species, RNS) που προέρχονται από το άζωτο (πίνακας 1), τα δραστικά είδη θείου (reactive sulfur species, RSS) που

προέρχονται από το θείο και τα δραστικά είδη χλωρίου (reactive chlorine species, RCS) που προέρχονται από το χλώριο.

Πίνακας 1. Δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS)

	ROS	RNS
Ρίζες	Σουπεροξειδίο (O_2^-)	Μονοξειδίο του αζώτου (NO)
	Ρίζα υδροξυλίου (OH)	Διοξειδίο του αζώτου (NO_2)
	Ρίζα αλκοξυλίου (RO)	
Μη-ρίζες	Υπεροξειδίο υδρογόνου (H_2O_2)	Νιτρώδες οξύ (HNO_2)
	Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)	Νιτρικό κατιόν (NO^+)
	Υποβρωμιώδες οξύ (HOBr)	Νιτρικό ανιόν (NO^-)
	Όζον (O_3)	Τετροξειδίο του αζώτου (N_2O_4)
	Singlet oxygen ($^1\Delta_g$)	Τριοξειδίο του αζώτου (N_2O_3)
		Υπεροξυνιτρικό (ONOOH)

3. Παραγωγή ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν μέσω:

- Απώλειας ενός ηλεκτρονίου από μια μη-ρίζα: $Y \rightarrow e^- + Y^{\cdot+}$
- Απόκτησης ενός μονήρους ηλεκτρονίου από μια μη-ρίζα: $Y + e^- \rightarrow Y^{\cdot-}$
- Ομολυτικής διάσπασης, όπου ο ομοιοπολικός δεσμός διασπάται συμμετρικά έτσι ώστε κάθε τμήμα του μορίου λαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο: $H-O-H \rightarrow H^{\cdot} + OH^{\cdot}$
- Ετερολυτικής διάσπασης, όπου ο ομοιοπολικός δεσμός διασπάται μη-συμμετρικά, έτσι ώστε και τα δύο δεσμικά ηλεκτρόνια παραμένουν στο ίδιο τμήμα, αφήνοντας το άλλο με ένα κενό τροχιακό (Halliwell and Gutteridge 1998): $H-O-H \rightarrow H^+ + OH^{\cdot-}$

Οι ελεύθερες ρίζες παίρνουν μέρος σε δύο είδη αντιδράσεων:

- Μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους (αντιδράσεις ρίζας-ρίζας), οπότε παράγεται μη-ρίζα και το προϊόν αυτό είναι συνήθως λιγότερο δραστικό από τα αντιδρώντα.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων αντιδράσεων είναι τα ακόλουθα.



β. Μπορούν να αντιδράσουν με μια μη-ρίζα οπότε σχηματίζεται μια νέα ελεύθερη ρίζα.

Συγκεκριμένα, οι ρίζες κατά την αντίδρασή τους με άλλα μόρια προκειμένου να συμπληρώσουν την εξωτερική τους στιβάδα μετατρέπουν το μόριο-στόχο σε ρίζα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη μιας αλυσιδωτής αντίδρασης, η οποία συνεχίζεται μέχρι να συναντηθούν δύο ρίζες, οπότε λαμβάνει χώρα αντίδραση ρίζας-ρίζας.

4. Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών στους ζωντανούς οργανισμούς είναι συνεχής κι αναπόφευκτη. Υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός πηγών ελευθέρων ριζών, οι οποίες είναι τόσο ενδογενείς όσο και εξωγενείς (εικόνα 2).

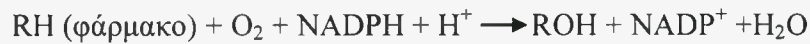
Ενδογενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

α. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδογενής πηγή ROS. Υπολογίζεται ότι 2-5% περίπου του οξυγόνου που χρησιμοποιείται για τον αερόβιο μεταβολισμό μετατρέπεται σε ROS (Boveris & Cadenas 1997). Όπως είναι γνωστό, η απαραίτητη για τους οργανισμούς ενέργεια (ATP) παράγεται κατά τη μεταφορά ηλεκτρονίων, μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας, στο οξυγόνο. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, κάποια ηλεκτρόνια διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων.

β. Η φλεγμονώδης αντίδραση. Κατά τη διάρκεια της φλεγμονής τα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, εωσινόφιλα, μονοκύτταρα και μακροφάγα) παράγουν ελεύθερες ρίζες κατά τη δράση τους.

γ. Το σύστημα του κυτοχρώματος P450. Το κυτόχρωμα P450 αποτελεί μία εξίσου σημαντική πηγή παραγωγής ROS. Σε αυτό εντοπίζεται το ενζυμικό σύστημα των μονοοξυγενασών, το οποίο εκτός από την αποτοξίνωση των ξеноβιοτικών παραγόντων

(πχ φάρμακα, εντομοκτόνα κ.α.) είναι υπεύθυνο και για το σχηματισμό των ROS. Ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα (π.χ. φάρμακο), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

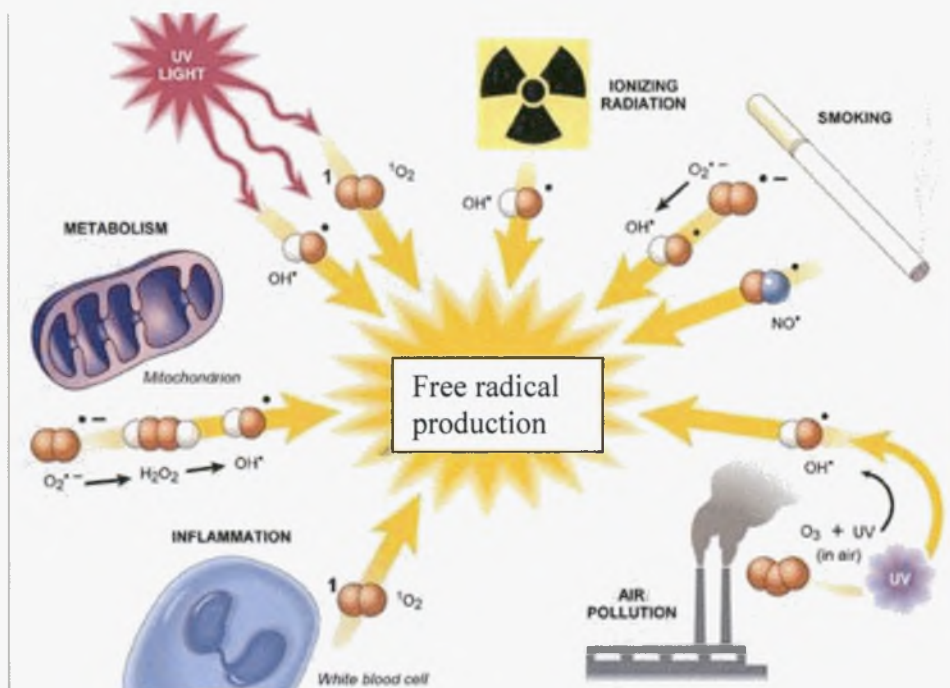


δ. Υπεροξειδιοσώματα. Αποτελούν μία ακόμη ενδογενή πηγή ROS, κυρίως υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Πρόκειται για μικρά μεμβρανικά κυστίδια που περιέχουν εξειδικευμένα ένζυμα, τα οποία μεσολαβούν σε αντιδράσεις οξείδωσης (Alberts, 2000).

Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

α. Διάφορα βιομόρια. Αυτοοξειδωση μορίων. Σε αυτά ανήκουν οι φλαβίνες, οι κατεχολαμίνες, οι θειόλες και η αιμογλοβίνη που μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας σουπεροξειδίου (O₂⁻) (Cutler 1994).

β. Στις εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών περιλαμβάνονται το κάπνισμα, η ρύπανση του περιβάλλοντος, η κατανάλωση αλκοόλ, η άσκηση, (η υποξία ή υπεροξία), η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (συμπεριλαμβανομένης της ηλιακής) και διάφορα συντηρητικά τροφών. Συγκεκριμένα, αυξημένα επίπεδα 8-υδροξυγουανίνης (μεταλλαξιγόνος βάσης που είναι αποτέλεσμα δράσης ελευθέρων ριζών) έχουν παρατηρηθεί στα λευκοκύτταρα μετά από άσκηση (Inoue et al., 1993; Poulsen et al., 1993), κάπνισμα (Suzuki et al., 1995), έκθεση σε καπνό (Howard et al., 1998) και κατανάλωση αλκοόλ (Nakajima et al., 1998). Επίσης, πολλές τροφές περιέχουν διάφορα χημικά, όπως εντομοκτόνα και φυτοφάρμακα, που οδηγούν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών μέσα στο σώμα. Ακόμη, κάποια επεξεργασμένα τρόφιμα περιέχουν σε υψηλά επίπεδα υπεροξειδία λιπιδίων, τα οποία σχηματίζουν ελεύθερες ρίζες που βλάπτουν το καρδιαγγειακό σύστημα. Τέλος, μία άλλη πολύ σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών είναι το άγχος που ενεργοποιεί την απόκριση του σώματος στο στρες, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Επιπλέον, οι ορμόνες που εμπλέκονται στην απόκριση στο στρες, όπως η κορτιζόλη και οι κατεχολαμίνες αποικοδομούνται σε ιδιαίτερα επιβλαβείς ελεύθερες ρίζες.



Εικόνα 2: Παραγωγή ελευθέρων ριζών

5. Θετικές επιδράσεις

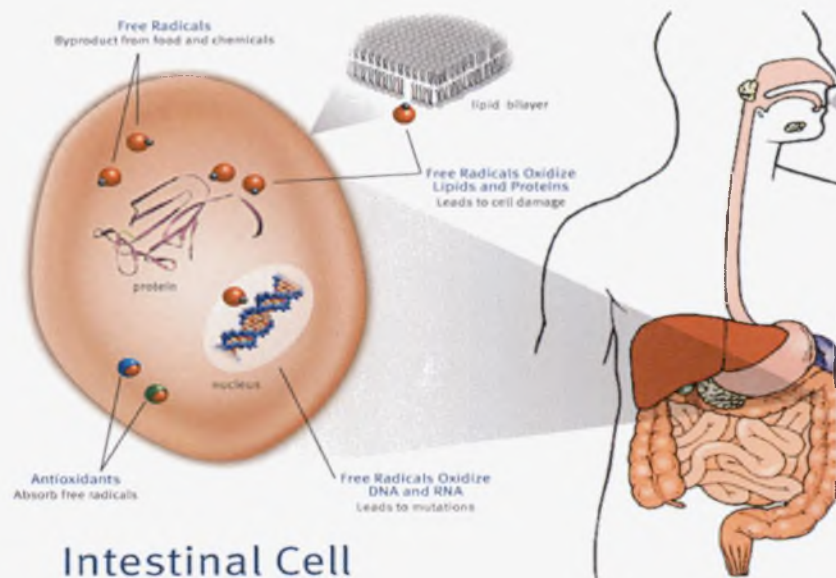
α. Οι ελεύθερες ρίζες χρησιμεύουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι στα σηματοδοτικά μονοπάτια και έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν το επίπεδο οξειδοαναγωγής (Sen et al., 1996; Reid 2001; Sen 2001; Linnane et al., 2002). Επίσης, συμμετέχουν στη ρύθμιση των υποδοχέων ινσουλίνης με δράση κινάσης τυροσίνης (Schmid et al., 1999). Ακόμα, συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνικών κινασών, του καταρράκτη κινασών MAPK καθώς και των μεταγραφικών παραγόντων AP-1 (Nose et al, 1991; Schieven et al, 1994) και NF-kB (Devary et al., 1991). Επιπλέον, οι ROS συμβάλλουν στη ρύθμιση μοριακών μηχανισμών που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό και την απόπτωση (Hensley et al., 2002).

β. Οι ROS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και στη μυϊκή συστολή καθώς έχει βρεθεί ότι η αναστολή παραγωγής των ROS οδηγεί σε απώλεια της ικανότητας συστολής των μυϊκών ινών (Reid 2001; Linnane et al., 2002). Ωστόσο, αυξημένη ποσότητα ROS στους μυϊκούς ιστούς έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης.

γ. Η συνεισφορά των ελευθέρων ριζών και στο ανοσοποιητικό σύστημα είναι αξιοσημείωτη, καθώς παράγονται από τα φαγοκύτταρα και δρουν ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύτωσης, όπως συμβαίνει στη διαδικασία της φλεγμονής (Finaud et al., 2006).

6. Αρνητικές επιδράσεις

Οι αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών, οι οποίες οφείλονται κυρίως στην οξείδωση μακρομορίων (εικόνα 3), μπορούν να συνοψιστούν στις εξής:



Εικόνα 3 : Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να οξειδώσουν λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA και RNA.

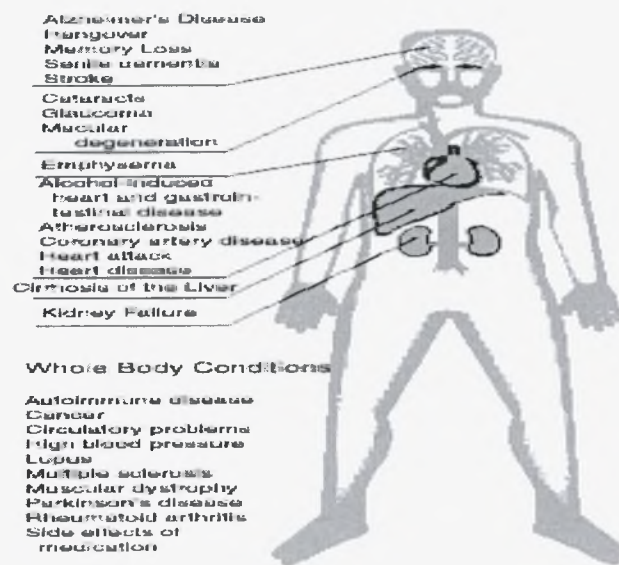
α. Υπεροξείδωση λιπιδίων. Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (polyunsaturated fatty acids-PUFAs), τα οποία συχνά προσβάλλονται από ελεύθερες ρίζες (λιπιδική υπεροξείδωση). Η υπεροξείδωση λαμβάνει χώρα μέσω μίας αλυσιδωτής αντίδρασης ριζών, η οποία αρχίζει με την οξείδωση ενός PUFA από μία ελεύθερη ρίζα οδηγώντας στο σχηματισμό μίας λιπιδικής ρίζας. Η ρίζα αυτή αντιδρά με το οξυγόνο και παράγεται μία ρίζα υπεροξυλίου, η οποία οξειδώνει ένα νέο PUFA οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό λιπιδικών υπεροξειδίων. Η οξειδωτική καταστροφή των μεμβρανικών λιπιδίων και τα προϊόντα της υπεροξείδωσής τους είναι επιβλαβή για την επιβίωση των κυττάρων και των ιστών (Mylonas & Kouretas 1999).

β. Οξείδωση πρωτεϊνών. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να οξειδώνουν τις πρωτεΐνες (Szweda et al., 2002) με αποτέλεσμα να αλλάζει η δομή και η λειτουργία τους. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η οξειδωτική καταστροφή των πρωτεϊνών αυξάνεται με την ηλικία (Standman et al., 2001) και ότι η υπεροξειδωση των λιπιδίων διαταράσσει τη λειτουργία των δομικών μεμβρανικών πρωτεϊνών (Beckman et al., 1998).

γ. Οξείδωση του DNA. Οι ROS προκαλούν μεταλλάξεις, καταστροφή του DNA και των χρωμοσωμάτων και επάγουν την κυτταρική διαίρεση. Επίσης, πιστεύεται ότι μέσω της καταστροφής του DNA επηρεάζουν τη λειτουργία των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου (Rodney et al., 2000). Η έκθεση των ζωντανών οργανισμών στην ιονίζουσα ακτινοβολία οδηγεί στην *in vivo* ομολυτική σύντηξη των δεσμών O-H στα μόρια νερού με αποτέλεσμα την παραγωγή OH[·] και H[·]. Οι ρίζες υδροξυλίου είναι ιδιαίτερα δραστικές και καταστρέφουν το DNA κι άλλα βιομόρια. Συγκεκριμένα, η ρίζα OH[·] αντιδρά με τη γουανίνη του DNA παράγοντας τη ρίζα [8-υδροξυγουανίνη], η οποία μπορεί στη συνέχεια να χάσει ένα ηλεκτρόνιο και να σχηματίσει τη μεταλλαξιγόνο βάση 8-υδροξυγουανίνη και να προκαλέσει μεταλλάξεις GC→TA (Cheng et al., 1992). Επιπλέον, τόσο η αδενίνη όσο και οι πυριμιδίνες μπορούν να τροποποιηθούν μετά από αλληλεπίδραση με τη ρίζα OH[·] (Mylonas and Kouretas, 1999).

