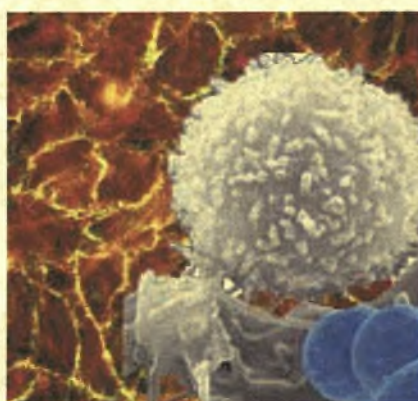


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ**  
**ΑΛΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗΣ ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ**  
**ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΗΛΟΝΙΚΗΣ ΔΙΑΛΔΕΪΔΗΣ ΣΕ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥΣ ΜΥΕΣ**  
**ΕΠΙΜΥΩΝ**

*Κουρσοβίτη Χριστίνα*

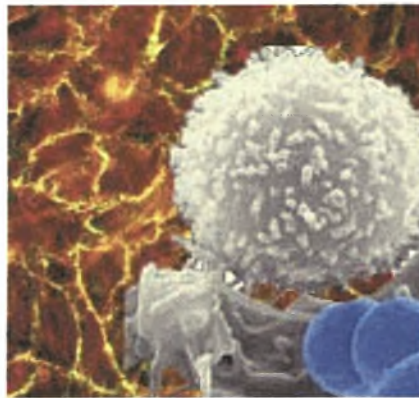
*Λάρισα 2010*



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**



**ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ**

**ΑΛΛΟΠΟΥΡΙΝΟΛΗΣ ΣΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ**  
**ΚΑΙ ΤΗΣ ΜΗΛΟΝΙΚΗΣ ΔΙΑΛΔΕΪΔΗΣ ΣΕ ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΥΣ ΜΥΕΣ**

**ΕΠΙΜΥΩΝ**

**Κουρσοβίτη Χριστίνα**

**Λάρισα 2010**

**Τ**





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

Αριθ. Εισ.: 8179/1  
Ημερ. Εισ.: 20-04-2010  
Δωρεά: \_\_\_\_\_  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2010  
ΚΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087095

## Τριμελής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΥΠΟΓΡΑΦΗ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ

### Επιβλέπων Καθηγητής

Κουρέτας Δημήτριος, καθηγητής  
φυσιολογίας



### Μέλη

Κυπάρος Αντώνιος, λέκτορας  
φυσιολογίας της άσκησης



Στάγκος Δημήτριος, διδάσκων ΠΔ 407/80





## Περιεχόμενα κεφαλαίων

| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ                          | ΣΕΛΙΔΑ |
|--------------------------------------|--------|
| Περίληψη                             | 7      |
| Εισαγωγή                             | 8      |
| Ελεύθερες Ρίζες                      | 8      |
| Κατηγορίες ελευθέρων ριζών           | 8      |
| Παραγωγή ελευθέρων ριζών             | 11     |
| Ενδογενείς Πηγές                     | 11     |
| Εξωγενείς Πηγές                      | 13     |
| Επιδράσεις ελευθέρων ριζών           | 13     |
| Θετικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών   | 13     |
| Αρνητικές επιδράσεις ελευθέρων ριζών | 14     |
| Οξειδωτικό στρες                     | 15     |
| Εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες  | 15     |
| Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί           | 15     |
| Ενζυμικοί Μηχανισμοί                 | 15     |
| Μη Ενζυμικοί Μηχανισμοί              | 17     |
| Αλβουμίνη                            | 19     |
| Μηλονική Διαλδεΰδη                   | 21     |
| Οξειδωτικό στρες και Άσκηση          | 23     |
| Αλλοπουρινόλη και Άσκηση             | 24     |
| Σκοπός                               | 27     |

|  |    |
|--|----|
| <b>Υλικά και Μέθοδοι</b>   | 28 |
| Πειραματόζωα   | 28 |
| Χορήγηση αλοπουρινόλης   | 29 |
| Εξοικείωση επιμύων   | 29 |
| Πρωτόκολλο κολύμβησης  | 30 |
| Συλλογή δειγμάτων  | 30 |
| Πρωτόκολλα δεικτών που μελετήθηκαν                                     | 31 |
| Στατιστική Ανάλυση   | 31 |
| <b>Αποτελέσματα</b>  | 32 |
| Μηλονική Διαλδεΰδη στον ορθό μηριαίο μυ                                | 32 |
| Μηλονική Διαλδεΰδη στον πρόσθιο κνημιαίο μυ                            | 33 |
| Μηλονική Διαλδεΰδη στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ                       | 34 |
| Αλβουμίνη στον ορθό μηριαίο μυ   | 35 |
| Αλβουμίνη στον πρόσθιο κνημιαίο μυ                                     | 36 |
| Αλβουμίνη στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ                                | 37 |
| <b>Συζήτηση</b>  | 38 |
| <b>Παράρτημα</b>   | 41 |
| Πρωτόκολλο Μηλονικής Διαλδεΰδης στους σκελετικούς μυες που μελετήθηκαν | 41 |
| Πρωτόκολλο Καμπύλης Μηλονικής Διαλδεΰδης                               | 43 |
| Πρωτόκολλο Αλβουμίνης στους σκελετικούς                                | 45 |

|                      |    |
|----------------------|----|
| μυες που μελετήθηκαν |    |
| <b>Βιβλιογραφία</b>  | 47 |

### Περιεχόμενα εικόνων

| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ   | ΣΕΛΙΔΑ |
|---|--------|
| <b>Εικόνα 1.</b> Δομή της αλβουμίνης                    | 20     |
| <b>Εικόνα 2.</b> Χημικός τύπος της μηλονικής διαλδεύδης | 22     |

### Περιεχόμενα διαγραμμάτων

| ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ   | ΣΕΛΙΔΑ |
|---|--------|
| <b>Διάγραμμα 1.</b> Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεύδης στον ορθό μηριαίο μυ επιμύων.          | 32     |
| <b>Διάγραμμα 2.</b> Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεύδης στον πρόσθιο κνημιαίο μυ επιμύων.      | 33     |
| <b>Διάγραμμα 3.</b> Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεύδης στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ επιμύων. | 34     |
| <b>Διάγραμμα 4.</b> Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον ορθό μηριαίο μυ επιμύων.                    | 35     |
| <b>Διάγραμμα 5.</b> Επίδραση της άσκησης και της  | 36     |

χορήγησης αλλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον πρόσθιο κνημιαίο μυ επιμύων.

**Διάγραμμα 6.** Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ επιμύων.

37



## Περίληψη

Από διάφορες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η άσκηση προκαλεί παραγωγή ελευθέρων ριζών και συνεπώς, αποτελεί σημαντική πηγή οξειδωτικού στρες. Κατά τη διάρκεια της άσκησης ενεργοποιείται η αλλοπουρινόλη, ένα δομικό ανάλογο της υποξανθίνης και ισχυρός αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης. Η αλλοπουρινόλη αναστέλλει την μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν να μελετήσει την επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλλοπουρινόλης σε δείκτες οξειδωτικού στρες στους σκελετικούς μυς επιμύων. Οι δείκτες αυτοί ήταν η μηλονική διαλδεϋδη (MDA) και η αλβουμίνη. Οι επίμυες μελετήθηκαν κάτω από τρεις καταστάσεις: άσκηση, χορήγηση αλλοπουρινόλης και τον συνδυασμό αυτών. Τα δείγματα λήφθηκαν πριν, αμέσως μετά και 5 ώρες μετά το τέλος της άσκησης, καθώς και τις αντίστοιχες χρονικές στιγμές μετά τη χορήγηση αλλοπουρινόλης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση της MDA δεν επηρεάστηκε στον ορθό μηριαίο μυ, ενώ στον πρόσθιο κνημιαίο μυ αυξήθηκε πέντε ώρες μετά την άσκηση στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε αλλοπουρινόλη. Στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ η συγκέντρωση της MDA μειώθηκε μετά την άσκηση, καθώς και από το συνδυασμό αλλοπουρινόλης και άσκησης. Επίσης, η συγκέντρωση της αλβουμίνης έμεινε αμετάβλητη και στους τρεις μυϊκούς ιστούς. Συμπερασματικά, λοιπόν, παρατηρήθηκε ότι η εξαντλητική άσκηση σε κάποιες περιπτώσεις αφενός αυξάνει το οξειδωτικό στρες και αφετέρου σε κάποιες άλλες το ελαττώνει.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ



## Ελεύθερες ρίζες

Οι ελεύθερες ρίζες είναι άτομα ή μόρια με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στη στοιβάδα σθένους (Halliwell & Gutteridge 1999). Η διαμόρφωσή τους είναι εξαιρετικά ασταθής με αποτέλεσμα να αντιδρούν ταχύτατα με άλλα μόρια αφαιρώντας τους ένα ηλεκτρόνιο (οξειδωση) (Sen 2001). Μπορούν να σχηματιστούν με την απώλεια ή την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου από μία μη-ρίζα, καθώς, επίσης, και όταν σπάσει ένας ομοιοπολικός δεσμός και το ένα ηλεκτρόνιο παραμείνει σε ένα άτομο. Η απλούστερη ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο H με ένα πρωτόνιο και ένα μονήρες ηλεκτρόνιο (Halliwell & Gutteridge, 1999). Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες ελευθέρων ριζών με κυριότερες τις δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS), τις δραστικές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species, RNS), τις δραστικές μορφές θείου (reactive sulfur species, RSS) και τις δραστικές μορφές χλωρίου (reactive chlorine species, PCS).

## Κατηγορίες

Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται μερικά παραδείγματα από τις ελεύθερες ρίζες που απαντώνται πιο συχνά, τις δραστικές μορφές οξυγόνου και τις δραστικές μορφές αζώτου.

| ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ                |                                    |
|--|------------------------------------|
| <u>Ρίζες</u>                             | <u>Μη ρίζες</u>                    |
| Ανιόν Σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ )  | Υπεροξείδιο Υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) |
| Ρίζα Υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ )         | Υποχλωριώδες Οξύ ( $HOCl$ )        |
| Ρίζα Υπεροξειδίου ( $RO_2^{\cdot}$ )     | Υποβρωμιώδες Οξύ ( $HOBr$ )        |
| Ρίζα Αλκοξειδίου ( $RO^{\cdot}$ )        | Όζον ( $O_3$ )                     |
| Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου ( $HO_2^{\cdot}$ ) | Μονήρες Οξυγόνο ( $^1O_2$ )        |

## ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ

| <u>Ρίζες</u>                               | <u>Μη ρίζες</u>                       |
|--|---------------------------------------|
| Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου (NO·)              | Νιτρώδες Οξύ (HNO <sub>2</sub> )      |
| Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου (NO <sub>2</sub> ·) | Κατιόν Νιτροσυλίου (NO <sup>+</sup> ) |
|  | Ανιόν Νιτροσυλίου (NO <sup>-</sup> )  |

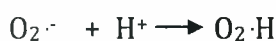
### Ανιόν του σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

Σχηματίζεται από την αναγωγή του οξυγόνου από ένα e<sup>-</sup> σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:  $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$

Η ρίζα του σουπεροξειδίου μπορεί να σχηματιστεί από την απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων στο O<sub>2</sub> από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου καθώς επίσης και από φαγοκύτταρα κατά τη διάρκεια της δράσης τους. Μικρότερες ποσότητες O<sub>2</sub><sup>-</sup> παράγονται σαν ενδοκυτταρικά σηματοδοτικά μόρια από πολλούς τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των ινοβλαστών. Η ρίζα του σουπεροξειδίου παράγεται, επίσης, από τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ (Halliwell & Gutteridge 1999).

