

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.

Διπλωματική Εργασία

**Η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο
μεταβολισμό του γλυκογόνου του υποκνημιδίου μύος και του ήπατος
επιμύων**

Τσόκα Αλεξάνδρα

Λάρισα 2008



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

Αριθ. Εισ.: 6587/1
Ημερ. Εισ.: 26-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2008
ΤΣΟ

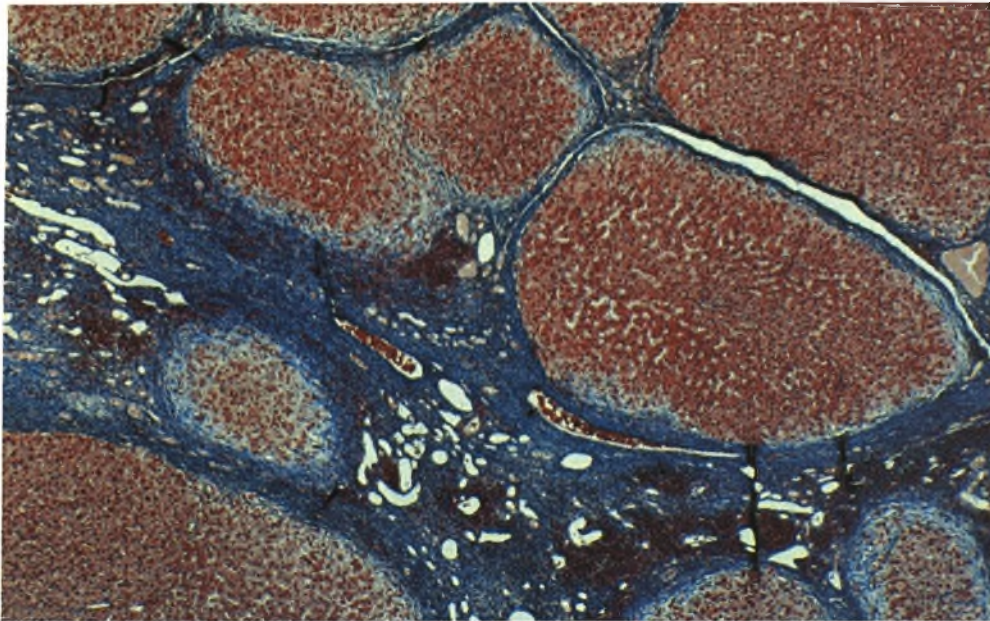
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087328

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.



Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων

Κυπάρος Αντώνιος, Διδάσκων ΠΔ 407/80

Κοντού Μαρία, Λέκτορας Κλινικής Χημείας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1. Μύες	7
1.1.2. Σκελετικοί μύες	7
1.1.3. Δομή των σκελετικών μυών	7
1.1.4. Διάκριση των σκελετικών μυών	8
1.2. Ήπαρ	10
1.2.1. Δομή	11
1.2.2. Ηπατοκύτταρα	11
1.3. Γλυκογόνο	12
1.3.1. Καταβολισμός του γλυκογόνου	13
1.3.2. Σύνθεση του γλυκογόνου	15
1.4. Άσκηση	15
1.4.1. Μυϊκό και ηπατικό γλυκογόνο κατά την άσκηση.	16
1.4.2. Διάσπαση του γλυκογόνου κατά την άσκηση.	17
1.4.3. Επίδραση της άσκησης στη γλυκόλυση	17
1.4.4. Παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση	18
1.5. Αλοπουρινόλη	20
1.6. Σκοπός	21
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	22
2.1. Πειραματόζωα	22
2.2. Χορήγηση αλοπουρινόλης	23
2.3. Εξοικείωση στη κολύμβηση	23
2.4. Πρωτόκολο κολύμβησης	23
2.5. Επεξεργασία των δειγμάτων	24
2.6. Χρώση periodic acid –Schiff	25
2.7. Χρώση PAS	25
2.8. Ημιποσοτική εκτίμηση του μυϊκού γλυκογόνου με τη χρήση του προγράμματος Image J.	26
2.9. Στατιστική ανάλυση	26
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	27

3.1. Ηπατικό γλυκογόνο	27
3.2. Μυϊκό Γλυκογόνο	30
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	33
5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	35
5.1 Πρωτόκολο χρώσης PAS	35
5.2 Πρωτόκολλο πρόγραμματος ημιποσοτικής εκτίμησης του μυϊκού γλυκογόνο (Image J).	36
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	37

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1	Δομή του σκελετικού μυός	8
Εικόνα 2.	Φωτογραφική απεικόνιση ηπατοκυττάρων	12
Εικόνα 3.	Απεικόνιση της διάσπασης του γλυκογόνου .	14
Εικόνα 4.	Δομή της αλοπουρινόλης	20
Εικόνα 5.	Τομή μυός με χρώση PAS	26
Εικόνα 6.	Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο ηπατικό γλυκογόνο σε εγκάρσιες τομές παραφίνης μετά από χρώση Periodic Acid-Schiff.	29
Εικόνα 7.	Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο μυϊκό γλυκογόνο σε εγκάρσιες τομές παραφίνης μετά από χρώση Periodic Acid-Schiff	31

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ & ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.

Πίνακας 1.	Χαρακτηριστικά των διαφορετικών τύπων μυϊκών ινών.	10
Πίνακας 2.	Ποσότητα ηπατικού γλυκογόνου επιμύων μετά από άσκηση και χορήγηση αλοπουρινόλης.	28
Πίνακας 3.	Ποσότητα μυϊκού γλυκογόνου επιμύων μετά από άσκηση και χορήγηση αλοπουρινόλης	30
Διάγραμμα 1.	Επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο ηπατικό γλυκογόνο	29
Διάγραμμα 2.	Επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο μυϊκό γλυκογόνο .	31

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

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιμελήτρια κυτταρολόγο κ. Νέγκα Χαριτίνη για την υπομονή και την πολύτιμη βοήθεια τόσο στην εκπόνηση του πειράματος όσο και στη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

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

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελέτες έδειξαν ότι η άσκηση προκαλεί διάσπαση του γλυκογόνου, ενώ δεν έχει βρεθεί η επίδραση της αλοπουρινόλης στο μεταβολισμό του. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο μεταβολισμό του γλυκογόνου στο ήπαρ και στο υποκνημίδιο μυ επιμύων. Αφορμή για την πειραματική αυτή μελέτη ήταν η επίδραση της αλοπουρινόλης στην απόδοση των επιμύων κατά την κολύμβηση μέχρι εξάντλησης. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας, οι επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη είχαν μειωμένη απόδοση συγκριτικά με τους επίμυες που δεν την είχαν λάβει. Σύμφωνα με το πρωτόκολο της παρούσας πειραματικής εργασίας οι επίμυες χωρίστηκαν σε αυτούς που έκαναν αερόβια εξαντλητική άσκηση και σε αυτούς που τους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη χωρίς να ασκηθούν. Τα δείγματα λήφθηκαν αμέσως μετά και 5 ώρες μετά την άσκηση και στις αντίστοιχες χρονικές στιγμές κατά τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Βρέθηκε ότι η άσκηση μείωσε τόσο το μυϊκό όσο και το ηπατικό γλυκογόνο. Το μυϊκό γλυκογόνο μειώθηκε τις πρώτες ώρες μετά την άσκηση ενώ άρχισε να αυξάνεται πιο γρήγορα συγκριτικά με το ηπατικό γλυκογόνο. Η αλοπουρινόλη δεν έχει καμία επίδραση στο μεταβολισμό του μυϊκού γλυκογόνου ενώ μείωσε σημαντικά το ηπατικό γλυκογόνο 7.5 ώρες μετά τη χορήγησή της. Η μείωση του ηπατικού και του μυϊκού γλυκογόνου λόγω της άσκησης είναι σύμφωνη και με παλαιότερες μελέτες τόσο σε επίμυες όσο και στον άνθρωπο. Αναφορικά με την αλοπουρινόλη δεν έχουν προηγηθεί μελέτες που να αποδεικνύουν την επίδραση της στο γλυκογόνο.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Μύες

Οι μύες αποτελούν τον ιστό που είναι υπεύθυνος για την σύσπαση και για την εκτέλεση των κινήσεων στα ανώτερα θηλαστικά.

Με βάση τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά οι μύες διακρίνονται:

- α) Λείοι μυες. Ελέγχουν την κίνηση οργάνων όπως τα αγγεία του αίματος, ο γαστρεντερικός σωλήνας, η μήτρα και η ουροδόχος κύστη και λειτουργούν υπό την επίδραση του αυτόνομου νευρικού συστήματος.
- β) Καρδιακός μύς. Έχει δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά μεταξύ των σκελετικών και των λείων μυών, τα οποία ελέγχουν την συνεχή και ρυθμική σύσπαση της καρδιάς.
- γ) Σκελετικοί μύες. Ελέγχονται εκούσια και είναι υπεύθυνοι για την κίνηση του σκελετού και ορισμένων οργάνων (Wheater, 1987).

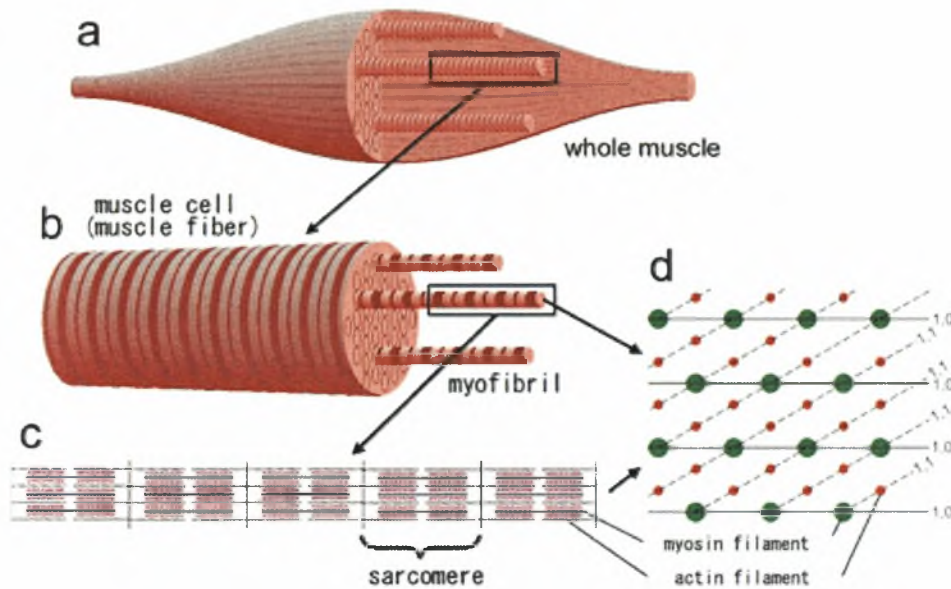
1.1.2. Σκελετικοί μύες

Οι σκελετικοί μύες δομικά αποτελούνται από επιμήκη, πολυπύρρηνα κύτταρα, τα μυϊκά ινίδια. Τα μυϊκά ινίδια ποικίλλουν σε διάμετρο, που κυμαίνεται από 10 έως 100μm και έχουν μήκος που μπορεί να φτάσει τα 35 cm. Η σύσπαση των σκελετικών μυών ελέγχεται από το κινητικό νεύρο. Η διέγερση του κινητικού νεύρου έχει ως αποτέλεσμα την ταυτόχρονη σύσπαση όλων των μυϊκών ινών που συγκαταλέγονται στην ίδια κινητική μονάδα.

1.1.3. Δομή των σκελετικών μυών

Οι μύες αποτελούνται από δεσμίδες μυϊκών ινών. Κάθε μυϊκή ίνα ,η οποία περιβάλλεται από το σαρκείλημα αποτελείται από πολλά μυϊκά ινίδια. Ανάμεσα στα μυϊκά ινίδια και στο σαρκείλημα υπάρχει μια μικρή ποσότητα κυτταροπλάσματος ,το σαρκόπλάσμα ,όπου βρίσκονται πολλοί πυρήνες ,μιτοχόνδρια κ.α. Τα μυϊκά ινίδια αποτελούν το συστατικό τμήμα της μυϊκής ίνας. Σε κάθε μυϊκή ίνιδιο διακρίνονται διαδοχικά τμήματα σκοτεινά και φωτεινά. Το μήκος των σκοτεινών τμημάτων είναι σταθερό ,ενώ το μήκος των φωτεινών αυξομειώνεται ανάλογα με την λειτουργική κατάσταση των ινιδίων. Σε κάθε μυϊκό ινίδιο υπάρχουν πολλά μυϊκά νημάτια ,που διακρίνονται σε λεπτά και χοντρά μυϊκά νημάτια. Τα λεπτά αποτελούνται από ακτίνη

και τα χοντρά από μυοσίνη. Μέσα στο σαρκόπλάσμα που προαναφέρθηκε υπάρχει ένα διάτρητο σύστημα μεμβρανών ,το σαρκοπλασματικό δίκτυο. Το δίκτυο αυτό διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην σύσπαση και στην μεταφορά των ιόντων ασβεστίου. Τα ιόντα ασβεστίου παίζουν σημαντικό ρόλο στην σύσπαση των μυών.



