

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας»**

**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

ΛΙΑΚΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

**«Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΛΗΨΗΣ Ν-
ΑΚΕΤΥΛΚΥΣΤΕΪΝΗΣ (ΝΑC) ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΟΝΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ
ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΕΛΛΕΙΨΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ G6PD»**

ΙΟΥΝΙΟΣ 2011

«Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΛΗΨΗΣ N-ΑΚΕΤΥΛΚΥΣΤΕΪΝΗΣ (NAC) ΣΤΗΝ ΟΞΕΙΔΟΝΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΕΛΛΕΙΨΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ G6PD»

Συμβουλευτική επιτροπή :

- 1) Τζιαμούρτας Αθανάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής**
- 2) Κουρέτας Δημήτρης, Καθηγητής**
- 3) Στάγκος Δημήτρης, Λέκτορας**

Περίληψη

Λιάκος Ιωάννης: Η επίδραση της συμπληρωματικής λήψης N-ακετυλκυστεΐνης (NAC) στην οξειδοναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD (Υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Τζιαμούρτα Αθανασίου)

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εξετάσει αν η χορήγηση N-ακετυλκυστεΐνης (NAC) μεταβάλλει την οξειδοναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη ενζύμου της αφυδρογονάσης της 6 φωσφορικής γλυκόζης (G6PD). Στην έρευνα συμμετείχαν 10 άτομα με έλλειψη δραστηριότητας του ενζύμου G6PD και 10 άτομα με κανονικά επίπεδα δραστηριότητας του ενζύμου. Σε όλους τους συμμετέχοντες έγινε χορήγηση υδατοδιαλυτού σκευάσματος NAC (600mg/ημέρα) για διάρκεια 14 ημερών. Πριν αλλά και με το πέρας της χορήγησης NAC πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες σε όλα τα άτομα. Ορός και αιμόλυμα χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση της ανηγμένης (GSH) και οξειδωμένης (GSSG) γλουταθειόνης, για την μέτρηση των επιπέδων των ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), της χολερυθρίνης και ουρικού οξέος. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως η δραστηριότητα του ενζύμου G6PD στα φυσιολογικά άτομα ήταν 150 φορές μεγαλύτερη ($p < 0.000$) σε σχέση με τα άτομα με έλλειψη του ενζύμου ($N = 9.27 \pm 1.9$ vs. $D = 0.62 \pm 0.55$ U/g Hb). Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης παρουσίασε σημαντικές διαφορές τόσο για την ομάδα ($F_{1,9} = 6.25$, $p < 0.05$) όσο και για το χρόνο ($F_{1,9} = 11.73$, $p < 0.005$). Η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων είχε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές ανηγμένης γλουταθειόνης σε σχέση με την ομάδα έλλειψης ενζύμου G6PD τόσο πριν ($N = 3.36 \pm 0.86$ $\mu\text{mol/g Hb}$ vs. $D = 2.75 \pm 0.55$ $\mu\text{mol/g Hb}$) όσο και μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος ($N = 3.80 \pm 0.90$ $\mu\text{mol/g Hb}$ vs. $D = 2.98 \pm 0.50$ $\mu\text{mol/g Hb}$). Δεν παρουσιάστηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδας και χρόνου ($F_{1,9} = 0.366$, $p = 0.56$). Η συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές τόσο για την ομάδα ($F_{1,9} = 2.22$, $p = 0.17$) όσο και για το χρόνο ($F_{1,9} = 0.009$, $p = 0.93$). Ο λόγος ανηγμένη/οξειδωμένη γλουταθειόνη δεν

έδειξε σημαντικές διαφορές για την ομάδα ($F_{1,9} = 0.19$, $p=0.67$) αλλά προσέγγισε τη σημαντικότητα για το χρόνο ($F_{1,9} = 4.205$, $p=0.07$). Η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων δεν είχε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές λόγου ανηγμένης / οξειδωμένη γλουταθειόνη σε σχέση με την ομάδα έλλειψης ενζύμου G6PD τόσο πριν ($N = 9.61 \pm 2.18$ vs. $D = 9.85 \pm 2.57$) όσο και μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος ($N = 11.70 \pm 4.51$ vs. $D = 10.40 \pm 2.95$). Η συγκέντρωση του ουρικού οξέος, και των TBARS δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές τόσο για την ομάδα όσο και για το χρόνο. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας υποδεικνύουν πως η βραχύχρονη συμπληρωματική χορήγηση NAC μπορεί να μεταβάλλει τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης τόσο στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD όσο και στα φυσιολογικά άτομα, χωρίς ωστόσο να επηρεάζονται δείκτες που σχετίζονται με τη λιπιδική υπεροξείδωση ή το αντιοξειδωτικό σύστημα. Επιπρόσθετες έρευνες χρειάζονται για να εξεταστεί η μακρόχρονη επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης NAC καθώς επίσης και η απόκριση του οργανισμού μετά από υποβολή κάποιου στρεσογόνου παράγοντα, όπως για παράδειγμα η άσκηση.