### Ρίζα υδροξυλίου (OH·)

Η ρίζα υδροξυλίου προκύπτει σύμφωνα με τις αντιδράσεις Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος και ο χαλκός (Mylonas and Kouretas, 1999).



Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις της ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου (Halliwell and Gutteridge, 1999).

### Υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ )

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου σχηματίζεται από οξειδάσες, όπως οι οξειδάσες των αμινοξέων, η οξειδάση της γλυκόζης και η οξειδάση του γλυκολικού οξέος, οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο. Σχηματίζεται, επίσης, με αυτο-οξειδοαναγωγή της ρίζας σουπεροξειδίου



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν είναι ελεύθερη ρίζα, αλλά προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις (10μM). Αποτελεί πηγή από την οποία προέρχεται το  $OH^{\cdot}$ . Λόγω της οξειδωτικής του ικανότητας προκαλεί απελευθέρωση σιδήρου, απενεργοποίηση ενζύμων, οξείδωση DNA, λιπιδίων, -SH ομάδων και κετοξέων.

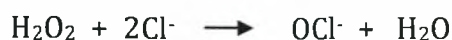
### Μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ )

Το  $^1O_2$  σχηματίζεται μέσω μιας αλλαγής στην κατάσταση του spin, από παράλληλη σε αντιπαράλληλη. Αυτό αυξάνει πάρα πολύ τη δραστηριότητά του επειδή αναιρείται ο περιορισμός του spin. Μπορεί να αντιδράσει εύκολα με αμινοξέα όπως η κυστεΐνη, η μεθειονίνη, η τρυπτοφάνη και η ιστιδίνη και αποτελεί το μεγαλύτερο καταλύτη για την έναρξη της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, η οποία προκαλεί καταστροφή των μεμβρανών.

### Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

Προκύπτει από την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) με το χλώριο (Cl), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση και είναι 100-1000 φορές πιο τοξικό από το  $H_2O_2$  και το  $O_2^{\cdot-}$





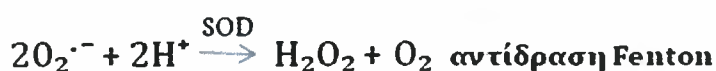
## Παραγωγή Ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται είτε ενδογενώς είτε εξωγενώς.

## Ενδογενείς Πηγές

### Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η σημαντικότερη πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι η οξειδωτική φωσφορυλίωση, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Di Meo & Venditti 2001). Η πλειοψηφία των ROS παράγεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια αφού το 90% της κατανάλωσης οξυγόνου από τον οργανισμό ανάγεται σε νερό. Κατά τη διάρκεια παραγωγής ATP, ηλεκτρόνια διαφεύγουν από την αναπνευστική αλυσίδα με αποτέλεσμα την παραγωγή ελευθέρων ριζών ως παραπροϊόντων. Συγκεκριμένα, ένα ποσοστό των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων χρησιμοποιείται για την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε  $\text{O}_2^{\bullet-}$  από την ημικιόνη (UQH) της NADH-αναγωγάσης του συνενζύμου Q (Halliwell & Gutteridge 1998). Ένα μέρος του  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ανάγεται προς  $\text{H}_2\text{O}_2$ , μια αντίδραση που καταλύεται από την υπεροξειδική δισμουτάση (Mn-SOD).



Μέσω της **αντίδρασης Haber-Weiss** ανάμεσα στο  $\text{O}_2^{\bullet-}$  και στο  $\text{H}_2\text{O}_2$  δημιουργείται  $\text{OH}^\bullet$ :



Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται, επίσης, μονοξείδιο του αζώτου (NO) από την ενζυμική δράση της συνθάσης του NO. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ( $\text{ONOO}^-$ ), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ( $\text{ONOOH}$ ) (Korpenol, 1998). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες  $\text{OH}^\bullet$  και  $\text{NO}_2^\bullet$ .

## Ανοσοαπαντήσεις

Στο ανοσοποιητικό σύστημα, τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα είναι υπεύθυνα για την εξουδετέρωση αντιγόνων. Τα κύτταρα παράγουν  $O_2^{\cdot-}$  μέσω του συστήματος της ανηγμένης NAPH-οξειδάσης, η οποία είναι παρούσα στα λευκοκύτταρα (Fehrenbach & Northoff, 2001). Η αντίδραση έχει ως εξής:



Η κυτταροπλασματική υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το  $O_2^{\cdot-}$  σε  $H_2O_2$ , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε  $OH^{\cdot}$  από ιόντα μετάλλων ή σε  $HOCl$ . Η αντίδραση αυτή καταλύεται από τη μυελοπεροξειδάση.



## Φαινόμενο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

Μία σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών αποτελεί και το φαινόμενο της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, το οποίο συμβαίνει μετά από χειρουργικές επεμβάσεις ή μετά από την άσκηση (Thompson-Gorman and Zweier, 1990, Jackson & O'Farrell, 1993). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP απαμινώνεται σε ADP και AMP εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύεται από σχηματισμό του  $O_2^{\cdot-}$ .

## Αυτοοξείδωση μορίων

Η αιμοσφαιρίνη και η μυοσφαιρίνη μετά από αυτοοξείδωση μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών.



Πιο συγκεκριμένα, η αιμοσφαιρίνη απελευθερώνει  $O_2^{\cdot-}$ , ενώ η μυοσφαιρίνη υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ).

## Κυτόχρωμα P-450

Το σύστημα του κυτοχρώματος P-450 αποτελεί μία σημαντική πηγή ελευθέρων ριζών. Τα ένζυμα του συστήματος αυτού εμπλέκονται στο μεταβολισμό ξενοβιοτικών ουσιών (π.χ. φάρμακα) μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το NADH ή το NADPH στο μοριακό οξυγόνο οξειδώνοντας το υπόστρωμα (π.χ. φάρμακο) σύμφωνα με την αντίδραση.



## Εξωγενείς Πηγές

Η ηλιακή και η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση και ο καπνός του τσιγάρου είναι σημαντικές εξωγενείς πηγές ελευθέρων ριζών (Koren, 1995). Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει, επίσης, την κατανάλωση αλκοόλ (Jones et al., 2000), τη διατροφή (Ames, 1986), το άγχος και την άσκηση. Ελεύθερες ρίζες παράγονται από τη δράση φαρμάκων (Rav et al., 2001) και άλλων ξενοβιοτικών, όπως τοξίνες και εντομοκτόνα.

## Επιδράσεις Ελευθέρων Ριζών

### Θετικές Επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στα σηματοδοτικά μονοπάτια ή στην κυτταρική βιογένεση καθώς μπορούν να χρησιμεύσουν ως κυτταρικοί αγγελιοφόροι ή να τροποποιήσουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών (Reid, 2001). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται στη δράση του ανοσοποιητικού συστήματος ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Jenkins, 1988). Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής, η οποία μπορεί να προκληθεί και από έντονη φυσική άσκηση, που προκαλεί μυϊκό τραυματισμό (έκκεντρη άσκηση) (Malm, 2001). Συνεισφέρουν ακόμη στην ενεργοποίηση ενζύμων, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την απόπτωση, την αποτοξίνωση από φάρμακα και τη μυϊκή σύσπαση (Jenkins, 1988; Linnane et al., 2002).

## Αρνητικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν οξείδωση λιπιδίων, πρωτεϊνών και καταστροφή του DNA. Επίσης, συνδέονται με νευροεκφυλιστικές νόσους (Parkinson's, Alzheimer's, κατάθλιψη), φλεγμονές, λοιμώδεις νόσους, νόσους των νεφρών, του ήπατος, των πνευμόνων, καθώς και τη γήρανση. Οι κυριότερες αρνητικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών αναλύονται παρακάτω.

### Λιπιδική υπεροξείδωση

Οι ROS προκαλούν την οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young & McEneny, 2001). Οι ROS προκαλούν, επίσης, οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, που είναι δομικά μόρια των κυτταρικών μεμβρανών (Alessio, 1993). Η οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου  $ROO^{\bullet}$ , συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεΰδης (MDA) (Young & McEneny, 2001). Η λιπιδική υπεροξείδωση αυξάνει τη ρευστότητα των μεμβρανών και τη διαπερατότητά τους.

### Πρωτεϊνική Οξείδωση

Οι πρωτεΐνες αποτελούν κύριους στόχους των ελευθέρων ριζών λόγω της αφθονίας τους στα βιολογικά συστήματα. Η οξείδωσή τους συνοδεύεται από παραγωγή πρωτεϊνικών καρβονυλίων και οξειδωμένων αμινοξέων (Levine, 2002). Η πρωτεϊνική οξείδωση, η οποία μπορεί να προκληθεί από φλεγμονή, άσκηση ή ισχαιμία-επαναιμάτωση οδηγεί σε απώλεια της ενζυμικής, συσταλτικής ή δομικής λειτουργίας των πρωτεϊνών. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεόσωμα και τα λυσοσώματα, αλλά τα καρβονύλια συσσωρεύονται σε συσσωματώματα μεγάλου μοριακού βάρους (Levine, 2002).

### Οξείδωση του DNA

Οι ελεύθερες ρίζες διασπούν τις έλικες του DNA και δημιουργούν βλάβες στο μηχανισμό επιδιόρθωσης των βάσεων (Jenkins, 1988). Ως συνέπεια,



προκαλούνται μεταλλάξεις, που είναι πιθανό να οδηγήσουν σε καρκινογένεση και γήρανση (Radak et al., 1999).

## **Οξειδωτικό στρες**

Είναι η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής προ-οξειδωτικών και της αντιοξειδωτικής άμυνας, όταν η τελευταία είναι ανεπαρκής (Sies, 1991). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε μοριακούς στόχους, όπως DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο μέσω των μηχανισμών της νέκρωσης και της απόπτωσης (Halliwell & Gutteridge, 1998). Μπορεί να προκληθεί τόσο από εξωγενείς όσο και από ενδογενείς παράγοντες.

## **Εξωγενείς Παράγοντες**

Οι εξωγενείς παράγοντες περιλαμβάνουν τις ξενοβιοτικές ουσίες, τα παθογόνα βακτήρια και τους ιούς. Άλλοι παράγοντες είναι η περιβαλλοντική ρύπανση, η ακτινοβολία (ηλιακή, ηλεκτρομαγνητική), το όζον και υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου. Τέλος, το κάπνισμα, το αλκοόλ, η διατροφή και η έντονη σωματική άσκηση ενοχοποιούνται για την πρόκληση οξειδωτικού στρες.

## **Ενδογενείς Παράγοντες**

Ενδογενείς πηγές οξειδωτικού στρες είναι ένζυμα όπως η οξειδάση της ξανθίνης, τα μιτοχόνδρια, τα λευκοκύτταρα, το κυτταρόπλασμα και οι βιολογικές μεμβράνες.

## **Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί**

Μια ποικιλία αντιοξειδωτικών μορίων περιλαμβάνει ενζυμικούς και μη ενζυμικούς μηχανισμούς που εξουδετερώνουν ή ελέγχουν τη δράση των ελευθέρων ριζών. Αυτό το επιτυγχάνουν με τρεις τρόπους:

- Εμποδίζοντας το σχηματισμό ριζών
- Μετατρέποντας τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια

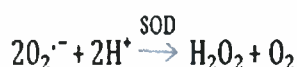
- Βοηθώντας στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες

Υπάρχουν αρκετά ενζυμικά συστήματα μέσα στο κύτταρο που εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, όπως υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και αναγωγή της γλουταθειόνης. Επίσης, αντιοξειδωτικά ιχνοστοιχεία (μη ενζυμικά) όπως οι βιταμίνες E, A, C, τα φλαβονοειδή, οι θειόλες και τα μικροστοιχεία δρουν σαν ενζυμικοί συμπαράγοντες. Τα τελευταία δε μπορούν να συντεθούν ενδογενώς και γι'αυτό πρέπει να παρέχονται κυρίως μέσω της διατροφής (Finaud et al., 2006).