δ. Γήρανση. Η γήρανση, που οφείλεται εν μέρει στη δράση των ελευθέρων ριζών, λαμβάνει χώρα μέσω καταστροφής του μιτοχονδριακού DNA (το οποίο σε αντίθεση με το πυρηνικό διαθέτει λιγότερους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς και συνεπώς είναι πιο ευαίσθητο σε οξειδωτικές βλάβες) και απενεργοποίησης κάποιων ειδικών πρωτεϊνών, όπως η μετατόπιση ATP-ADP (Hamilton et al., 2001). Η διαδικασία αυτή οδηγεί στη δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, τα οποία δεν μπορούν να διατηρήσουν το δυναμικό της μεμβράνης και τη σύνθεση του ATP. Τα δυσλειτουργικά μιτοχόνδρια απελευθερώνουν ιόντα Ca²⁺ και κυτόχρωμα C στο κυτταρόπλασμα και σηματοδοτούν την καταστροφή των κυτταρικών οργανιδίων και την απόπτωση των κυττάρων.

ε. Πρόκληση ασθενειών. Οι ελεύθερες ρίζες θεωρούνται υπεύθυνες για την εμφάνιση ασθενειών που προσβάλλουν τον άνθρωπο, όπως είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρτηριοσκλήρυνση, η χρόνια φλεγμονή, το σύνδρομο Down Jones και η νόσος Parkinson.



Εικόνα 4: Ασθένειες που προκαλούνται από την επίδραση των ελευθέρων ριζών.

7. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας

Τα κύτταρα είναι επιρρεπή στη δράση των ελευθέρων ριζών και για το λόγο αυτό εξελικτικά έχει δημιουργηθεί ένας ενδοκυττάριος αντιοξειδωτικός μηχανισμός που εξισορροπεί ή ελέγχει τη δραστηριότητα των ROS. Στην πραγματικότητα η ισορροπία είναι ελαφρώς μετατοπισμένη προς όφελος των ROS, αφού όπως προαναφέρθηκε οι ROS είναι υπεύθυνες για την ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών. Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται όταν η παραγωγή ROS ξεπερνά κατά πολύ αυτή την ισορροπία. Για το λόγο αυτό υπάρχει η ανάγκη της δράσης αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Bulkley 1990). Η αντιοξειδωτική άμυνα εμφανίζει διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ιστών και κυτταρικών τύπων. Επιπρόσθετα, υπάρχουν και αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται με την τροφή και συμμετέχουν στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών.

Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται κάθε ουσία που όταν βρίσκεται σε χαμηλή συγκέντρωση, συγκριτικά με το προς οξείδωση υπόστρωμα, καθυστερεί ή αναστέλλει σημαντικά την οξείδωση του συγκεκριμένου υποστρώματος (Halliwell & Gutteridge 1998). Τα αντιοξειδωτικά είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά καθώς μπορούν να

προσφέρουν ηλεκτρόνια στις ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα αυτές να μην προσβάλλουν τα κυτταρικά συστατικά. Μετά την αντίδραση, τα αντιοξειδωτικά μετατρέπονται σε ρίζες, οι οποίες όμως δεν είναι δραστικές. Τα εξωκυττάρια υγρά διαθέτουν διαφορετικούς προστατευτικούς μηχανισμούς σε σχέση με το ενδοκυττάριο περιβάλλον. Τα αντιοξειδωτικά ανάλογα με τη χημική τους φύση μπορούν να διαχωριστούν σε ενζυμικά και μη ενζυμικά. Γενικότερα, οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί κατατάσσονται ανάλογα με τη λειτουργία τους στις ακόλουθες κατηγορίες:

α. Ένζυμα, που απομακρύνουν ελεύθερες ρίζες, όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης.

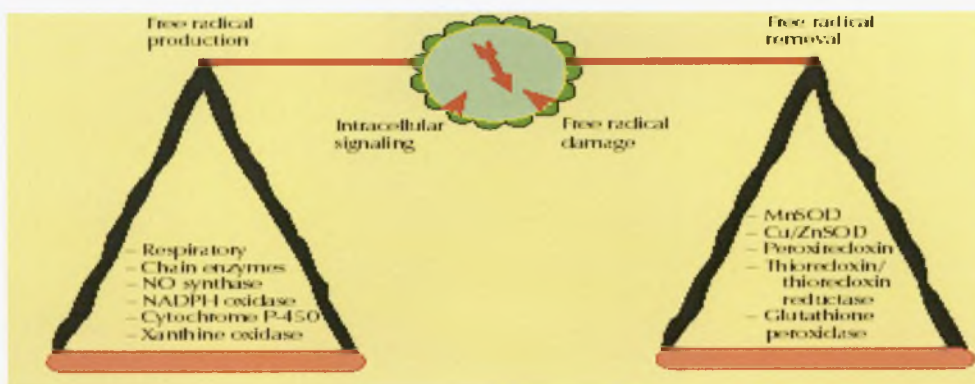
β. Πρωτεΐνες, που ελαχιστοποιούν τη διαθεσιμότητα προοξειδωτικών παραγόντων, όπως τα ιόντα σιδήρου, τα ιόντα χαλκού και η αίμη. Παραδείγματα αυτής της κατηγορίας αποτελούν οι τρανσφερίνες, οι μεταλλοθειονίνες, η σερουλοπλασμίνη και οι πρωτεΐνες που προσδένουν την αίμη απτογλοβίνη και αιμοπεξίνες.

γ. Πρωτεΐνες, που προστατεύουν τα βιομόρια από την οξειδωτική καταστροφή, όπως οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ.

δ. Μικρού μοριακού βάρους διαλυτοί παράγοντες, που απομακρύνουν τις ROS και RNS όπως η γλουταθειόνη, η α-τοκοφερόλη, το ασκορβικό οξύ και το ουρικό οξύ (Bulkley 1990).

8. Οξειδωτικό στρες

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες υπάρχει ισορροπία ανάμεσα στην παραγωγή των ROS και στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Deaton et al., 2003). Το οξειδωτικό στρες είναι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των οξειδωτικών και αναγωγικών μέσων. Συγκεκριμένα, η κυτταρική παραγωγή προ-οξειδωτικών υπερέρχει της φυσιολογικής ικανότητας του συστήματος να τα εξουδετερώνει (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Οξειδωτικό stress, η διαταραγμένη ισορροπία μεταξύ παραγωγής δραστικών ειδών και αντιοξειδωτικών, προς όφελος των πρώτων (Mylonas & Kouretas, 1999).

Κάθε κύτταρο ενός οργανισμού εκτίθεται σε οξειδωτικά μέσα. Υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που επάγουν το οξειδωτικό στρες και που συχνά δρούν πολύ γρήγορα και πολλές φορές η δράση τους είναι αθροιστική ή τουλάχιστον συνεργιστική (πίνακας 2).

Πίνακας 2: Παράγοντες που επάγουν το οξειδωτικό στρες.

Ενδογενείς παράγοντες	Εξωγενείς παράγοντες				
	Διατροφή	Ρύποι	Φάρμακα	Ακτινοβολία	Απορροφήσιμες ενώσεις από το δέρμα
<ul style="list-style-type: none"> • Φυσική άσκηση, καθιστική ζωή • Ψυχολογικό στρες • Φλεγμονή (παροδική μόλυνση/ χρόνια πάθηση) • Καρκίνος • Ισχαιμία/επανοξυγόνωση • Κυτταρικός θάνατος 	<ul style="list-style-type: none"> • Δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνες ή λίπη • Προοξειδωτικά (ξеноβιοτικά) • Αντιοξειδωτικά (χαμηλή περιεκτικότητα διατροφής) • Αφενήματα (αλκοόλ, καφεΐνη) 	<ul style="list-style-type: none"> • Κάπνισμα • Ρύπανση αέρα (SO₂, NO₂, O₃, υδρογονάνθρακες) • Επαγγελματικές νόσοι (μεταβατικά μέταλλα, άσβεστος, paraquat) 	<ul style="list-style-type: none"> • Αντικαρκινικά • Ψωραλένιο 	<ul style="list-style-type: none"> • Ιονίζουσα • Υπεριώδης • Μικροκύματα 	<ul style="list-style-type: none"> • Εντομοκτόνα • Ψωραλένιο • Φάρμακα (lindane, παράγωγα ψωραλενίου)

9. Άσκηση και οξειδωτικό στρες

Η άσκηση συνιστάται ως μέτρο πρόληψης ορισμένων ασθενειών, καθώς μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιακών νόσων, καρκίνου, οστεοπόρωσης και διαβήτη (Lee & Paffenbarger 2000; Lee & Paffenbarger 1997; McCarter 2000). Παράλληλα, βελτιώνει τη λειτουργία των σκελετικών μυών και συμβάλλει στη διατήρηση της μυϊκής μάζας (Leeuwenburgh & Heinecke, 2001). Αυξάνει, επίσης, τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, μεταξύ των οποίων της SOD, της καταλάσης και της GSH-Px στο σκελετικό μυ, την καρδιά και το ήπαρ (Jenkins 1988; Ji et al., 1992; Ji & Fu 1992; Ji 1993). Θεωρείται, ακόμη, ότι αυξάνει το μέσο όρο ζωής στους επίμυες (Holloszy 1993).

Οι μηχανισμοί που οδηγούν σε αυτά τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν προσαρμογές πρωτεϊνών-υποδοχέων και πρωτεϊνών-μεταφορέων, αλλαγή των λιπιδικών και ορμονικών προφίλ, μεταβολές της αντιοξειδωτικής άμυνας κ.α. Το ενδιαφέρον για την εμπλοκή των ROS στην καταστροφή των ιστών που προκαλείται από την άσκηση εντάθηκε το 1978 όταν εξετάστηκε η σχέση της άσκησης με την οξειδωτική βλάβη στους ιστούς του ανθρώπου (Dillard et al., 1978). Στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε ότι μέτριας έντασης άσκηση αύξησε τα επίπεδα εκπνεόμενου πεντανίου, ενός προϊόντος της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Αργότερα, αποδείχθηκε σε πειράματα με επίμυες ότι η άσκηση αυξάνει 2-3 φορές τα επίπεδα των ελευθέρων ριζών στους σκελετικούς μύες και το ήπαρ (Davies et al., 1982). Έκτοτε, ένας μεγάλος αριθμός μελετών υποστηρίζει ότι υπάρχει μία συσχέτιση της άσκησης με την αύξηση της κατανάλωσης οξυγόνου και της παραγωγής ελευθέρων ριζών και συνεπώς με την εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Υπολογίζεται ότι για κάθε 25 μόρια O₂ που ανάγονται κατά τη φυσιολογική αναπνοή, παράγεται μία ελεύθερη ρίζα (Chance et al., 1979) και ότι κατά την άσκηση ο ρυθμός κατανάλωσης O₂ αυξάνεται κατά 10-15 φορές. Τέλος, η ροή O₂ σε έναν ενεργό μυ μπορεί να αυξηθεί περίπου 100 φορές κατά την άσκηση (Sen 1995).

Αποτελέσματα προηγούμενων εργασιών τεκμηριώνουν πως η άσκηση αυξάνει το οξειδωτικό 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). Η άσκηση αυξάνει και τη λιπιδική υπεροξειδωση στο πλάσμα και το σκελετικό μυ (Ajmani et al., 2003; Alessio et al., 2000;). Επίσης, ο λόγος ανηγμένης

γλουταθειόνης (GSH) προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), 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).

10. Μηχανισμοί επαγωγής οξειδωτικού στρες κατά την άσκηση

Η άσκηση αυξάνει το ρυθμό της αναπνοής

Η αερόβια αναπνοή, που λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, περιλαμβάνει μια ροή ηλεκτρονίων από τους μεταβολίτες του κύκλου του Krebs στο μοριακό οξυγόνο για την αναγωγή του σε νερό. Μικρά ποσοστά, όμως, ελευθέρων ριζών (2-5% $O_2^{\bullet-}$ και H_2O_2) διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα. Η αναγωγή της ουβικινόνης προς ουβικινόλη, επάγει το σχηματισμό μιας δραστηκής ενδιάμεσης ένωσης, της ουβισεμικινόνης, με την προσφορά ενός ηλεκτρονίου. Αντί λοιπόν η ουβισεμικινόνη να δεχθεί ένα ηλεκτρόνιο και ένα πρωτόνιο για να σχηματίσει την ουβικινόλη, προσφέρει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στο οξυγόνο, οπότε παράγεται $O_2^{\bullet-}$ (Møller et al., 1996) (εικόνα 6).

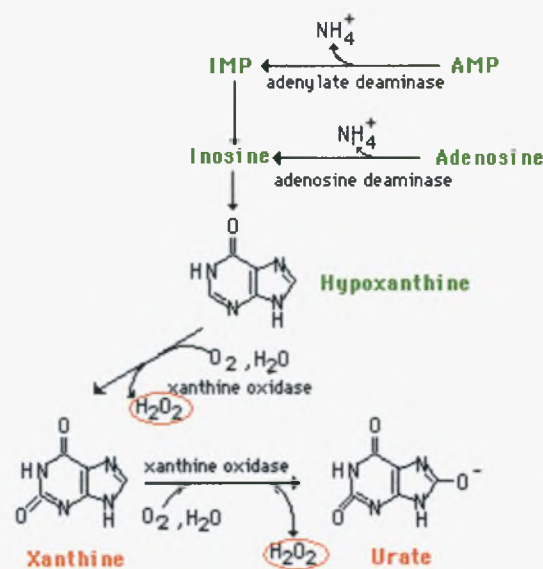


Εικόνα 6: Η ουβικινόνη (Q) ανάγεται προς ουβικινόλη (QH₂) μέσω μιας ενδιάμεσης ημικινόνης (QH_•).

Η δραστηκότητα της οξειδάσης της ξανθίνης

Κάτω από συνθήκες που οδηγούν σε εξάντληση των αποθεμάτων ATP, τα ενδοκυτταρικά επίπεδα μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP) (η οποία προκύπτει από τη διάσπαση του ATP σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και της τελευταίας σε AMP) είναι αυξημένα. Το γεγονός αυτό επάγει τη διάσπαση του AMP προς υποξανθίνη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε ξανθίνη και ουρικό οξύ από το σύστημα της οξειδάσης της ξανθίνης (XO). Η XO καταλύει μια αντίδραση που έχει χαρακτηριστεί ως μια από τις κυριότερες πηγές ελευθέρων ριζών, καθώς είναι συζευγμένη με την παραγωγή $O_2^{\bullet-}$ (εικόνα 7).

Η υψηλής έντασης άσκηση και η ισχαιμία-επαναιμάτωση (ischemia reperfusion) προκαλούν την ενεργοποίηση του μονοπατιού της XO (Møller et al., 1996). Έχει βρεθεί πως η υποξανθίνη συσσωρεύεται μετά από έντονη μυϊκή σύσπαση και το ουρικό οξύ βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα τόσο στον ασκούμενο μυ όσο και στο πλάσμα (Hellsten et al., 1988; Hellsten et al., 1997; Radak et al., 1996; Vina et al., 2000). Αντίθετα, κάτω από αερόβιες συνθήκες το ATP αναπληρώνεται μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και η υποξανθίνη και η ξανθίνη μετατρέπονται σε ουρικό οξύ από τη δεϋδρογενάση της ξανθίνης και όχι από την XO οπότε δεν παράγονται ROS.

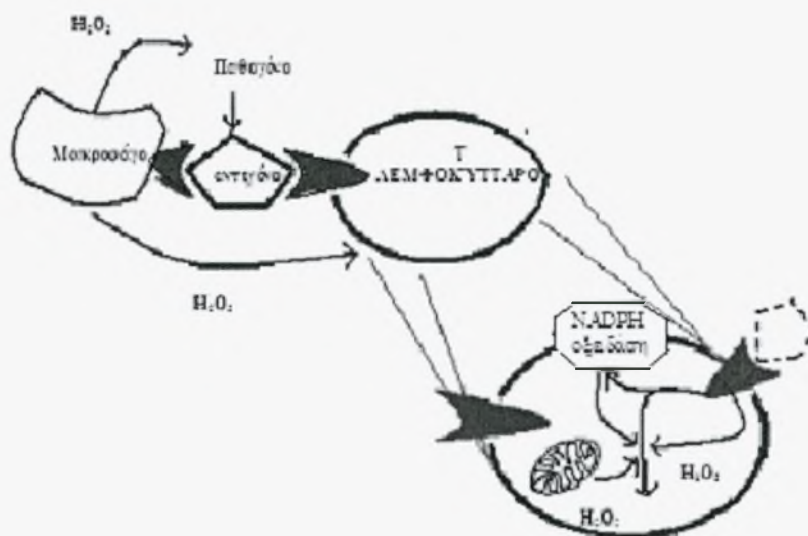


Εικόνα 7: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από το σύστημα της οξειδάσης της ξανθίνης.