Λέξεις κλειδιά: Οξειδωτικό στρες, ελεύθερες ρίζες, θειόλες, συμπλήρωμα

Abstract

Liakos Ioannis: The effects of NAC supplementation on redox status in people with G6PD deficiency (Under the supervision of Associate Professor Athanasios Jamurtas)

The purpose of this study was to examine the effects of N-acetylcysteine (NAC) supplementation on redox status in people with glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD). Ten young people (8 males and 2 females) with G6PD deficiency (D) and 10 matched controls with normal levels of the enzyme (N) participated in the study. All subjects received NAC (600 mg per day) for 14 days. Before and after supplementation blood was collected from all participants. Serum and whole blood lysate was used to measure reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), thiobarbituric reactive substances (TBARS), bilirubin and uric acid. Results showed that G6PD levels were 150 times higher in N compared to D ($N = 9.27 \pm 1.9$ U/g Hb vs. $D = 0.62 \pm 0.55$ U/g Hb). Furthermore, there were differences in GSH for group ($F_{1,9} = 6.25$, $p < 0.05$) and time ($F_{1,9} = 11.73$, $p < 0.005$). GSH levels in N were significantly higher before ($N = 3.36 \pm 0.86$ $\mu\text{mol/g Hb}$ vs. $D = 2.75 \pm 0.55$ $\mu\text{mol/g Hb}$) and after ($N = 3.80 \pm 0.90$ $\mu\text{mol/g Hb}$ vs. $D = 2.98 \pm 0.50$ $\mu\text{mol/g Hb}$) supplementation compared to D. No group X time interaction was found for GSH. No significance for group ($F_{1,9} = 2.22$, $p = 0.17$), time ($F_{1,9} = 0.009$, $p = 0.93$) or group x time was observed for GSSG levels. GSH/GSSG ratio was not significant for group ($F_{1,9} = 0.19$, $p = 0.67$) but approached significance for time ($F_{1,9} = 4.205$, $p = 0.07$). No differences between the two groups were observed before ($N = 9.61 \pm 2.18$ vs. $D = 9.85 \pm 2.57$) or after ($N = 11.70 \pm 4.51$ vs. $D = 10.40 \pm 2.95$) supplementation for GSH/GSSG ratio. No significance for group, time or group x time was observed for TBARS, bilirubin or uric acid levels. The results from this study indicate that short term supplementation with NAC can alter GSH levels in G6PD deficient individuals with no changes in lipid peroxidation or antioxidant indices. Further research is needed in order to examine the effects of long term with NAC supplementation on redox status and the response of these individuals following a stressful condition such as exercise.

Key words: Oxidative stress, free radicals, thiols, supplement

Περιεχόμενα	Σελίδα
1. Περίληψη	3
2. Εισαγωγή	9
<i>Σημασία της έρευνας</i>	12
<i>Ερευνητικές υποθέσεις</i>	13
<i>Στατιστικές υποθέσεις</i>	13
<i>Περιορισμοί της εργασίας</i>	14
3. Ανασκόπηση βιβλιογραφίας	15
4. Μεθοδολογία	23
<i>Συμμετέχοντες</i>	23
<i>Ανθρωπομετρικές μετρήσεις</i>	23
<i>Συλλογή και χειρισμός αίματος</i>	24
<i>Δείκτες οξειδωτικού στρες</i>	24
<i>Προσδιορισμός ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)</i>	24
<i>Προσδιορισμός οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG)</i>	25
<i>Προσδιορισμός θειβαρβιτουρικού οξέος (TBARS)</i>	27
<i>Προσδιορισμός χολερυθρίνης (BILLIRUBIN)</i>	27
<i>Προσδιορισμός ουρικού οξέος (URIC ACID)</i>	27
<i>Διαιτητική ανάλυση</i>	28
<i>Στατιστική ανάλυση</i>	28
5. Αποτελέσματα	29
<i>Δραστικότητα G6PD</i>	29
<i>Δείκτες οξειδωτικού στρες</i>	30
6. Συζήτηση	36

7. Συμπεράσματα – Προτάσεις για μελλοντική έρευνα	39
8. Βιβλιογραφία	40
9. Παραρτήματα	42

Εισαγωγή

Έλλειψη της Αφυδρογονάσης της 6 Φωσφορικής Γλυκόζης

Η έλλειψη της αφυδρογονάσης της 6 φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) θεωρείται μια από τις πιο ευρέως διαδεδομένες ενζυμοπάθειες, επηρεάζοντας περισσότερα από 400 εκατομμύρια άτομα σ' όλο τον κόσμο (Mehta, Mason, & Vulliamy, 2000). Στην Ελλάδα περίπου το 3.2% του πληθυσμού πάσχει από έλλειψη του ένζυμου G6PD ενώ στην περιοχή της Θεσσαλίας υπολογίζεται ότι το ποσοστό αγγίζει το 10% πράγμα που το καθιστά το υψηλότερο στην Ελλάδα (Missiou-Tsagaraki, 1991). Αποτέλεσμα αυτής της γενετικής ανωμαλίας είναι τα ερυθροκύτταρα των ατόμων αυτών να παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες το οποίο προκαλεί την καταστροφή τους (Mehta et al., 2000).