## **A) Ενζυμικοί Μηχανισμοί**

### **Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)**

Η SOD είναι το κύριο ένζυμο μεταβολισμού του ανιόντος σουπεροξειδίου. Η αντίδραση που καταλύει είναι:



Σε όλα τα κύτταρα, κατά την ηρεμία, το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου από τα μιτοχόνδρια  $O_2^{\cdot-}$  ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD (Mn-SOD) ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers & Lennon, 2000). Στα μυϊκά κύτταρα το 65-85% της δραστηριότητας της SOD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Cu-Zn SOD) (Das et al., 1997). Υπάρχουν διάφορες μορφές SOD στα βιολογικά συστήματα όπως η Cu-SOD στο κυτταρόπλασμα, η Mn-SOD στα μιτοχόνδρια, η Cu,Zn-SOD στο εξωκυττάριο υγρό και η Fe-SOD στα βακτήρια και τα φυτά.

### **Καταλάση (CAT)**

Η δραστηριότητά της εντοπίζεται στα υπεροξειδιοσώματα (Chance B et al., 1979) και καταλύει τη μετατροπή του  $H_2O_2$  σε νερό και οξυγόνο σύμφωνα με την αντίδραση:



Η CAT, επιπροσθέτως, μπορεί να χρησιμοποιήσει το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> για την αποτοξίνωση ορισμένων ουσιών μέσω μίας αντίδρασης υπεροξειδωσης με υποστρώματα, όπως αλκοόλη, φαινόλη.



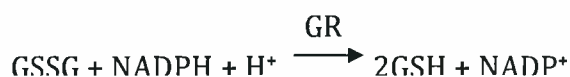
### Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Η GPX ανάγει τα υδροϋπεροξειδία (ROOH) σε αλκοόλες (ROH) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό, ενώ προκαλεί την οξείδωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.



### Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

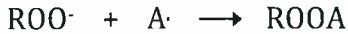
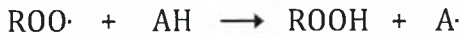
Υπάρχει μία δυναμική ισορροπία μεταξύ της οξειδωμένης και της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH:GSSG). Η αναγωγή της γλουταθειόνης καταλύει τη μετατροπή της ανηγμένης μορφής στην οξειδωμένη.



## **B) Μη Ενζυμικοί Μηχανισμοί**

### Βιταμίνη E

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



### Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C είναι μία υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη και πιθανόν το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό στα εξωκυττάρια υγρά, αλλά είναι, επίσης, αποτελεσματικό και στο κυτταρόπλασμα (Bigard, 2001). Έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει τις ROS και να ενισχύει τη δράση της βιταμίνης E και της GSH αναγεννώντας τις ενεργές τους μορφές μετά την αλληλεπίδρασή τους με τις ROS (Evans, 2000).

### Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες που σχηματίζονται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και μηλονικό οξύ (Willcox et al., 2002). Έχει αποδειχθεί ότι καταστέλλουν τη δράση προ-οξειδωτικών ενζύμων *in vitro* και επιπλέον, μπορούν να απενεργοποιούν ορισμένες ROS.

### Θειόλες

Οι θειόλες είναι μόρια που διαθέτουν σουλφυδρυλικά κατάλοιπα (-SH) στο ενεργό τους κέντρο. Συντίθενται από τα αμινοξέα κυστεΐνη και μεθειονίνη. Συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση και την ανοσολογική αντίδραση και έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Sen & Packer, 2000). Η GSH είναι η μεγαλύτερη παρούσα θειόλη στον οργανισμό. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τα μιτοχόνδρια και αποτελεί το κυριότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό στα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Δρα ως υπόστρωμα της GPX κι έτσι συμμετέχει στην αναστολή της παραγωγής των ROS. Η GSH, επίσης, εξουδετερώνει τις ROS και άμεσα, ενώ παράλληλα ενισχύει την αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών E και C (May et al., 1996). Σε περιβάλλον οξειδωτικού στρες παρατηρείται, συνήθως, μείωση του λόγου της ανηγμένης προς την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH:GSSG), καθώς και μείωση των επιπέδων των ολικών θειολών. Τα φαινόμενα αυτά εμφανίζονται μετά την άσκηση, κατά τη γήρανση καθώς και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι



οι νόσοι του Parkinson και του Alzheimer. Οι μειωμένες ποσότητες GSH μπορούν να εξισορροπηθούν με συμπληρώματα βιταμινών E και C, γεγονός που σημαίνει ότι τα παραπάνω αντιοξειδωτικά έχουν τους ίδιους στόχους. Το λιποϊκό οξύ είναι μία θειόλη που αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση και συμβάλλει στην αναγωγή των βιταμινών C και E από τις οξειδωμένες μορφές τους (Serbinova et al., 1992).

### Ουρικό οξύ

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

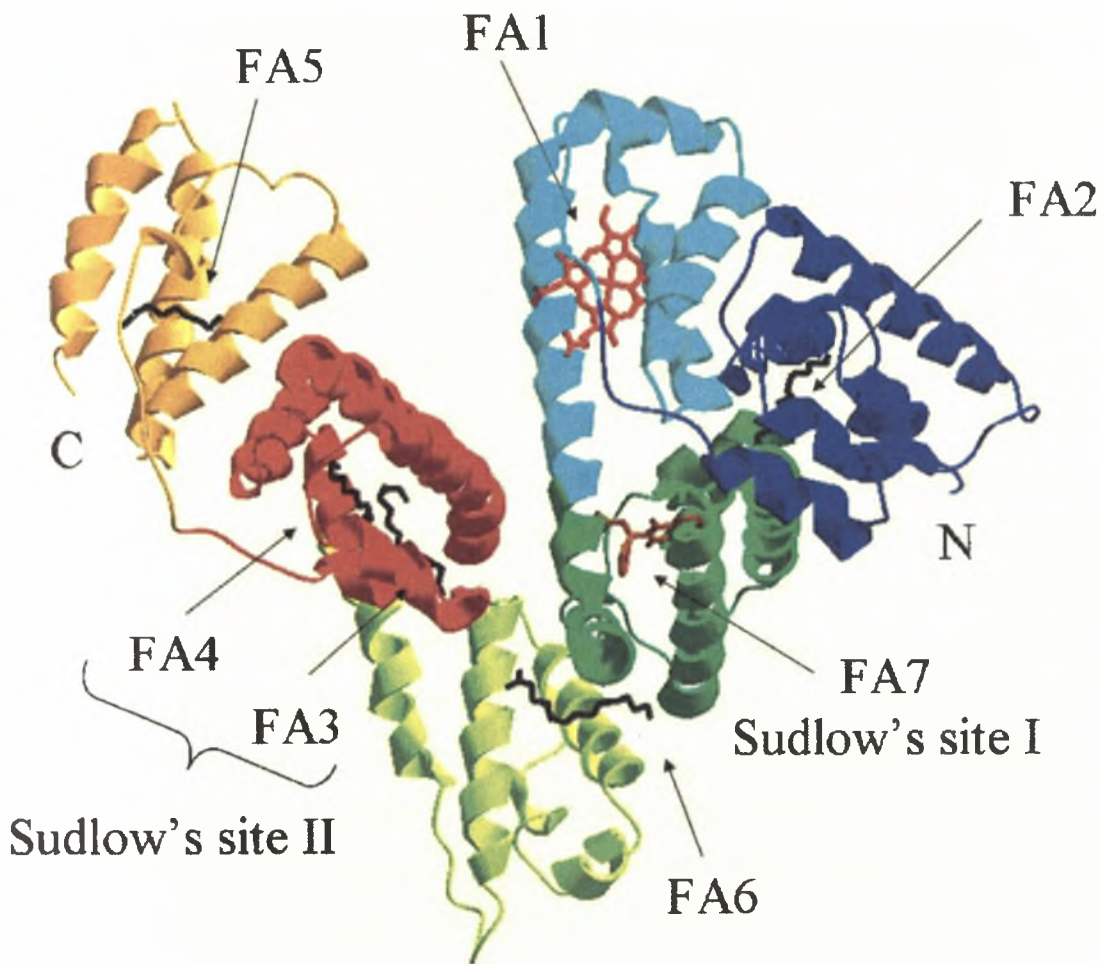
### Συνένζυμο Q 10

Το συνένζυμο Q 10 (ουβικινόνη) παίρνει μέρος στις λειτουργίες της αναπνευστικής αλυσίδας, όπου παράγεται ATP. Έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, ενώ παράλληλα είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση ενός άλλου πολύ ισχυρού λιπόφιλου αντιοξειδωτικού, της α-τοκοφερόλης.

### Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος, καθώς αποτελεί περίπου το 50% της πρωτεϊνικής μάζας σ' αυτό και κωδικοποιείται στο χρωμόσωμα 4. Αποτελείται από μία μονή πολυπεπτιδική αλυσίδα 585 αμινοξικών καταλοίπων και περιλαμβάνει 17 δισουλφιδικούς δεσμούς (θειολική πρωτεΐνη). Η αλυσίδα αυτή διπλώνει παίρνοντας ένα σχήμα καρδιάς με τρεις ομόλογες περιοχές, καθεμιά από τις οποίες έχει δύο υποπεριοχές. Η αλβουμίνη με μοριακό βάρος περίπου 67kD είναι μια αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη και συντίθεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ. Ο χρόνος ημιζωής της είναι περίπου 19 μέρες. Από το ήπαρ εξάγεται ως μη-γλυκοσυλιωμένη αλυσίδα, η οποία φθάνει

στο αίμα σε συγκέντρωση  $7.0 \times 10^{-4}$  M (Prinsen et al., 2004). Ωστόσο, έχει αποδειχθεί πως ορισμένη ποσότητα αλβουμίνης συντίθεται, επίσης, σε σκελετικούς μύες επιμύων (Yamada et al., 1984).



Εικόνα 1. Δομή της αλβουμίνης

Η αλβουμίνη συναντάται σε 2 μορφές. Στη μία της μορφή έχει μια ελεύθερη ομάδα θειόλης και ονομάζεται μερκαπταλβουμίνη (HMA) και στην άλλη βρίσκεται σε οξειδωμένη μορφή και ονομάζεται μη-μερκαπταλβουμίνη (HNA). Το μόριό της περιλαμβάνει πολλές θέσεις πρόσδεσης για διάφορα μόρια (Kragh-Hansen, 1990), όπως ιόντα μετάλλων, ορμόνες, μεταβολίτες, βιταμίνες, για τα οποία έχει και το ρόλο του μεταφορέα. Επίσης, δρα ως μεταφορέας του NO (Fasano et al., 2005), αλλά και ως ένζυμο (Drmanovitz et al., 1999). Μία σημαντική λειτουργία της αλβουμίνης είναι η διατήρηση της οσμωτικής πίεσης και του όγκου του αίματος (Prinsen et al., 2004). Η αφθονία αυτής της πρωτεΐνης επιδρά στη φαρμακοκινητική συμπεριφορά πολλών φαρμάκων,

επιηρεάζοντας τη δραστικότητα και το ρυθμό μεταφοράς τους. Επιπλέον, διαθέτει αντιοξειδωτικές ιδιότητες εξαιτίας των ομάδων θειόλης που υπάρχουν στο μόριό της (Imai et al., 2002; Halliwell & Gutteridge, 1998).