Εικόνα 1. Δομή του σκελετικού μυός.

1.1.4. Διάκριση των σκελετικών μυών

Ο τρόπος λειτουργίας και οι κινήσεις των σκελετικών μυών ποικίλουν. Οι μύες που συμμετέχουν στη διατήρηση της στάσης συσπώνται σχεδόν συνέχεια ενώ οι μύες των οφθαλμών κάνουν γρήγορες και μικρής διάρκειας κινήσεις. Η διάκριση των σκελετικών μυών σε δύο κατηγορίες έγινε με μελέτες νευρικής διέγερσης και παρουσιάζεται παρακάτω.

Βραδείας συστολής ή ερυθροί μύες.

Είναι μικροί, η λειτουργία τους βασίζεται στον αερόβιο μεταβολισμό και περιέχουν μεγάλο αριθμό μιτοχονδρίων. Περιέχουν επίσης μεγάλη συγκέντρωση μυοσφαιρίνης, ενός μορίου αποθήκευσης οξυγόνου, στο οποίο οφείλεται το κόκκινο χρώμα τους. Ένας χαρακτηριστικός ερυθρός μυς είναι ο υποκνημίδιος.

Ταχείας συστολής ή λευκοί μύες.

Είναι μεγάλοι σε μέγεθος και λειτουργούν αναερόβια. Περιέχουν μικρό αριθμό μιτοχονδρίων και χαμηλή ποσότητα μυοσφαιρίνης. Οι λευκές μυϊκές ίνες είναι πλούσιες σε γλυκογόνο και γλυκολυτικά ένζυμα. Αναερόβιες μυϊκές ίνες

συναντώνται στους μύες που είναι υπεύθυνοι για την έντονη αλλά σποραδική σύσπαση όπως στους δικέφαλους και τους τρικέφαλους των άνω άκρων.

Η δραστικότητα του μιτοχονδριακού ενζύμου σουκινική δεϋδρογονάση είναι ένας δείκτης της αναλογίας των μιτοχονδρίων στις διαφορετικές μυϊκές ίνες. Ομοίως, η δραστικότητα της ΑΤΡάσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καθορίσει τη σχετική αναλογία του τύπου των μυϊκών ινών σε διάφορους μύες. Οι αερόβιες μυϊκές ίνες έχουν μεγαλύτερη δραστικότητα ΑΤΡάσης και βάζονται έντονα, ενώ οι αναερόβιες έχουν μικρή δραστικότητα ΑΤΡάσης. Ο τύπος του μεταβολισμού της κάθε μυϊκής ίνας καθορίζεται από τη συχνότητα των νευρικών ώσεων του αντίστοιχου κινητικού νεύρου. Κάθε νευρική ίνα νευρώνει μυϊκές ίνες ενός μόνο μεταβολικού τύπου ενώ όλες οι μυϊκές ίνες μιας συγκεκριμένης κινητικής μονάδας ανήκουν στον ίδιο μεταβολικό τύπο. Έχει δείχτεί πειραματικά ότι αν μια νευρική ίνα που παρέχει νεύρωση σε μία αερόβια μυϊκή ίνα μεταμοσχευτεί ώστε να νευρώσει μία αναερόβια μυϊκή ίνα, η τελευταία θα μετατραπεί σε αερόβια μυϊκή ίνα.

Μία διάκριση των μυϊκών ινών των σκελετικών μυών με βάση τα ποικίλα δομικά χαρακτηριστικά τους είναι η ακόλουθη:

- α) μυϊκές ίνες τύπου I: Είναι αργής σύσπασης ή οξειδωτικές μυϊκές ίνες.
- β) μυϊκές ίνες τύπου ΙΑ: Είναι ταχείας σύσπασης ή οξειδωτικές μυϊκές ίνες
- γ) μυϊκές ίνες τύπου ΙΒ: Είναι ταχείας σύσπασης ή γλυκολυτικές μυϊκές ίνες

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά των διαφορετικών τύπων μυϊκών ινών (Marieb 2004)

	TYPE I	TYPE II A	TYPE IIB
Χρόνος σύσπασης	Μικρός	Μεγάλος	Πολύ μεγάλος
Μέγεθος κινητικής μονάδας	Μικρό	Μεγάλο	Πολύ μεγάλο
Αντίσταση στη κόπωση	Υψηλή	Μέτρια	Χαμηλή
Είδος άσκησης που ενεργοποιούνται	Αερόβια άσκηση	Μεγάλης διάρκειας αναερόβια άσκηση	Μικρής διάρκειας αναερόβια άσκηση
Παραγωγή δύναμης	Χαμηλή	Υψηλή	Πολύ χαμηλή
Πυκνότητα μιτοχονδρίων	Υψηλή	Υψηλή	Χαμηλή
Πυκνότητα αγγείων	Υψηλή	Μέτρια	Χαμηλή
Οξειδωτική ικανότητα	Υψηλή	Υψηλή	Χαμηλή
Γλυκολυτική ικανότητα	Χαμηλή	Υψηλή	Υψηλή
Κύρια αποθηκευτική καύσιμη ύλη	Τριγλυκερίδια	Φωσφοκρεατίνη, Γλυκογόνο	Φωσφοκρεατίνη, Γλυκογόνο
Χρώμα	Κόκκινο	Κόκκινο προς ροζ	Λευκό

1.2. Ήπαρ

Το ήπαρ είναι εξωκρινής αδένας, οι κύριες λειτουργίες του οποίου είναι οι ακόλουθες:

- α) Αποτοξίνωση από παραπροϊόντα του μεταβολισμού.
- β) Σύνθεση και έκκριση της χολής.
- γ) Σύνθεση πρωτεϊνών του πλάσματος συμπεριλαμβανομένων και των παραγόντων πήξης του αίματος.
- δ) Σύνθεση του γλυκογόνου και γλυκονεογένεση.

Πολλές από τις βιοσυνθετικές λειτουργίες χρησιμοποιούν απευθείας τα προϊόντα της πέψης. Με εξαίρεση τα λιπίδια, τα απορροφημένα προϊόντα των τροφών πριν εισέλθουν στη γενική κυκλοφορία, περνούν με το φλεβικό αίμα από το λεπτό έντερο στο ήπαρ. Έτσι στο ήπαρ καταλήγει αίμα πλούσιο σε αμινοξέα, απλά σάκχαρα και άλλα προϊόντα της πέψης. Ωστόσο, το αίμα αυτό είναι φτωχό σε οξυγόνο. Το οξυγόνο χρειάζεται για να υποστηρίξει την έντονη μεταβολική λειτουργία του ήπατος γι' αυτό και το ήπαρ αιματώνεται με αρτηριακό αίμα μέσω της ηπατικής αρτηρίας. Το ήπαρ δηλαδή έχει διπλή αιμάτωση, αρτηριακή και φλεβική.

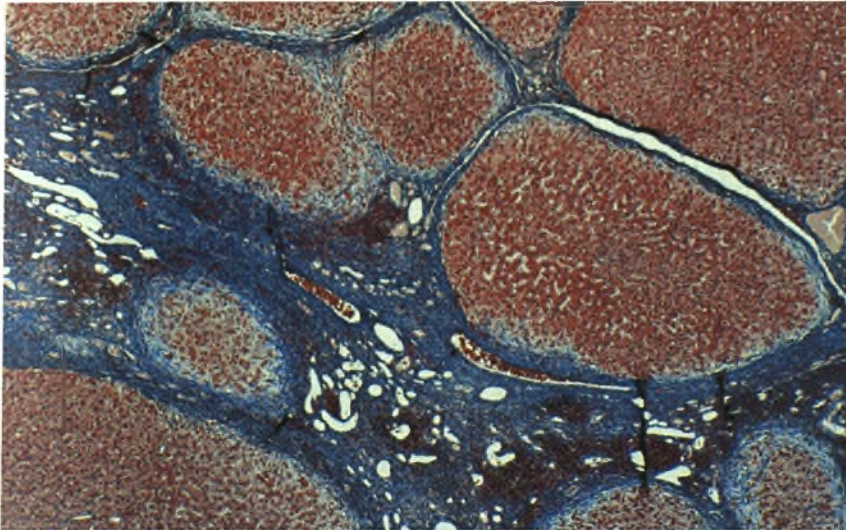
1.2.1. Δομή

Τα δομικά κύτταρα του ήπατος είναι τα ηπατοκύτταρα, τα οποία είναι οργανωμένα σε δομές, τα ηπατικά λοβία. Εντός του ηπατικού λοβίου διακρίνονται τρεις ζώνες (Z1, Z2, Z3). Η Z1 βρίσκεται περίξ του πυλαίου διαστήματος (της γωνίας δηλαδή των ηπατικών λοβίων), η Z3 σε γειτνίαση με τον κλάδο της ηπατικής φλέβας και η Z2 καταλαμβάνει την ενδιάμεση περιοχή του λοβίου. Οι τρεις ζώνες αντιπροσωπεύουν τρεις διαφορετικές περιοχές μεταβολικής δραστηριότητας, δεδομένου ότι διαφέρουν σχετικά με την παροχή οξυγόνου, τροφικών και άλλων συστατικών του αίματος καθώς και στην κατανομή των διαφόρων ηπατικών ενζύμων. Όλα τα κύτταρα του ηπατικού λοβίου παράγουν λευκωματίνη. Οι πρωτεΐνες οξείας φάσεως (ινωδογόνο, απτοσφαιρίνη) παράγονται επίσης σε όλη την έκταση του ηπατικού λοβίου. Αντιθέτως, η γλυκονεογένεση, ο καταβολισμός των αμινοξέων, η σύνθεση της χοληστερόλης και ο σχηματισμός της χολής γίνονται κυρίως στη ζώνη Z1, ενώ η ζώνη Z3 είναι υπεύθυνη για τη γλυκόλυση, τη λιπονεογένεση, την κετογένεση καθώς και την αδρανοποίηση ή βιομετατροπή φαρμάκων ή άλλων τοξικών ουσιών. Επίσης, στη ζώνη Z3 πραγματοποιείται η μεταβολική διάσπαση της αιθυλικής αλκοόλης από το ένζυμο δεϋδρογονάση της αλκοόλης (Wolfle et al., 1983; Wolfle et al., 1985).

1.2.2. Ηπατοκύτταρα

Τα ηπατοκύτταρα είναι μεγάλα, πολυεδρικά κύτταρα με ποικίλη κυτταροπλασματική εμφάνιση. Σε ενήλικες με καλή διατροφή, τα ηπατοκύτταρα αποθηκεύουν σημαντικές ποσότητες γλυκογόνου και επεξεργάζονται μεγάλες ποσότητες λιπιδίων. Τόσο το γλυκογόνο όσο και τα λιπίδια μετακινούνται κατά τη

διάρκεια της ιστολογικής προετοιμασίας αφήνοντας ακανόνιστες άβαφτες περιοχές μέσα στο κυτταρόπλασμα. Το υπόλοιπο κυτταρόπλασμα είναι πλούσιο σε κυτταρικά οργανίδια. Ο πυρήνας των ηπατοκυττάρων είναι μεγάλος με περιφερειακά διασκορπισμένη χρωματίνη και προεξέχων πυρηνίσκο. Ο πυρήνας περιέχει συχνά δυο, τέσσερις ή και οκτώ φορές φορές το συνηθισμένο αριθμό των χρωμοσωμάτων (πολυπλοειδία) (Παπαδημητρίου, 2001).