Η πρώτη επιστημονική προσέγγιση έλλειψης του ενζύμου G6PD έγινε πριν από περίπου 50 χρόνια όταν ερευνητές προσπάθησαν να δικαιολογήσουν τον λόγο που ορισμένα άτομα παρουσίαζαν αιμόλυση ερυθροκυττάρων μετά από χορήγηση φαρμάκων κατά της μαλάριας, όπως η πριμακίνη (Alving, Carson, Flanagan, & Ickes, 1956). Ως συνέχεια αυτής της προσέγγισης αποτέλεσε η σύνδεση της αιμολυτικής παρενέργειας που εμφανίσανε τα άτομα αυτά με τα χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης που παρουσιάζουν τα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD (Alving et al., 1956). Αν και η έλλειψη ενζύμου G6PD θεωρείται ασυμπτωματική απεναντίας έχει παρατηρηθεί τα άτομα αυτά να εμφανίζουν νεογνικό ίκτερο, αιμολυτική αναιμία μετά την χορήγηση συγκεκριμένων φαρμάκων καθώς και μετά από την κατανάλωση κουκιών (Mehta et al., 2000). Πρόσθετες μελέτες συνέδεσαν την έλλειψη του ενζύμου G6PD με άμυνα του οργανισμού ενάντια στο πλασμώδιο της ελονοσίας που εμφανίστηκε σε τροπικές και υποτροπικές χώρες (*Plasmodium falciparum*).

Η G6PD καταλύει την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει την μετατροπή της γλυκόζης σε πεντόζες (σάκχαρα με πέντε άτομα άνθρακα). Επιπρόσθετα, το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών παρέχει αναγωγική ισχύ με τη μορφή του αδενοσινικού νικοτιναμίδιου (NADPH) (Mehta et al., 2000) που αποτελεί δότη ηλεκτρονίων για τη βιοσύνθεση

διάφορων μορίων αλλά και για την αναγέννηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) από την οξειδωμένη της μορφή (GSSG),.

Ένα ποσοστό 9% της γλυκόζης στο ερυθροκύτταρο, αντί να ακολουθήσει το εργογόνο μεταβολικό μονοπάτι της μετατροπής της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ για την παραγωγή ενέργειας για τις λειτουργίες του ερυθροκυττάρου, μετατρέπεται σε μια πεντόζη (Ronquist & Theodorsson, 2007). Στο πρώτο στάδιο αυτής της μετατροπής, η G6PD χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα την 6-φωσφορική γλυκόζη και την μετατρέπει σε 6-φωσφογλυκονολακτόνη, η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε 5-φωσφορική ριβόζη μέσω του 6-φωσφογλυκονικού οξέος και της 5-φωσφορικής ριβουλόζης (Mehta et al., 2000). Τα ριβοζικά σάκχαρα χρησιμοποιούνται ως πρόδρομοι στη βιοσύνθεση πολλών σημαντικών μορίων όπως του ATP, του συνενζύμου A, του NAD, του FAD, του RNA και του DNA (Mehta et al., 2000).

Το NADPH που παράγεται στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών από τη δράση της G6PD και της αφυδρογονάσης του 6-φωσφογλυκονικού χρησιμεύει ως δότης ηλεκτρονίων στη βιοσύνθεση κυρίως της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων, καθώς και στην σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου (νιτρικού οξέος). Πέραν από το μονοπάτι αυτό, το NADPH μπορεί να παραχθεί μόνο από το μηλικό ένζυμο στα μιτοχόνδρια. Με δεδομένο ότι τα ερυθροκύτταρα στερούνται μιτοχονδρίων, το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών αποτελεί τη μοναδική τους πηγή παραγωγής NADPH. Επομένως η παραγωγή NADPH είναι καίριας σημασίας για την προστασία των ερυθροκυττάρων από το οξειδωτικό στρες (Mehta et al., 2000).

Η μειωμένη ικανότητα των ερυθροκυττάρων με έλλειψη του G6PD να ανάγουν το NADP^+ σε NADPH σε φυσιολογικό ρυθμό λόγω αυξημένης ευαισθησίας στο οξειδωτικό στρες, αποτελεί την αιτία για την αιμόλυση τους. Κύριος ρόλος των παραγομένων NADPH είναι να διατηρούν την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSH) σε ένα λόγο μεγαλύτερο του 500:1 έναντι της οξειδωμένης μορφής (GSSG). Η ανηγμένη γλουταθειόνη κατέχει σημαντικό ρόλο στην αναγωγή οξειδωμένων μορίων, αντιδρώντας με το υπεροξείδιο του υδρογόνου και οργανικές υπεροξειδάσες. Τα υπεροξείδια του υδρογόνου μπορούν επίσης να αναχθούν από την καταλάση, η οποία, όπως και στο μονοπάτι της γλουταθειόνης, εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του NADPH. Με την παρουσία οξειδωτικών παραγόντων, το

μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών ενός φυσιολογικού κυττάρου επιταχύνεται έντονα, με αποτέλεσμα τα επίπεδα των NADPH και της ανηγμένης γλουταθειόνης να παραμένουν αμετάβλητα. Η επιτάχυνση του μονοπατιού προκαλείται κυρίως μέσω αύξησης της έκφρασης του G6PD. Σε ένα ερυθροκύτταρο, όμως, με έλλειψη του ενζύμου G6PD, η ροή της γλυκόζης μέσω του μονοπατιού δεν μπορεί να αυξηθεί, και ως αποτέλεσμα τα επίπεδα του NADPH και της ανηγμένης γλουταθειόνης μειώνονται. Ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου τα μειωμένα επίπεδα αναγωγικών μέσων κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες οδηγούν σε αιμόλυση δεν έχει ξεκαθαριστεί. Συμπερασματικά, τα ερυθροκύτταρα των ατόμων με έλλειψη G6PD θεωρητικά, έχουν θεωρητικά μειωμένη ικανότητα αντίστασης στο οξειδωτικό στρες (Mehta et al., 2000).

Οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν μια κατηγορία ατόμων ή μορίων που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα, και παράγονται σε όλα τα κύτταρα. Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες προέρχονται από τα δραστικά είδη οξυγόνου ή τα δραστικά είδη αζώτου. Τα δραστικά είδη οξυγόνου περιλαμβάνουν τα μόρια που περιέχουν οξυγόνο, όπως το υπεροξείδιο ($O_2^{\bullet-}$) και τη ρίζα υδροξυλίου ($OH^{\bullet}$), αλλά και μερικά προϊόντα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωρικό οξύ ($HOCl$). Τα δραστικά στοιχεία μπορούν να οξειδώσουν διάφορα βιομόρια λόγω της έντονης χημικής δραστηρότητάς τους (Kohen & Nyska, 2002).

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού. Έχει οριστεί ως μια διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων (Halliwell & Whiteman, 2004). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και οξείδωση μορίων όπως λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και DNA (Halliwell & Whiteman, 2004). Η αποφυγή της δημιουργίας ελευθέρων ριζών από τον ανθρώπινο οργανισμό είναι αδύνατη. Συνεπώς, ένα εύρος αντιοξειδωτικής άμυνας έχει αναπτυχθεί στους οργανισμούς. Υπάρχουν τόσο ενζυμικές όσο και μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες.

Αναφορές στη βιβλιογραφία αναφέρουν ότι άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD παρουσιάζουν αυξημένο οξειδωτικό στρες. Στην περίπτωση που η δραστηριότητα του ενζύμου G6PD είναι πολύ χαμηλή και το οξειδωτικό στρες αυξημένο τότε μπορεί να προκληθεί αυξημένη καταστροφή ερυθρών αιμοσφαιρίων και κατά συνέπεια να εμφανιστεί αιμολυτική αναιμία (Cooper, Vollaard, Choueiri, & Wilson, 2002). Συμπτώματα της αιμόλυσης που δημιουργείται είναι η εμφάνιση κίτρινης απόχρωσης στο δέρμα και στα μάτια (ικτερική), γρήγορες αναπνοές, γρήγοροι σφυγμοί, αδυναμία και αίσθηση λιποθυμίας καθώς και τα ούρα γίνονται πολύ κίτρινα ή σκούρα πορτοκαλί. Επίσης παρουσιάζεται γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει καταρράκτη στα άτομα αυτά. Θεωρητικά λοιπόν τα άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD βρίσκονται σε μειονεκτικότερη θέση επειδή τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης είναι χαμηλότερα και επομένως υπολείπονται σε ένα από τους κύριους μηχανισμούς από τον οργανισμό αντιμετώπισης του οξειδωτικού στρες.

Η Ν-ακετυλκυστεΐνη που συνήθως αναφέρεται ως NAC, είναι η πιο βιοδιαθέσιμη πρόδρομος ουσία της γλουταθειόνης. Καμία μελέτη στη βιβλιογραφία ή σχετική έρευνα δεν υπάρχει που να έχει μελετήσει την ανταπόκριση του οργανισμού των ατόμων με έλλειψη ενζύμου G6PD έπειτα από χορήγηση Ν-ακετυλκυστεΐνης (NAC).

Σημασία της έρευνας

Η Ελλάδα είναι μία από τις χώρες με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της έλλειψης του G6PD (περίπου 3,2 % του πληθυσμού εμφανίζει έλλειψη G6PD) (Missiou-Tsagaraki, 1991). Είναι χαρακτηριστικό, ότι η Θεσσαλία (έδρα του πανεπιστημίου όπου πραγματοποιήθηκε η έρευνα) παρουσιάζει την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης της έλλειψης του G6PD (περίπου 10 %) από όλα τα γεωγραφικά διαμερίσματα της χώρας (Missiou-Tsagaraki, 1991). Το γεγονός αυτό προσδίδει μεγάλη πρακτική σημασία στα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, τόσο στην τοπική κοινωνία, όσο και γενικότερα στην Ελλάδα.

Η συγκεκριμένη εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια χαρακτηρισμού της ανταπόκρισης σε χορήγηση NAC σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD.