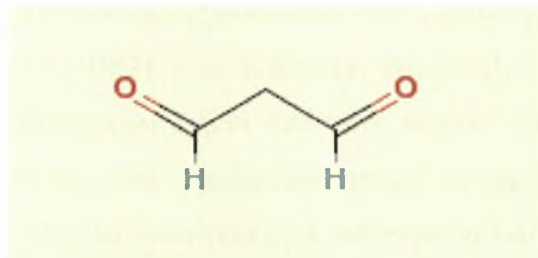
Έχει αναφερθεί ότι η άσκηση προκαλεί οξείδωση των μακρομορίων όπως του DNA, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών των ιστών (Nikolaidis et al., 2006). Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται από την εξαντλητική άσκηση μπορεί να προκαλούν αλλαγές στη δομή της αλβουμίνης. Αυτές οι αλλαγές με τη σειρά τους μπορεί να επηρεάζουν τη διαμόρφωση του μορίου και συνεπώς, την ικανότητα της αλβουμίνης να δεσμεύει ελεύθερες ρίζες (Halliwell & Gutteridge, 1998; Lamprecht et al., 2008). Από αυτή την άποψη, μία αλλαγή στη συγκέντρωση της αλβουμίνης των μυών μπορεί να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη σύνθεσή της, τη μεταφορά και την πιθανή αντιοξειδωτική της λειτουργία.

Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι τα διμερή αλβουμίνης είναι οξειδωμένα προϊόντα που προκύπτουν από την αντίδραση με υπεροξειδία και έτσι η παρουσία τους στους ιστούς μπορεί να είναι ενδεικτική του οξειδωτικού στρες (Alvarez et al., 1999; Carballal et al., 2003). Σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας βρέθηκε ότι η αλβουμίνη καθώς και τα διμερή της αλβουμίνης αυξήθηκαν σε σκελετικούς μύες επιμύων μετά από άσκηση (Veskoukis et al., 2010, under review). Υπάρχουν πολλοί βιολογικοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί για να εξηγήσουν τις θετικές επιδράσεις των υψηλότερων συγκεντρώσεων αλβουμίνης στην κυκλοφορία. Στην πραγματικότητα, η αλβουμίνη αποτελεί ένα από τα κύρια αντιοξειδωτικά που κυκλοφορούν στο πλάσμα (Soriani et al., 1994; Roche et al., 2008). Η εργασία, λοιπόν, αυτή έχει ως κύριο στόχο να εξετάσει αν η αλβουμίνη μπορεί να χρησιμεύσει ως ένας δείκτης οξειδωτικού στρες μετά από δύο παρεμβάσεις, άσκηση και χορήγηση αλλοπουρινόλης, που μεταβάλλουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ιστών.

### **Μηλονική Διαλδεΰδη (MDA)**

Η μηλονική διαλδεΰδη (MDA) είναι ένα οργανικό σύνθετο με δομή  $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$ . Το ενεργό αυτό μόριο είναι φυσικό προϊόν του καταβολισμού των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και είναι ένας από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους δείκτες λιπιδικής υπεροξειδωσης (Nielsen et al., 1997). Η

MDA είναι μια δραστική αλδεΰδη και ως δραστική ηλεκτρόφιλη μορφή προκαλεί τοξικό στρες στα κύτταρα και δημιουργεί ομοιοπολικά πρωτεϊνικά συμπλέγματα που είναι γνωστά ως τελικά προϊόντα της οξείδωσης λιπιδίων (ALE). Το οξειδωτικό στρες στο περιβάλλον του κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή εξαιρετικά ενεργών και ασταθών λιπιδικών υπεροξειδίων. Η αποσύνθεση των ασταθών αυτών υπεροξειδίων καταλήγει στη δημιουργία της MDA, η οποία μπορεί να υπολογιστεί ποσοτικά ακολουθώντας μια ελεγχόμενη αντίδραση με θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) σε αναλογία 1:2.



**Εικόνα 2.** Χημικός τύπος της μηλονικής διαλδεΰδης.

Μικρές ποσότητες "ελεύθερης" MDA σχηματίζονται κατά την υπεροξείδωση των περισσότερων μεμβρανικών συστημάτων, ειδικότερα των μικροσωμάτων. Μεγαλύτερες ποσότητες MDA μπορούν να παραχθούν κατά την υπεροξείδωση των ηπατικών μικροσωμάτων παρουσία αλάτων σιδήρου (Halliwell & Gutteridge, 1998). Η MDA μπορεί, επίσης, να σχηματιστεί ενζυμικά κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού των εικοσανοειδών. Υπάρχει σε ποικίλες μορφές που εξαρτώνται από το pH. Σε φυσιολογικό pH, οποιαδήποτε "ελεύθερη" MDA υφίσταται ως ενολικό ανιόν, το οποίο έχει χαμηλή ενεργότητα σε σχέση με τις περισσότερες αμινικές ομάδες. Καθώς, ωστόσο, το pH ελαττώνεται, η ενεργότητα αυξάνει αρκετά.

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι η MDA είναι ισχυρά γενοτοξική και καρκινογενής, ιδιότητες που ενδεχομένως προέρχονται από τη βιολογική δραστηριότητα μερικώς υδρολυμένων παραγώγων της. Αν και η MDA προσδέεται στο DNA δεν είναι ισχυρά μεταλλαξιγόνος (Halliwell & Gutteridge, 1998).



## Οξειδωτικό στρες και Άσκηση

Τόσο οι ενζυμικοί όσο και οι μη ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί προστατεύουν τους ιστούς από οξειδωτικές βλάβες. Αυτός ο ρόλος είναι ιδιαίτερα σημαντικός κατά τη διάρκεια της άσκησης, η οποία αφενός συμβάλλει στη βελτίωση της ποιότητας ζωής και αφετέρου σχετίζεται με την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Αποτελέσματα από έρευνες που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η άσκηση συνδέεται με την αύξηση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών και συνεπώς, επάγει την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες (Nikolaidis et al., 2006; Veskoukis et al 2008).

Οι Davies et al. (1982) ήταν οι πρώτοι που έδειξαν ότι η άσκηση αυξάνει την παραγωγή των ελεύθερων ριζών. Από τότε, πολλές μελέτες αποκάλυψαν τις επιδράσεις της άσκησης στο οξειδωτικό στρες. Οι περισσότερες από αυτές περιελάμβαναν αερόβια άσκηση (τρέξιμο, ποδηλασία και κολύμβηση) (Alessio, 1993; Vasankari et al., 1997; Liu et al., 1999; Mastaloudis et al., 2001; Palmer et al., 2003; Ashton et al., 1998; Child et al., 1998; Lovlin et al., 1987; Aguilo et al., 2005). Η αερόβια άσκηση συνοδεύεται από αυξημένη μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου,  $VO_2$ , γεγονός το οποίο ίσως αυξάνει την δραστηριότητα των ελευθέρων ριζών (Alessio, 1993). Όσο πιο έντονη και εξαντλητική είναι η άσκηση τόσο μεγαλύτερη είναι η παραγωγή ελευθέρων ριζών και επομένως, το οξειδωτικό στρες (Palmer et al., 2003).

Έχει παρατηρηθεί ότι τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αυξάνονται στο πλάσμα και το γαστροκνήμιο μυ επιμύων μετά από εξαντλητική άσκηση, όπως το ίδιο συμβαίνει και με τη λιπιδική υπεροξειδωση (Alessio et al., 2000). Επίσης, η άσκηση αυξάνει τη λιπιδική υπεροξειδωση στο πλάσμα και το σκελετικό μυ, όπως έχει αναφερθεί και στο παρελθόν (Ajmani et al., 2003; Alessio et al., 2000; You et al., 2005). Σε αθλητές του τριάθλου μετά από αγώνα παρατηρείται αύξηση των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) (Palazzeti et al., 2003). Ακόμη έχει βρεθεί ότι τα επίπεδα της καταλάσης είναι αυξημένα στο αίμα κολυμβητών των 800 μέτρων (Inal et al., 2001).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η άσκηση αυξάνει τη συγκέντρωση της GSSG (Aguilo et al., 2005) στο αίμα σε ποδηλάτες. Επιπλέον, τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων είναι αυξημένα στα ερυθροκύτταρα σε ποδηλάτες

που έφθασαν το 100%  $VO_{2max}$  σε σύγκριση με αυτά των ποδηλατών με 40%  $VO_{2max}$  (Lovlin et al., 1987).

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

### **Αλλοπουρινόλη και Άσκηση**

Η αλλοπουρινόλη είναι ένα δομικό ανάλογο της υποξανθίνης (Parks & Granger 1986) και αναστολέας της οξειδάσης της ξανθίνης (Kelley & Beardmore 1990) και της δεϋδρογονάσης της ξανθίνης (Hoey et al., 1988). Η οξειδάση της ξανθίνης είναι υπεύθυνη για την οξείδωση της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, το οποίο είναι το κύριο προϊόν του καταβολισμού των πουρινών.

Η αλλοπουρινόλη, λόγω της ικανότητάς της να αναστέλλει την παραγωγή ουρικού οξέος, χρησιμοποιείται ως φάρμακο απέναντι στην ουρική αρθρίτιδα, ασθένεια κατά την οποία μεγάλες συγκεντρώσεις ουρικού οξέος συσσωρεύονται στα οστά. Εκτός από τη χρήση στην αντιμετώπιση της ουρικής αρθρίτιδας, η αλλοπουρινόλη χρησιμοποιείται και για την αντιμετώπιση των δυσμενών συνεπειών της χημειοθεραπείας (πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ουρικού οξέος εξαιτίας του εξαπλώμενου κυτταρικού θανάτου).

Η οξειδάση της ξανθίνης χρησιμοποιεί ως δέκτη ηλεκτρονίων το μοριακό οξυγόνο κατά τη διαδικασία της διάσπασης των πουρινών με αποτέλεσμα την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και ανιόντος σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) (McCord & Fridovich, 1968). Η αλλοπουρινόλη αναστέλλει τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ, μειώνοντας την παραγωγή ουρικού οξέος. Η αλλοπουρινόλη μεταβολίζεται, επίσης, σε οξυπουρινόλη από τη δεϋδρογονάση της ξανθίνης και την αλδεϋδική οξειδάση.

Τόσο η αλλοπουρινόλη όσο και η οξυπουρινόλη έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ρίζες  $\text{OH}^\bullet$  (Moorhouse et al., 1987). Λόγω της ιδιότητας της αλλοπουρινόλης να αναστέλλει την παραγωγή  $\text{O}_2^\bullet$  μέσω της αναστολής της δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης, μπορεί να θεωρηθεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο (Gomez-Cabrera et al., 2006).

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι ένα ένζυμο που συνεισφέρει σημαντικά στην παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση, όπως έχει παρατηρηθεί από προηγούμενες μελέτες (McCord & Fridovich, 1968). Έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση αλλοπουρινόλης αναστέλλει τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης μετά από τρέξιμο σε επίμυες (Gomez-Cabrera et al., 2005) και μετά από μαραθώνιο (Gomez-Cabrera et al., 2006) και ποδηλασία σε ανθρώπους (Gomez-Cabrera et al., 2003).