Ενεργοποίηση της φλεγμονώδους αντίδρασης

Τα πολυμορφοουδετερόφιλα (PMN) είναι μια κατηγορία κυττάρων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα των ιστών έναντι σε μολύνσεις από ιούς ή βακτήρια. Τα PMN, που ενεργοποιούνται με την ήπια καταστροφή των ιστών κατά τη μυϊκή συστολή, είτε από το οξειδωτικό στρες, είτε από κάποιο τραυματισμό, μεταναστεύουν στη μολυσμένη περιοχή καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που απελευθερώνουν τα κατεστραμμένα κύτταρα. Με την άφιξή τους εκκρίνουν λυσοζύμη, η οποία προωθεί τη διάσπαση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και

κυτταρικών υπολειμμάτων (Ji, 1999). Επίσης εκκρίνουν $O_2^{\bullet-}$, που παράγεται από τη μυελοπεροξειδάση και τη NADPH οξειδάση σύμφωνα με την αντίδραση $NADPH + 2O_2 \rightarrow 2 O_2^{\bullet-} + NADP^+ + H^+$, προλαμβάνοντας έτσι την επέκταση της βακτηριακής μόλυνσης (Leewennburgh & Heinecke 2001) (εικόνα 8).



Εικόνα 8: Παραγωγή H_2O_2 από τα T λεμφοκύτταρα κατά τη φλεγμονώδη αντίδραση

Έχει διαπιστωθεί αυξημένη μετανάστευση ουδετερόφιλων στο σκελετικό μυ μετά από μία ποικιλία ασκήσεων (Maughan et al., 1989; MacIntyre et al., 2000; Fielding et al., 2000; Childs et al., 2000) και επομένως οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από τα φαγοκύτταρα στον κατεστραμμένο μυ μπορεί να είναι υπεύθυνες για την οξειδωτική βλάβη που παρατηρείται μετά την άσκηση (Leewennburgh & Heinecke 2001). Εν τούτοις, η μετακίνηση των ουδετερόφιλων απαιτεί αρκετό χρονικό διάστημα οπότε η συγκεκριμένη απόκριση ίσως να μην αποτελεί την κυριότερη πηγή ROS κατά την άσκηση, αλλά να αποτελεί ένα δευτερεύοντα μηχανισμό που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ROS κατά την περίοδο αποκατάστασης κυρίως μετά από αγωνίσματα μακράς χρονικής διάρκειας, όπως ο μαραθώνιος ή αμέσως μετά την έκκεντρη άσκηση (Møller et al., 1996).

Κατεχολαμίνες

Οι κατεχολαμίνες, τα επίπεδα των οποίων έχει βρεθεί ότι αυξάνονται σε περίπτωση παρατεταμένης άσκησης, αυξάνουν τον οξειδωτικό μεταβολισμό των μυών και του μυοκαρδίου μέσω ενεργοποίησης των β-αδρενεργικών υποδοχέων και ως εκ τούτου αυξάνεται η παραγωγή των ROS στα μιτοχόνδρια (Elosua et al., 2003). Επιπλέον, η αυτοοξειδωση της επινεφρίνης σε αδρενόχρωμα (adrenochrome) συνοδεύεται από την ταυτόχρονη παραγωγή $O_2^{\bullet-}$. Ωστόσο, η σημασία των κατεχολαμινών ως πηγής παραγωγής ROS κατά τη διάρκεια της άσκησης δεν έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό και συνεπώς παραμένει αδιευκρίνιστη (Elosua et al., 2003).

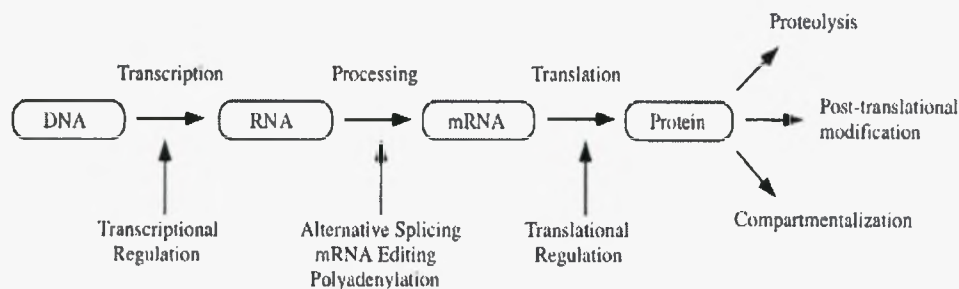
Συσσώρευση γαλακτικού οξέος

Κατά τον αναερόβιο μεταβολισμό και την έντονη άσκηση το γαλακτικό οξύ που παράγεται συσσωρεύεται και έτσι παρατηρείται τοπική πτώση του pH, η οποία επάγει την απελευθέρωση οξυγόνου από την αιμοσφαιρίνη. Επίσης, προκαλεί αύξηση της μερικής πίεσης του οξυγόνου στους ιστούς και μείωσή της στις αρτηρίες (φαινόμενο Bohr), (Ji 1999; Banerjee et al., 2003). Η πτώση του pH έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση σιδήρου από τις πρωτεΐνες που περιέχουν αίμη. Έτσι, η μυοσφαιρίνη και η αιμοσφαιρίνη επάγουν την παραγωγή ROS μέσω των ατόμων σιδήρου που διαθέτουν (Banerjee et al., 2003) σύμφωνα με τις αντιδράσεις:



11. Πρωτεωμική-Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων

Ο κλάδος της Πρωτεωμικής αναφέρεται στη μελέτη του πρωτεώματος σε ευρεία κλίμακα με τη χρήση τεχνικών υψηλής απόδοσης. Ο όρος πρωτέωμα προέρχεται από τις πρωτεΐνες που εκφράζονται στο γονιδίωμα (proteome, **protein complement of a genome**). Το πρωτέωμα δεν είναι ένα σταθερό χαρακτηριστικό των κυττάρων. Αντιθέτως, επειδή αντιπροσωπεύει τη λειτουργική έκφραση των πληροφοριών, τροποποιείται ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, το αναπτυξιακό στάδιο και τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Το πρωτέωμα είναι πολύ μεγαλύτερο από το γονιδίωμα λόγω της ύπαρξης παραγόντων όπως το εναλλακτικό μάτισμα των μεταγράφων, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, η χρονική ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης και οι πολλές τροποποιούμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Σε αντίθεση με το γονιδίωμα, το πρωτέωμα δεν είναι στατικό (εικόνα 9), (Wilkins et al., 1996).



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση των κυτταρικών διαδικασιών που συμμετέχουν στη δημιουργία φαινότυπου και η σχέση τους στο πρωτέωμα.

Οι πρωτεωμικές αναλύσεις εστιάζουν τη δράση τους στο χαρακτηρισμό και τη μελέτη του συνόλου των πρωτεϊνών ενός βιολογικού υλικού (κύτταρα, ιστούς, βιολογικά υγρά, υλικό βιοψίας κλπ.). Έχουν ως στόχο να αναγνωρίσουν, όχι μόνο τις αλλαγές στην πρωτεϊνική έκφραση, αλλά και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών, την κυτταρική και υπο-κυτταρική διανομή τους και τα χρονολογικά πρότυπα έκφρασης (Verrills 2006). Ο σκοπός της διαφορικής και λειτουργικής πρωτεωμικής είναι η κατανόηση των κυτταρικών μονοπατιών και των μεταξύ τους σχέσεων στα κύτταρα και στους ζωντανούς οργανισμούς.

Συγκεκριμένα, η πρωτεωμική περιλαμβάνει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών, την αναγνώριση αυτών και το χαρακτηρισμό της φύσης και της θέσης των πρωτεϊνικών τροποποιήσεων. Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-DE ή 2-D ηλεκτροφόρηση) και η φασματοσκοπία μάζας (mass spectrometry, MS) αποτελούν τις κύριες τεχνικές της πρωτεωμικής ανάλυσης. Η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων είναι μια μορφή ηλεκτροφόρησης πηκτωμάτων που χρησιμοποιείται κατεξοχήν για το διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα.

Η μελέτη των πρωτεϊνών (proteomics), ειδικά της δομής και λειτουργίας τους, έχει τις ρίζες της στις αναλυτικές βιοχημικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον πρωτεϊνικό διαχωρισμό. Οι πρώτοι πρωτεϊνικοί διαχωρισμοί υψηλής ευκρίνειας επιτεύχθηκαν από τη δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων το 1975. Πρωτοπόροι στον τομέα των Proteomics, όπως ο Leigh Anderson, είδαν τις δυνατότητες της 2DE προς τα τέλη της δεκαετίας του '70 ως μηχανισμού για την πραγματοποίηση μελετών των πρωτεϊνών και των λευκοκυττάρων του αίματος. Επιπλέον, η συνεχής παραγωγή πηκτωμάτων εμπόδισε την επέκταση της τεχνικής μέχρι την εισαγωγή των ακινητοποιημένων βαθμιαίων μεταβολών pH (IPGs) το 1982 και την πολύ βελτιωμένη δεύτερη γενιά IPGs προς το τέλος της δεκαετίας του '80. Αυτό συνέπεσε με την ανάπτυξη των τεχνικών ιονισμού φασματοσκοπίας μάζας για τα πεπτίδια, που επιτρέπουν τον πρωτεϊνικό προσδιορισμό και χαρακτηρισμό σε μια μεγάλη κλίμακα. Έκτοτε η 2DE έχει χρησιμεύσει στη διεξαγωγή διαφόρων εργασιών όπως την πρωτεϊνική ανάλυση του ανθρώπινου πλάσματος (Choi et al., 2006) και τη μελέτη του παράσιτου της ελονοσίας *Plasmodium falciparum*, που είχε ως αποτέλεσμα την αναγνώριση νέου πιθανού φαρμακευτικού στόχου (Lasonder et al., 2002; Nilsson 2002).

Η 2-DE χρησιμοποιείται, γενικά, ως μέσο για την απομόνωση των πρωτεϊνών για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό τους με τη φασματοσκοπία μάζας. Τα μίγματα πρωτεϊνών διαχωρίζονται βάσει δύο ιδιοτήτων σε δύο διαστάσεις (2D) στα πηκτώματα. Αυτό επιτρέπει στο δείγμα να διαχωριστεί σε μια μεγαλύτερη περιοχή, αυξάνοντας έτσι την ανάλυση κάθε συστατικού (Gorg et al., 2000). Στο εργαστήριο, η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για δύο κύριους λόγους. Αρχικά για τον μεγάλης κλίμακας προσδιορισμό όλων των πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Αυτό αναλαμβάνεται όταν ερευνάται η ολική πρωτεϊνική έκφραση ενός οργανισμού ή ενός ιστού και διεξάγεται καλύτερα σε

οργανισμούς μοντέλα των οποίων το γονιδίωμα έχει πλήρως αλληλουχηθεί. Κατ' αυτό τον τρόπο οι απομονωμένες πρωτεΐνες μπορούν να προσδιοριστούν ευκολότερα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας μάζας.

Η δεύτερη χρήση αυτής της τεχνικής είναι η διαφορική έκφραση, όπου συγκρίνονται δύο ή περισσότερα δείγματα για τον εντοπισμό διαφορών στην πρωτεϊνική έκφρασή τους. Για παράδειγμα, μπορεί να ερευνηθεί η ανθεκτικότητα ενός παρασίτου σε φάρμακα. Σε αυτή την περίπτωση μπορεί να επιθυμείται η σύγκριση ενός ανθεκτικού οργανισμού με έναν επιρρεπή σε μια προσπάθεια εντοπισμού των διαφορών που είναι υπεύθυνες για την ανθεκτικότητα. Εδώ, οι απαιτήσεις αλληλούχησης δεν είναι σημαντικές, καθώς ερευνηθεί ένας σχετικά μικρός αριθμός διαφορών και έτσι μπορεί να διατεθεί περισσότερος χρόνος για τον χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών.

12. Εφαρμογές πρωτεωμικής

Τα πεδία δράσης της πρωτεωμικής έρευνας μπορούν να διακριθούν, ανάλογα με το σκοπό και με τη λειτουργία τους, στις ακόλουθες κατηγορίες:

- α. Ταξινόμηση πρωτεϊνών (protein mining): Δημιουργία καταλόγου πρωτεϊνών που εντοπίζονται σε ένα ιστό, κύτταρο ή οργανίδιο (εικόνα 10).

Structure	Proteins	Method
ER: microsomes ^b	491	ICAT/MudPIT
Spliceosome	311	Aff/1D-PAGE/GPF LC/MS/MS
Nucleolus	271	1D-PAGE/ESI/MS/MS
Nuclear envelope	148	2D-PAGE/PMF/PSD
Peroxisomes	181	GPF LC/MS/MS
Mitochondrion	179	1D-PAGE/LC/MS/MS
Phagosome	140	LB/2D-PAGE/ESI/MS/MS
Golgi	81	1D-PAGE/Edman/PMF/ESI/MS/MS
Chloroplast	81	2D-PAGE/Edman/PMF/ESI/MS/MS
Lysosomes	27	2D-PAGE/PMF/ESI/MS/MS
Exosomes	21	1D-PAGE/PMF/ESI/MS/MS

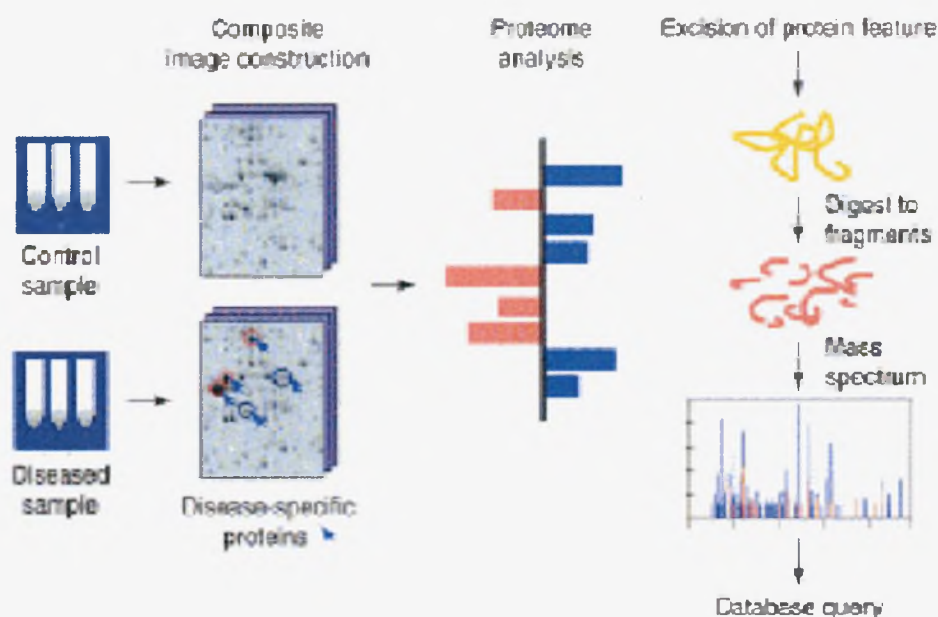
^aAbbreviations: Aff, affinity capture; ER, endoplasmic reticulum; ESI, electrospray ionization (static nanospray); GPF, gas phase fractionation; ICAT, isotope coded affinity tagging; LB, latex bead encapsulation; LC/MS/MS, liquid chromatography-

Εικόνα 10: Λίστα οργανιδίων με τον αντιπροσωπευτικό, για το καθένα, αριθμό πρωτεϊνών που έχουν τακτοποιηθεί με τη χρήση των μεθόδων πρωτεωμικής (Taylor et al., 2003).