Ερευνητικές υποθέσεις

- i. Η χορήγηση NAC θα οδηγήσει σε άνοδο των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD.
- ii. Η χορήγηση NAC θα οδηγήσει σε μείωση του οξειδωτικού στρες στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD εξαιτίας της αύξησης των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης.

Στατιστικές υποθέσεις

Μηδενικές υποθέσεις

- i) Μηδενική υπόθεση ($\mu_1 = \mu_2$): Δεν θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μετρήσεων (πριν και μετά την χορήγηση NAC), στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης στην ομάδα ατόμων με έλλειψη του G6PD.
- iii. Μηδενική υπόθεση ($\mu_1 = \mu_2$): Δεν θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD παρά τις μεταβολές των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης.

Εναλλακτικές υποθέσεις

- i) Εναλλακτική υπόθεση ($\mu_1 \neq \mu_2$): Θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μετρήσεων (πριν και μετά την χορήγηση NAC), στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης στην ομάδα ατόμων με έλλειψη του G6PD.
- iv. Εναλλακτική υπόθεση ($\mu_1 \neq \mu_2$): Θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD παρά τις μεταβολές των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης.

Περιορισμοί της έρευνας

Οι περιορισμοί της εργασίας αφορούν το γεγονός ότι οι μετρήσεις του οξειδωτικού στρες έγιναν μόνο στο αίμα. Επίσης περιοριστικός παράγοντας είναι η ηλικία και το

βάρος των συμμετεχόντων στην εργασία όπως και η ποσότητα NAC που χορηγήθηκε (600 mg/άτομο/ημέρα) καθώς και η χρονική διάρκεια της λήψης της που ήταν δύο εβδομάδες.

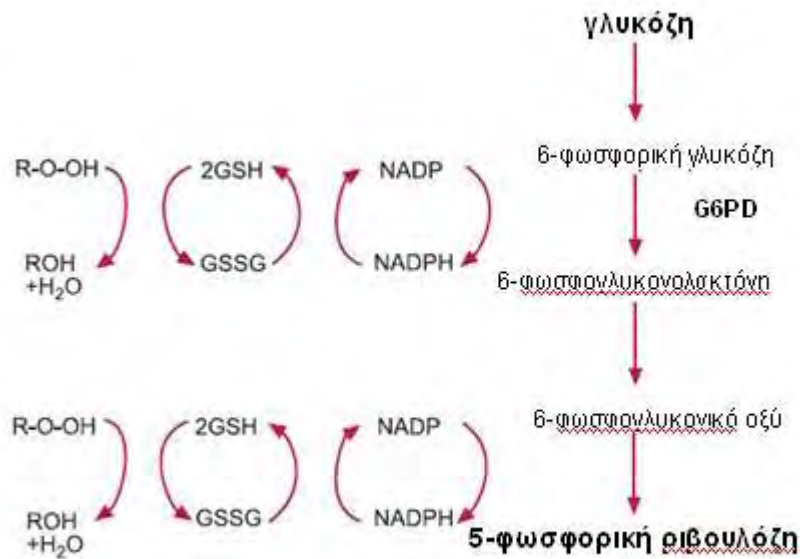
Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

Ανεπάρκεια της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης

Η έλλειψη της αφυδρογονάσης της 6 φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) αποτελεί μια από τις πιο ευρέως διαδεδομένες ενζυμοπάθειες, επηρεάζοντας περισσότερα από 400 εκατομμύρια άτομα σ'όλο τον κόσμο (Mehta et al., 2000). Διάφορες μελέτες υποδεικνύουν ότι είναι αποτέλεσμα εξελικτικού πλεονεκτήματος που προσέφερε η έλλειψη του G6PD κατά τη διάρκεια μόλυνσης από το πλασμώδιο της ελονοσίας (*Plasmodium falciparum*). Σύντομα έγινε φανερό ότι η συντριπτική πλειονότητα των πάσχοντων από έλλειψη του G6PD ήταν ασυμπτωματική, γεγονός που το καθιστούσε ιδιαίτερα επικίνδυνο. Ωστόσο, τα άτομα με έλλειψη του ενζύμου βρίσκονται σε κίνδυνο εμφάνισης νεογνικού ίκτερου και σοβαρής αιμολυτικής αναιμίας μετά από χορήγηση συγκεκριμένων φαρμάκων κατά τη διάρκεια κάποιων μολύνσεων, και κυρίως μετά την κατανάλωση κουκιών (Mehta et al., 2000).

Μεταβολικός ρόλος του G6PD

Το G6PD καταλύει την πρώτη αντίδραση του μεταβολικού μονοπατιού των φωσφορυλιωμένων πεντοζών. Το μονοπάτι αυτό περιλαμβάνει τη μετατροπή της γλυκόζης σε πεντόζες (σάκχαρα με πέντε άτομα άνθρακα), που είναι απαραίτητα για μια πληθώρα βιοσυνθετικών διαδικασιών, και παράλληλα παρέχει αναγωγική ισχύ στο ερυθροκύτταρο (σχ 1) (Mehta et al., 2000).