Έχει βρεθεί ότι η αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης μέσω χορήγησης αλλοπουρινόλης προκαλεί μείωση στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεΰδης του πλάσματος μετά από μαραθώνιο (Gomez-Cabrera et al., 2006) και ποδηλασία υψηλού επιπέδου (Gomez-Cabrera et al., 2003) σε ανθρώπους. Επίσης, η χορήγηση αλλοπουρινόλης μείωσε τη συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων μετά από τρέξιμο μέχρι εξάντλησης (Gomez-Cabrera et al., 2005). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η αλλοπουρινόλη μείωσε την αυξημένη από την άσκηση κρεατινική κινάση, η οποία είναι ένας δείκτης μυικής καταστροφής (Gomez-Cabrera et al., 2003). Ακόμη, έχει εξεταστεί αν οι ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης οδηγούν σε επαγωγή έκφρασης σημαντικών ενζύμων, όπως οι Mn-SOD, iNOS και eNOS, για τις προσαρμογές κατά τη διάρκεια της άσκησης. Η Mn-SOD ενεργοποιείται κατά την εξαντλητική άσκηση και η ενεργοποίηση αυτή αποτράπηκε σε επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλλοπουρινόλη (Gomez-Cabrera et al., 2005). Οι συνθάσες του NO ενεργοποιήθηκαν από την άσκηση, ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε με τη χορήγηση της αλλοπουρινόλης (Gomez-Cabrera et al., 2005).

Ωστόσο, ο αντιοξειδωτικός ρόλος της αλλοπουρινόλης δεν επιβεβαιώθηκε από προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας (Veskoukis et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η αλλοπουρινόλη αυξάνει τη

συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και των TBARS στα ερυθροκύτταρα και το γαστροκνήμιο μυ επιμύων μετά από εξαντλητική άσκηση. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην αδυναμία χαρακτηρισμού της αλλοπουρινόλης ως αντιοξειδωτικού μορίου. Έτσι, η υιοθέτηση ενός νέου δείκτη οξειδωτικού στρες, της αλβουμίνης, πιθανόν να δώσει μία απάντηση στο ερώτημα αυτό.

## Σκοπός της εργασίας



Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν να εξετάσει την επίδραση της εξαντλητικής αερόβιας άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεΰδης, ως δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης και της αλβουμίνης, ως ουσίας με αντιοξειδωτικές ιδιότητες και πιθανού δείκτη οξειδωτικού στρες σε σκελετικούς μύες επίμυων.



# ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



## Πειραματόζωα

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 80 ένηβοι αρσενικοί επίμυες της φυλής Wistar, ηλικίας 8 εβδομάδων, οι οποίοι ζύγιζαν  $220 \pm 10$  gr. Οι επίμυες στεγάστηκαν κάτω από ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (12ωρη εναλλαγή φωτός – σκοταδιού και θερμοκρασία 20 °C) και η τροφή και το νερό διατίθονταν ελεύθερα (Veskoukis et al., 2008).

Οι επίμυες μελετήθηκαν σε 8 ομάδες των 10 ατόμων κάτω από τις ακόλουθες τρεις καταστάσεις: άσκηση, χορήγηση αλλοπουρινόλης και συνδυασμό αυτών.

## Πειραματικές ομάδες

- I. Δέκα επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε διμέθυλ-σουλφοξείδιο (DMSO), ασκήθηκαν και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση.
- II. Δέκα επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO, ασκήθηκαν και θανατώθηκαν 5 ώρες μετά την άσκηση.
- III. Δέκα επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλλοπουρινόλη, ασκήθηκαν και θανατώθηκαν αμέσως μετά την άσκηση.
- IV. Δέκα επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλλοπουρινόλη, ασκήθηκαν και θανατώθηκαν 5 ώρες μετά την άσκηση.
- V. Δέκα επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλλοπουρινόλη και θανατώθηκαν 1.5 ώρες μετά τη χορήγηση.
- VI. Δέκα επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλλοπουρινόλη και θανατώθηκαν 2.5 ώρες μετά τη χορήγηση.
- VII. Δέκα επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε αλλοπουρινόλη και θανατώθηκαν 7.5 ώρες μετά τη χορήγηση.
- VIII. Δέκα επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO και θανατώθηκαν 1.5 ώρες μετά τη χορήγηση (ομάδα control).

Το μοντέλο άσκησης που εφαρμόστηκε ήταν η κολύμβηση μέχρι εξάντλησης. Το DMSO ή η αλλοπουρινόλη χορηγήθηκαν 1.5 ώρες πριν την έναρξη της άσκησης διότι τόσοσ είναι ο απαραίτητος χρόνος έως ότου να παρατηρηθεί η μέγιστη συγκέντρωση της αλλοπουρινόλης στο μυ. Η θανάτωση των επιμύων, στους οποίους χορηγήθηκε αλλοπουρινόλη έγινε 1.5, 2.5 και 7.5 ώρες μετά τη χορήγηση έτσι ώστε να υπάρξει πλήρης αντιστοιχία με τους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO. Η ομάδα, στην οποία χορηγήθηκε DMSO και θανατώθηκε πριν την άσκηση θεωρήθηκε ως ομάδα ελέγχου (control). Πιλοτικά πειράματα απέδειξαν την ανάγκη για τη χρησιμοποίηση μίας μόνο ομάδας ελέγχου αφού δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στους δείκτες που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια των 7.5 ωρών του πειράματος. Επίσης, πιλοτικά πειράματα έδειξαν ότι η χορήγηση DMSO δεν επηρεάζει τις τιμές των προς μελέτη δεικτών σε καμία χρονική στιγμή (Veskoukis et al., 2008).

### **Χορήγηση αλλοπουρινόλης**

Η δόση της αλλοπουρινόλης, που χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά ήταν 50 mg·kg<sup>-1</sup> σωματικού βάρους των επιμύων 1.5 ώρες πριν την εκτέλεση του πρωτοκόλλου της άσκησης. Η αλλοπουρινόλη διαλύθηκε σε DMSO, καθότι δεν μπορεί να διαλυθεί σε φυσιολογικό ορό ή μίγμα DMSO και φυσιολογικού ορού. Το DMSO είναι ένας καλός διαλύτης για την αλλοπουρινόλη και έχει χρησιμοποιηθεί σε προηγούμενα πειράματα με ανθρώπους (Lee & Wang, 1999).

### **Εξοικείωση των επιμύων**

Κατά την άφιξή τους οι επίμυες αφέθηκαν να εγκλιματιστούν πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας. Στη συνέχεια, οι επίμυες εξοικειώθηκαν με το νερό για πέντε μέρες πριν την εφαρμογή του πρωτοκόλλου κολύμβησης. Την πρώτη μέρα της εξοικείωσης, τα πειραματόζωα αφέθηκαν στο νερό για 10 λεπτά χωρίς βάρος στην ουρά τους. Τις επόμενες δυο μέρες, ασκήθηκαν για 10 λεπτά με εφαρμογή βάρους στη βάση της ουράς τους ισοδύναμου με 1% του σωματικού τους βάρους, ενώ τις τελευταίες δυο μέρες με 2% του σωματικού τους βάρους. Τελικά, οι επίμυες ξεκουράστηκαν για τρεις μέρες πριν την έναρξη του πρωτοκόλλου κολύμβησης.

## Πρωτόκολλο κολύμβησης

Κάθε επίμυς ασκήθηκε ξεχωριστά μέχρι εξάντλησης σε μία ειδική δεξαμενή, διαμέτρου 1 m και βάθους 0.7 m, με θερμοκρασία νερού 33-36 °C. Στη βάση της ουράς του προστέθηκε ένα βαρίδιο ισοδύναμο με το 4% του σωματικού του βάρους, ώστε να επιτευχθεί συνεχής κολύμβηση. Το κολύμπι επιλέχθηκε επειδή είναι μια μορφή άσκησης που, αντίθετα από το τρέξιμο σε δαπεδοεργόμετρο, προκαλεί περιορισμένη μυϊκή καταστροφή (Komulainen et al., 1995). Έτσι, οποιαδήποτε επίδραση στους δείκτες του οξειδωτικού στρες που μελετήθηκαν, αποδίδεται στην άσκηση και όχι στη μυϊκή καταστροφή, η οποία επάγει την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Nikolaidis et al., 2007). Επίσης, το πρωτόκολλο επιλέχθηκε να γίνει μέχρι εξάντλησης καθώς έχει αναφερθεί ότι το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την άσκηση είναι άμεσα εξαρτώμενο από την έντασή της (Palmer et al., 2003).

## Συλλογή δειγμάτων

Οι επίμυες θανατώθηκαν με αποκεφαλισμό, ύστερα από σύντομη έκθεσή τους σε αιθέρα. Τα δείγματα των σκελετικών μυών (ορθός μηριαίος, πρόσθιος κνημιαίος και έξω πλατύς τετρακέφαλος μυς) αφαιρέθηκαν χειρουργικά, ψύχθηκαν αμέσως σε υγρό άζωτο και διατηρήθηκαν στους -80°C. Η προετοιμασία των ιστών περιελάμβανε την ομογενοποίησή τους με γουδί και γουδοχέρι, χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο. Η ομογενοποίηση έγινε σε ένα phosphate buffered saline pH 7.4 (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl και 1 mM EDTA), και προστέθηκε ένα μίγμα αναστολέων πρωτεασών: απροτινίνη (10mg/mL), λιουπεπτίνη (1mg/mL) και PMSF (9mg/mL). Μετά τα δείγματα υπέστησαν επεξεργασία με υπερήχους για περαιτέρω διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και απελευθέρωση όσο το δυνατόν μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης. Τέλος, φυγοκεντρήθηκαν για 30 λεπτά σε 12000g στους 4°C και έγινε συλλογή του υπερκείμενου. Καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας τα δείγματα διατηρούνταν στον πάγο.

### Πρωτόκολλα δεικτών που μελετήθηκαν

Τα πρωτόκολλα της παρούσας διπλωματικής που παρατίθενται αναλυτικά στο παράρτημα, πραγματοποιήθηκαν φασματοφωτομετρικά και εις τριπλούν. Η ολική πρωτεΐνη υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν αποκτήθηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

### 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.

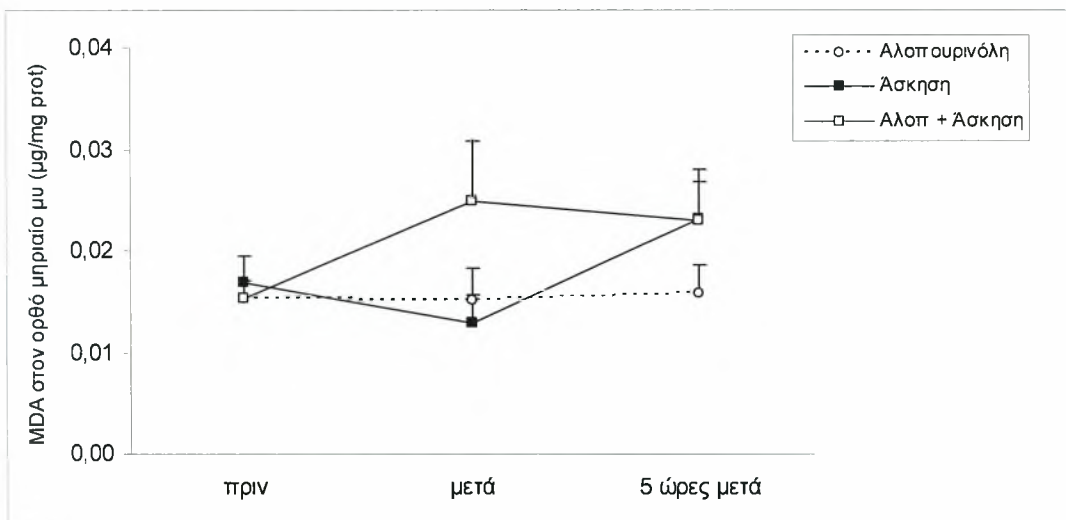
# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



## Μηλονική Διαλδεύδη

### • Ορθός μηριαίος μυς

Δε βρέθηκε καμία επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου και του συνδυασμού τους.