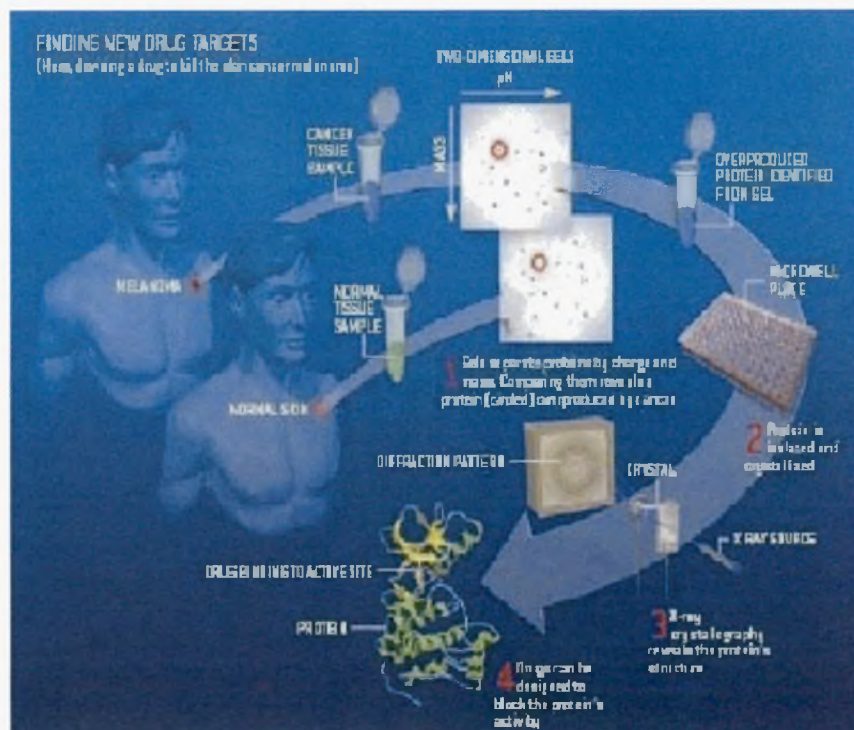
- β. Πρότυπο διαφορικής έκφρασης (Differential Expression Profiling): Αναγνώριση πρωτεϊνών ενός δείγματος ως προς τη λειτουργία που επιτελούν σε μια συγκεκριμένη κατάσταση, η οποία μπορεί να αφορά διαφοροποίηση, στάδιο ανάπτυξης, κατάσταση μιας ασθένειας, απόκριση σε φάρμακο ή ερέθισμα. Η αναγνώριση του προτύπου διαφορικής έκφρασης πρωτεϊνών αποτελεί ουσιώδες

εργαλείο, τόσο για τη διάγνωση ασθενειών όσο και για την καταπολέμησή τους, στις ακόλουθες υποκατηγορίες:

- Πρωτεωμική των ασθενειών (Proteomics of disease), (εικόνα 11).
- Πρωτεωμική για παθογόνα (Proteomics for pathogen).
- Πρωτεωμική ταυτότητας (ID proteomics).
- Φαρμακολογική επίδραση (Drug impact), (εικόνα 12).
- Κύκλωμα διαγνωστικής πρωτεΐνης (Diagnostic protein Chip).



Εικόνα 11: Διαδικασία ελέγχου ασθενούς πρωτεώματος. Οι δοκιμασίες ελέγχου (screening tests) που βασίζονται στην πρωτεωμική συγκρίνουν τις πρωτεΐνες που εκφράζονται στο αίμα ή σε ένα δείγμα ιστού με πρωτεΐνες ασθενών για τους οποίους είναι γνωστό ότι πάσχουν από μία συγκεκριμένη ασθένεια. Αυτή η τεχνολογία έχει αναγνωρίσει πρωτεΐνες που αποτελούν πιθανούς διαγνωστικούς ή προγνωστικούς δείκτες ή και θεραπευτικούς στόχους σε μία ομάδα ασθενειών (Vivanco et al., 2008).

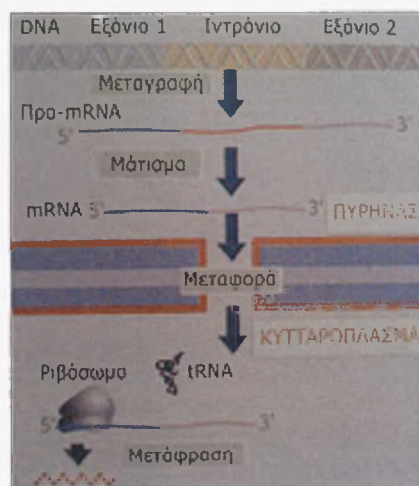


Εικόνα 12: Διαδικασία ανεύρεσης πιθανών φαρμακευτικών στόχων για την καταπολέμηση του καρκίνου. 1) Αρχικά οι πρωτεΐνες από δείγματα 2-D ηλεκτροφόρησης ασθενών (καρκινικά) και κανονικών ατόμων συγκρίνονται για τον εντοπισμό των πρωτεϊνών που υπερπαράγονται από τον καρκίνο. 2) Ακολούθως η πρωτεΐνη απομονώνεται και κρυσταλλώνεται. 3) Η X-ray κρυσταλλογραφία αποκαλύπτει τη δομή της πρωτεΐνης. 4) Φάρμακα μπορούν να σχεδιαστούν για να αναστείλουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης (π.χ. με δέσμευση στο ενεργό κέντρο) (Scientific American 2002).

- γ. Χαρτογράφηση δικτύων (Network Mapping): Αναγνώριση πρωτεϊνών σε λειτουργικά δίκτυα, βιοσυνθετικά μονοπάτια, μονοπάτια σηματοδότησης, πολυπρωτεϊνικά συστήματα.
- δ. Χαρτογράφηση πρωτεϊνικών τροποποιήσεων (Mapping Protein Modifications): Χαρακτηρισμός μετεμεταφραστικών τροποποιήσεων όπως φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση, οξειδωση.

13. Πρωτεωμική στην άσκηση - πρωτεϊνική σύνθεση

Πρωτεϊνική σύνθεση καλείται η διαδικασία με την οποία οι πρωτεΐνες σχηματίζονται μέσω μεταγραφής και μετάφρασης καθορισμένων τμημάτων DNA (εικόνα 9). Η έναρξη της μεταγραφής πραγματοποιείται με την πολυμεράση, ένα ένζυμο που αντιγράφει την αλληλουχία DNA σε ένα πανομοιότυπο μόριο που καλείται αγγελιαφόρο RNA (messenger RNA, mRNA). Ο μηχανισμός περιλαμβάνει αντικατάσταση της θυμίνης (T) με ουρακίλη (U), μια βοηθητική βάση, έτσι ώστε να είναι ξεκάθαρο πως το mRNA είναι ένα αντίγραφο. Οι βάσεις (A, T, G, C) στη μία αλυσίδα DNA καθορίζουν την αλληλουχία βάσεων στην καινούργια αλυσίδα mRNA (A, U, G, C). Το DNA παραμένει μέσα στον πυρήνα καθ'όλη τη διαδικασία, αλλά το mRNA ταξιδεύει έξω στο κυτόπλασμα. Κατά τη μετάφραση, το ριβόσωμα στο κυτταρόπλασμα χρησιμοποιεί το μεταφορικό RNA (transfer RNA, tRNA) για να προσδεθεί στο mRNA και να μεταφράσει τις βάσεις σε αμινοξέα. Τα tRNA μόρια μεταφέρουν τα συγκεκριμένα αμινοξέα, τα οποία το ριβόσωμα συνδέει μεταξύ τους για να σχηματίσουν μια πρωτεΐνη.



Εικόνα 13: Από το DNA στην πρωτεΐνη. Το γονίδιο χρησιμεύει σαν ταμπλέτα για τη σύνθεση μίας πρωτεΐνης.

Η πρωτεωμική εξετάζει τις ολικές αλλαγές στο μυϊκό πρωτέωμα ως απόκριση στη γήρανση (Cobon et al., 2002), σε διάφορες ασθένειες και στη διατροφή (Schmid et al., 2004). Ωστόσο, αυτή η πειραματική προσέγγιση δεν έχει εφαρμοστεί σε μεγάλο βαθμό στην εξέταση του σκελετικού μυϊκού πρωτεώματος ως απόκριση στην άσκηση.

Οι αλλαγές στα επίπεδα μιας συγκεκριμένης μυϊκής πρωτεΐνης μπορεί να οφείλονται σε αλλαγή στο ρυθμό της σύνθεσης (Dohm et al., 1985), της αποικοδόμησης (Dohm et al. 1980) ή ενός συνδυασμού και των δύο μηχανισμών (Kasperek et al., 1985). Κατά τη διάρκεια αερόβιας άσκησης το ποσοστό σύνθεσης μυϊκών πρωτεϊνών μειώνεται ελαφρώς αλλά όχι σημαντικά (Wolfe 1982). Αντίθετα μετά από 4 ώρες αποκατάστασης από τη μυϊκή άσκηση η πρωτεϊνική σύνθεση αυξάνεται σημαντικά (Carraro et al., 1991). Από αυτήν την παρατήρηση τουλάχιστον δύο σημαντικές ερωτήσεις προκύπτουν: (1) πώς η σύνθεση μυϊκών πρωτεϊνών διατηρείται κατά τη διάρκεια της άσκησης ακόμα κι αν η οξειδωση αμινοξέος (συμπεριλαμβανομένης της λευκίνης) αυξάνεται, και (2) πώς η σύνθεση μυϊκών πρωτεϊνών αυξάνεται στην αποκατάσταση παρά την απουσία πρόσληψης αμινοξέων;

Ο προτεινόμενος μηχανισμός, αρμόδιος για τη διατήρηση της μυϊκής σύνθεσης κατά τη διάρκεια της άσκησης είναι θεωρητικός τουλάχιστον σε κάποια έκταση. Προτείνεται ότι το άζωτο (N) που απελευθερώνεται από το μυ και το ήπαρ σε ένα αυξανόμενο ποσοστό κατά την άσκηση τρανσαμινώνεται στα διάφορα αμινοξέα και ενσωματώνεται στις πρωτεΐνες γρήγορης αναστροφής (rapidly turn-over proteins) αντί να ενσωματώνεται στην ουρία και να εκκρίνεται στα ούρα. Άλλα αμινοξέα απαραίτητα για την πλήρη σύνθεση των πρωτεϊνών προέρχονται από ένα συνεχώς αυξανόμενο καταβολισμό πρωτεϊνών των εντέρων, που οφείλεται στην περιορισμένη ροή αίματος στα έντερα κατά την άσκηση. Αυτές οι ηπατικές πρωτεΐνες εκκρίνονται έπειτα στο πλάσμα σε ένα αυξανόμενο ποσοστό, απελευθερώνονται διαδοχικά και καταβολίζονται ως ένα ορισμένο βαθμό στο μυ, παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο ένα μηχανισμό για να μεταφέρουν το αμινο άζωτο από το έντερο στο μυ κατά τη διάρκεια της άσκησης.

Υπάρχει μια σειρά στοιχείων που στηρίζουν αυτή τη θεωρία: (1) η παραγωγή ουρίας δεν αυξάνεται κατά την άσκηση (Wolfe et al., 1982; Carraro & Wolfe 1992), (2) οι πρωτεΐνες γρήγορης αναστροφής του πλάσματος συντίθενται σε ένα αυξανόμενο βαθμό ως απόκριση στην άσκηση (Carraro et al., 1990), (3) οι πρωτεΐνες του πλάσματος μπορούν να συνεισφέρουν στο σύνολο των μυϊκών αμινο οξέων (Komjatt & Waldhausl 1989), και (4) η καθαρή απελευθέρωση του αμινο αζώτου από το έντερο αυξάνεται κατά την άσκηση των σκύλων (Wasserman et al., 1991).

Το ερώτημα για το πώς αυτή η γενική διαδικασία μπορεί να προχωρήσει χωρίς έναν ισορροπημένο ανεφοδιασμό σε αμινοξέα (λόγω της αυξανόμενης οξειδωσης των ουσιαστικών αμινοξέων) παραμένει αναπάντητο αλλά πρέπει να θεωρηθεί ότι η άσκηση έχει μια πεπερασμένη διάρκεια και υπάρχει η δυνατότητα ύπαρξης μίας ασταθούς κατάστασης στο σύνολο των αμινοξέων κατά την άσκηση.

Η αυξανόμενη σύνθεση μυϊκών πρωτεϊνών κατά την αποκατάσταση μπορεί να εξηγηθεί κατά ένα μεγάλο βαθμό από μια μείωση του ποσοστού οξειδωσης των αμινοξέων. Η οξειδωση λευκίνης μειώνεται κατά την αποκατάσταση (Devlin et al., 1990). Η οξειδωση της λευκίνης αυξάνεται μέσω ενεργοποίησης της αλυσίδας της δευδρογενάσης άλφα-κέτο οξέος (branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase, BCKDH). Η δραστηριότητα της BCKDH αυξάνεται κατά την άσκηση μειώνοντας τη συγκέντρωση της λευκίνης στο πλάσμα και διακυτταρικά. Μετά την άσκηση κατά την αποκατάσταση της μυϊκής πρωτεϊνικής σύνθεσης απαιτείται διαιτολόγιο πλούσιο σε πρωτεΐνες ή λευκίνη για την αύξηση των επιπέδων λευκίνης των ιστών με σκοπό την επαγωγή του συμπλέγματος των παραγόντων έναρξης μετάφρασης 4 (4E, 4G και ριβοσωμική πρωτεΐνη S6) μέσω ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης των θηλαστικών στόχο της ραπαμυκίνης (mTOR). Η επίδραση της λευκίνης στον mTOR είναι συνεργική με την ινσουλίνη μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού της κινάσης της φωσφοϊνσοσιτόλης 3. Η λευκίνη μαζί με την ινσουλίνη επιτρέπουν στο σκελετικό μυ να ρυθμίζει τη πρωτεϊνική σύνθεση ανάλογα με τη κατάσταση της φυσιολογίας και τη διαιτολογική πρόσληψη, επάγοντας τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης 4 (Norton & Layman 2006). Επίσης, έχει αποδειχτεί πως τα ένζυμα Akt, mTOR, p70(S6K), rpS6, GSK3 και η συνθάση του γλυκογόνου αλληλέπιδρούν για τον έλεγχο της σύνθεσης των πρωτεϊνών και του γλυκογόνου στους σκελετικούς μύες και κάθε ένα από αυτά αποκρίνεται στην άσκηση (Ivy et al., 2008).

14. Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξετάσει ποιοτικά την επίδραση της άσκησης στην έκφραση πρωτεϊνών στον υποκνημίδιο μυ επίμυων.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΟΛΑ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΑΠΟΚΤΗΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΤΑΙΡΙΑ SIGMA-ALDRICH (ST. LOUIS, MO, USA).

1. Τρόπος χειρισμού και χαρακτηριστικά των επιμύων

Για την πραγματοποίηση της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν 8 ένηβοι αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar, οι οποίοι αποκτήθηκαν από το Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur. Οι επίμυες ήταν ηλικίας 8 εβδομάδων και βάρους 220 ± 10 gr και διατηρήθηκαν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος (εναλλαγή φωτός και σκότους ανά 12 ώρες και θερμοκρασία 20°C). Χωρίστηκαν σε κλουβιά των δύο και η τροφή και το νερό διατίθονταν ελεύθερα. Το πείραμα αξιολογήθηκε και εγκρίθηκε από την επιτροπή προστασίας ζώων του πανεπιστημίου. Όλες οι διαδικασίες ήταν σύμφωνες με τον οδηγό φροντίδας και χρήσης των εργαστηριακών ζώων (1996, National Academy Press, 2101 Constitution Ave. NW, Washington, DC 20055, USA). Το μοντέλο άσκησης που εφαρμόστηκε ήταν η κολύμβηση μέχρι εξάντλησης. Η θανάτωση των επιμύων έγινε αμέσως μετά την άσκηση.

2. Εξοικείωση

Κατά την άφιξη τους, οι επίμυες αφήθηκαν για 7 μέρες στον πειραματικό χώρο ώστε να εγκλιματιστούν χωρίς να υποστούν κάποια μεταχείριση. Στη συνέχεια, σε 4 από αυτούς ξεκίνησε η εξοικείωση με το νερό για 5 μέρες πριν ξεκινήσει η εφαρμογή του πρωτοκόλλου κολύμβησης. Την πρώτη μέρα εξοικείωσης οι 4 επίμυες μπήκαν στο νερό για 10 λεπτά χωρίς βάρος στην ουρά τους. Τις επόμενες δύο μέρες οι 4 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 4 επίμυες αναπαύθηκαν για 3 μέρες πριν ξεκινήσει η εφαρμογή του πρωτοκόλλου.

3. Πρωτόκολλο κολύμβησης

Οι 4 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 πρωτόκολλο της κολύμβησης που εφαρμόστηκε επιλέχθηκε διότι προκαλεί την μικρότερη μυϊκή καταστροφή σε σύγκριση με το τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο (Duarte et al., 1994).

4. Θανάτωση των επιμύων, συλλογή και ομογενοποίηση των δειγμάτων

Οι 8 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 με 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).