Σχήμα 1: Το μονοπάτι μετατροπής της γλυκόζης σε πεντόζες, του οποίου την πρώτη αντίδραση καταλύει το G6PD.

Ένας εναλλακτικός δρόμος για τη γλυκόζη, από το να ακολουθήσει τα εργογόνα μονοπάτια της γλυκόλυσης, του κύκλου του κιτρικού οξέος και της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, είναι να μετατραπεί σε μια πεντόζη. Στο πρώτο στάδιο αυτής της μετατροπής, το G6PD χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα την 6-φωσφορική γλυκόζη και την μετατρέπει σε 6-φωσφογλυκονολακτόνη, η οποία με τη σειρά της μετατρέπεται σε 5-φωσφορική ριβόζη μέσω του 6-φωσφογλυκονικού οξέος και της 5-φωσφορικής ριβουλόζης. Τα ριβοζικά σάκχαρα χρησιμοποιούνται ως πρόδρομοι στη βιοσύνθεση πολλών σημαντικών μορίων όπως του ATP, του συνενζύμου A, του NAD, του FAD, του RNA και του DNA (Mehta et al., 2000). Το NADPH που παράγεται στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών από τη δράση του G6PD και της αφυδρογονάσης του 6-φωσφογλυκονικού (το ένζυμο που καταλύει την τρίτη αντίδραση του μονοπατιού) χρησιμεύει ως δότης ηλεκτρονίων στη βιοσύνθεση κυρίως της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων καθώς και στην σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου (νιτρικού οξέος) (Tsai et al., 1998). Εκτός από το μονοπάτι αυτό, το NADPH μπορεί να παραχθεί μόνο από το μηλικό ένζυμο στα μιτοχόνδρια. Με δεδομένο ότι τα ερυθροκύτταρα στερούνται μιτοχονδρίων, το

μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών αποτελεί τη μοναδική τους πηγή NADPH. Όπως θα δούμε παρακάτω, αυτή η παραγωγή NADPH είναι αποφασιστικής σημασίας για την προστασία των ερυθροκυττάρων από το οξειδωτικό στρες (Mehta et al., 2000; Ronquist & Theodorsson, 2007).

Μηχανισμός αιμόλυσης στα άτομα με έλλειψη G6PD

Η αιμόλυση των ερυθροκυττάρων των ατόμων με έλλειψη G6PD είναι αποτέλεσμα αυξημένης ευαισθησίας στο οξειδωτικό στρες δεδομένου ότι είναι ανίκανα να ανάγουν το NADP^+ σε NADPH σε φυσιολογικό ρυθμό. Ο κύριος ρόλος αυτού του NADPH είναι να διατηρήσει την ανηγμένη μορφή της γλουταθειόνης σε ένα λόγο μεγαλύτερο του 500:1 έναντι της οξειδωμένης δισουλφιδικής μορφής. Η ανηγμένη γλουταθειόνη παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγωγή οξειδωμένων μορίων, αντιδρώντας με το υπεροξείδιο του υδρογόνου και οργανικές υπεροξειδάσες, καθώς επίσης και διατηρώντας τις κυστεΐνες της αιμοσφαιρίνης και άλλων πρωτεϊνών στην ανηγμένη μορφή. Τα υπεροξείδια του υδρογόνου μπορούν επίσης να αναχθούν από την καταλάση, η οποία, όπως και στο μονοπάτι της γλουταθειόνης, εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα του NADPH. Με την παρουσία οξειδωτικών παραγόντων, το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών ενός φυσιολογικού κυττάρου επιταχύνεται έντονα με αποτέλεσμα τα επίπεδα των NADPH και της ανηγμένης γλουταθειόνης να παραμένουν σχεδόν αμετάβλητα. Η επιτάχυνση του μονοπατιού καταδείχθηκε πρόσφατα ότι προκαλείται κυρίως μέσω αύξησης της έκφρασης του G6PD. Σε ένα ερυθροκύτταρο, όμως, με έλλειψη του ενζύμου G6PD, όπου το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών ήδη λειτουργεί σε ένα σχεδόν μέγιστο ρυθμό, η ροή της γλυκόζης μέσω του μονοπατιού δεν μπορεί να αυξηθεί, και ως αποτέλεσμα τα επίπεδα των NADPH και της ανηγμένης γλουταθειόνης μειώνονται. Ένας πιθανός μηχανισμός έχει προταθεί από τον Murray RK και απεικονίζεται στο σχήμα 2. Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου τα μειωμένα επίπεδα αναγωγικών μέσων κατά τη διάρκεια οξειδωτικού στρες οδηγούν σε αιμόλυση αναμένει να αναγνωρισθεί. Συνεπώς, τουλάχιστον θεωρητικά, τα ερυθροκύτταρα των ατόμων με έλλειψη G6PD έχουν μειωμένη ικανότητα αντίστασης στο οξειδωτικό στρες εξαιτίας των χαμηλών επιπέδων του NADPH και της ανηγμένης γλουταθειόνης (Mehta et al., 2000; Ronquist & Theodorsson, 2007).