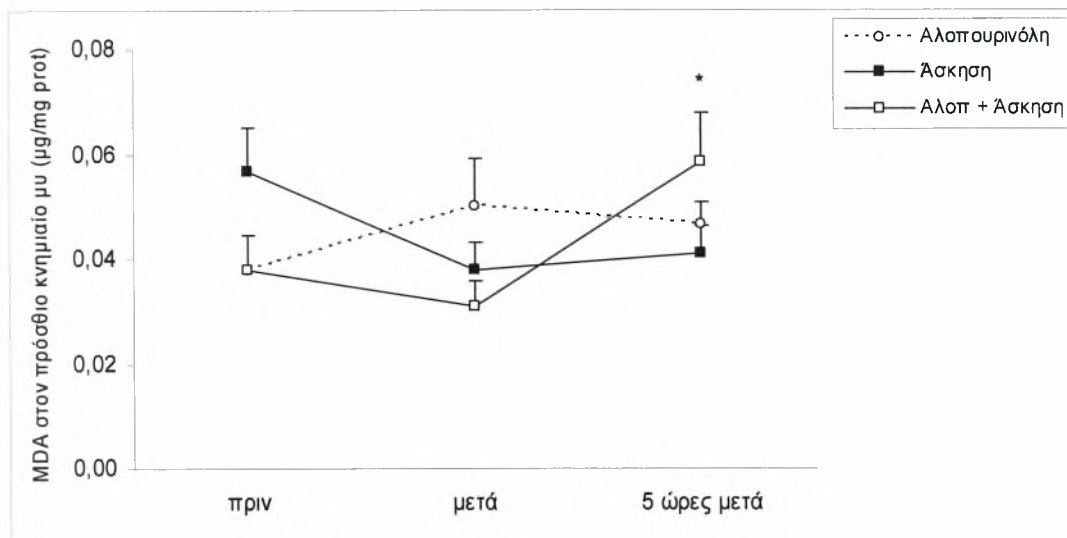
**Διάγραμμα 1.** Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεύδης στον ορθό μηριαίο μυ επιμύων.



## 🌿 Πρόσθιος κνημιαίος μυς

Βρέθηκε σημαντική επίδραση του συνδυασμού χρόνου και παρέμβασης.

Η MDA αυξήθηκε 5 ώρες μετά την άσκηση στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε αλοπουρινόλη.

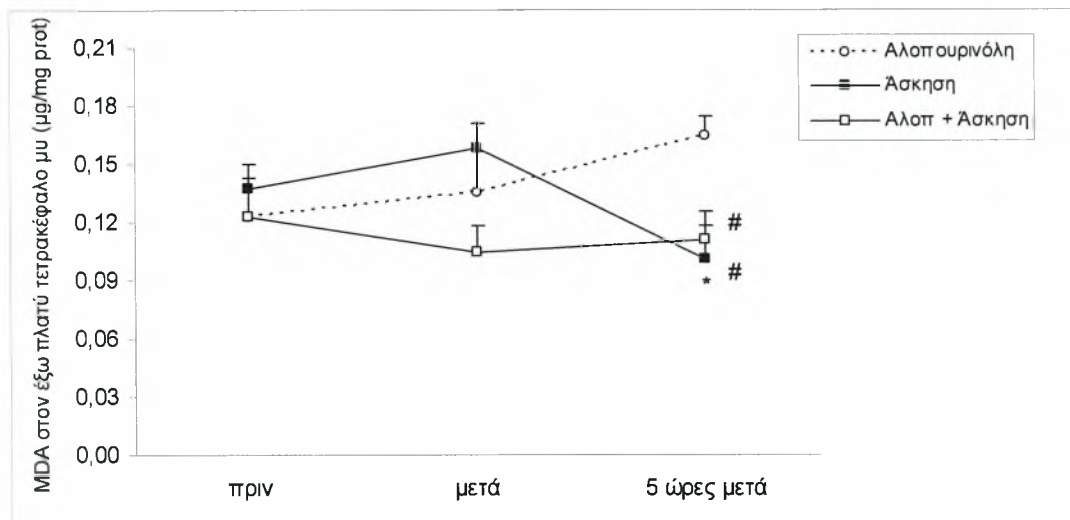


**Διάγραμμα 2.** Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεϋδης στον πρόσθιο κνημιαίο μυ επιμύων. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή ηρεμίας (πριν) στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0.05$ ).

### • Έξω πλατύς τετρακέφαλος μυς

Βρέθηκε σημαντική επίδραση του συνδυασμού χρόνου και παρέμβασης.

Η MDA μειώθηκε 5 ώρες μετά την άσκηση σε σχέση με την τιμή της πριν την άσκηση. Η MDA μειώθηκε στους επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε DMSO και αλλοπουρινόλη 5 ώρες μετά την άσκηση σε σχέση με τους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε αλλοπουρινόλη και δεν έκαναν άσκηση.

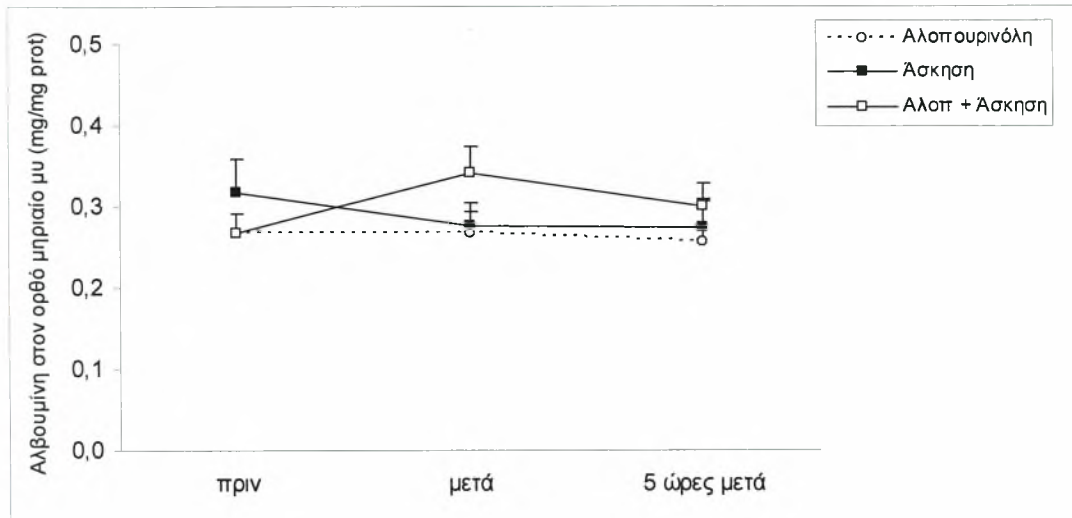


**Διάγραμμα 3.** Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της μηλονικής διαλδεύδης στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ επιμύων. \*Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την τιμή ηρεμίας (πριν) στην ίδια πειραματική ομάδα ( $P < 0.05$ ). #Στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στην άσκηση και το συνδυασμό αλλοπουρινόλης και άσκησης σε σχέση με την αλλοπουρινόλη 5 ώρες μετά ( $P < 0.05$ ).

## Αλβουμίνη

### • Ορθός μηριαίος μυς

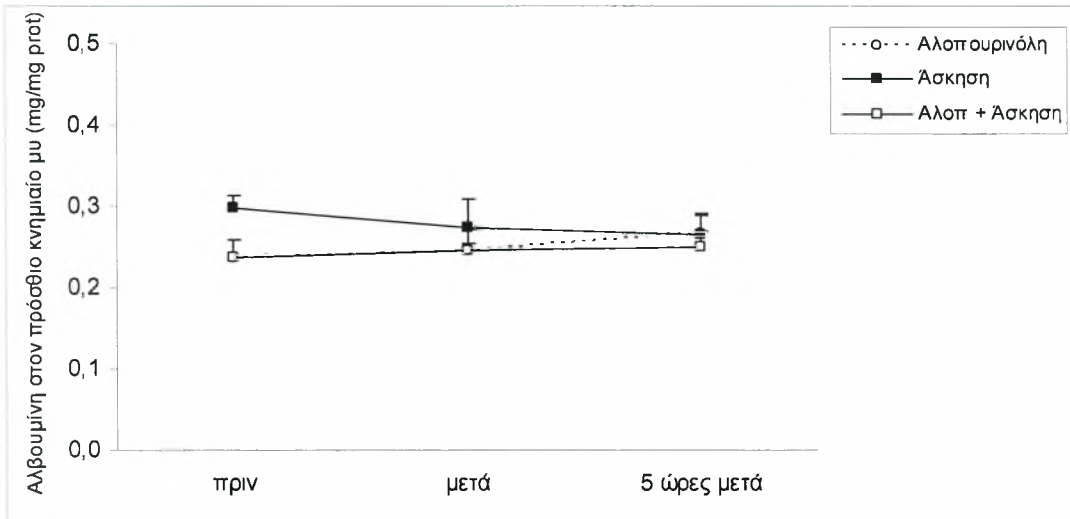
Δε βρέθηκε καμία επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου και του συνδυασμού τους.



**Διάγραμμα 4.** Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον ορθό μηριαίο μυ επιμύων.

## • Πρόσθιος κνημιαίος μυς

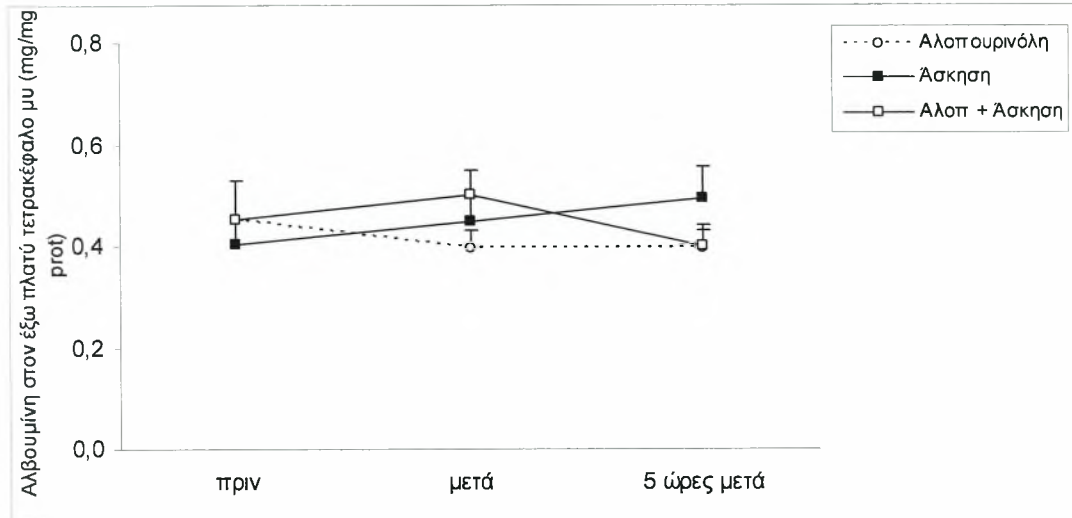
Δε βρέθηκε καμία επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου και του συνδυασμού τους.