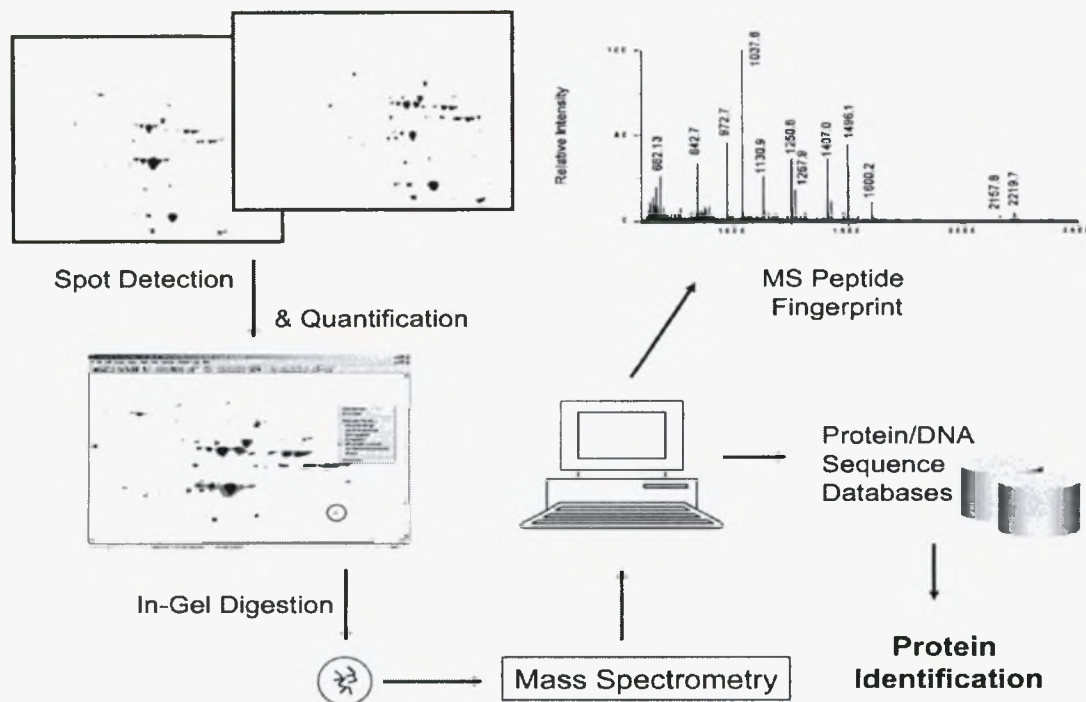
5. Αρχή της μεθόδου

Η ΛΕΠΤΟΜΕΡΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΠΟΥ ΑΚΟΛΟΥΘΗΘΗΚΕ ΕΙΝΑΙ ΚΑΤΑΓΡΑΜΜΕΝΗ ΣΤΟ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.

Η όλη διαδικασία της απομόνωσης και χαρακτηρισμού των πρωτεϊνών μπορεί να διακριθεί σε τρία αυτοτελή, διαδοχικά μέρη (εικόνα 14). Αρχικά, με την ηλεκτροφόρηση δυο διαστάσεων οι πρωτεΐνες κατανέμονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο και το μοριακό τους βάρος σε όλο το μήκος ενός πηκτώματος σε ευδιάκριτες κηλίδες. Κάθε κηλίδα είναι μια πρωτεΐνη, έτσι είναι πλέον δυνατός ο εντοπισμός διαφορών συγκριτικά με το πήκτωμα μάρτυρα, είτε με γυμνό μάτι, είτε με τη χρήση σχετικών προγραμμάτων ηλεκτρονικού υπολογιστή. Αφού εντοπιστούν οι προς μελέτη πρωτεΐνες αποκόπτονται από το πήκτωμα και χαρακτηρίζονται με τη φασματοσκοπία μάζας (mass spectrometry, MS). Με την MS ανιχνεύονται και καταγράφονται διάφορες φασματοσκοπικές κορυφές που αντιστοιχούν στα αμινοξέα της πρωτεΐνης, λαμβάνεται δηλαδή ένα πεπτιδικό αποτύπωμα της πρωτεΐνης. Χάρη στη μοναδικότητα που παρουσιάζει η κάθε πρωτεΐνη

στην ποσοτική και ποιοτική περιεκτικότητα της σε αμινοξέα μπορεί να χαρακτηριστεί ανάλογα.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε 2-DE πρωτεϊνών του υποκνημίδιου μύος (soleus) (εικόνα 15) επιμύων. Τα δείγματα μύος συλλέχθηκαν αμέσως μετά το πέρας της άσκησης των επιμύων, έτσι εξετάστηκε ποιοτικά η επίδραση της άσκησης στην πρωτεϊνική έκφραση κατά τη διάρκεια της άσκησης και όχι κατά την περίοδο αποκατάστασης. Ο υποκνημίδιος μύς επιλέχθηκε λόγω της φυσιολογίας της συγκεκριμένης άσκησης που επιβάλλει την έντονη λειτουργία του υπό μελέτη μύος.



Εικόνα 14: Διάγραμμα ροής της διαδικασίας ανίχνευσης πρωτεϊνών πηκτώματος 2-DE με τη χρήση προγράμματος υπολογιστή και φασματοσκοπία μάζας. Διακρίνονται οι κηλίδες στο πηκτώμα και οι φασματομετρικές κορυφές.



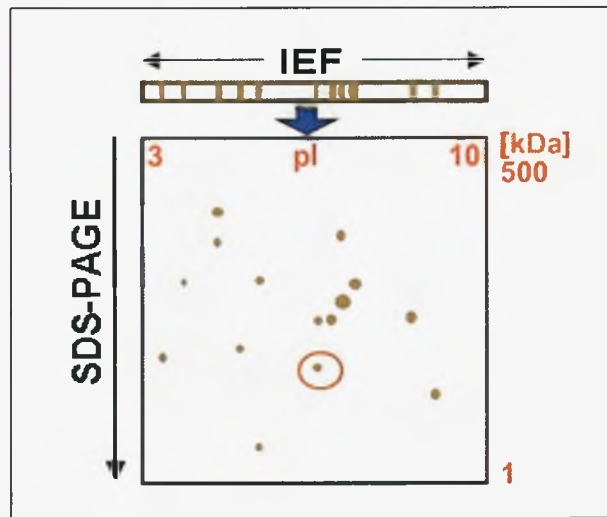
Εικόνα 15: Απεικόνιση της ανατομίας μυών των πίσω ποδιών. Είναι ευδιάκριτη η θέση των υποκνημίδιων μυών (soleus).

Ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων

Η 2-D ηλεκτροφόρηση ολοκληρώνεται σε δυο φάσεις (εικόνα 16):

1) την ισοηλεκτρική εστίαση – πρώτη διάσταση (isoelectric focusing, IEF) (Richetti 1983). Σε αυτή τη φάση οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI), το pH, δηλαδή, στο οποίο έχουν ολικό ηλεκτρικό φορτίο 0. Βιολογικά επαμφοτερίζοντα μόρια, όπως είναι οι πρωτεΐνες μπορεί να περιέχουν τόσο όξινες όσο και βασικές λειτουργικές ομάδες. Τα αμινοξέα από τα οποία αποτελούνται οι πρωτεΐνες μπορεί στη φύση να είναι φορτισμένα θετικά, αρνητικά, ή ουδέτερα. Σε ένα pH κάτω από το pI τους, οι πρωτεΐνες έχουν θετικό ολικό φορτίο ενώ πάνω από το pI τους έχουν αρνητικό ολικό φορτίο. Έτσι, οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο σε ένα πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

2) την SDS ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων πολυακρυλαμιδίου (SDS polyakrilamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) - δεύτερη διάσταση. Στη φάση αυτή οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μέγεθός τους (μοριακό βάρος, MB).



Εικόνα 16: Τρόπος διαχωρισμού πρωτεϊνών στα πηκτώματα. Οριζόντια διαχωρίζονται ως προς το ισοηλεκτρικό τους σημείο, ενώ κατακόρυφα ως προς το μοριακό τους βάρος. Ακολούθως η πρωτεΐνη που παρουσιάζει ενδιαφέρον αποκόπτεται από το πηκτώμα και ταυτοποιείται με φασματοσκοπία μάζας.

Ηλεκτροφόρηση είναι η μετανάστευση φορισμένων μορίων σε διάλυμα ως απόκριση σε ένα ηλεκτρικό φορτίο. Ο ρυθμός μετανάστευσής τους εξαρτάται από τη δύναμη του πεδίου, το ολικό τους φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα τους, καθώς και την ιοντική δύναμη, το ιξώδες και τη θερμοκρασία του μέσου στο οποίο τα μόρια κινούνται. Ως εργαλείο ανάλυσης, η ηλεκτροφόρηση είναι απλή, γρήγορη και ιδιαίτερα ευαίσθητη. Χρησιμοποιείται αναλυτικά για τη μελέτη των ιδιοτήτων ενός φορισμένου είδους αλλά και ως τεχνική διαχωρισμού. Συγκεκριμένα, το δείγμα τρέχει σε μια μήτρα υποστήριξης, όπως χαρτί, εστέρα κυτταρίνης, πηκτώμα αγαρόζης, αμύλου ή και πολυακρυλαμίδιου. Η μήτρα κατά τη μεταφορά εμποδίζει τη μίξη που προκαλείται από τη θέρμανση.

Επιπλέον, οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μήτρες υποστήριξης, αγαρόζη και πολυακρυλαμίδιο, παρέχουν τα μέσα για το διαχωρισμό των μορίων με βάση το μέγεθός τους δεδομένου ότι είναι πορώδη πηκτώματα. Ένα πορώδες πηκτώμα μπορεί να ενεργήσει ως κόσκινο προκαλώντας την καθυστέρηση ή ακόμα και πλήρη παρεμπόδιση της κίνησης μεγάλων μακρομορίων ενώ παράλληλα επιτρέποντας σε μικρότερα μόρια την ελεύθερη μετανάστευση. Επειδή τα αραιά πηκτώματα αγαρόζης είναι γενικά πιο άκαμπτα και ευκολότερα στη χρήση από τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδιου της ίδιας συγκέντρωσης, η αγαρόζη χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μεγαλύτερων μακρομορίων, όπως είναι τα νουκλεϊνικά οξέα, οι μεγάλες πρωτεΐνες και τα πρωτεϊνικά

συγκροτήματα. Το πολυακρυλαμίδιο, που εύκολα μπορεί να σχηματιστεί και να γίνει αντικείμενο χειρισμού σε υψηλότερες συγκεντρώσεις χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των περισσότερων πρωτεϊνών και μικρών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία απαιτούν μικρό μέγεθος πόρου πηκτώματος για την επιβράδυνσή τους.

Οι πρωτεΐνες είναι επαμφοτερίζουσες ενώσεις και επομένως το ολικό τους φορτίο καθορίζεται από το pH του μέσου στο οποίο είναι αναρτημένες. Σε ένα διάλυμα με ένα pH πάνω από το ισοηλεκτρικό της σημείο, μια πρωτεΐνη έχει αρνητικό ολικό φορτίο και μεταναστεύει προς την άνοδο σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Κάτω από το ισοηλεκτρικό της σημείο, η πρωτεΐνη φορτίζεται θετικά και μεταναστεύει προς την κάθοδο. Επιπλέον, το ολικό φορτίο που φέρει μια πρωτεΐνη είναι ανεξάρτητο από το μέγεθός της, δηλαδή, το φορτίο που φέρεται ανά μονάδα μάζας (ή μήκους, δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊνικά οξέα είναι γραμμικά μακρομόρια) του μορίου διαφέρει από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη. Επομένως σε ένα συγκεκριμένο pH και υπό τους όρους μη-μετουσίωσης, ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός των πρωτεϊνών καθορίζεται τόσο από το μέγεθος όσο και από το φορτίο των μορίων.

Το θειικό άλας νατρίου (Sodium dodecyl sulphate, SDS) είναι ένα ανιονικό απορρυπαντικό που μετουσιώνει τις πρωτεΐνες με «το τύλιγμα γύρω από» τη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Επίσης, το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες αρκετά εξειδικευμένα σε αναλογία μάζας 1.4:1. Με αυτές τις ενέργειες, το SDS παρέχει ένα αρνητικό φορτίο στο πολυπεπτιδίο αναλογικά προς το μήκος του, δηλαδή, μετουσιωμένα πολυπεπτιδία γίνονται «ράβδοι» αρνητικά φορτισμένου σύννεφου με ίσο φορτίο ή πυκνότητες φορτίου ανά μονάδα μήκους. Είναι συνήθως απαραίτητο να μειωθούν οι γέφυρες δισουλφιδίου στις πρωτεΐνες προτού να υιοθετήσουν την τυχαία εσπειραμένη διαμόρφωση, η οποία είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό με βάση το μέγεθος: αυτό γίνεται με 2-μερκαπτοαιθανόλη (2-mercaptoethanol) ή διθιοθρεϊτόλη (dithiothreitol). Επομένως, η μετανάστευση καθορίζεται όχι από το εγγενές ηλεκτρικό φορτίο του πολυπεπτιδίου, αλλά από το μοριακό του βάρος.

Ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με το παραλληλισμό των αποτελεσμάτων της SDS-PAGE των πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους σε σχέση με αυτά των υπό χαρακτηρισμό πρωτεϊνών. Γραμμική σχέση υπάρχει μεταξύ του λογαρίθμου του μοριακού βάρους ενός SDS- μετουσιωμένου πολυπεπτιδίου,

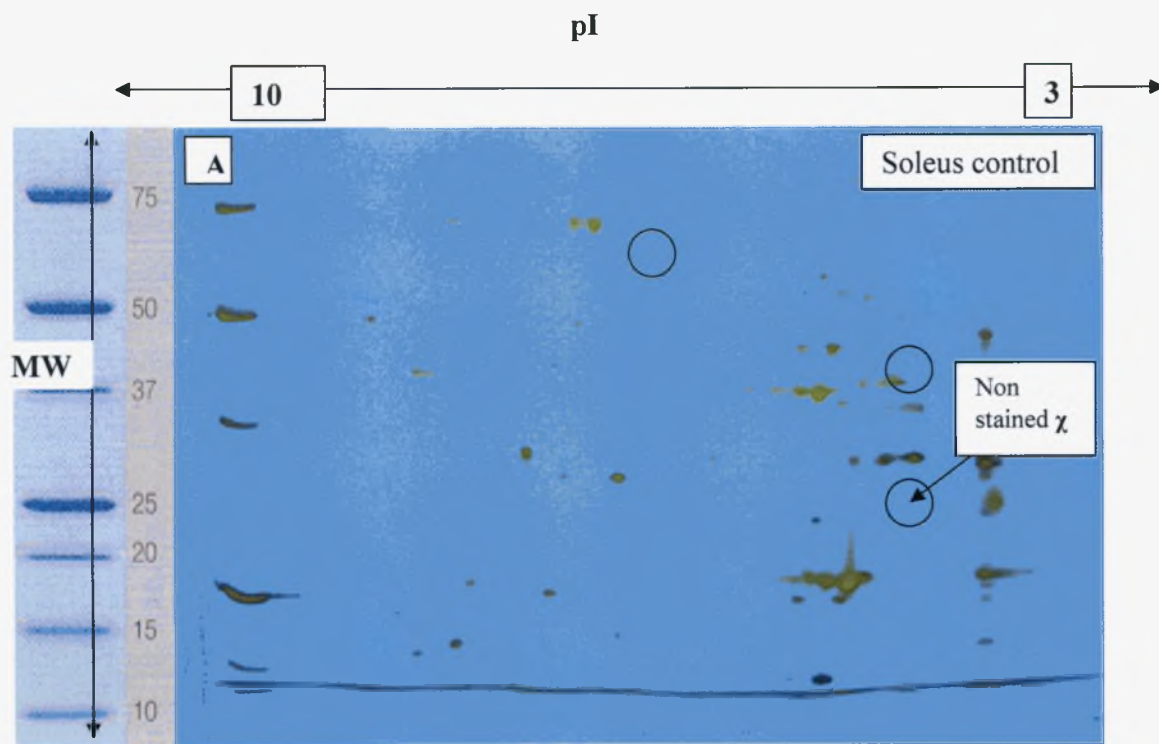
ή ενός νουκλεϊνικού οξέος και του R_f του. Το R_f ορίζεται ως η αναλογία της απόστασης μετανάστευσης ενός μορίου προς αυτή που μετανάστευσε ένας χρωματισμένος μάρτυρας. Ένας απλός τρόπος υπολογισμού του σχετικού μοριακού βάρους (M_r) με ηλεκτροφόρηση είναι ο σχεδιασμός μιας πρότυπης καμπύλης της απόστασης που μετανάστευσε προς το $\log_{10} M_r$ για τα γνωστά δείγματα και την αφαίρεση του $\log M_r$ του δείγματος αφού μετρηθεί η απόσταση που μετανάστευσε στο ίδιο πήκτωμα.