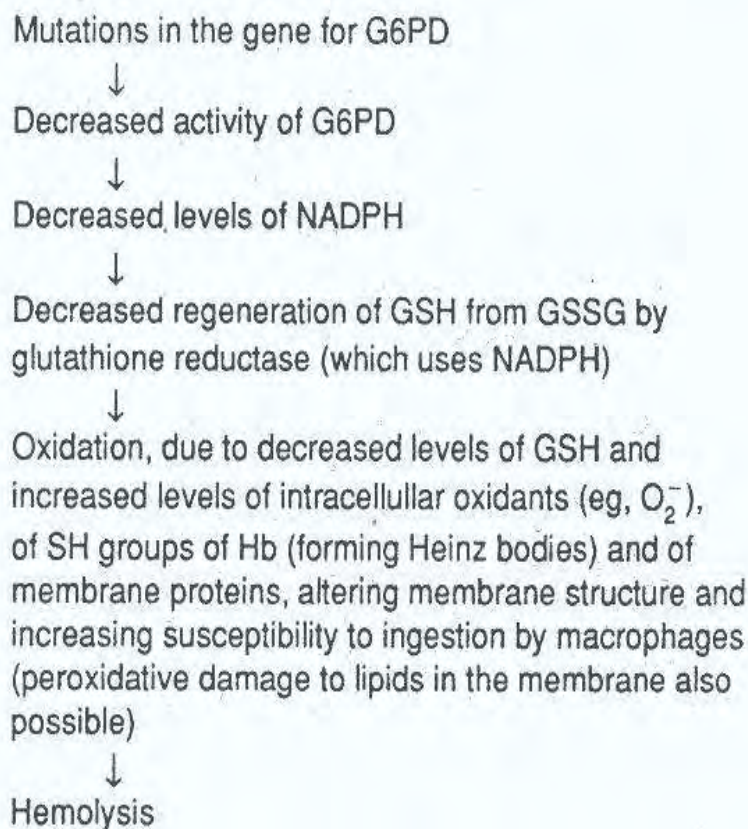


Figure 60–2. Summary of probable events causing hemolytic anemia due to deficiency of the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (GPD).

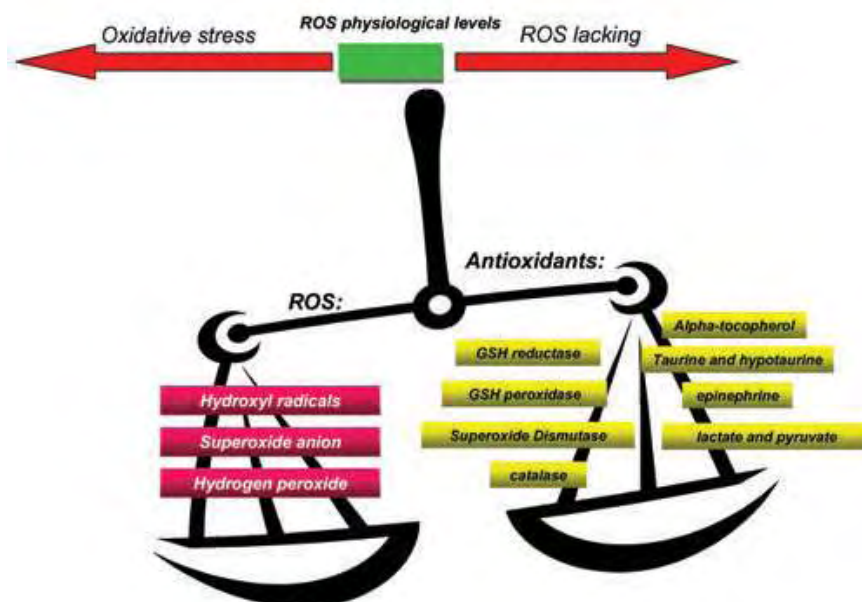
Σχήμα 2: Πιθανός μηχανισμός πρόκλησης αιμόλυσης σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD (Murray RK 1993).

Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες

Οι ελεύθερες ρίζες, μια κατηγορία ατόμων ή μορίων που περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα, παράγονται σε όλα τα κύτταρα. Οι περισσότερες ελεύθερες ρίζες που συναντώνται *in vivo* είτε είναι είτε προέρχονται από τα δραστικά στοιχεία οξυγόνου ή τα δραστικά στοιχεία αζώτου. Τα δραστικά στοιχεία οξυγόνου περιλαμβάνουν τις ελεύθερες ρίζες που έχουν ως βάση το οξυγόνο όπως το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), το υδροξύλιο ($H_2^{\cdot}$), το αλκοξύλιο ($RO^{\cdot}$), το υπεροξύλιο ($ROO^{\cdot}$), και το υδροπεροξύλιο ($ROOH^{\cdot}$). Άλλα δραστικά στοιχεία οξυγόνου (για παράδειγμα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου και τα

υπεροξειδία των λιπιδίων) μπορούν να μετατραπούν σε ελεύθερες ρίζες από μεταβατικά μέταλλα και να βρίσκονται ελεύθερα στο κύτταρο ή δεσμευμένα σε πρωτεΐνες. Τα δραστικά στοιχεία αζώτου περιλαμβάνουν τις ελεύθερες ρίζες μονοξείδιο του αζώτου (NO[•]) και διοξείδιο του αζώτου (NO₂[•]) (Cooper et al., 2002).