Εικόνα 2. Φωτογραφική απεικόνιση ηπατοκυττάρων

1.3. Γλυκογόνο

Το γλυκογόνο είναι ένα μεγάλο, διακλαδισμένο πολυμερές καταλοίπων γλυκόζης, το οποίο μπορεί να αποικοδομηθεί και να αποδώσει γλυκόζη όταν απαιτείται ενέργεια. Τα περισσότερα κατάλοιπα γλυκόζης στο γλυκογόνο συνδέονται μεταξύ τους με γλυκοζιτικούς δεσμούς α -1,4 ενώ οι διακλαδώσεις που απαντώνται περίπου σε κάθε δέκα κατάλοιπα σχηματίζονται από α -1-6 γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Η γλυκόζη από το γλυκογόνο κινητοποιείται άμεσα και επομένως είναι μια καλή πηγή ενέργειας για ξαφνική, έντονη δραστηριότητα. Σε αντίθεση με τα λιπαρά οξέα, η απελευθερούμενη γλυκόζη μπορεί να προμηθεύει με ενέργεια αναερόβιες δραστηριότητες. Ωστόσο έχει αποδειχθεί εδώ και χρόνια ότι η οξείδωση των λιπαρών οξέων αναστέλλει την γλυκόλυση και διεγείρει την γλυκονεογένεση (Williamson, 1964; Anderson and Bridges, 1984).

Οι κύριες θέσεις αποθήκευσης του γλυκογόνου είναι το ήπαρ και οι σκελετικοί μύες. Η συγκέντρωση του γλυκογόνου είναι υψηλότερη στο ήπαρ σε σχέση με τους μύες (10% έναντι 2% κατά βάρος, αντίστοιχα), ωστόσο στους

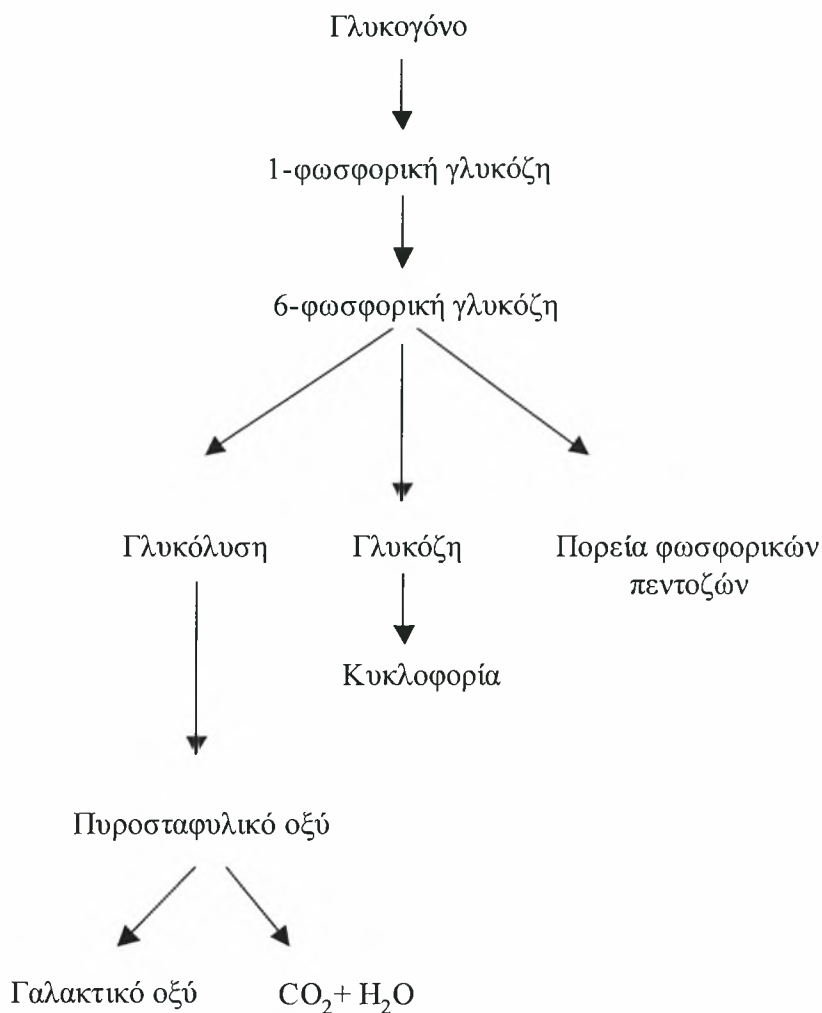
σκελετικούς μύες αποθηκεύεται περισσότερο γλυκογόνο λόγω της μεγάλης μάζας τους (Stryer 1995). Η συγκέντρωση του γλυκογόνου ποικίλλει ανάμεσα στα διάφορα είδη των μυϊκών ινών (Baldwin et al., 1977). Το γλυκογόνο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα με την μορφή κοκκίων, τα οποία περιέχουν επιπλέον και τα ένζυμα που καταλύουν και ρυθμίζουν τις αντιδράσεις της σύνθεσης και της διάσπασης του γλυκογόνου (Marchand et al., 2002).

Στο ήπαρ η σύνθεση και η αποικοδόμηση του γλυκογόνου ρυθμίζονται έτσι ώστε να διατηρούν στο αίμα τα επίπεδα της γλυκόζης που απαιτούνται για την κάλυψη των αναγκών του οργανισμού. Αντίθετα, στους μύες οι διεργασίες αυτές ρυθμίζονται για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών μόνο των μυών.

Η γλυκόζη του αίματος και το μυϊκό γλυκογόνο είναι απαραίτητα για να παρατείνουν την διάρκεια της έντονης άσκησης (Dyck et al., 1993). Η εξάντληση μπορεί να προκληθεί είτε από υπογλυκαιμία είτε από έλλειψη του μυϊκού γλυκογόνου (Holloszy et al., 1975). Τόσο στους μύες όσο και στο ήπαρ η μείωση του γλυκογόνου και η υπογλυκαιμία μπορεί να προκληθεί κάτω από την έλλειψη των υδατανθράκων που προκαλεί η έντονη άσκηση (Holloszy et al., 1980).

1.3.1. Καταβολισμός του γλυκογόνου

Η αποικοδόμηση του γλυκογόνου γίνεται μέσω απελευθέρωσης της 1-φωσφορικής γλυκόζης από το γλυκογόνο, μετατροπής της 1-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφορική γλυκόζη, η οποία είναι το αρχικό υπόστρωμα για τη γλυκόλυση ενώ συμμετέχει και στην πορεία των φωσφορικών πεντοζών με παραγωγή NADPH και παραγώγων της ριβόζης. Επίσης, η 6-φωσφορική γλυκόζη μετατρέπεται σε ελεύθερη γλυκόζη, που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία. Η μετατροπή αυτή συμβαίνει κυρίως στο ήπαρ και σε μικρότερη έκταση στο έντερο και τους νεφρούς.



Εικόνα 3. Απεικόνιση της διάσπασης του γλυκογόνου .

Η φωσφορυλάση του γλυκογόνου είναι το ένζυμο που καταλύει τον καταβολισμό του γλυκογόνου. Ωστόσο, η φωσφορυλάση δε διασπά τους α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Στη διάσπασή τους συμμετέχουν δυο επιπλέον ένζυμα, μια μεταφοράση και μια γλυκοζιτάση α-1,6 δεσμού. Αυτά τα ένζυμα μετατρέπουν τη διακλαδισμένη δομή σε γραμμική και διευκολύνουν τη δράση της φωσφορυλάσης.

Η 1- φωσφορική γλυκόζη που απελευθερώνεται από το γλυκογόνο μπορεί γρήγορα να μετατραπεί με το ένζυμο φωσφογλυκομούταση σε 6-φωσφορική γλυκόζη, ένα σημαντικό μεταβολικό ενδιάμεσο. Η 6-φωσφορική γλυκόζη που παράγεται δε διαχέεται εύκολα έξω από τα κύτταρα σε αντίθεση με την ελεύθερη γλυκόζη. Το ήπαρ περιέχει ένα υδρολυτικό ένζυμο, τη φωσφατάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, το οποίο διασπά τη φωσφορική ομάδα προς σχηματισμό ελεύθερης γλυκόζης και

ορθοφωσφορικού. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου μεταφέρεται η 6-φωσφορική γλυκόζη. Η γλυκόζη και το ορθοφωσφορικό που σχηματίζονται από την υδρόλυση μεταφέρονται πίσω στο κυτταρόπλασμα. Το ένζυμο αυτό απουσιάζει από τους μύες γι' αυτό σε αυτούς διατηρείται η 6-φωσφορική γλυκόζη για την παραγωγή ATP (Ku wajima et al., 1986).

1.3.2. Σύνθεση του γλυκογόνου

Η γλυκογονοσύνθεση γίνεται μέσω της διαδοχικής προσθήκης μορίων γλυκόζης σε μια επιμηκυνόμενη αλυσίδα με τη δράση του ενζύμου συνθάση του γλυκογόνου. Η σύνθεση του γλυκογόνου απαιτεί μια ενεργοποιημένη μορφή της γλυκόζης, τη UDP-γλυκόζη, η οποία παράγεται από την αντίδραση της UTP – γλυκόζης με την 1-φωσφορική γλυκόζη. Η UDP-γλυκόζη αντιδρά με το γλυκογόνο κι έτσι η αλυσίδα του γλυκογόνου επιμηκύνεται. Το ένζυμο συνθάση του γλυκογόνου δημιουργεί μόνο γραμμικά και όχι διακλαδισμένα τμήματα. Στη δημιουργία των διακλαδισμένων τμημάτων συμβάλλει το διακλαδωτικό ένζυμο. Για να προσθέσει η συνθάση κατάλοιπα γλυκόζης θα πρέπει η πολυσακχαριτική αλυσίδα να περιέχει περισσότερα από τέσσερα κατάλοιπα. Επομένως, για να δράσει το ένζυμο είναι απαραίτητος ένας εκκινητής, ο οποίος είναι το ένζυμο γλυκογονίνη

1.4. Άσκηση

Κατά την άσκηση υπάρχει ανάγκη αυξημένης παραγωγής ενέργειας. Η ενέργεια δεν προέρχεται από μια μόνο πηγή σε κάθε είδους άσκηση.

Οι κυριότερες πηγές είναι:

α) οι ενώσεις με υψηλό δυναμικό μεταφοράς της φωσφορικής ομάδας.

β) οι υδατάνθρακες.

Σε υψηλής έντασης και μικρής διάρκειας άσκηση είναι πολύτιμη η συνεισφορά της φωσφοκρεατίνης για την παραγωγή ενέργειας με την μορφή ATP στα πρώτα λεπτά της άσκησης. Ο μηχανισμός αυτός παραγωγής ενέργειας είναι αναερόβιος.



Λόγω της μικρής όμως ποσότητας της CP δεν αρκεί για μεγάλης διάρκειας άσκηση παρα μόνο λίγα δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια ενεργοποιείται το γλυκογόνο μέσω της διαδικασίας της γλυκόλυσης. Στα αρχικά της στάδια η γλυκόλυση εξελίσσεται αναερόβια με κέρδος 2 ATP για κάθε μόριο γλυκόζης. Τελικό προϊόν της γλυκόλυσης είναι το πυροσταφυλικό οξύ που μετατρέπεται αναερόβια σε γαλακτικό

οξύ. Σε αερόβιες όμως συνθήκες ευνοείται η πλήρης οξειδωση του πυροσταφυλικού οξέος μέσω του κύκλου του κιτρικού οξέος με μεγαλύτερο ενεργειακό κέρδος (30 μόρια ATP). Κατά την επικράτηση των αναερόβιων συνθηκών το πυροσταφυλικό οξύ της γλυκόλυσης εισέρχεται στα μιτοχόνδρια (Μούγιος, 2002).

1.4.1. Μυϊκό και ηπατικό γλυκογόνο κατά την άσκηση

Έχουν αποδειχτεί ότι υπάρχουν διαφορές στο μεταβολισμό του γλυκογόνου ανάμεσα στο ήπαρ και τους σκελετικούς μύες (Fell et al., 1980; Saitoh et al., 1983).

Το μυϊκό γλυκογόνο αποτελεί απευθείας πηγή ενέργειας για την επίτευξη των μυϊκών κινήσεων και τη διεξαγωγή όλων των εξαντλητικών εργασιών (Pernow et al., 1971; Holloszy et al., 1998). Σε αντίθεση με τη γρήγορη αύξηση του μυϊκού γλυκογόνου, το ηπατικό γλυκογόνο παραμένει αισθητά μειωμένο 3 ώρες μετά την εξαντλητική άσκηση απουσία εξωγενούς παροχής υδατανθράκων (Fell et al., 1980). Ο λόγος της γρήγορης ανασύνθεσης του μυϊκού γλυκογόνου μετά την άσκηση δεν οφείλεται μόνο στην αυξημένη ενεργότητα της συνθάσης I του γλυκογόνου αλλά και στην αυξημένη διαπερατότητα του σκελετικού μύος σε γλυκόζη (Fell et al., 1980).