Υπάρχουν δύο τύποι συστημάτων ρυθμιστικών διαλυμάτων στην ηλεκτροφόρηση, τα συνεχή και τα ασυνεχή. Ένα συνεχές σύστημα έχει μόνο ένα ενιαίο πήκτωμα διαχωρισμού και χρησιμοποιεί το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα στις δεξαμενές και το πήκτωμα. Σε ένα ασυνεχές σύστημα, ένα μη περιοριστικό πήκτωμα με μεγάλους πόρους, αποκαλούμενο πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel) είναι τοποθετημένο σε στρώσεις πάνω από ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Κάθε πήκτωμα γίνεται με ένα διαφορετικό ρυθμιστικό διάλυμα και τα ρυθμιστικά των δεξαμενών είναι διαφορετικά από τα ρυθμιστικά των πηκτωμάτων. Η ανάλυση που πετυχαίνεται σε ένα ασυνεχές σύστημα είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή που λαμβάνεται με ένα συνεχές σύστημα.

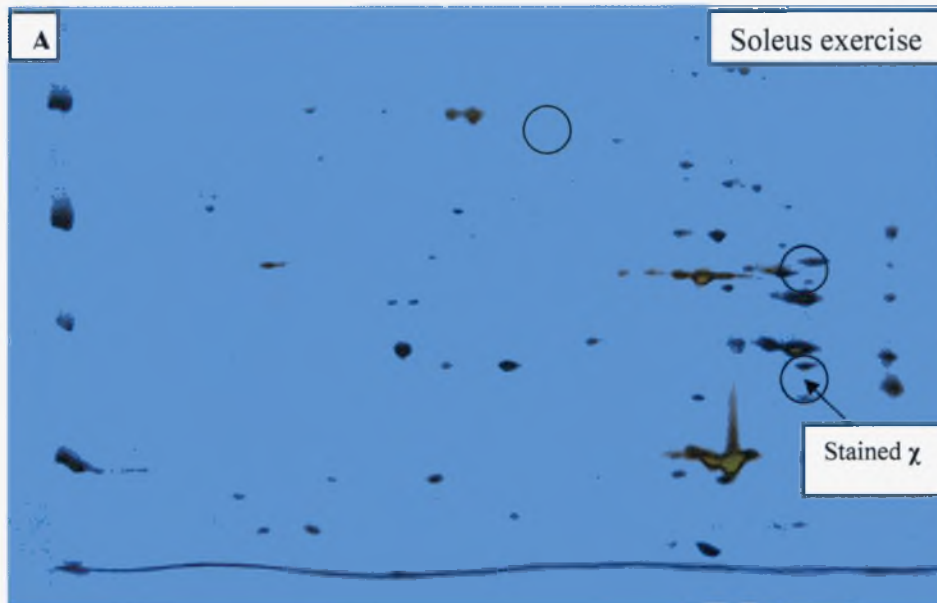
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι εικόνες 17, 18 και 19, 20 είναι αποτελέσματα δύο 2-D ηλεκτροφορήσεων Α και Β αντίστοιχα και αποτελούν ενδεικτικά δείγματα για το σύνολο των οκτώ 2-D ηλεκτροφορήσεων που έχουν πραγματοποιηθεί στη παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα, οι εικόνες 17 και 18 είναι τα πηκτώματα 2-DE υποκνημίδιου μύος μη ασκούμενου επίμυος (control) και ασκούμενου επίμυος αντίστοιχα. Στην αριστερή πλευρά του πηκτώματος της εικόνας 17 είναι τοποθετημένη η κλίμακα μοριακών βαρών του μάρτυρα. Η πορεία του μάρτυρα στο πήκτωμα σε σύγκριση με την κλίμακα μπορεί να δώσει ενδεικτικές τιμές για τα μοριακά βάρη των κηλίδων των πρωτεϊνών που σχηματίστηκαν στο πήκτωμα, ενώ παράλληλα αποτελεί ένδειξη σωστού ηλεκτροφορητικού τρεξίματος. Επίσης, το pH των πρωτεϊνών κυμαίνεται μεταξύ 3-10 με τη φορά που δείχνει η κλίμακα που είναι τοποθετημένη πάνω από το πήκτωμα της εικόνας 17, σύμφωνα με το IPG-strip (ακίνητοποιημένες βαθμιαίες μεταβολές pH) που χρησιμοποιήθηκε.

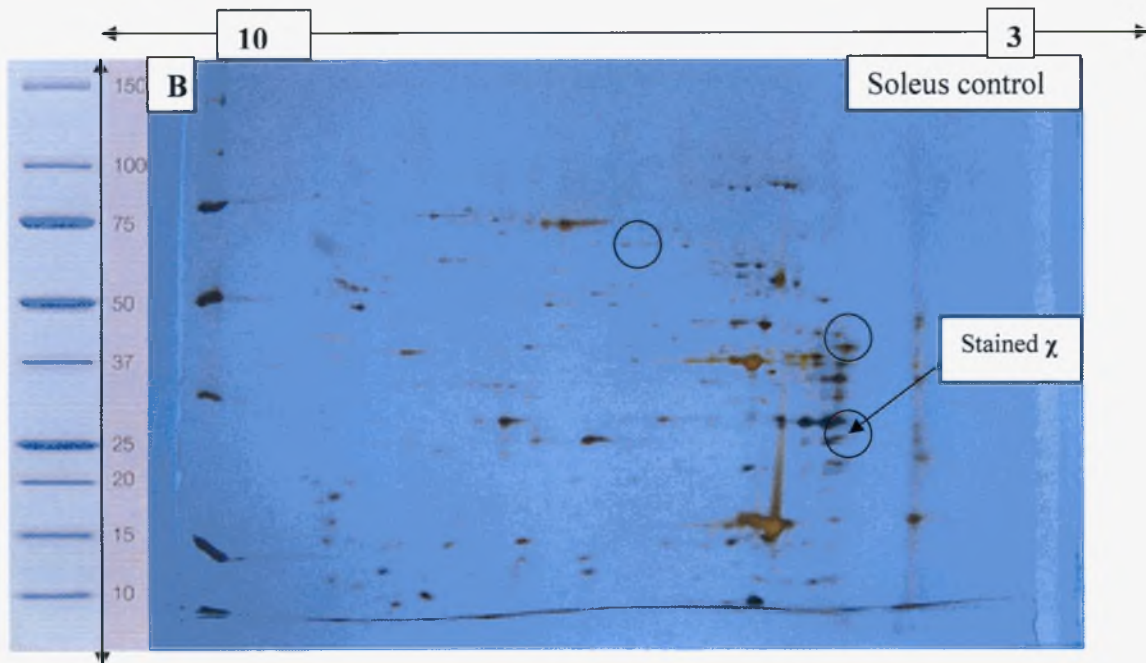
Μετά από προσπάθεια εντοπισμού, με γυμνό μάτι, πιθανών ποιοτικών διαφορών στην έκφραση πρωτεϊνών δεν εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που να παρουσιάζουν διαφορετική εμφάνιση σε επαναλήψιμο τρόπο στην πλειοψηφία του συνόλου των πηκτωμάτων. Η συγκεκριμένη παρατήρηση προέκυψε από τη μελέτη της έκφρασης πρωτεϊνών με την αξιολόγηση της εμφάνισης των κηλίδων τους. Η κηλίδα χ , για παράδειγμα, δεν εμφανίζεται στα αποτελέσματα της 2-DE Α του υποκνημίδιου μύος μη ασκούμενου επίμυος (εικόνα 17) ενώ υπάρχει στο πήκτωμα ασκούμενου επίμυος (εικόνα 18) της ίδιας ηλεκτροφόρησης. Αντίθετα, η χ εμφανίζεται στο πήκτωμα τόσο ασκούμενου, όσο και μη ασκούμενου επίμυος της 2-D ηλεκτροφόρησης Β (εικόνες 19 και 20). Η ασταθής παρουσία της χ παρατηρήθηκε με παρόμοιο μοτίβο εμφάνισης και για άλλες κηλίδες, οι οποίες επίσης επισημαίνονται στις εικόνες των πηκτωμάτων. Συγκεκριμένα, μεγάλη διακύμανση στην έκφραση και έτσι στην εμφάνισή τους στα πηκτώματα παρατηρήθηκε για πρωτεΐνες με $pI \approx 5$ και MW 30-75. Διακύμανση επίσης παρατηρήθηκε για πρωτεΐνες με $MW \approx 85$ και $pI \approx 7$.



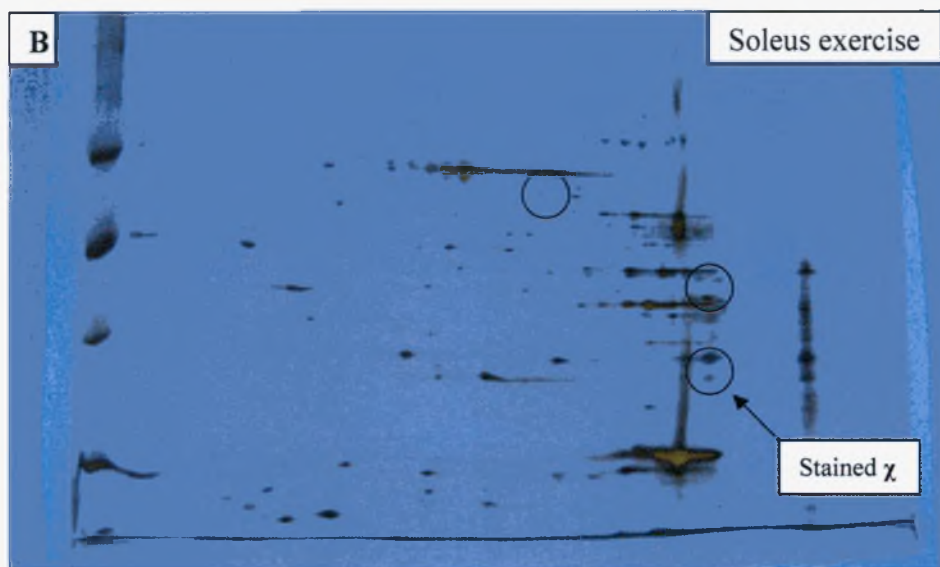
Εικόνα 17: Αποτέλεσμα 2-D ηλεκτροφόρησης Α υποκνημίδιου μύος μη ασκούμενου επίμουσ.



Εικόνα 18: Αποτέλεσμα 2-D ηλεκτροφόρησης Α υποκνημίδιου μύος ασκούμενου επίμουσ.



Εικόνα 19: Αποτέλεσμα 2-D ηλεκτροφόρησης B υποκνημίδιου μύος μη ασκούμενου επίμυος.



Εικόνα 20: Αποτέλεσμα 2-D ηλεκτροφόρησης B υποκνημίδιου μύος ασκούμενου επίμυος .

Συνοψίζοντας, με τη μελέτη πηκτωμάτων 2-D ηλεκτροφορήσεων υποκνημίδιου μύος εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που εκφράζονταν μόνο μετά από την εξαντλητική αερόβια άσκηση. Η εμφάνιση των πρωτεϊνών αυτών φάνηκε να επικεντρώνεται στην περιοχή του πηκτώματος των πρωτεϊνών με $pI \approx 5$ και MW 30-75. Εν τούτοις, η έκφραση τους δεν παρατηρήθηκε να επαναλαμβάνεται στην πλειοψηφία του συνόλου των οκτώ πηκτωμάτων και γι'αυτό δεν επιβεβαιώθηκε η αλλαγή στην έκφραση τους. Ως αποτέλεσμα καμία πρωτεϊνική κηλίδα δεν αποκόπηκε από τα πηκτώματα ώστε να ταυτοποιηθεί με φασματοσκοπία μάζας.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε ότι η εξαντλητική αερόβια άσκηση δεν οδήγησε σε σημαντικές ποιοτικές διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών του υποκνημίδιου μυός επιμύων. Το αποτέλεσμα αυτό φάνηκε από τη μελέτη πηκτωμάτων 2-D ηλεκτροφορήσεων πρωτεϊνών του υποκνημίδιου μυός επιμύων, στα οποία δεν εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που να παρουσιάζουν διαφορετικό προφίλ με επαναλήψιμο τρόπο στην πλειοψηφία του συνόλου των πηκτωμάτων.

Με τη χρήση αυτής της τεχνικής εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που εκφράζονταν μόνο μετά από την εξαντλητική αερόβια άσκηση, εν τούτοις η έκφραση τους δεν παρατηρήθηκε να επαναλαμβάνεται στην πλειοψηφία του συνόλου των οκτώ πηκτωμάτων που εξετάστηκαν και γι'αυτό δεν επιβεβαιώθηκε η αλλαγή στην έκφρασή τους. Εν τούτοις, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι κατά τη διάρκεια αερόβιας άσκησης το ποσοστό σύνθεσης μυϊκών πρωτεϊνών μειώνεται ελαφρώς, αλλά όχι σημαντικά (Wolfe 1982). Αντίθετα, μετά από 4 ώρες αποκατάστασης από τη μυϊκή άσκηση η πρωτεϊνική σύνθεση αυξάνεται σημαντικά (Carraro et al., 1991). Πιθανές, λοιπόν, ποιοτικές διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών θα μπορούσαν να ανιχνευθούν κατά την περίοδο αποκατάστασης μετά το πέρας μερικών ωρών όταν και η οξειδωση της λευκίνης μειώνεται (Devlin et al., 1990). Η λευκίνη ρυθμίζει τη έναρξη της μετάφρασης στην πρωτεϊνική σύνθεση (Norton & Layman 2006). Επιπρόσθετα υπάρχει σχετικά μειωμένη απόκριση της σύνθεσης πρωτεϊνών του υποκνημίδιου μυός στην άσκηση με αντιστάσεις (Trape et al., 2004) γεγονός που ίσως ισχύει και για την αερόβια άσκηση, προδιαθέτοντας, έτσι, για τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Αρκετές υποθέσεις θα μπορούσαν να προταθούν για τις προκαλούμενες με την άσκηση αλλαγές στην έκφραση των πρωτεϊνών που έχουν παρατηρηθεί. Όπως έχει αναφερθεί οι αλλαγές στα επίπεδα μιας συγκεκριμένης μυϊκής πρωτεΐνης μπορεί να οφείλονται σε αλλαγή στο ρυθμό της σύνθεσης (Dohm et al., 1985), της αποικοδόμησης (Dohm et al. 1980) ή ενός συνδυασμού και των δύο μηχανισμών (Kasperek et al., 1985). Εναλλακτικά, αλλαγές στα επίπεδα μιας πρωτεΐνης μπορούν να οφείλονται σε εναλλαγή του βαθμού πρωτεϊνικής εξαγωγής ως απόκριση σε αλλαγή στη σχέση της με τα μυοϊνίδια ή στη διαμερισματοποίησή της (Rathgeber et al., 1990; Somero & Hand 1999). Ακόμα, ο βαθμός εξαγωγής μερικών μυϊκών πρωτεϊνών είναι ευαίσθητος στην

κατάσταση της φυσιολογίας του μυός και στα επίπεδα δράσης του (Rathgeber et al., 1990). Είναι επίσης δυνατό οι αλλαγές να οφείλονται στην απελευθέρωση πρωτεϊνών έξω από το μυ λόγω της προκαλούμενης από την άσκηση μυϊκής βλάβης (Malm 2001) ή την απέκκρισή της από το μυ, καθώς ο σκελετικός μυς μπορεί να εκκρίνει μια σειρά από πρωτεΐνες που ενεργούν ως αυτοκρινείς, παρακρινείς ή ενδοκρινείς παράγοντες, όπως η ιντερλευκίνη-618 και ο ινσουλινοεξαρτώμενος αυξητικός παράγοντα-1 (MacGregor & Parkhouse 1996). Επίσης, καθώς η αιματική ροή στους σκελετικούς μύες αυξάνεται ως απόκριση στην άσκηση θα μπορούσαν να αυξηθούν τα επίπεδα πρωτεϊνών του αίματος σε σχέση με τις μυϊκές πρωτεΐνες, κάτι που παρατηρήθηκε με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών όπου κηλίδες που προέκυψαν από 2-D ηλεκτροφορήσεις σκελετικού μυός αντιστοιχούσαν σε πρωτεΐνες του αίματος.