**Διάγραμμα 5.** Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον πρόσθιο κνημιαίο μυ επιμύων.

## • Έξω πλατύς τετρακέφαλος μυς

Δε βρέθηκε καμία επίδραση της παρέμβασης, του χρόνου και του συνδυασμού τους.



**Διάγραμμα 6.** Επίδραση της άσκησης και της χορήγησης αλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ επιμύων.



## ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της εξαντλητικής αερόβιας άσκησης και της χορήγησης αλλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της MDA και της αλβουμίνης σε τρεις σκελετικούς μύες επιμύων. Παρατηρήθηκε ότι η εξαντλητική άσκηση σε συνδυασμό με τη χορήγηση αλλοπουρινόλης οδήγησε σε αύξηση του οξειδωτικού στρες στον πρόσθιο κνημιαίο μυ των επιμύων, όπως φάνηκε από την αύξηση της συγκέντρωσης της MDA. Επιπλέον, η MDA ήταν αυξημένη στον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ των επιμύων, στους οποίους χορηγήθηκε αλλοπουρινόλη και δεν έκαναν άσκηση σε σχέση με εκείνους στους οποίους χορηγήθηκε DMSO και αλλοπουρινόλη 5 ώρες μετά. Η συγκέντρωση της αλβουμίνης δε, δεν επηρεάστηκε σε κανέναν ιστό, σε καμία από τις δύο παρεμβάσεις.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι η άσκηση επάγει το οξειδωτικό στρες όπως φάνηκε από την αύξηση της MDA και των λιπιδικών υπεροξειδίων στον άνθρωπο (Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2006) και σε επίμυες (Gomez-Cabrera et al., 2005; Koyama et al., 1999; Veskoukis et al., 2008). Αύξηση της MDA παρατηρήθηκε και σε μία άλλη εργασία μετά από μαραθώνιο στον άνθρωπο (Gomez-Cabrera et al., 2006), ενώ η κρεατινική κινάση ως δείκτης μυικής καταστροφής αυξήθηκε στο πλάσμα μετά από ποδηλασία υψηλού επιπέδου (Gomez-Cabrera et al., 2003). Μετά από αερόβια άσκηση (800m κολύμβηση), επίσης, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της καταλάσης και μείωση της συγκέντρωσης της GSH στον άνθρωπο (Inal et al., 2001),

Σε έρευνες των Michailidis et al., και των Nikolaidis et al., έχει διαπιστωθεί ότι η άσκηση επάγει το οξειδωτικό στρες όπως φάνηκε από την αύξηση των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων του πλάσματος (Michailidis et al., 2007; Nikolaidis et al., 2006). Σε μελέτες που έγιναν στο γαστροκνήμιο μυ επιμύων η άσκηση αύξησε τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο (Gomez-Cabrera et al., 2005) και των TBARS (Veskoukis et al., 2008).

Μελετώντας την επίδραση της άσκησης και της αλλοπουρινόλης στην ποδηλασία στον άνθρωπο, η προκαλούμενη από την άσκηση αύξηση της MDA

στο αίμα μετριάστηκε μετά από τη χορήγηση αλλοπουρινόλης (Gomez-Cabrera et al., 2005). Επίσης, η αλλοπουρινόλη μείωσε τη μυϊκή καταστροφή που προκλήθηκε από την άσκηση, όπως φάνηκε από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις της κρεατινικής κινάσης και της αμινοτρανσφεράσης του ασπαραγινικού οξέος σε σχέση με την άσκηση (Gomez-Cabrera et al., 2005).

Ακόμα μία εργασία μελέτησε την επίδραση της αλλοπουρινόλης στον άνθρωπο και συγκεκριμένα μετά από μαραθώνιο (Gomez-Cabrera et al., 2006). Παρατηρήθηκε ότι η λιπιδική υπεροξειδωση μετά από την αερόβια υψηλής διάρκειας και έντασης άσκηση, αυξήθηκε όπως φάνηκε από την αύξηση της MDA στο πλάσμα. Αντίθετα, η αλλοπουρινόλη δεν επέτρεψε την αύξηση της MDA μετά την άσκηση, καθώς τη διατήρησε στα επίπεδα που βρισκόταν πριν από αυτή (Gomez-Cabrera et al., 2006).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω εργασιών δεν ταυτίζονται με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τον έξω πλατύ τετρακέφαλο μυ των επιμύων η συγκέντρωση της MDA βρέθηκε αυξημένη στους επίμυες στους οποίους χορηγήθηκε αλλοπουρινόλη και δεν έκαναν άσκηση. Επιπλέον, στον πρόσθιο κνημιαίο μυ, ενώ η άσκηση και η αλλοπουρινόλη είχαν αντίθετες αλλά όχι στατιστικά σημαντικές επιδράσεις στη συγκέντρωση της MDA, ωστόσο ο συνδυασμός τους την αύξησε 5 ώρες μετά την άσκηση. Έτσι, τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα ευρήματα προηγούμενης εργασίας του εργαστηρίου μας, στην οποία η αλλοπουρινόλη προκαλεί την εμφάνιση οξειδωτικού στρες (Veskoukis et al., 2008).

Όσον αφορά τον δεύτερο δείκτη που μελετήθηκε, υπάρχει μεγάλος αριθμός εργασιών που μελετούν τις επιδράσεις διαφόρων παρεμβάσεων στη συγκέντρωση της αλβουμίνης στα ζώα και τον άνθρωπο (Lamprecht et al., 2009; Goldwasser & Feldman 1997; Szapacs et al., 2006). Όμως, μόνο λίγες από αυτές αναφέρονται στην αλβουμίνη των ιστών (Wagatsuma & Yamada 2000; Wagatsuma et al., 2001, 2002), ενώ δεν υπάρχουν μελέτες που να μετράνε την συγκέντρωση της αλβουμίνης στους ιστούς μετά από εξαντλητική αερόβια άσκηση και χορήγηση αλλοπουρινόλης.

Κάποιες από αυτές, λοιπόν, έχουν δείξει ότι η αλβουμίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού (Roche et al., 2008). Στην παρούσα εργασία η συγκέντρωση της αλβουμίνης δεν μεταβλήθηκε σε κανέναν

μυϊκό ιστό ούτε με την άσκηση, ούτε με τη χορήγηση αλλοπουρινόλης, ούτε με το συνδυασμό τους. Από την άλλη, το γεγονός ότι δεν βρέθηκε κάποια επίδραση της αλλοπουρινόλης στη συγκέντρωση της αλβουμίνης μετά την άσκηση, μπορεί να καταδεικνύει ότι υπήρξε μία ισορροπία μεταξύ της προοξειδωτικής και της οξειδωτικής δράσης της αλλοπουρινόλης, έτσι ώστε οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί της αλβουμίνης να μην ενεργοποιήθηκαν. Η αλλοπουρινόλη μπορεί να ανέστειλε τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης, δηλαδή του ενζύμου παραγωγής ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση, παράλληλα, όμως, ανέστειλε και την παραγωγή του ουρικού οξέος, δηλαδή ενός ισχυρού αντιοξειδωτικού μορίου, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού.

Συμπερασματικά, η άσκηση δε φάνηκε να έχει ισχυρές επιδράσεις στους δείκτες που μελετήθηκαν. Η αλλοπουρινόλη, ωστόσο, προκάλεσε την εμφάνιση οξειδωτικού στρες, δεδομένα που βρίσκονται σε συμφωνία με προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## Πρωτόκολλα δεικτών που μελετήθηκαν

- MDA στους σκελετικούς μύες που μελετήθηκαν

### Αντιδραστήρια

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

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

#### TCA (Trichloroacetic acid) 5%

Για να φτιάξουμε 100mL TCA 5% διαλύουμε 5gr TCA σε 100mL H<sub>2</sub>O.

#### TBA (Thiobarbituric acid) 0.8%

Για να φτιάξουμε 100mL TBA 0.8% διαλύουμε 0.8gr TBA σε 100mL H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος και για να διαλυθεί χρειάζεται χαμηλή θέρμανση και ανάδευση.

### Πειραματική διαδικασία

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

#### Δείγμα 1

|                                       | Δείγμα 1 |
|---------------------------------------|----------|
| Ομογενοποιημένος ιστός αραιωμένος 1/2 | 50μL     |
| TCA 5%                                | 924μL    |
| BHT 0.8%                              | 576μL    |

2. Αναδεύουμε στο vortex για 30sec.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3min στα 3000g στους 4°C.
4. Απομακρύνουμε το εξάνιο, το οποίο είναι το ανώτατο στρώμα του υπερκειμένου.
5. Προσθέτουμε 900μL TCA 5% και αναδεύουμε στο vortex.

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

|          | Τυφλό | Δείγμα |
|----------|-------|--------|
| Δείγμα 1 | –     | 625    |
| TBA 0.8% | 375   | 375    |
| TCA 5%   | 625   | –      |

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

8. Μεταφέρουμε τα δείγματα για 10min στον πάγο.

9. Φυγοκεντρούμε για 3min στα 3000g στους 4°C.

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

#### *Υπολογισμοί*

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



## *Πρωτόκολλο καμπύλης MDA*

### *Αντιδραστήρια*

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

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

#### HCl 0.1N

Για να φτιάξουμε HCl 0.1N αραιώνουμε 10 φορές από ένα διάλυμα HCl 1N (Για τελικό όγκο 30mL HCl 0.1N προσθέτουμε 3 mL HCl 1N και 27 mL H<sub>2</sub>O).

#### TBA (Thiobarbituric acid) 0.8%

Για να φτιάξουμε 100mL TBA 0.8% διαλύουμε 0.8gr TBA σε 100mL H<sub>2</sub>O. Το διάλυμα αυτό ετοιμάζεται τη μέρα του πειράματος και για να διαλυθεί χρειάζεται χαμηλή θέρμανση και ανάδευση.

### *Πειραματική διαδικασία*

1. Σε ένα falcon όγκου 15mL προσθέτουμε 75μL TEP stock συγκέντρωσης 239μg/mL και αραιώνουμε σε τελικό όγκο 10mL με την προσθήκη 9.925μL HCl 0.1N. Αναδεύουμε το διάλυμα στο vortex, το βράζουμε στο υδατόλουτρο σε 100°C για 5min και μετά μεταφέρουμε το falcon σε πάγο για άλλα 5min. Σε ογκομετρική φιάλη των 100ml μεταφέρουμε το περιεχόμενο του falcon και προσθέτουμε H<sub>2</sub>O μέχρι να πληρωθεί η φιάλη.

2. Ετοιμάζουμε τις αραιώσεις της MDA.