Ο ρόλος του ηπατικού γλυκογόνου είναι να συντηρεί τη συγκέντρωση της γλυκόζης του αίματος σε φυσιολογικά επίπεδα και να προμηθεύει με γλυκόζη ολόκληρο το κεντρικό νευρικό σύστημα για την κάλυψη των μεταβολικών αναγκών. Απουσία εξωγενούς παροχής υδατανθράκων το επίπεδο της γλυκόζης του αίματος διατηρείται σε φυσιολογικά επίπεδα μέσω της διαδικασίας της γλυκονεογένεσης και της γλυκογονόλυσης που λαμβάνουν χώρα στο ήπαρ (Fell et al., 1980). Η συγκέντρωση του ηπατικού γλυκογόνου ταλαντεύεται μεταξύ των γευμάτων και μειώνεται μετά από ολονύχτια νηστεία. Η παραγωγή του ηπατικού γλυκογόνου ελέγχεται:

- α) Από τη διέγερση ή την αναστολή που προκαλείται από τα επίπεδα της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης.
- β) Από τη διέγερση μέσω των κατεχολαμινών (επινεφρίνη και νορεπινεφρίνη).

Κατά την άσκηση δεν παρατηρείται καμία μείωση στα επίπεδα της γλυκόζης του αίματος μέχρι 1h έντονης και εξαντλητικής άσκησης, ενώ οι αλλαγές στους ρυθμιστές της παραγωγής του ηπατικού γλυκογόνου, του επιπέδου της γλυκαγόνης και της ινσουλίνης λαμβάνουν χώρα νωρίτερα κατά τη διάρκεια της άσκησης (Wasserman et al., 1990). Ο μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την αύξηση της έκκρισης της γλυκαγόνης και τη μείωση της απελευθέρωσης της ινσουλίνης δεν είναι

γνωστός. Ίσως να οφείλεται στη συμπαθητική διέγερση των α και β παγκρεατικών κυττάρων (Wood et al., 1974).

1.4.2. Διάσπαση του γλυκογόνου κατά την άσκηση

Η ταχύτητα της γλυκογονόλυσης στο μυ σε κατάσταση ηρεμίας είναι χαμηλή ενώ σε περιβάλλον άσκησης η ταχύτητά της αυξάνεται. Αυτό συμβαίνει διότι, λόγω της υδρόλυσης του ATP στο σαρκόπλασμα αυξάνει η συγκέντρωση του P_i , το οποίο είναι το υπόστρωμα της πρώτης αντίδρασης της γλυκογονόλυσης. Επίσης, υπεύθυνη για αυτή τη διαδικασία είναι η αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων Ca^{2+} λόγω της απελευθέρωσής τους από το σαρκοπλασματικό δίκτυο κατά τη μυϊκή συστολή. Τα ιόντα Ca^{2+} συνδέονται με την κινάση της φωσφορυλάσης και την ενεργοποιούν όταν η συγκέντρωσή τους φτάσει τα 10^{-6} mol/L. Η ενεργοποιημένη κινάση φωσφορυλιώνει τη φωσφορυλάση β (ανενεργός μορφή) μετατρέποντας τη στην ενεργοποιημένη μορφή φωσφορυλάση α (Brostrom et al., 1971).

Επίσης, κατά την άσκηση αυξάνεται η αναλογία AMP/ATP κι έτσι ενεργοποιείται η μετατροπή της φωσφορυλάσης στην ενεργή της μορφή (Drummond et al., 1969). Επιπλέον, η φωσφορυλάση ενεργοποιείται από την επινεφρίνη, η έκκριση της οποίας από το μυελό των επινεφριδίων εντείνεται λόγω της άσκησης. Η επινεφρίνη ενεργοποιεί το ένζυμο και σε ένα μυ σε ηρεμία αλλά έχει μικρότερη επίδραση στην γλυκογονόλυση (Ren et al., 1989). Ο βαθμός της διάσπασης του γλυκογόνου αυξάνεται κατά τη διάρκεια της συντηρητικής άσκησης (Hultman et al., 1988). Πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός ότι ο βαθμός της γλυκογονόλυσης ορίζεται από τις ενεργότητες της φωσφορυλάσης και της συνθετάσης του γλυκογόνου. Μελέτες με ραδιοσημασμένη γλυκόζη έχουν αποδείξει ότι η σύνθεση του γλυκογόνου συνεχίζεται ακόμη και όταν λαμβάνει χώρα η διάσπαση του γλυκογόνου κατά τη μυϊκή σύσπαση (Nesher et al., 1985). Εναλλακτικά, ο βαθμός της γλυκογονόλυσης μπορεί να εξαρτάται από την τροφοδοσία από άλλα μεταβολικά μονοπάτια (Ren et al., 1989).

1.4.3. Επίδραση της άσκησης στη γλυκόλυση

- Αύξηση του υποστρώματος (6-φωσφορικής γλυκόζης) της δεύτερης αντίδρασης της γλυκόλυσης. Αυτό το υπόστρωμα προέρχεται είτε από τις αποθήκες γλυκόζης μέσω της δράσης του ενζύμου φωσφορυλάση του γλυκογόνου είτε από

εξωγενή παροχή γλυκόζης. Η παραγωγή της γλυκόζης ελέγχεται από το ήπαρ είτε εξωγενώς είτε από τις ενδογενείς αποθήκες (Wahren et al., 1977).

- Αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα. Οφείλεται στην αυξημένη αιματική ροή προς του ασκούμενους μύες και στην αύξηση της συγκέντρωσης των μεταφορέων της γλυκόζης στο σαρκείλημα (GLUT1, GLUT3, GLUT4). Κυρίως συμμετέχει ο GLUT4 (James et al., 1988) και σε μικρότερο ποσοστό ο GLUT1. Η ινσουλίνη μεταφέρεται από τον GLUT4 από την ενδοκυτταρική περιοχή αποθήκευσης στην πλασματική μεμβράνη (Douen et al., 1990). Ο GLUT1 εμφανίζεται μόνο σε μικρές συγκεντρώσεις και δεν επηρεάζεται από την άσκηση.

- Αλλοστερική ρύθμιση της φωσφοφρουκτοκινάσης. Είναι ένα πολύπλοκο κινητικά ένζυμο που δεσμεύει έναν αριθμό αλλοστερικών τροποποιητών (Bauer et al., 1984). Το ένζυμο αυτό ρυθμίζει τη γλυκόλυση μέσω ορισμένων μεταβολικών μονοπατιών και ενεργοποιείται από το AMP και την αμμωνία ενώ αναστέλλεται από το ATP (Tornheim et al., 1988). Σε ένα μυ που βρίσκεται σε ηρεμία το ένζυμο είναι σχετικά ανενεργό, ενώ με την έναρξη της άσκησης μειώνεται η ποσότητα του ATP και αυξάνεται η συγκέντρωση του AMP και η ποσότητα της αμμωνίας λόγω απαμίνωσης του AMP και των αμινοξέων με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενζύμου.

- Ενεργοποίηση του ενζύμου που καταλύει τη δέκατη αντίδραση της γλυκόλυσης (κινάση του πυροσταφυλικού οξέος). Το ένζυμο αυτό αναστέλλεται από το ATP και τη φωσφοκρεατίνη ενώ ενεργοποιείται από το ADP.

Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος σε σκελετικούς μύες σε αερόβια άσκηση αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του O₂ (Connett et al., 1986). Η άσκηση προκαλεί μια αύξηση στη μιτοχονδριακή αναπνευστική χωρητικότητα και μειώνει το επίπεδο του συσσωρευμένου γαλακτικού οξέος (Favier et al., 1986).

1.4.4. Παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση

Η άσκηση προκαλεί την παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα κύτταρα (Davies et al., 1982). Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν κυτταρική καταστροφή μόνο κατά την διάρκεια της εξαντλητικής άσκησης (Sastre et al., 1992) ενώ έχουν τόσο θετικές επιδράσεις (π.χ στο ανοσοποιητικό σύστημα) ή αρνητικές συνέπειες (στα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και το DNA). Ο οργανισμός για να περιορίσει τις αρνητικές αυτές συνέπειες έχει αναπτύξει ένα σύστημα προστασίας. Το αντιοξειδωτικό σύστημα

περιλαμβάνει τα αντιοξειδωτικά ένζυμα (καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, υπεροξειδική δισμουτάση) και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά (βιταμίνη Α, βιταμίνη Ε, βιταμίνη C ,γλουταθειόνη και ουρικό οξύ). Εάν η παραγωγή των ελευθέρων ριζών συμβαίνει σε τέτοιο βαθμό που η αντιοξειδωτική άμυνα δεν μπορεί να τις απομακρύνει ή να τις αδρανοποιήσει τότε παράγεται οξειδωτικό στρες.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προέλθει από:

1. Μείωση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών λόγω μεταλλάξεων, που επηρεάζουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τοξικών παραγόντων που μειώνουν την αντιοξειδωτική άμυνα καθώς και διατροφικών ελλείψεων.
2. Αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών, που μπορεί να προέρχεται από αύξηση είτε των επιπέδων των τοξινών είτε της ενεργοποίησης των φυσικών συστημάτων παραγωγής ριζών.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε:

1. Τραυματισμό των ιστών προκαλώντας βλάβες στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια.
2. Κυτταρικό θάνατο διεγείροντας τους δύο μηχανισμούς που οδηγούν στο θάνατο (νέκρωση και απόπτωση).
3. Προσαρμογή μέσω αύξησης της έκφρασης της αντιοξειδωτικής άμυνας (Halliwell 2001).
4. Οξείδωση της γλουταθειόνης, απελευθέρωση των κυτταρικών ενζύμων (Sastre et al., 1992) καθώς και σε άλλα σήματα κυτταρικής καταστροφής (Jackson 1987).
5. Μετάδοση των σημάτων μέσα στα κύτταρα μέσω διέγερσης των σηματοδοτικών μονοπατιών (Reid et al., 1992; Murrant et al., 2001) .

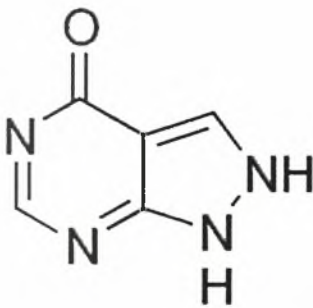
Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες. Στους ενδογενείς περιλαμβάνονται το ψυχολογικό στρες, η φλεγμονή (παροδική μόλυνση/χρόνια πάθηση), ο καρκίνος, η ισχαιμία/επαναιμάτωση και ο κυτταρικός θάνατος. Στους εξωγενείς παράγοντες περιλαμβάνονται η διατροφή, οι ρύποι, τα φάρμακα, η ακτινοβολία, η έντονη άσκηση και η έκθεση σε ξενοβιοτικά. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες δρουν συχνά πολύ γρήγορα και πολλές φορές η δράση τους είναι αθροιστική ή τουλάχιστον συνεργιστική (Møller et al., 1996).

Επίσης, η έντονη άσκηση προκαλεί αύξηση στην παραγωγή των αντιοξειδωτικών. Μελέτες τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους απέδειξαν μια

αυξημένη αντιοξειδωτική ικανότητα τόσο στο αίμα όσο και στους ιστούς μετά την αεροβική άσκηση.

1.5. Αλοπουρινόλη

Η αλοπουρινόλη [4-hydroxyglyoxal (3,4-d) pyrimidine] είναι ένα δομικό ανάλογο της υποξανθίνης (Parks and Granger 1986) και αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης (Kelley and Beardmore 1990) και της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης (Hoey et al., 1988). Η αλοπουρινόλη μεταβολίζεται σε οξυπουρινόλη και αναστέλλει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ μειώνοντας τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ουρικής αρθρίτιδας και της πρωτογενούς και δευτερογενούς υπερουριχαιμίας (Wortmann et al., 2005). Η αλοπουρινόλη έχει χρόνο ημιζωής στο πλάσμα 2-3 ώρες ενώ η οξυπουρινόλη 14-30 ώρες (Pea 2005).