Παρά τα πλεονεκτήματα της εφαρμογής της ποιοτικής πρωτεωμικής στη μελέτη της απόκρισης του μυϊκού πρωτεώματος στην άσκηση, υπάρχουν ορισμένα όρια που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Όπως συμβαίνει σε κάθε τεχνική, η μεταβλητότητα και η ευαισθησία της πειραματικής προσέγγισης, που περιγράφεται εδώ, δεν μπορεί να επιτρέψει την ανίχνευση των μικρών διαφορών στα επίπεδα των επιμέρους πρωτεϊνών. Πιθανές πηγές αυτής της διακύμανσης της έκφρασης των πρωτεϊνών μπορεί να είναι το ποσό των δειγμάτων που ελήφθησαν από τις ταινίες IPG κατά τη διάρκεια της ισοηλεκτρικής εστίασης ή η απόκλιση κατά τη μεταβίβαση των πρωτεϊνών από την ταινία IPG στο πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου. Ως αποτέλεσμα, τα όρια ανίχνευσης της τεχνικής επηρεάζονται από το μέγεθος του δείγματος και από τις συγκεκριμένες πρωτεϊνικές κηλίδες που εξετάστηκαν, με διαφορετικό βαθμό μεταβλητότητας στο μέγεθος τους. Έτσι, με τη χρήση μιας στατιστικής προσέγγισης, μικρότερες αλλαγές μπορεί να ανιχνευθούν στις πρωτεΐνες που παρουσιάζουν μικρότερη διακύμανση, ενώ για τις κηλίδες με το μεγαλύτερο ποσοστό διακύμανσης μπορεί να απαιτούνται μεγαλύτερες αλλαγές για να θεωρηθούν οι αλλαγές ως στατιστικά σημαντικές.

Άλλος ένας περιορισμός της 2-DE ανάλυσης είναι ότι δεν μπορούν όλες οι πρωτεΐνες να ανιχνευθούν από ένα δεδομένο πρωτόκολλο προετοιμασίας του δείγματος, καθώς και μια σειρά από κηλίδες εξαιρούνται από την ανάλυση, λόγω του ότι βρίσκονται σε ένα σύμπλεγμα κηλίδων και δεν επικεντρώνονται ευδιάκριτα ή είναι πολύ μικρές για

να ανιχνευθούν. Επιπλέον, ο αριθμός των πρωτεϊνών που μπορούν να εξεταστούν από την 2-DE περιορίζεται από το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) και το εύρος μοριακού βάρους που επιλέγονται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Στην παρούσα μελέτη, οι πρωτεΐνες που ερευνηθήκαν ήταν περιορισμένες σε εκείνες με pI μεταξύ 3 και 10 και με μοριακό βάρος 10-250 kDa. Δεδομένου των περιορισμών που αναφέρονται ανωτέρω, μόνο ένα υποσύνολο των μυικών πρωτεϊνών ερευνηθήκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας και, για το λόγο αυτό, περισσότερη έρευνα αυτού του είδους είναι απαραίτητη για να ληφθούν περισσότερες πληροφορίες για την απόκριση του μυικού πρωτεώματος στην άσκηση και στην αποκατάσταση.

Εν κατακλείδι, η παρούσα εργασία υποδεικνύει ότι, παρά την ύπαρξη κάποιων μειονεκτημάτων, η ποιοτική πρωτεωμική αποτελεί χρήσιμη μέθοδο για τη μελέτη της απόκρισης του μυικού πρωτεώματος στην άσκηση. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου εντοπίστηκαν πρωτεΐνες που εκφράστηκαν μόνο μετά από την εξαντλητική αερόβια άσκηση. Εν τούτοις, η έκφραση τους δεν παρατηρήθηκε να επαναλαμβάνεται στην πλειοψηφία του συνόλου των οκτώ πηκτωμάτων και γι'αυτό δεν επιβεβαιώθηκε η αλλαγή στην έκφρασή τους. Δεδομένου ότι με την παρούσα εργασία εξετάστηκε ένα μικρό δείγμα μυικών πρωτεϊνών, η αξιολόγηση αυτών των αποτελεσμάτων θα εξαρτηθεί από τη μελέτη της απόκρισης ενός μεγαλύτερου συνόλου μυικών πρωτεϊνών στην εξαντλητική αερόβια άσκηση. Επιπρόσθετα, παραμένει αδιευκρίνιστο κατά πόσο το πρότυπο των αλλαγών στην έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών ως απόκριση στην αερόβια άσκηση διαφέρει από αυτό που σχετίζεται με άλλου τύπου ασκήσεις (π.χ. άσκηση με αντιστάσεις) για τις οποίες έχει διαπιστωθεί ότι προκαλούν αλλαγές στα επίπεδα πρωτεϊνών. Επίσης, σε επόμενες έρευνες θα είχε ενδιαφέρον η μελέτη ποιοτικών διαφορών στην πρωτεϊνική έκφραση κατά την περίοδο αποκατάστασης, αρκετές ώρες μετά το πέρας της άσκησης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πρωτόκολλο διαχωρισμού πρωτεϊνών με τη χρήση ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων.

1^η ΗΜΕΡΑ-ΕΠΑΝΥΔΑΤΩΣΗ (Rehydration)

- Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι η διανομή του πρωτεϊνικού δείγματος κατά μήκος του strip.

Βήμα 1^ο

Με μια πιπέτα μεταφέρουμε 315μl δείγματος, που αποτελείται από 25μl πρωτεΐνης και 290μl ρυθμιστικού διαλύματος επανυδάτωσης (Rehydration buffer) κατά μήκος της μιας πλευράς του διαδρόμου του tray αφήνοντας 1cm σε κάθε άκρο. Η μεταφορά του δείγματος γίνεται προσεκτικά ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες, οι οποίες εμποδίζουν τη διανομή του δείγματος στο strip.

Ρυθμιστικό διάλυμα επανυδάτωσης 3 ml (Rehydration buffer)

Urea	7M (1.2613gr)
Thiourea	2M (0.4567gr)
Chaps	2% (0.06gr)
DTT	30mg
Ampholytes	0.5%
Bromophenol blue	trace

Βήμα 2^ο

Αφού φορτώσουμε το δείγμα στο διάδρομο του tray βγάζουμε το IPG strip pH 3-10 από τους -20 C όπου φυλάσσεται και με τη βοήθεια λαβίδας απομακρύνουμε το πλαστικό κάλυμμα που προστατεύει την πλευρά του strip με το πήκτωμα. Προσεχτικά τοποθετούμε το strip με την πλευρά του πηκτώματος πάνω στο δείγμα. Τα “+” και “pH 3-10” που αναγράφονται πάνω στο strip πρέπει να είναι τοποθετημένα προς την αριστερή πλευρά του διαδρόμου. Το strip τοποθετείται με προσοχή, ώστε να μην εγκλωβιστούν φυσαλίδες κάτω από αυτό.

Βήμα 3°

Καλύπτουμε κάθε strip με 2-3ml mineral oil. Το mineral oil αποτρέπει την εξάτμιση του δείγματος κατά τη διάρκεια της επανυδάτωσης.

Βήμα 4°

Καλύπτουμε το tray με πλαστικό καπάκι και το αφήνουμε σε επίπεδη επιφάνεια (11-16h) ώστε να επιτευχθεί η ενυδάτωση και να προσκολληθεί το δείγμα στο strip.

2^η ΗΜΕΡΑ

ΜΕΡΟΣ Α΄ - ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ I^{HE} ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ

Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται στο strip με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο. Κάθε πρωτεΐνη μετακινείται προς ένα σημείο της βαθμίδωσης που αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό της σημείο και παραμένει στο σημείο αυτό.

Βήμα 1°

Χρησιμοποιούμε ένα "PROTEAN IEF focusing tray", το οποίο διαθέτει δύο ηλεκτρόδια σε κάθε διάδρομο. Πάνω σε κάθε ηλεκτρόδιο τοποθετούμε 3 χαρτάκια εμποτισμένα με ddH₂O για καλύτερη αγωγιμότητα.

Βήμα 2°

Απομακρύνουμε προσεκτικά το strip από το tray με τη βοήθεια λαβίδας. Το κρατάμε για λίγο κάθετα ώστε να απομακρυνθεί το mineral oil.

Βήμα 3°

Μεταφέρουμε το IPG strip στο focusing tray με την πλευρά του gel προς τα κάτω και τα "+" και "pH 3-10" προς την αριστερή πλευρά.

Βήμα 4°

Καλύπτουμε το strip με 2-3ml mineral oil.

Βήμα 5^ο

Κλείνουμε το focusing tray και το τοποθετούμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης 1^{ης} διάστασης, η οποία είναι προγραμματισμένη ως εξής:

Για strip 18 cm και pH 3-10:

- LINEAR, 60 min, 250V (αν δεν έχει φτάσει στη μία ώρα στα 250V αυξάνουμε τα 60 min σε 90).
- RAPID, 4h, 250 V
- LINEAR, 4h, 6000 V (μέγιστη ένταση ρεύματος 50μΑ/strip. Αν όμως φτάσει το ρεύμα αυτό, καλό είναι οι 4h να αυξηθούν σε 4.5h).
- RAPID, 6000 V, 50000-60000Vh
- LINEAR, 5 min, 500V
- RAPID, 20h, 500V (η πρώτη διάσταση τελειώνει με την ολοκλήρωση του 5^{ου} βήματος. Στο 6^ο βήμα μπορεί να μείνει το δείγμα για 20h μέχρι να βγει).

ΜΕΡΟΣ Β' - ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ 2^{ΗΣ} ΔΙΑΣΤΑΣΗΣ

Το strip τοποθετείται πάνω σε μια πλάκα πηκτής SDS-πολυακρυλαμιδίου και ακολουθεί κάθετη ηλεκτροφόρηση. Κάθε πρωτεΐνη κινείται και διαχωρίζεται ανάλογα με το μοριακό της βάρος σχηματίζοντας μία διακριτή κηλίδα.

Βήμα 1^ο

Απλώνουμε στον πάγκο διηθητικό χαρτί και τοποθετούμε αρχικά το μεγάλο τζαμί (large outer plate) πάνω σ' αυτό.

Βήμα 2^ο

Στις δύο παράλληλες κάθετες πλευρές απλώνουμε βαζελίνη και κατά μήκος αυτών τοποθετούμε τα spacers με φορά από μέσα προς τα έξω ώστε να σπρώξουμε την βαζελίνη προς τα έξω.

Βήμα 3^ο

Κατά μήκος των spacers (αφήνουμε απόσταση 1cm από την πάνω πλευρά) βάζουμε βαζελίνη.

Βήμα 4^ο

Από πάνω τοποθετούμε το μικρό τζάμι (small inner plate).

Βήμα 5^ο

Στερεώνουμε ανάμεσα σε δυο clamps και τα δύο τζάμια. Ελέγχουμε αν τα τζάμια έχουν ενωθεί σωστά και προσέχουμε να μην προεξέχει κάποιο από τα δύο.

Βήμα 6^ο

Ανάμεσα στα δυο τζάμια βάζουμε μια alignment card ώστε να σπρώξουμε τα spacers προς τις άκρες.

Βήμα 7^ο

Στερεώνουμε τα τζάμια με τα clamps και στην κάτω οριζόντια πλευρά βάζουμε με μια πιπέτα Pasteur αγαρόζη. Δημιουργείται με αυτόν τον τρόπο ένα στεγανό για την αποφυγή διαρροών. Για να φτιάξουμε 0,5% διάλυμα αγαρόζης διαλύουμε 0,5gr αγαρόζης σε 100ml ddH₂O.

Βήμα 8^ο

Αφήνουμε για λίγο την αγαρόζη να πήξει και ελέγχουμε ρίχνοντας σταδιακά ddH₂O ανάμεσα στα δυο τζάμια.

Βήμα 9^ο

Αφού βεβαιωθούμε πως δεν υπάρχουν διαρροές απομακρύνουμε το ddH₂O (χρησιμοποιώντας και διηθητικό χαρτί).

Βήμα 10°

Προσθέτουμε το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) ανάμεσα στα δυο τζάμια έως 3cm κάτω από την επιφάνεια του μεγάλου τζαμιού.

Πήκτωμα διαχωρισμού (Separating gel preparation).

Acrylamide/Bis working concentration (10%)

dd water	39.7mL
1.5M Tris-HCL, pH 8.8	25.0mL
10% (w/v) SDS stock (at RT)	1.0mL
Acrylamide/Bis (30% stock)	33.3mL
10% ammonium persulfate (APS)*	1000μL
TEMED	60μL
Total volume (enough for 2 gels)	100mL

Βήμα 11°

Προσθέτουμε λίγο ddH₂O με πιπέτα, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες και να ισορροπήσει το separating gel. Το αφήνουμε για 1-1,5h ώστε να πήξει.

Βήμα 12°

Μετά από 1,5h αφαιρούμε το ddH₂O (με τη βοήθεια και διηθητικού χαρτιού).

Βήμα 13°

Προσθέτουμε και το πήκτωμα συσσωρεύσεως (stacking gel) και το αφήνουμε για 1h να πήξει.

Πήκτωμα συσσωρεύσεως (stacking gel).

Enough for 2 gels. For strips 20 or 18 cm

dd water	14.5mL
1M Tris-HCL, pH 6.8	2.5mL
10% (w/w) SDS	200.0μL
Acrylamide/Bis (30% stock)	2.6mL
10% ammonium persulfate (APS)*	200μL
TEMED	20μL
Total volume	20mL

Για την προετοιμασία του μονομερούς αναμειγνύουμε όλα τα αντιδραστήρια εκτός από τα APS και TEMED. Για την έναρξη του πολυμερισμού προσθέτουμε τα APS και TEMED και ανακινούμε απαλά ώστε να αναμειχθούν.

Βήμα 14°

Μετά από περίπου μια ώρα τοποθετούμε και το χτενάκι.

Βήμα 15°

Τυλίγουμε τα τζάμια με τα πήκτωμα με βρεγμένο χαρτί και διαφανή μεμβράνη και τα αφήνουμε κατά τη διάρκεια της νύχτας στα κρύο δωμάτιο ώστε να πολυμεριστεί το πήκτωμα.

3^Η ΗΜΕΡΑ-2^Η ΔΙΑΣΤΑΣΗ

Βήμα 1^ο

Ετοιμάζουμε το equilibration buffer.

Equilibration buffer (50 ml)

Urea	18gr
1M Tris-HCL, pH 6.8	2.5mL
Glycerol	15mL
10% (w/w) SDS	5mL
dd water	adjust to 50mL
Bromophenol	trace

Βήμα 2^ο

Στη συνέχεια ετοιμάζουμε τα equilibration buffers I και II, τα οποία αναδεύουμε. Διατηρούμε το equilibration buffer II στους 4^ο C.

- Equilibration buffer I για 2 strips:
Προσθέτουμε 45mg DTT σε 12mL E.B.S.
- Equilibration buffer II για 2 strips:
Προσθέτουμε 270mg iodoacetamide σε 12mL E.B.S.

Βήμα 3^ο

Όταν η ηλεκτροφόρηση 1^{ης} διάστασης ολοκληρωθεί απομακρύνουμε το focusing tray από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

Βήμα 4^ο

Κατόπιν, με τη βοήθεια λαβίδας απομακρύνουμε το IPG strip, το κρατάμε κάθετα ώστε να απομακρυνθεί το mineral oil και το τοποθετούμε σε ένα Rehydration / Equilibration tray με την πλευρά του πηκτώματος προς τα κάτω.

Βήμα 5°

Καλύπτουμε, αρχικά, το strip με το equilibration buffer I, κλείνουμε το tray με πλαστικό καπάκι και το αφήνουμε στον αναδευτήρα για 10 min.

Βήμα 6°

Απομακρύνουμε το E.B.I και καλύπτουμε το strip με το equilibration buffer II και το αφήνουμε να αναδευτεί για άλλα 10 min.

Βήμα 7°

Μεταφέρουμε 1x TGS buffer στη συσκευή ηλεκτροφόρησης 2^{ης} διάστασης (το 1x TGS φτάνει 1 cm πάνω από την αгарόζη).

Βήμα 8°

Αφαιρούμε το χτενάκι, απομακρύνουμε το μονομερές και τοποθετούμε στο πηγαδάκι που σχηματίστηκε 5 μl marker.

Βήμα 9°

Αφού ολοκληρωθεί η ανάδευση, απομακρύνουμε με λαβίδα το IPG strip από το tray, το εμβαπτίζουμε σε 1x TGS buffer και το τοποθετούμε ανάμεσα στα δύο τζάμια με την πλευρά του πηκτώματος προς το μικρό τζάμι.

Βήμα 10°

Προσθέτουμε μίγμα αгарόζης με χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης με πιπέτα Pasteur στο κενό ανάμεσα στα δύο τζάμια πάνω από το strip.

Βήμα 11°

Όταν πήξει η αгарόζη μεταφέρουμε τα τζάμια με τα πηκτώματα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης 2^{ης} διάστασης.