C1: i) 20μl stock + 180μl H<sub>2</sub>O = 200μl

ii) 5μl stock + 995μl H<sub>2</sub>O = 1000μl (C1=119.5ng/mL)

C2: i) 20μl stock + 80μl H<sub>2</sub>O = 200μl

ii) 10μl stock + 990μl H<sub>2</sub>O = 1000μl (C2=239ng/mL)

C3: i) 20μl stock + 180μl H<sub>2</sub>O = 200μl

ii) 20μl stock + 980μl H<sub>2</sub>O = 1000μl (C3=478ng/mL)

C4: i)  $20\mu\text{l stock} + 180\mu\text{l H}_2\text{O} = 500\mu\text{l}$

ii)  $20\mu\text{l stock} + 646\mu\text{l H}_2\text{O} = 666\mu\text{l}$  ( $C_4=717\text{ng/mL}$ )

C5:  $5\mu\text{l stock} + 995\mu\text{l H}_2\text{O} = 1000\mu\text{l}$  ( $C_5=1.195\mu\text{g/mL}$ )

C6:  $10\mu\text{l stock} + 1420\mu\text{l H}_2\text{O} = 500\mu\text{l}$  ( $C_6=1.673\mu\text{g/mL}$ )

C7:  $10\mu\text{l stock} + 990\mu\text{l H}_2\text{O} = 1000\mu\text{l}$  ( $C_7=2.39\mu\text{g/mL}$ )

C8:  $10\mu\text{l stock} + 660\mu\text{l H}_2\text{O} = 670\mu\text{l}$  ( $C_8=3.585\mu\text{g/mL}$ )

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

|               | Τυφλό | C <sub>1</sub> | C <sub>2</sub> | C <sub>3</sub> | C <sub>4</sub> | C <sub>5</sub> | C <sub>6</sub> | C <sub>7</sub> | C <sub>8</sub> |
|---------------|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| MDA (μL)      | —     | 100            | 100            | 100            | 100            | 100            | 100            | 100            | 100            |
| 5% TCA (μL)   | 625   | 525            | 525            | 525            | 525            | 525            | 525            | 525            | 525            |
| 0.8% TBA (μL) | 375   | 375            | 375            | 375            | 375            | 375            | 375            | 375            | 375            |

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

5. Μεταφέρουμε τα δείγματα για 5min στον πάγο.

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

- Αλβουμίνη στους σκελετικούς μύες που μελετήθηκαν

#### *Αρχή της μεθόδου*

Η προσθήκη αλβουμίνης σε ένα διάλυμα με πράσινο της βρωμοκρεσόλης και σε 0.075M διαλύματος ηλεκτρικού οξέος με pH 4.2, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της απορρόφησης στα 628 nm.

#### *Αντιδραστήρια*

Ηλεκτρικό οξύ 0.1M, pH 4. (MW): 118.1

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

Διάλυμα πράσινου της βρωμοκρεσόλης Stock 0.6mM. (MW): 698.02

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

#### Διάλυμα χρωστικής

Αραιώνουμε έναν όγκο από stock διάλυμα BCG με τρεις όγκους 0.1M ηλεκτρικού οξέος, προσθέτουμε 4mL 30% Brij-35 ανά λίτρο και προσεκτικά προσαρμόζουμε το pH στο 4.2. Αποθηκεύουμε στους 4°C.

#### Διάλυμα Brij-35 30%

Διαλύουμε 30g Brij-35 σε 100mL νερό.

#### Διάλυμα αλβουμίνης Stock 10g/dL

Διαλύουμε 10g αλβουμίνης (BSA) και 50mg αζιδίου του νατρίου σε νερό σε μια ογκομετρική φιάλη των 100mL. Αραιώνουμε με νερό και αποθηκεύουμε στους 4°C.

#### Διαλύματα αλβουμίνης γνωστών συγκεντρώσεων 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0 g/dL

Φτιάχνονται με κατάλληλες αραιώσεις από το stock διάλυμα αλβουμίνης. Αποθηκεύουμε στους 4°C.

### Πειραματική διαδικασία

Πέντε  $\mu\text{L}$  από ομογενοποιημένο ιστό προστίθενται σε  $995\mu\text{L}$  χρωστικής. Το διάλυμα ανακινείται έντονα σε vortex και αφήνεται για 10 λεπτά στους  $25^{\circ}\text{C}$ . Η απορρόφηση μετράται στα  $628\text{nm}$  αφού μηδενίσουμε αρχικά το φωτόμετρο με το τυφλό.

Προσθέτουμε τα ακόλουθα σε σωληνάκια erpendorf

|                        | Τυφλό             | Δείγμα           |
|------------------------|-------------------|------------------|
| Χρωστική               | $1000\mu\text{L}$ | $995\mu\text{L}$ |
| Ομογενοποιημένος ιστός | -                 | $5\mu\text{L}$   |

### Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση της αλβουμίνης υπολογίζεται με βάση την καμπύλη των γνωστών συγκεντρώσεων αλβουμίνης.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

Aguilo A, Tauler P, Fuentespina E (2005). Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav* 84(1): 1-7.

Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993; 25 (2): 218-24.

Ames BN (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res* 206: 3-32.

Ashton T, Rowlands CC, Jones E, et al (1998). Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol* 77(6): 498-502.

Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527-605.

Chevion S, Moran DS, Heled Y, et al (2003). Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5119-23.

Child RB, Wilkinson DM, Fallowfield JL et al (1998). Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc* 30(11):1603-7.

Di Meo S, Venditti P. (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 10: 125-40.

Das KC, Lewis-Molock Y, White CW. (1997). Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 713-26.

Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA et al (1982). Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 1198-205.

Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr* 2000; 72 (S): 647-52.

Fasano M., Curry S., Terreno E., et al. (2005). The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. Department of Structural and Functional Biology, University of Insubria, Italy: 788.

Finaud J, Lac G, Filaire E.(2006). Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med.* 36(4):327-58.

Funchs J, Weber S, Podda M, et al. (2003). HPLC analysis of vitamin E isoforms in human epidermis: correlation with minimal erythema dose and free radical scavenging activity. *Free Radic Biol Med* 34 (3): 330-6.

Goldwasser P, Feldman J. (1997). Association of serum albumin and mortality risk. *J Clin Epidemiol.* Jun; 50(6):693-703.

Gomez-Cabrera MC, Pallardo FV, Sastre J, Vina J, Garcia-del-Moral L. (2003). Allopurinol and markers of muscle damage among participants in the Tour de France. *JAMA* 289:2503-2504.

Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Ji LL, Vina J. (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 567:113-120.

Gomez-Cabrera MC, Martinez A, Santangelo G, Pallardo FV, Sastre J Vina J. (2006). Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr* 96 Suppl 1:S31-33.

Green HJ, Fraser IG. (1988). Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc* 20(2): 55-9.



Halliwell B and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.

Halliwell B, Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. May; 142(2):231-55.

Hellsten Y, Sjodin B, Richter EA, et al.(1998). Urate uptake and lowered ATP levels in human muscle after high-intensityintermittent exercise. *Am J Physiol* 274: E600-6.

Hoey BM, Butler J, Halliwell B. (1988). 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*. 4(4):259-63.

Inal M, Akyuz F, Turgut A, et al. (2001). Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc* 33(4):564-7.

Jenkins RR. (1988). Free radical chemistry: relationship to exercise. *Sports Med* 5: 156 70.

Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 28: 625-635.

Koren HS (1995). Association between criteria air pollutants and asthma. *Environ Health Perspect* 103: 235-242.

Koyama K, Kaya M, Ishigaki T, Tsujita J, Hori S, Seino T, Kasugai A (1999). Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 80:28-33.

Kragh-Hansen U, Pedersen AO, Galliano M, Minchiotti L, Brennan SO, Tarnoky AL et al. (1996). High-affinity binding of laurate to naturally occurring mutants of human serum albumin and proalbumin. *Biochem J.* 320:911–916.

Lamprecht M, Greilberger JF, Schwabberger G, Hofmann P, Oettl K. (2008). Single bouts of exercise affect albumin redox state and carbonyl groups on plasma protein of trained men in a workload-dependent manner. *J Appl Physiol* 104: 1611–1617.

Lamprecht M, Oettl K, Schwabberger G, Hofmann P, Greilberger JF. (2009). Protein modification responds to exercise intensity and antioxidant supplementation. *Med Sci Sports Exerc.* Jan; 41(1):155-63.

Lee DK, Wang DP. (1999). Formulation development of allopurinol suppositories and injectables. *Drug Dev Ind Pharm.* 25: 1205-1208.

Levine RL. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 32 (9): 790-6.

Liu ML, Bergholm R, Makimattila S, et al (1999). A marathon run increases the susceptibility of LDL to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *Am J Physiol* 276 (6): E1083-91.

Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, and Belcastro AN. (1987). Are indices of free radical damage related to exercise intensity? *Eur. J. Appl. Physiol. Occup.Physiol.* 1987; 56(3):313-6.

Malm C. (2001). Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. *Acta Physiol Scand* 171: 233-9.

Mastaloudis A, Leonard SW, Traber MG (2001). Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* 31(7): 911-22.

May JM, Qu Z, Whitesell RR, et al. (1996). Ascorbate recycling in human erythrocytes: role of GSH in reducing dehydroascorbate. *Free Radic Biol Med* 20 (4): 543-51.

McCord, JM, and Fridovich I. (1968). The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* 243: 5753-5760.

Michailidis Y, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Fatouros IG, Koutedakis Y, Papassotiriou I, Kouretas D. (2007). Sampling time is crucial for measurement of aerobic exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 39:1107-1113.

Moorhouse, PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, and Gutteridge JM. (1987). Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett.* 213: 23-28.

Mylonas C, Kouretas D (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13: 295-309.

Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Kostaropoulos IA, Kladi-Skandali A, Balamitsi V, Koutedakis Y, and Kouretas D. (2006). Exercise-induced oxidative stress in G6PD-deficient individuals. *Med Sci Sports Exerc.* 38: 1443-1450.

Nikolaidis MG, Jamurtas AZ, Paschalis V, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D. (2008). The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations. *Sports Med.* 38(7):579-606.

Palazzetti S, Richard MJ, Favir A (2003). Overload training increase exercise-induced oxidative stress and damage. *Can J Appl Physiol* 28(4):588-604.

Palmer FM, Nieman DC, Henson DA, et al. (2003). Influence of vitamin C supplementation on oxidative and salivary IgA changes following an ultramarathon. *Eur J Appl Physiol.* 89: 100-7.

Powers SK, Lennon SL. (2000). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58: 1025-33.

Radak Z, Kaneko T, Tahara S, et al. (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 27 (1-2): 69-74.

Rav RS, Mehrotra S, Shanker U, Babu GS, Joshi PC, Hanss RK (2001). Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug Chem Toxicol* 24: 191-200.

Reid MB. (2001). 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* 90: 724-31.

Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett.* Jun 11;582(13):1783-7.

Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 368-70.

Sen CK, Packer L. (2000). Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr* 72: 653S-69S.

Serbinova E, Reznick SKAZ, Packer L. (1992). Thiocetic acid protects against ischemia reperfusion injury in the isolated langendorffheart. *Free Radic Res Commun* 17: 49-58.

Sies, H. (1991). Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *New York: Academic Press.*

Szapacs ME, Riggins JN, Zimmerman LJ, Liebler DC. (2006). Covalent adduction of human serum albumin by 4-hydroxy-2-nonenal: kinetic analysis of competing alkylation reactions. *Biochemistry* Sep 5; 45(35):10521-8.

Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, et al (1997). Effects of acute prolonged exercise on serum and LDL oxidation and antioxidants defences. *Free Radic Biol Med* 22(3): 509-13.

Veskoukis AS, Kyparos A, Stagos D, Kouretas D (2010). Differential effects of xanthine oxidase inhibition and exercise on albumin concentration in rat tissues. *Appl Physiol Nutr Metab*, under review.

Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, Kouretas D (2010). Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* Dec;33(6):1140-54.

Wagatsuma A, Yamada S. (2000 Aug;). Specific protein alteration in the soleus following immobilization-atrophy. *Scand J Med Sci Sports* 10(4):205-10.

Wagatsuma A, Yamazaki Y, Mizuno K, Yamada S. (2001 Jun). Molecular properties and gene expression of albumin in the skeletal muscle following hindlimb immobilization in a shortened position. *Acta Neuropathol* 101(6):540-6.

Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. (1987). The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 924(3):408-19.

Willcox JK, Catignani GL, Roberts LJ. (2002). Dietary flavonoids fail to suppress F2 isoprostane formation in-vivo. *Free Radic Biol Med* 34 (7): 795-9.

Young IS, McEneaney J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 29 (2): 358-62.