Εικόνα 4. Δομή της αλοπουρινόλης

Έχει δειχθεί ότι η αλοπουρινόλη προστατεύει ενάντια στην κυτταρική καταστροφή που προκαλεί η έντονη άσκηση τόσο στον άνθρωπο (Gomez-Gabrera et al., 2003) και στους επίμυες (Vina et al., 2000). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η αλοπουρινόλη έχει προστατευτικό ρόλο απέναντι στο προκαλούμενο από την άσκηση οξειδωτικό στρες (Gomez-Cabrera et al., 2005; Gomez –Cabrera et al., 2006). Πιο συγκεκριμένα, η χορήγηση αλοπουρινόλης αναστέλλει την επαγόμενη από την άσκηση αυξημένη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης στους επίμυες σε δαπεδοεργόμετρο (Gomez-Cabrera et al., 2005; Koyama et al., 1999) και στον άνθρωπο στο μαραθώνιο (Gomez-Cabrera et al., 2006) και την ποδηλασία υψηλού επιπέδου (Gomez-Cabrera et al., 2003). Η αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης

προκαλεί μείωση στην ενεργότητα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στα λεμφοκύτταρα (Gomez-Cabrera et al., 2006). Επίσης, η χορήγηση αλοπουρινόλης προκαλεί μείωση της μηλονικής διαλδεΐδης στον άνθρωπο μετά από μαραθώνιο (Gomez-Cabrera et al., 2006) ενώ προκάλεσε μείωση στη συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης σε επίμυες που υποβλήθηκαν σε εξαντλητικό τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο (Gomez-Cabrera et al., 2006).

Ορισμένες από τις προηγούμενες εργασίες εξέτασαν και την επίδραση της αλοπουρινόλης στην αθλητική απόδοση, ωστόσο δε βρήκαν καμία διαφορά τόσο στους επίμυες (Gomez-Cabrera et al., 2005; Koyama et al., 1999) όσο και στον άνθρωπο (Gomez-Cabrera et al., 2003). Ωστόσο, πρόσφατα βρέθηκε ότι η χορήγηση αλοπουρινόλης μειώνει την απόδοση των επιμύων (Veskoukis et al in press) κατά την αερόβια εξαντλητική άσκηση.

1.6. Σκοπός

Σκοπός, λοιπόν της εργασίας αυτής ήταν να εξετάσει την πιθανή αλληλεπίδραση της αλοπουρινόλης και της άσκησης στο μεταβολισμό του μυϊκού και του ηπατικού γλυκογόνου ως αιτία για την πτώση της απόδοσης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πειραματόζωα

Εξήντα ένηβοι αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar (ηλικίας 8 εβδομάδων, βάρους 220 ± 10 gr, mean \pm SEM) αποκτήθηκαν από το Ελληνικό Ινστιτούτο Pasteur. Οι επίμυες φιλοξενήθηκαν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (12 ώρες φώς /12 ώρες σκότος και θερμοκρασία 20°C) σε κλουβιά των τριών. Η τροφή και το νερό ήταν διαθέσιμα ελεύθερα. Το πειραματικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την αρμόδια επιτροπή για την έρευνα με πειραματόζωα και ήταν σύμφωνο με την ισχύουσα Ευρωπαϊκή νομοθεσία.

Οι επίμυες μελετήθηκαν κάτω από δύο καταστάσεις, χορήγηση αλοπουρινόλης και άσκηση. Το DMSO (Dimethyl sulfoxide, που ήταν ο διαλύτης της αλοπουρινόλης και η αλοπουρινόλη χορηγήθηκαν 1.5h πριν την άσκηση. Τα δείγματα των ιστών λήφθηκαν χειρουργικά πριν, αμέσως μετά την άσκηση και 5h μετά το τέλος της άσκησης. Η ομάδα επιμύων στην οποία χορηγήθηκε DMSO και θανατώθηκε 1.5h μετά τη χορήγηση είναι η ομάδα ελέγχου. Η διάρκεια της άσκησης για τους επίμυες στους οποίους δε χορηγήθηκε αλοπουρινόλη ήταν περίπου 1h.

Πιο συγκεκριμένα, οι επίμυες χωρίστηκαν στις παρακάτω ομάδες των δέκα ζώων.

- α) Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO, δεν ασκήθηκαν και θανατώθηκαν 1.5h μετά τη χορήγηση. Η ομάδα αυτή ήταν η ομάδα ελέγχου (ομάδα control, CON).
- β) Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO, ασκήθηκαν 1.5h μετά τη χορήγηση και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση.
- γ) Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO, ασκήθηκαν 1.5h μετά τη χορήγηση και θανατώθηκαν 5h μετά την άσκηση.
- δ) Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη, δεν ασκήθηκαν και θανατώθηκαν 1.5h μετά τη χορήγηση.
- ε) Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη, δεν ασκήθηκαν και θανατώθηκαν 2.5h μετά τη χορήγηση.
- στ) Επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη, δεν ασκήθηκαν και θανατώθηκαν 7.5h μετά τη χορήγηση.

Σε προηγούμενες μελέτες έχει παρατηρηθεί σημαντική αύξηση των δεικτών οξειδωτικού στρες μερικές ώρες μετά την άσκηση τόσο στον άνθρωπο (Michailidis et al., 2007) όσο και στους επίμυες (Koyama et al., 1999) γι' αυτό επιλέχθηκε η συλλογή δειγμάτων αμέσως μετά την άσκηση αλλά και 5h μετά την άσκηση. Προκαταρκτικά πειράματα απέδειξαν ότι η χορήγηση DMSO δεν επηρεάζει καμία από τις μετρούμενες μεταβλητές σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή.

2.2. Χορήγηση αλοπουρινόλης

Μια δόση αλοπουρινόλης των $50\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ βάρους σώματος των επιμύων χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 1.5h πριν το πρωτόκολο κολύμβησης καθώς η μέγιστη τιμή των επιπέδων της αλοπουρινόλης στο πλάσμα παρατηρείται 1,5-2h μετά τη χορήγηση. Η αλοπουρινόλη ήταν διαλυμένη σε DMSO, εφόσον δεν ήταν δυνατό να διαλυθεί σε αλατούχο διάλυμα ή σε ένα μείγμα DMSO και αλατούχο διάλυμα. Το DMSO είναι ένας καλός διαλύτης για την αλοπουρινόλη και έχει χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενα πειράματα στον άνθρωπο (Lee and Wang 1999).

2.3. Εξοικείωση στη κολύμβηση

Κατά την άφιξη τους οι επίμυες αφέθηκαν να εγκλιματιστούν για 7 ημέρες πριν την έναρξη της άσκησης. Τα ζώα εξοικειώθηκαν στην κολύμβηση για μια περίοδο πέντε ημερών πριν ακολουθήσουν το πρωτόκολλο της κολύμβησης. Την πρώτη μέρα της εξοικείωσης οι επίμυες παρέμειναν στο νερό για 10 λεπτά χωρίς πρόσθετο βάρος στην ουρά τους. Τις επόμενες δυο ημέρες οι επίμυες κολυμπούσαν για δέκα λεπτά με βάρος δεμένο στη βάση της ουράς τους που αντιστοιχούσε στο 1% του σωματικού τους βάρους. Τις τελευταίες δύο ημέρες το φορτίο αυξήθηκε σε 2%. Τελικά οι επίμυες ξεκουράστηκαν για τρεις ημέρες πριν ακολουθήσουν το πρωτόκολο κολύμβησης.

2.4. Πρωτόκολο κολύμβησης

Οι επίμυες των ομάδων άσκησης κολύμβησαν ανεξάρτητα μέχρι εξαντλήσεως μέσα σε δεξαμενές νερού (διαμέτρου 1.0m, βάθους 0.7m) σε θερμοκρασία νερού 33–36 °C. Το βάρος αντιστοιχούσε στα 4% του σωματικού τους βάρους για να επιτευχθεί συνεχής κολύμβηση. Η κολύμβηση επιλέχθηκε διότι είναι μια μορφή άσκησης που αντίθετα με το εξαντλητικό τρέξιμο προκαλεί πολύ μικρή μυϊκή καταστροφή (Komulainen et al., 1995).

2.5. Επεξεργασία των δειγμάτων

Τα δείγματα του υποκνημίδιου μυός και του ήπατος των επιμύων λήφθηκαν χειρουργικά και τοποθετήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% (υδατικό διάλυμα της αέριας φορμαλδεΰδης). Η φορμόλη είναι διάλυμα μονιμοποίησης και χρησιμεύει στην αποφυγή των μεταθανάτιων αλλοιώσεων των ιστών που προκαλούνται λόγω της λύσης των κυττάρων. Πριν την περαιτέρω επεξεργασία των ιστοτεμαχίων γίνεται έκπλυση με ρέον νερό για την απομάκρυνση της περίσσειας της φορμόλης. Μετά την έκπλυση ακολουθεί το στάδιο της λήψης των κατάλληλων ιστολογικών τομών από το ήπαρ και τους μύες. Η κάθε τομή εγκλείεται σε ένα μικρό διάτρητο πλαστικό καψάκι.

Οι ιστοί που προκύπτουν από όλη την προηγούμενη προετοιμασία είναι μαλθακοί και περιέχουν νερό, γι' αυτό το λόγο δεν είναι κατάλληλοι για τη λήψη των ιστολογικών τομών. Πρέπει να αφαιρεθεί το νερό και τη θέση του να καταλάβει ένα υλικό που να προσδίδει τον κατάλληλο βαθμό σκληρότητας για τον τεμαχισμό των δειγμάτων. Το πιο κατάλληλο υλικό για αυτό το σκοπό αυτό είναι η παραφίνη. Η αφυδάτωση των ιστοτεμαχίων γίνεται με ενβάπτιση τους σε ανιούσα σειρά αλκοολών 70, 80, 95, και 100 βαθμών αλκοόλης. Μετά την αφυδάτωση ακολουθεί η αντικατάσταση της αλκοόλης από ένα υλικό που στο επόμενο στάδιο αντικαθίσταται από την παραφίνη. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται σε αυτό το στάδιο δίνουν μια ημιδιαφανή όψη στον μέχρι τότε αδιαφανή ιστό και είναι συνήθως η ξυλόλη. Κατά το τελικό στάδιο της εμπότισης των ιστοτεμαχίων με παραφίνη η διαδικασία γίνεται σε δοχείο που διατηρεί την παραφίνη σε υγρή μορφή.

Η παραπάνω διαδικασία γίνεται σε μηχανήμα που ονομάζεται ιστοκινέττα και αποτελείται από ειδικά γυάλινα δοχεία που περιέχουν τα οιοπνεύματα και τις ξυλόλες και δυο κλιβάνους με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία, όπου βρίσκεται η λιωμένη παραφίνη. Τα καψάκια με τα ιστοτεμάχια τοποθετούνται σε ένα μεταλλικό καλάθι που μετακινείται και βυθίζεται από το ένα δοχείο στο επόμενο. Μετά διαδικασία αυτή ακολουθεί η έγκλειση ή σκλήνωση του ιστοτεμαχίου. Αυτό είναι το στάδιο στο οποίο ο ιστός φέρεται μέσα στο μέσο έγκλεισης (παραφίνη), το οποίο είναι σε υγρή κατάσταση και στη συνέχεια ακολουθεί η πήξη του μέσου έγκλεισης σε καλούπια. Έτσι, το μέσο έγκλεισης και το εντός αυτού ιστοτεμάχιο αποτελούν ένα συμπαγές σώμα (κύβο παραφίνης ή block), που μπορεί να διατηρηθεί επ'άοριστον.

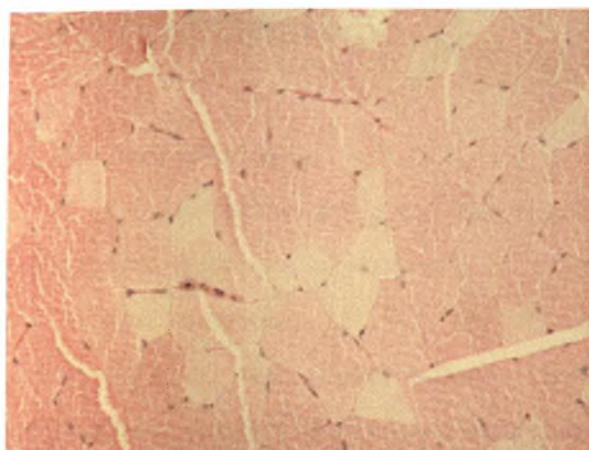
Ο κύβος παραφίνης τοποθετείται στο μικροτόμο παραφίνης, που επιτρέπει τη λήψη εξαιρετικά λεπτών και διάφανων στο μικροσκόπιο τομών. Οι τομές αυτές έχουν

πάχος 3 μm και επιτρέπουν τη μελέτη των ιστολογικών στοιχείων του παρασκευάσματος.