Βήμα 12°

Γεμίζουμε τη συσκευή με 1x TGS buffer και τη συνδέουμε με τη βρύση. Στη συσκευή εισέρχεται νερό το οποίο, στη συνέχεια, απομακρύνεται.

Η ηλεκτροφόρηση αρχίζει: 25mA/gel για 1h
35mA/gel για ~6h

Βήμα 13°

Βάψιμο με νιτρικό άργυρο (Silver nitrate staining)

Αφού η ηλεκτροφόρηση 2^{ns} διάστασης ολοκληρωθεί τοποθετούμε τα τζάμια πάνω σε διηθητικό χαρτί (το μεγάλο τζάμι προς τα κάτω). Απομακρύνουμε τα spacers. Αφαιρούμε με προσοχή το μικρό τζάμι, απομακρύνουμε το stacking gel, κόβουμε το separating gel στην πάνω αριστερή γωνία ώστε να ξέρουμε που βρίσκεται ο marker και τοποθετούμε το separating gel σε μία λεκάνη και εκτελούμε τα παρακάτω βήματα:

Fix step

Μεταφέρουμε το separating gel σε 50% μεθανόλη (methanol) + 5% οξικό οξύ (acetic acid) και αναδεύουμε για 20 min.

Fix buffer: 500mL methanol +50mL acetic acid σε 450mL ddH₂O

Wash step

Πλένουμε το gel με 50% μεθανόλη και αναδεύουμε για 10 min.

Wash buffer: 500mL methanol σε 500mL ddH₂O

Wash step

Πλένουμε το gel με ddH₂O και το αφήνουμε να αναδευτεί όλη τη νύχτα ή για 1h.

4^η ΗΜΕΡΑ

Sensitize step

Μεταφέρουμε το separating gel σε 0.02% Na₂S₂O₃ για 1min (0.2gr Na₂S₂O₃ σε 1lt ddH₂O)

Wash step

Πλένουμε το gel δύο φορές, για 1 min κάθε φορά, με ddH₂O.

Stain step

Μεταφέρουμε το gel σε κρύο 0.1% AgNO₃ για 20 min (0.1 gr AgNO₃ σε 1Lt ddH₂O). Το διάλυμα αφού ετοιμαστεί καλύπτεται με αλουμινόχαρτο και διατηρείται στους 4°C μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Wash step

Πλένουμε το gel δύο φορές, για 1 min κάθε φορά, με ddH₂O.

Develop step

Μεταφέρουμε το separating gel σε 0.04% formalin + Na₂CO₃ και αναδεύουμε μέχρι το βάψιμο να είναι επαρκές (400μL formalin (37% formalin solution) + 20gr Na₂CO₃ σε 1Lt ddH₂O).

Stop step

Προσθέτουμε 50mL οξικό οξύ για να σταματήσει το βάψιμο (50 mL acetic acid σε 950mL ddH₂O).

Στοκ διαλύματα.

<i>Acrylamide/Bis (30%)</i>	<i>1.5 M Tris-HCL, pH 8.8, MW: 121.14</i>
146g acrylamide 4g N'N'-Bis-methylene-acrylamide in 500mL dd water (29.2g acrylamide/100mL dd water 0.8g bis/100mL dd water Or 30g acrylamide/bis/100mL dd water)	181.5g Tris base in 1000mL dd water Dissolve Tris in 500mL dd water Adjust to pH 8.8 with 10.1N HCL. Make to 1000mL with dd water and store at 4°C. (18.15g/100mL dd water)
<i>1 M Tris-HCL, pH 6.8, MW: 121.14</i>	<i>10% SDS</i>
121g Tris base in 1000mL dd water Dissolve Tris in 500mL dd water Adjust to pH 8.8 with 10.1N HCL. Make to 1000mL with dd water and store at 4°C.	Dissolve 10g SDS in water with gentle stirring and bring to 100mL with distilled water. Store at RT.
<i>5X electrode (Running, TGS) buffer, pH 8.3</i>	<i>Destaining solution</i>
Tris base 45g (15g/L) Glycine 216g (72g/L) SDS 15g (5g/L) -----	100mM sodium thiosulfate 30mM potassium ferricyanide ----- 200mM ... 2.48gr/50mL 60mM ... 0.98gr/50mL
Total volume 3 L dd water Store at 4°C. Warm to 37°C before use if precipitation occurs.	Mix 1/1

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E, Tur JA., Cordova A, Pons A.. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology and behavior* 2005; 85:1-7.
2. Ajmani RS, Fleg JL, Demehim AA, Wright JG, O'Connor F, Heim JM, Tarien E, Rifkind JM. Oxidative stress and hemorheological changes induced by acute treadmill exercise. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2003; 28:29-40.
3. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας- Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του κυττάρου. (2000). Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
4. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25 (2):218-24.
5. Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. *Circ. Res.* 2001; 88:763-73.
6. Banerjee A.K., Mandal A., Chanda D., Chakraborti S. (2003). Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol Cell Biochem.* 2003; 253:307-312.
7. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78:547-581.
8. Boveris A, Cadenas E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. *Inc* 1997; 1-25.
9. Bulkley G. Free radicals and reactive oxygen species. (2002). The evolution of a scientific concept. *Cosmos Journals.*
10. Carraro E, Hartl WH, Stuart CA, Layman DK, Jahoor F, Wolfe RR. Whole-body and plasma protein synthesis in exercise and recovery in human subjects. *Am. J. Physiol.* 1990; 258 (Endocrinol. Metab., 21):821-831.
11. Carraro E, Stuart CA, Hartl WH, Rosenblatt J, Wolfe RR. Effect of exercise and recovery on muscle protein synthesis in human subjects. *Am. J. Physiol.* 1991; 259 (Endocrinol. Metab., 22):470-476.
12. Carraro E, Wolfe RR. Urea production and urea nitrogen recycling during two levels of exercise intensity. (1992). Submitted for publication.

13. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59:527–605.
14. Cheng, KC, Cahill DS, Kasai H., Nishimura S, Loeb LA . 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative damage, causes G-T and A-C substitutions. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:166-172.
15. Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Leeuwenburgh C. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 29 (suppl. 1):531.
16. Cobon GS, Verrills N, Papakostopoulos P, Eastwood H, Linnane AW. The proteomics of ageing. *Biogerontology.* 2002; 3(1-2):133-6.
17. Cutler R. (1994) Antioxidants, aging and longevity. In: Pryor W A (ed) *Free Radicals in Biology*, vol 6. Orlando, FL: Academic Press, Inc. pp 381-395
18. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982; 107:1198-205.
19. Deaton C, Marlin D. Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2003; 2:278-291.
20. Devary Y, Gottlieb RA, Laus LF, Karin M. Rapid and preferential activation of the *c-jun* gene during the mammalian UV response. *Mol Cell Biol* 1991; 11:2804–2811.
21. Devlin TJ, Brodsky I, Scrimgeour A, Fuller S, Bier DM. Amino acid metabolism after intense exercise. *Am. J. Physiol.* 1990; 258:249-255.
22. Dillard CJ, Litov RE, Savin WM, Dumelin EE. Tappel, A. L. *J. Appl. Physiol.* 1978; 45:927±932.
23. Dohm GL, Kasperek GJ, Tapscott EB, Barakat HA. Protein metabolism during endurance exercise. *Fed Proc.* 1985; 44(2):348-52.
24. Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada J.L, Covas M.I, Ordonez-Llanos J, Marrugat J. Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis* 2003; 167:327–334.
25. Fielding RA, Violan MA, Svetkey L, Abad LW, Manfredi TJ, Cosmas A, Bean. *J Eff. Med. Sci. Sports Exerc.* 2000; 32:359.


26. Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 2006; 36(4):327-58.
27. 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* 2005; 567:113-120.
28. Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. *Electrophoresis.* 2000; 21(6):1037-53.
29. Halliwell B and Gutteridge JMC. (1998). *Free radicals in biology and chemistry.* New York: Oxford Science Publications.
30. Hamilton ML, Guo CD, Fuller H, Van Remmen WF, Ward SN, Austad DA, Troyer I, Thompson ZM, Richardson A. A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:2117–2126.
31. Hellsten, Y, Ahlborg, G., Jensen-Urstad, M., and Sjodin, B. Indication of in vivo xanthine oxidase activity in human skeletal muscle during exercise *Acta Physiol. Scand.* 1998; 134:159-160.
32. Hellsten Y, Frandsen U, Orthenblad N, Sjodin B, Richter EA. Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise: A role of inflammation. *J. Physiol.* 1997; 498:239-248.
33. Hensley, K., and Floyd, R.A. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: A look back, a look ahead. *Arch. Biochem. Biophys.* 2002; 397:377-383.
34. Holloszy JO. Exercise increases average longevity of female rats despite increased food intake and no growth retardation. *J. Gerontol.* 1993; 48(3):97-100.
35. Howard DJ, Ota RB, Briggs LA, Hampton M, Pritsos CA. Environmental tobacco smoke in the workplace induces oxidative stress in employees, including increased production of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7:141–146.
36. Inoue T, Mu Z, Sumikawa K, Adachi Z, Okochi T. Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84:720 –725.

37. Ivy JL, Ding Z, Hwang H, Cialdella-Kam LC, Morrison PJ. Post exercise carbohydrate-protein supplementation: phosphorylation of muscle proteins involved in glycogen synthesis and protein translation. *Amino Acids*. 2008; 35(1):89-97.
38. Jenkins RR. Free radical chemistry: Relationship to exercise. *Sport Med*. 1988; 5:156-170.
39. Ji, LL. Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med. Sci. Sports Exer*. 1993; 25:225-231.
40. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *P.S.E.B.M*. 1999; 222:283-292.
41. Ji LL, Fu RG, Mitchell E. Glutathione and antioxidant enzyme in skeletal muscle: Effect of fiber type and exercise intensity. *J. Appl. Physiol*. 1992; 73:1854-1859.
42. Ji LL, Fu RG. Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J. Appl. Physiol*. 1992; 72:549-554.
43. Kasperek GJ, Snider RD. The effect of exercise on protein turnover in isolated soleus and extensor digitorum longus muscles. *Experientia*. 1985; 41(11):1399-400.
44. Komjati M, Waldhausl N. Contribution of plasma protein to muscular de novo synthesis of glutamine. *Metabolism* 1989; 38:52-55.
45. Lasonder E, Ishihama Y, Andersen JS, Vermunt AM, Pain A, Sauerwein RW, Eling WM, Hall N, Waters AP, Stunnenberg HG, Mann M. Analysis of the *Plasmodium falciparum* proteome by high-accuracy mass spectrometry. *Nature*. 2002; 419(6906):537-42.
46. Lee IM, Paffenbarger RS. *Am J Epidemiol*. 2000; 151:293.
47. Lee IM, Paffenbarger RS, Hennekens. *Aging (Milano)*1997; 9:2.
48. Leeuwenburgh C, Heinecke JW. Oxidative Stress and Antioxidants in Exercise, *Current Medicinal Chemistry* 2001; 8:829-838.
49. Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N. Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959:396-411.
50. MacGregor J, Parkhouse WS. The potential role of insulin-like growth factors in skeletal muscle regeneration. *Can. J. Appl. Physiol*. 1996; 21: 236–50.

51. MacIntyre DL, Reid WD, Lyster DM, McKenzie DC. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2000; 81:47.
52. Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: Fact or fiction? *Acta Physiol. Scand.* 2001; 171: 233–9.
53. Maughan RJ, Donnelly AE, Gleeson M, Whiting PH, Walker KA, Clough PJ. *Muscle Nerve.* 1989; 12: 32.
54. McCarter RJM. In *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Eds., Sen C., Packer L., Hanninen O., Amsterdam, 2000, pp 797-830.
55. Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis Y, Papassotiropoulos I, Kouretas D. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39:1107-1113.
56. Møller Peter, Wallin Hakan, Knudsen Lisbeth. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-biological interactions* 1996; 102:17-36.
57. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 1999; 13:295-309.
58. Nakajima M, Takeuchi T, Takeshita T, Morimoto K. 8-Hydroxydeoxyguanosine in human leukocyte DNA and daily health practice factors: effects of individual alcohol sensitivity. *Environ Health Perspect* 1996; 104:1336 –1338.
59. Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, Kouretas D. Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc.* 2006; 38:1443-1450.
60. Nilsson CL. Bacterial proteomics and vaccine development. *Am J Pharmacogenomics.* 2002; 2(1):59-65.
61. Norton LE, Layman DK. Leucine regulates translation initiation of protein synthesis in skeletal muscle after exercise. *J Nutr.* 2006; 136(2):533S-537S.
62. Nose K, Shibamura M, Kikuchi K, Kageyama H, Sakiyama S, Kuroki T. Transcriptional activation of early-response genes by hydrogen peroxide in a mouse osteoblastic cell line. *Eur J Biochem* 1991; 201:99–106.

63. 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.
64. Poulsen HE, Loft S, Vistisen K. Increased oxidative DNA damage after 30 days of vigorous exercise. *J Toxicol Environ Health* 1993; 40:459-462.
65. Radak Z, Asano K, Inoue M, Kizaki T, Oh-Ishi S, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H. Superoxide dismutase derivative prevents oxidative damage in liver and kidney of rats induced by exhaustive exercise. *Eur. J. Appl. Physiol* 1996 ; 72:189-194.
66. Rathgeber BM, Pato MD, Boles JA, Shand PJ. Rapid post-mortem glycolysis and delay chilling of turkey carcasses cause alterations to protein extractability and degradation of breast muscle proteins. *J. Agric. Food Chem*. 1999; 47: 2529-36.
67. 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.
68. Richetti, P.G (1983) Isoelectric focusing: theory, methodology and applications. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, vol. 11. Eds Work, T.S. & Burdon, R.H. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, Netherlands.
69. Rodney E. Shackelford, William K. Kaufmann, Richard S. Paules. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical Biology & Medicine* 2000; 28(9):1387-1404.
70. Schieven GL , Mittler RS, Nadler SG, Kirihara JM , Bolen JB, Kanner SB, Ledbetter JA. ZAP-70 tyrosine kinase, CD45, and T cell receptor involvement in UV- and H₂O₂-induced T cell signal transduction. *J Biol Chem* 1994; 269:20718-20726.
71. Schmid E, Hotz-Wagenblatta, Drogew. Inhibition of the insulin receptor kinase phosphorylation by nitric oxide: functional and structural aspects. *Antioxidants Redox Signal* 1999; 1:45-53.

72. Schmid GM, Converset V, Walter N, Sennitt MV, Leung KY, Byers H, Ward M, Hochstrasser DF, Cawthorne MA, Sanchez JC. Effect of high-fat diet on the expression of proteins in muscle, adipose tissues, and liver of C57BL/6 mice. *Proteomics*. 2004; 4(8):2270-82.
73. Scientific American. How proteomics can help drug development 2002, p41.
74. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33:368-370.
75. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *Faseb J* 1996; 10:709-20.
76. Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol*. 1995; 79:675–686.
77. Somero GN, Hand SC. Protein assembly and metabolic regulation. Physiological and evolutionary perspectives. *Physiol. Zool*. 1990; 63: 443–71.
78. Standman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann NY Acad Sci* 2001; 928:22-38.
79. Suzuki J, Inoue Y, Suzuki S. Changes in urinary level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generating substances. *Free Radic Biol Med* 1995; 18:431–436.
80. Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Poteolysis, free radicas and aging. *Free Radic Biol Med* 2002; 33:29-36.
81. Taylor SW, Fahy E, Ghosh SS. *Trends Biotechnol* 2003; 21(2):82-8.
82. Verrills NM. *Clinical Proteomics: Present and Future Prospects*. *Clin Biochem Rev* 2006; 27:99-116.
83. Vina J, Gimeno A, Sastre J, Desco C, Asensi M, Pallardo FV, Cuesta A, Ferrero JA, Terada LS, and Repine JE. *IUBMB Life* 2000; 49:539-544.
84. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:489-501.
85. Wasserman DH, Geer RJ, Williams PE, Becker T, Lacy BD, Abumrad N. Interaction of gut and liver in nitrogen metabolism in exercise. *Metabolism* 1991; 40:307-314.

- 
86. Wilkins MR, Gasteiger E, Gooley AA, Herbert BR, Molloy MP, Binz P, Ou K, Sanchez J, Bairoch A, Williams KL, Hochstrasser DF. High-throughput mass spectrometric discovery of protein post-translational modifications. *Journal of Molecular Biology* 1999; 289(3):645-657.
 87. Wolfe RR, Goodenough RD, Wolfe MH, Royle GT, Nadel ER: Isotopic analysis of leucine and urea metabolism in exercising humans. *J. Appl. Physiol.* 1982; 52: 458-466.
 88. Yarasheski KE, Zachwieja JJ, Bier DM. Acute effects of resistance exercise on muscle protein synthesis rate in young and elderly men and women. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 1993; 265:210-214.