Οι ιστολογικές τομές μεταφέρονται σε υδατόλουτρο επιπλεύσεως ιστών κατάλληλης θερμοκρασίας ώστε η παραφίνη να γίνει μαλακή με συνέπεια την εκτύλιξη των τομών. Οι εκτυλιχθείσες τομές μεταφέρονται σε αντικειμενοφόρες πλάκες θετικά φορτισμένες για να γίνει καλύτερη συγκόλληση των κυττάρων πάνω στα πλακίδια. Οι τομές που είναι επιστρωμένες πάνω στις πλάκες είναι μερικώς αφυδατωμένες γι' αυτό τοποθετούνται στον κλίβανο σε θερμοκρασία $37-40^{\circ}\text{C}$ ώστε να ξηραθούν και να καθλωθούν πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα. Από την ξυλόλη τα βαμμένα πλακίδια καλύπτονται με καλυπτρίδα χρησιμοποιώντας κόλλα Endellan.

2.6. Χρώση periodic acid -Schiff

Οι τομές των μυών και του ήπατος βάφτηκαν με χρώση PAS σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολο (MacManus, 1948). Με τη χρώση αυτή βάφονται το γλυκογόνο, η βλέννη και το υαλουρονικό οξύ. Μερικά από αυτά τα συστατικά με τη χρώση PAS δίνουν μια έντονη χρωματική αντίδραση ενώ άλλα δίνουν πιο ασθενή αντίδραση. Το γλυκογόνο κατά την επεξεργασία με τη χρώση βάφεται σε μώβ απόχρωση. Η χρώση αυτή αναγνωρίζει τις ομάδες $\text{CHOH}\cdot\text{CHOH}$, $\text{CHOH}\cdot\text{CHNH}_2$, $\text{CHOH}\cdot\text{CHNHR}$ στους πολυσακχαρίτες, στις γλυκοπρωτείνες και στα γλυκολιπίδια. Η ταυτοποίηση των ομάδων αυτών γίνεται μέσω της παραγωγής των αλδεϋδών λόγω της οξειδωσης του περιοδικού οξέος, οι οποίες βάφονται μέσω του αντιδραστήριου Schiff. Το ξέπλυμα ανάμεσα στην οξειδωση του περιοδικού οξέος και στην εμβάπτιση στο διάλυμα Schiff μειώνει την αντίδραση ανάμεσα τους (Hale 1979). Το αντιδραστήριο της αιματοξυλίνης βάφει τον πυρήνα των κυττάρων.



Εικόνα 5. Τομή μυός με χρώση PAS. Η τομή δείχνει την εξωτερική περιφερική τοποθέτηση των πυρήνων των σκελετικών μυϊκών ινών. Οι μυϊκές ίνες εμφανίζονται ακανόνιστες και πολυεδρικές.

2.8. Ημιποσοτική εκτίμηση του μυϊκού γλυκογόνου με τη χρήση του προγράμματος Image J.

Η μικροσκοπική εξέταση των τομών έγινε με μικροσκόπιο Nikon και φωτογραφήθηκαν με φωτογραφική μηχανή υψηλής ανάλυσης COOLPIX. Οι ψηφιακά αποθηκευμένες εικόνες υπέστησαν επεξεργασία με το σύστημα επεξεργασίας εικόνων Image J. Το Image J είναι ένα πρόγραμμα, το οποίο έχει τη δυνατότητα να μετράει περιοχές ή την ποσότητα των στατιστικών pixel της επιλεγόμενης περιοχής. Μπορεί να μετρήσει αποστάσεις ή και γωνίες και να δημιουργήσει ιστογράμματα. Η ποσότητα του γλυκογόνου αντιστοιχεί στο μαύρο χρώμα. Επιλέγουμε μια εικόνα που χρησιμοποιούμε ως πρότυπο και κατώτερο όριο μέτρησης για σύγκριση με τις υπόλοιπες εικόνες. Από την εικόνα αυτή επιλέγουμε μια περιοχή, την αντιγράφουμε και την επικολλούμε πάνω στην προς μέτρηση εικόνα. Στην προς μέτρηση εικόνα συχνά συναντούμε περιοχές που αντιστοιχούν σε αναδιπλώσεις της τομής ή σε αρτηρίες τις οποίες αφαιρούμε .

2.9. Στατιστική ανάλυση

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

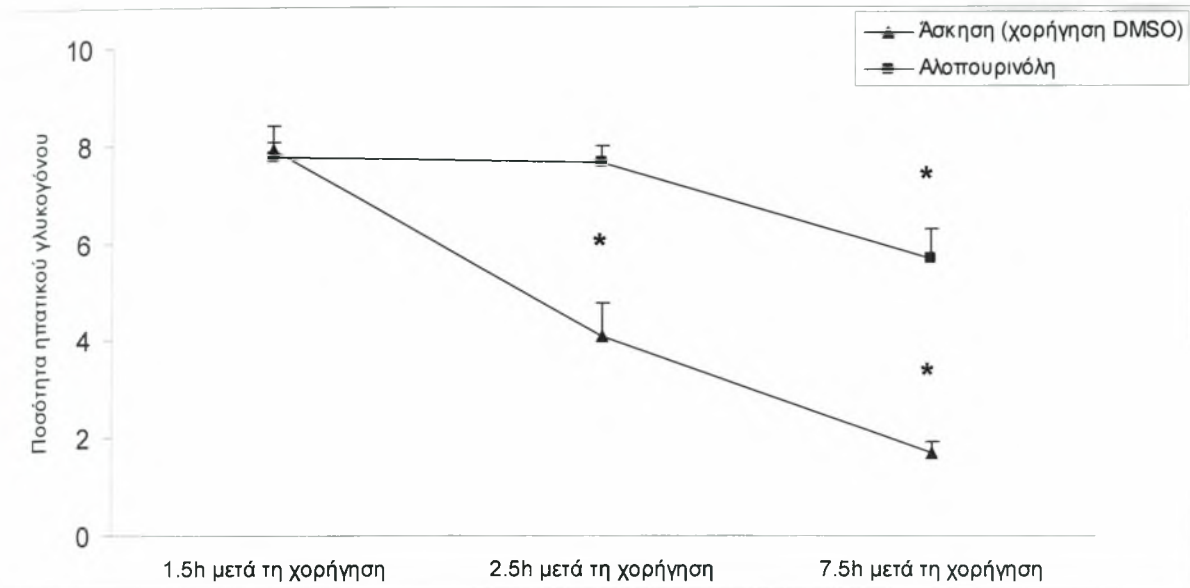
3.1. Ηπατικό γλυκογόνο

Ο υπολογισμός του ηπατικού γλυκογόνου στήριζεται στη μικροσκοπική παρατήρηση έμπειρου παρατηρητή. Η συγκέντρωση γλυκογόνου δεν εμφανίζει ομοιόμορφη κατανομή σε όλη την έκταση της τομής λόγω διαφοράς στη λειτουργικότητα των μεμονωμένων ηπατοκυττάρων. Σε κάποιο δεδομένο ηπατοκύτταρο υπάρχει ομοιόμορφη κατανομή στο υπόστρωμα καθώς και σβωλία με πιο έντονο χρώμα. Οι τομές του ήπατος για καλύτερη σύγκριση έγιναν από το μέσο του δεξιού λοβού (κάθετα) για να ανταποκρίνονται στο ίδιο περίπου τμήμα του ήπατος. Η βαθμολόγηση της ποσότητας του γλυκογόνου στις τομές του ήπατος των επιμύων έγιναν με κλίμακα από το 1 έως το 10 ανάλογα με την ένταση του χρώματος της χρώσης σε όλη την έκταση της τομής. Οι παράμετροι στους οποίους βασίστηκε η μέτρηση της ποσότητας του γλυκογόνου είναι οι ακόλουθοι:

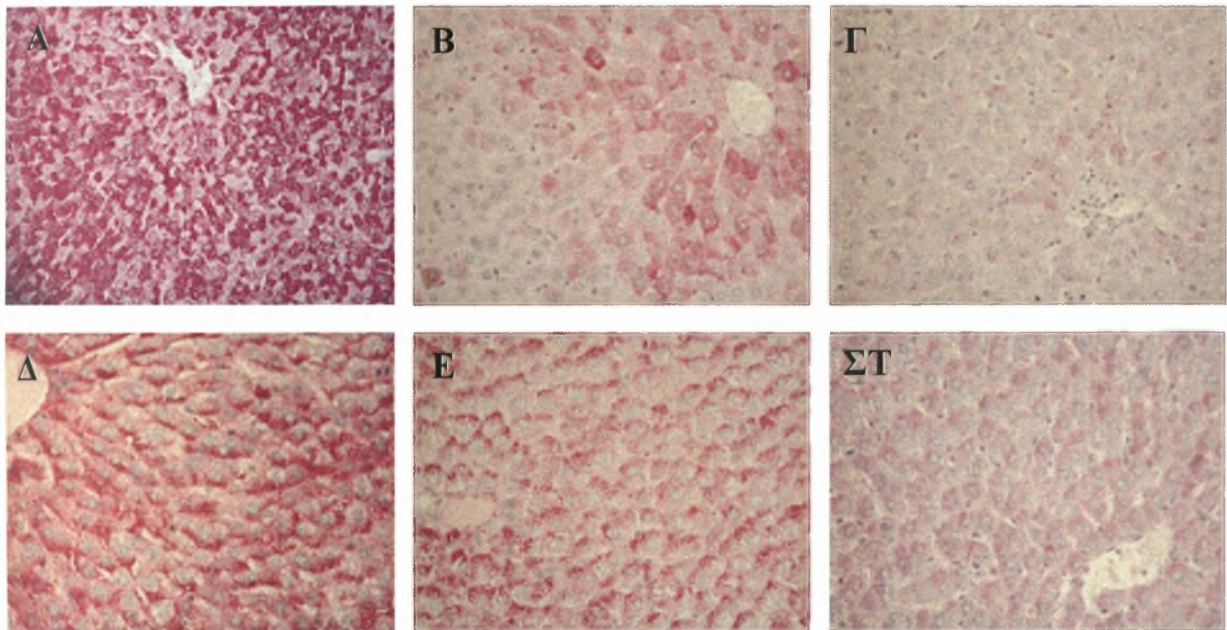
- Η ένταση του χρώματος της τομής
- Η κοκκίωση (μικρές ή μεγαλύτερες συσσωρεύσεις βυσσινί κοκκίων).
- Έκταση των κοκκίων επάνω στην τομή

Πίνακας 2. Ποσότητα ηπατικού γλυκογόνου επιμύων μετά από άσκηση και χορήγηση αλοπουρινόλης. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($P<0.05$).

Πειραματική ομάδα	Ένταση χρώματος (mean \pm SEM)
ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (1.5h μετά τη χορήγηση DMSO)	7 \pm 0.5
ΑΜΕΣΩΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ (2.5h μετά τη χορήγηση DMSO)	4 \pm 0.7*
5h ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ (7.5h μετά τη χορήγηση DMSO)	2 \pm 0.2*
ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗ (1.5h μετά τη χορήγηση)	7.7 \pm 0.3
ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗ (2.5h μετά τη χορήγηση)	7 \pm 0.3
ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗ (7.5h μετά τη χορήγηση)	6 \pm 0.6*



Διάγραμμα 1. Επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο ηπατικό γλυκογόνο.*:Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($P<0.05$).



Εικόνα 6. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο ηπατικό γλυκογόνο σε εγκάρσιες τομές παραφίνης μετά από χρώση Periodic Acid-Schiff. A: Ομάδα ελέγχου, B: Αμέσως μετά την άσκηση, Γ: 5 ώρες μετά την άσκηση, Δ: 1.5 ώρες μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης, E: 2.5 ώρες μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης, ΣΤ: 7.5 ώρες μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας του γλυκογόνου (x10).

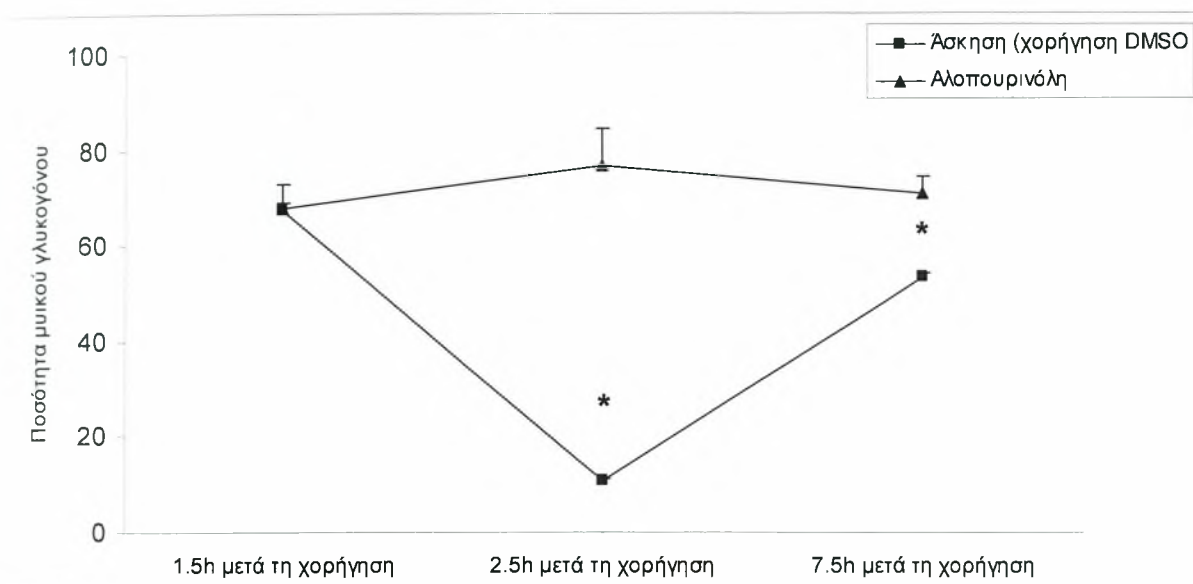
Η εξαντλητική αερόβια άσκηση προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση στην ποσότητα του ηπατικού γλυκογόνου τόσο αμέσως μετά την άσκηση όσο και 5h μετά την άσκηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Στατιστικά σημαντική μείωση του ηπατικού γλυκογόνου παρατηρήθηκε επίσης στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη και θανατώθηκαν 7.5h μετά τη χορήγηση. Αντίθετα, 1.5h και 2.5h μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή της ποσότητας του γλυκογόνου.

3.2. Μυϊκό Γλυκογόνο

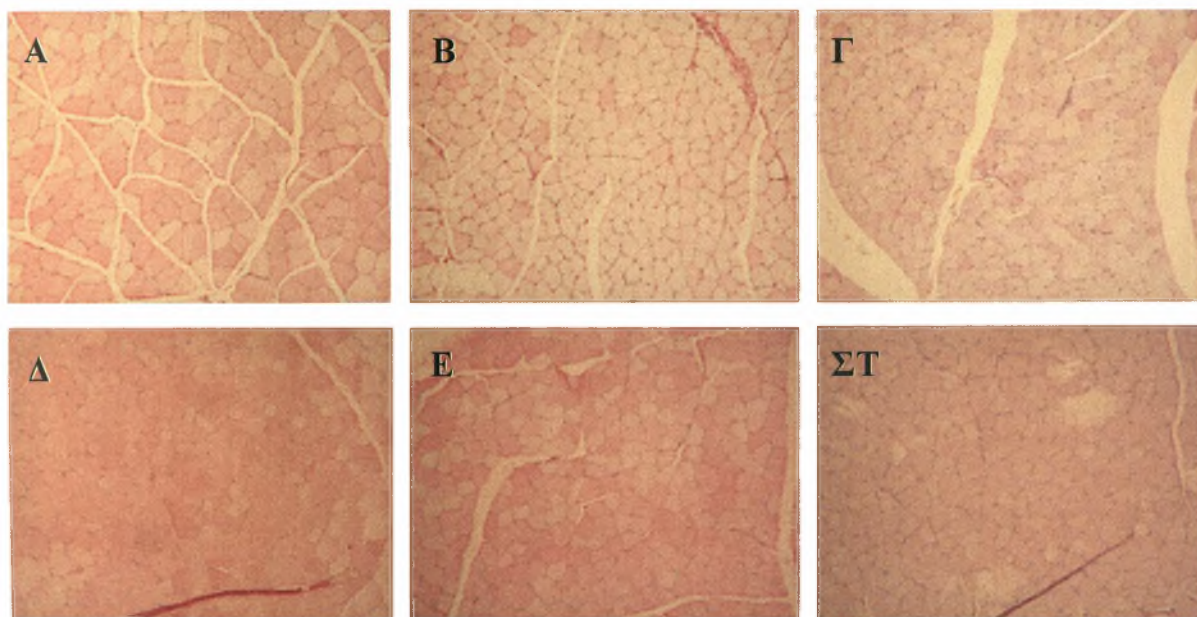
Το μυϊκό γλυκογόνο υπολογίστηκε ημιποσοτικά με το πρόγραμμα Image J.

Πίνακας 3. Ποσότητα μυϊκού γλυκογόνου επιμύων μετά από άσκηση και χορήγηση αλοπουρινόλης. *: Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($P<0.05$).

Πειραματική ομάδα	% pixels (mean ± SEM)
ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ (1.5h μετά τη χορήγηση DMSO)	67.4%±1.7
ΑΜΕΣΩΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ (2.5h μετά τη χορήγηση DMSO)	10.7%±0.4*
5h ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ (7.5h μετά τη χορήγηση DMSO)	53.5%±0.9*
ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗ (1.5h μετά τη χορήγηση)	68%±5.1
ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗ (2.5h μετά τη χορήγηση)	76.7%±7.9
ΑΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗ (7.5h μετά τη χορήγηση)	71.1%±3.2



Διάγραμμα 2. Επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο μυϊκό γλυκογόνο.*:Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($P<0.05$).



Εικόνα 7. Η επίδραση της άσκησης και της αλοπουρινόλης στο μυϊκό γλυκογόνο σε εγκάρσιες τομές παραφίνης μετά από χρώση Periodic Acid-Schiff. A: Ομάδα ελέγχου, B: Αμέσως μετά την άσκηση, Γ: 5 ώρες μετά την άσκηση, Δ: 1.5 ώρες μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης, E: 2.5 ώρες μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης, ΣΤ: 7.5 ώρες μετά τη χορήγηση αλοπουρινόλης. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της ποσότητας του γλυκογόνου (x10).

Η εξαντλητική αερόβια άσκηση προκάλεσε στατιστικά σημαντική μείωση στην ποσότητα του μυικού γλυκογόνου τόσο αμέσως μετά την άσκηση όσο και 5h μετά την άσκηση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αντίθετα, στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή της ποσότητας του γλυκογόνου.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της εξαντλητικής αερόβιας άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στο μεταβολισμό του μυϊκού και του ηπατικού γλυκογόνου. Η ποσότητα του μυϊκού και του ηπατικού γλυκογόνου μειώθηκε τόσο αμέσως μετά την άσκηση όσο και 5h μετά την άσκηση. Το μυϊκό γλυκογόνο μειώθηκε τις πρώτες ώρες μετά την άσκηση ενώ 5h αργότερα άρχισε να αυξάνεται σε αντίθεση με το ηπατικό γλυκογόνο το οποίο παρέμεινε αισθητά μειωμένο 5h μετά την άσκηση. Η αλοπουρινόλη προκάλεσε μείωση του ηπατικού γλυκογόνου 7.5h μετά τη χορήγησή της ενώ σε καμία άλλη χρονική στιγμή δεν επηρέασε ούτε το ηπατικό ούτε το μυϊκό γλυκογόνο.

Όσο αφορά την άσκηση, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με προηγούμενες εργασίες που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο. Στις εργασίες αυτές βρέθηκε μείωση του μυϊκού και ηπατικού γλυκογόνου μετά από οξεία και χρόνια αερόβια άσκηση. Σε μια από αυτές τις μελέτες βρέθηκε μείωση της συγκέντρωσης του ηπατικού και του μυϊκού γλυκογόνου μετά την άσκηση σε επίμυες που κολύμβησαν 6 ώρες την ημέρα για 14 εβδομάδες και σε αυτούς που υποβλήθηκαν σε έντονο τρέξιμο για 45 λεπτά (Baldwin et al., 1974). Επίσης, σε άλλη εργασία βρέθηκε σημαντική μείωση του γλυκογόνου στο ήπαρ και στον υποκνημίδιο μυ επιμύων μετά από τρέξιμο 3 ωρών στο δαπεδοεργόμετρο (Ferry et al., 1992). Ανάλογα αποτελέσματα όσο αφορά το γλυκογόνο στον μακρύ εκτείνοντα τους δακτύλους και στον υποκνημίδιο μυ επιμύων βρέθηκαν επίσης μετά από έντονο τρέξιμο διάρκειας 40 λεπτών σε δαπεδοεργόμετρο (Yoshimura et al., 2005). Η μείωση του μυϊκού γλυκογόνου υπολογίστηκε με την βοήθεια της χρώσης Periodic acid Schiff (PAS) (Yoshimura et al., 2005). Επίσης, σημαντική μείωση του μυϊκού γλυκογόνου παρατηρήθηκε σε σκύλους οι οποίοι έτρεξαν 140 χλμ. την ημέρα επί 4 συνεχόμενες ημέρες χωρίς να έχουν δυνατότητα λήψης τροφής. Σε έρευνες σε ανθρώπους βρέθηκε σημαντική μείωση του μυϊκού γλυκογόνου τόσο μετά από οξεία όσο και χρόνια άσκηση (Green et al., 2007; Tsintzas and Williams, 1998).

Στην εργασία μας η μείωση του ηπατικού και του μυϊκού γλυκογόνου κατά την άσκηση ήταν αναμενόμενη. Ο οργανισμός προκειμένου να μπορέσει να ανταπεξέλθει στις αυξημένες του ανάγκες για ενέργεια λόγω της κολύμβησης χρησιμοποιεί το γλυκογόνο. Ο καταβολισμός του γλυκογόνου παρατηρείται αρχικά στο μυϊκό και στη συνέχεια στο ηπατικό γλυκογόνο. Το μυϊκό γλυκογόνο αποτελεί

την άμεση πηγή ενέργειας για τους ασκούμενους μύες. Ο ρόλος του ηπατικού γλυκογόνου είναι να διατηρεί τη συγκέντρωση του γλυκόζης του αίματος σε μια φυσιολογική τιμή και να παράγει την απαραίτητη ενέργεια κατά την άσκηση. Το ηπατικό γλυκογόνο μειώνεται εάν δεν υπάρχει εξωτερική πηγή παροχής υδατανθράκων.

Η διαφορά στο μεταβολισμό του γλυκογόνου ανάμεσα στο ήπαρ και το σκελετικό μυ έχει παρατηρηθεί σε επίμυες που τράφηκαν με τροφή πλούσια σε υδατάνθρακες μετά από εξαντλητική άσκηση (Fell et al., 1980). Παρατηρήθηκε μια γρήγορη αύξηση του μυϊκού γλυκογόνου συγκριτικά με το ηπατικό. Ο λόγος αυτής της διαφοράς είναι ότι η γλυκόζη παρέχεται μέσω της γλυκονεογένεσης. Η γλυκονεογένεση λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, όπου η γλυκόζη που παράγεται μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στο μυ. Εκεί συμβάλει στη σύνθεση του μυϊκού γλυκογόνου για να καλύψει τις ανάγκες του μυός κατά την άσκηση. Δεν παραμένει στο ήπαρ για να συνθέσει ηπατικό γλυκογόνο (Fell et al., 1980). Επίσης, η γρήγορη σύνθεση του γλυκογόνου στη περίοδο που ακολουθεί την άσκηση οφείλεται στην αυξημένη δράση του ενζύμου συνθάση του γλυκογόνου και στην αυξημένη διαπερατότητα του μυός για το γλυκογόνο (Fell et al., 1980).

Από την άλλη πλευρά η χορήγηση αλοπουρινόλης δεν επηρεάζει ούτε το ηπατικό ούτε το μυϊκό γλυκογόνο. Τα αποτελέσματα μας δεν συνηγορούν υπέρ της αρχικής μας υπόθεσης για την μείωση του γλυκογόνου λόγω της χορήγησης αλοπουρινόλης. Η μείωση που παρατηρείται 7.5 ώρες μετά την χορήγηση αλοπουρινόλης είναι σημαντική, αλλά δεν αρκεί για να επιβεβαιώσει την αρχική μας υπόθεση.

Συμπερασματικά, η άσκηση μείωσε τόσο το μυϊκό όσο και το ηπατικό γλυκογόνο, ενώ η αλοπουρινόλη μείωσε μόνο το ηπατικό γλυκογόνο 7.5 ώρες μετά τη χορήγησή της.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

5.1 Πρωτόκολο χρώσης PAS .

Επεξεργασία ιστού	Χαρακτηριστικό	Χρόνος
Αποπαραφίνωση	Σε θερμό κλίβανο	15min
Ενυδάτωση	Κατιούσα σειρά οινοπνευμάτων (95, 80, 70)	5 min στο καθένα
Ενυδάτωση	Απεσταγμένο νερό	10min
Προετοιμασία	1% Περιοδικό οξύ	20min
Ξέπλυμα	Απεσταγμένο νερό	3min
Χρώση	Αντιδραστήριο Schiff	30min
Ξέπλυμα	Νερό βρύσης	10min
Χρώση του πυρήνα	Αιματοξυλίνη	3min
Ξέπλυμα	Νερό βρύσης	5sec
Διαφοροπ.αιματοξυλίνης	HCL 1%	2 εμβαπτίσεις
Ξέπλυμα	Απεσταγμένο νερό	5 sec
Χρώση	Lithium carbonate 1%	30 sec
Ξέπλυμα	Απεσταγμένο νερό	5sec
Αφυδάτωση	Ανιούσα σειρά οινοπνευμάτων (70, 80, 95)	5 εμβαπτίσεις στο καθένα
Διάγωση	Ευλόγη	10min

5.2 Πρωτόκολο πρόγραμματος ημιποσοτικής εκτίμησης του μυϊκού γλυκογόνου (Image J).

Τα βήματα που ακολουθούμε προκειμένου να υπολογίσουμε τα pixels που αντιστοιχούν στην ποσότητα του μυϊκού γλυκογόνου είναι τα ακόλουθα:

- File → Open

Ανοίγουμε την εικόνα που χρησιμοποιούμε ως πρότυπο και κατώτερο όριο μέτρησης για σύγκριση με τις υπόλοιπες εικόνες της ίδιας κατηγορίας. Από την εικόνα αυτή επιλέγουμε μια περιοχή και την αντιγράφουμε στις υπόλοιπες.

- Edit → copy

Στη συνέχεια ανοίγουμε την εικόνα προς μέτρηση και επικολλούμε την επιλεγόμενη περιοχή.

- Edit → Paste

Έπειτα επιλέγουμε

- Plugins
- Colour Threshold
- Threshold Colour
- Threshold
- Sample .

Η εικόνα μετατρέπεται σε ασπρόμαυρη από έγχρωμη. Απαραίτητο βήμα για την μέτρηση του μυϊκού γλυκογόνου είναι η μετατροπή της έγχρωμης εικόνας σε ασπρόμαυρη.

Έπειτα επιλέγουμε

- Analyze
- Histogram Υπολογίζει τα pixels του μαύρου και του άσπρου που αντιστοιχούν στην εικόνα που μετράμε. Η κλίμακα είναι από το 0 έως το 255, όπου το 0 αντιστοιχεί στο μαύρο και το 255 στο άσπρο.

Συχνά, στην εικόνα που μετράμε εντοπίζουμε ορισμένες περιοχές που αντιστοιχούν σε αναδιπλώσεις της τομής ή σε αρτηρίες, τις οποίες πρέπει να τις αφαιρέσουμε από την μετρούμενη περιοχή. Προκειμένου να το επιτύχουμε αυτό επιλέγουμε από την γραμμή εργαλείων του Image J την επιλογή ελεύθερο σχέδιο και μαρκάρουμε την αντίστοιχη περιοχή. Υπολογίζουμε τα pixels που αντιστοιχούν στην περιοχή αυτή (measure) και τα αφαιρούμε από τα ολικά pixels της εικόνας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Anderson JW, Bridges SR. Short –chain fatty acid fermentation products of plant fiber affect glucose metabolism of isolated rat hepatocytes (41958).*Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 177:372-376.
2. Baldwin KM, Fitts RH, Booth FW, Winder WW, Holloszy JO. Depletion of muscle and liver glycogen during exercise. Protective effect of training. *Pflugers Arch* 1975; 354:203-212.
3. Baldwin KM, Fitts RH, Booth FW, Winder WW, Holloszy JO. Depletion of muscle and liver glycogen during exercise. Protective effect of training. *Pflugers Arch.* 1975; 354:203-212.
4. Bauer BA, Younathan ES. Decreased phosphofructokinase activity in skeletal muscle of diabet rats. *Clin Physiol Biochem.* 1984; 2: 137-145.
5. Brostrom CO, Hunkeler FL, Krebs EG. The regulation of skeletal muscle phosphorylase kinase by Ca^{+2} . *J Biol Chem* 1971; 246:1961-1967.
6. Conett RJ, Gayeski TEJ, Honig CR. Lactate efflux is unrelated to intracellular PO_2 in a working red muscle in situ. *J Appl Physiol* 1986; 61: 402-408.
7. Davies KJA, Quintanilha AT, Brooks GA&Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commn* 1982; 107: 1198-1205.
8. Douen AG, Ramlal T, Rastogi S, Bilan PJ, Cartee GD, Vranic M, Holloszy JO, Klip A. Exercise induces recruitment of the <insulin –responsive glucose transporter>. *J Biol Chem.* 1990; 265: 13427-13430.
9. Drummond GI, Harwood JP, Powel CA. Studies on the activation of phosphorylase in skeletal muscle by contraction and by epinephrine. *J Biol Chem* 1969; 244:4235 4240.
10. Dyck DJ, Putman CT, Heigenhauser GJF, Hultman E, Spriet LL. Regulation of fat carbohydrate interaction in skeletal muscle during intense aerobic cycling. *Am J Physiol* 1993; 265:E852-E859..
11. Favier RJ, Constable SH, Chen M, Holonzy JO. Endurance exercise training reduces lactate production. *J Appl Physiol.* 1986; 61: 885-889..
12. Fell RD, McLane JA, Winder WW, Holloszy JO. Preferential resynthesis of muscle glycogen in fasting rats after exhausting exercise. *Am J Physiol* 1980; 238:328-332.

13. Ferry A, Amiridis I, Rieu M. Glycogen depletion and resynthesis in the rat after downhill running. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1992; 64(1):32-5.
14. Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV, Sastre J, Vina J, Garcia-del-Moral L. Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA* 2003; 289:2503-2504.
15. Green HJ, Duhamel TA, Holloway GP, Moule J, Ouyang J, Ranney D, Tupling AR. Muscle metabolic responses during 16 hours of intermittent heavy exercise. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007; 85(6):634-45.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology and Medicine* (2nd edition). Oxford: Clarendon Press 1989; 136-158.
17. Hoey BM, Butler J, Halliwell B. On the specificity of allopurinol and oxypurinol as inhibitors of xanthine oxidase. A pulse radiolysis determination of rate constants for reaction of allopurinol and oxypurinol with hydroxyl radicals. *Free Radic. Res. Commun* 1988; 4: 259-263.
18. Hultman E, Spriet LL. Dietary intake prior to and during exercise. In exercise, Nutrition and Energy Metabolism (Horton, E.S., and Terjung, R.L., eds) Macmillan Publishing Company. New York. 1988.
19. James DE, Brown R, Navarro J, Pilch P. Insulin regulatable tissue express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature*. 1988; 333: 183-185.
20. Komulainen J, Takala TE, Vihko V. Does increased serum creatine kinase activity reflect exercise-induced muscle damage in rats? *Int. J. Sports Med* 1995; 16: 150-154.
21. Koyama K, Kaya M, Ishigaki T, Tsujita J, Hori S, Seino T, Kasugai A. Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol. Occup. Physiol* 1999; 80: 28-33.
22. Kuwajima M, Newgard CB, Foster DW, McGarry JD. The glucose-phosphorylating capacity of liver as measured by three independent assays. Implications for the mechanism of hepatic glycogen synthesis. *J Biol Chem* 1986; 261: 8849.
23. Lee DK, Wang DP. Formulation development of allopurinol suppositories and injectables. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1999; 25: 1205-1208.

24. McKenzie EC, Hinchcliff KW, Valberg SJ, Williamson KK, Payton ME, Davis MS. Assessment of alterations in triglyceride and glycogen concentrations in muscle tissue of Alaskan sled dogs during repetitive prolonged exercise. *Am J Vet Res.* 2008; 69(8):1097-103.
25. McManus J. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol* 1948;23: 99-108..
26. Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis Y, Papassotiriou I, Kouretas D. Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 2007; 39: 1107-1113.
27. Møller Peter, Wallin Hakan, Knudsen Lisbeth. Oxidative stress associated with exercise, physiological stress and life-style factors. Chemico-biological interactions. 1996; 102: 295-310.
28. Nesher R, Karl IE, Kipnis DM. Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *Am J Physiol.* 1985; 249: 226-232.
29. Nikolaidis MG, Paschalis V, Giakas G, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D, Jamurtas AZ. Decreased blood oxidative stress after repeated muscle damaging exercise. *Med. Sci. Sports Exerc* 2007b; 39: 1080-1089.
30. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 1986; 548: 87-99.
31. Pea F. Pharmacology of drugs for hyperuricemia :mechanisms, kinetics and interactions. *Contrib Nephrol* 2005; 147: 35-46.
32. Pernow B, Saltin B. Availability of substrates and capacity for prolonged heavy exercise in man. *J Appl Physiol* 1971; 131: 416-422.
33. Reid MB, ShoJi T, Moody MR, Entman ML. Reactive oxygen in skeletal muscle II. Extracellular release of free radicals. *J Appl Physiol* 1992; 73: 1805-1809.
34. Ren JM, Hultman E. Regulation of glycogenolysis in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1989; 67: 2243-2248.
35. Saitoh S, Yoshitake Y, Suzuki M. Enhanced glycogen repletion in liver and skeletal muscle with citrate orally fed after exhaustive treadmill running and swimming. *J Nurt Sci Vitaminol* 1983; 29: 45-52.

36. Sastre J, Asensi N, Gasco E, Pallardo FV, Ferrero JA, Furukawa T. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood . Prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol* 1992; 32: 992-995.
37. Smythe C, Cohen P. The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur J Biochem* 1991; 200: 625..
38. Stryer Berg Tymoczko. Βιοχημεία Ι. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης. 2004.
39. Tornheim K. Fructose2,6 biphosphate and glycolytic oscillations in skeletal muscle extracts. *J Biol Chem* 1988; 263: 2619-2624.
40. Tsintzas K, Williams C. Human muscle glycogen metabolism during exercise. Effect of carbohydrate supplementation. *Sports Med* 1998; 25(1):7-23.
41. Veskoukis A, Nikolaidis M, Kyparos M, Kokkinos D, Nepka Ch, Barbanis S, Kouretas D. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr & Metab, in press*.
42. Vina J, Borras C, Gomez-Cabrera MC, Orr WC. Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signaling and gene expression. Role of reactive oxygen species and (phyto)oestrogens in the modulation of adaptive response to stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2006; 40: 11-19.
43. Wahren J. Glucose turnover during exercise in man. *Ann NY Acad Sci* 1977; 301: 45 55.
44. Wasserman DH, Williams PE, Lacy DB, Bracy D, Cherrington AD. Hepatic nerves are not essential to the increase in hepatic glucose production during muscular work. *Am J Physiol* 1990; 259:195-203.
45. Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. *Fuctional Histology* (2nd edition). Churchill Livingstone..1987.
46. Williamson JR. Effects of insulin and starvation on the metabolism of acetate and pyruvate by the perfused rat heart. *Biochem J.* 1964; 93:97-106..
47. Wolfle D, Jungermann K. Long -term effects of physiological oxygen concentrations on glycolysis and glyconeogenesis in hepatocyte cultures. *Eur J Biochem.* 1985; 151:299.
48. Wolfle D, Schmidt H, Jungermann K. Short-term modulation of glycogen metabolism, glycolysis and glyconeogenesis by physiological oxygen concentrations in hepatocyte cultures. *Eur J Biochem* 1983; 135: 405.

49. Wood SC, Porte D. Neural control of the endocrine pancreas. *Physiol* 1974; 54: 569-619.
50. Wortmann RL. Recent advances in the management of gout and hyperuricemia. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17: 319-324.
51. Yoshimura A, Toyoda Y, Murakami T, Yoshizato H, Ando Y, Fujitsuka N. Glycogen depletion in intrafusal fibres in rats during short-duration high-intensity treadmill running. *Acta Physiol* .2005; 185(1):41-50.
52. Holloszy JO. Biochemical adaptations to exercise: aerobic metabolism. In :Exercise and sport sciences reviews, vol.1, pp.45-71. Edit.by J.H.Wilmore, New York: Academic.1973; 354:203-212.
53. Marchand I, Chorneyko K, Tarnopolsky M, Hamilton S, Shearer J, Potvin J, Graham TE. Quantification of subcellular glycogen in resting human muscle: granule size, number, and location. *J Appl Physiol* 2002; 93:1598-1607.
54. Marieb EN. *Human Anatomy & Physiology*. Benjamin Cummings, 2004.
55. Μούγιος Β. Βιοχημεία της άσκησης. Step Publications, Stepres. Θεσσαλονίκη. 2002.
56. Παπαδημητρίου Μ. Εσωτερική Παθολογία. University studio press. Εκδόσεις επιστημονικών περιοδικών και βιβλίων. Έκδοση δεύτερη. Θεσσαλονίκη 2001.