Ο όρος οξειδωτικό στρες αναφέρεται σε μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της παραγωγής δραστικών ειδών και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού (Σχήμα 3). Έχει οριστεί ως μια διαταραχή στην προοξειδωτική και αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή βιομορίων (Halliwell & Whiteman, 2004). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και οξείδωση μορίων του.



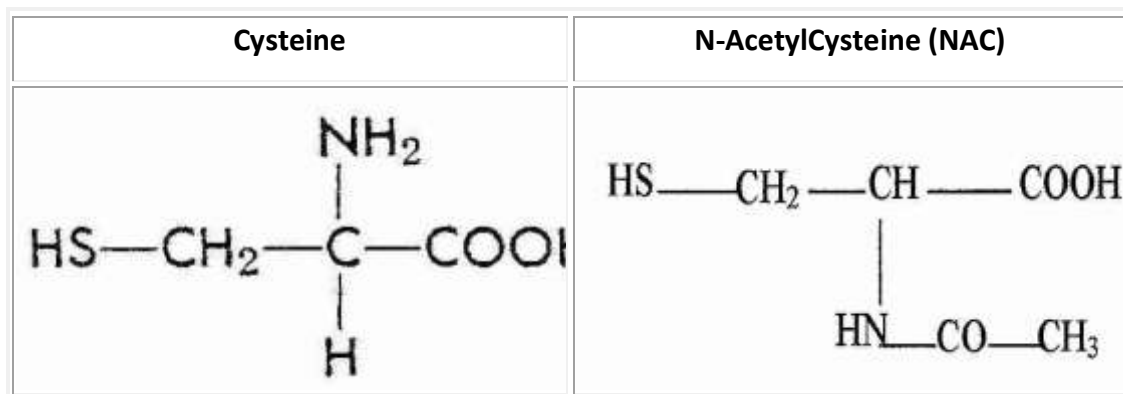
Σχήμα 3: Ανισορροπία μεταξύ των δραστικών ειδών και του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού μπορεί να προκαλέσει οξειδωτικό στρες.

Οι ελεύθερες ρίζες έχουν την ικανότητα να αντιδρούν με μια ποικιλία χημικών ουσιών, καθιστώντας τις ιδανικές για ένα μεγάλο εύρος βιολογικών λειτουργιών όπως την κυτταρική σηματοδότηση και τη ρύθμιση της δραστηριότητας πολλών ενζύμων. Η πλειονότητα των ελευθέρων ριζών που παράγονται στο ζωντανό κύτταρο είναι οξειδωτικές ουσίες, οι οποίες είναι σε θέση να οξειδώσουν διάφορα είδη βιολογικών μορίων, όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα και

νουκλεοτίδια. Δεδομένου ότι είναι αδύνατο να αποφύγουμε ολόκληρη την παραγωγή ελευθέρων ριζών, δεν αποτελεί έκπληξη ότι ένα εύρος αντιοξειδωτικής άμυνας έχει αναπτυχθεί στους οργανισμούς. Υπάρχουν τόσο ενζυμικές όσο και μη ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων το υπεροξειδίο της δισμουτάσης, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και την καταλάση. Οι κύριες μη ενζυματικές αντιοξειδωτικές ουσίες είναι η ανηγμένη γλουταθειόνη, η βιταμίνη C και η βιταμίνη E. Η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού είναι συνήθως επαρκής, για να αποτρέψει καταστροφή ιστού σε σημαντικό βαθμό. Ωστόσο, η υπερπαραγωγή ελευθέρων ριζών ή/και η μείωση του επιπέδου της αντιοξειδωτικής άμυνας μπορεί να οδηγήσει σε μια ανισορροπία και να προκαλέσει βλαβερές συνέπειες, μια κατάσταση που είναι γνωστή ως οξειδωτικό στρες.

N-ακετυλκυστεΐνη

Η χημική ουσία *N*-ακετυλκυστεΐνη (NAC) είναι το αμινοξύ L-κυστεΐνη συν μια ακετυλο ομάδα ($-\text{CO}-\text{CH}_3$) που συνδέονται με μια αμινομάδα (NH_2).



Σχήμα 4: Συντακτικός τύπος κυστεΐνης και NAC.

Η ακετυλο μορφή βοηθά στο να επιταχύνεται η απορρόφηση της καθώς και η διανομή της μέσω κατάποσης της από το στόμα. Το άτομο υδρογόνου της σουλφιδικής ομάδας της NAC μπορεί να λειτουργήσει ως δότης ενός ηλεκτρονίου για την εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών στον οργανισμό. Η γλουταθειόνη συντίθεται από τρία αμινοξέα μέσω μιας διαδικασίας που περιλαμβάνει δύο στάδια, αρχίζοντας με τον συνδυασμό γλουταμινικού οξέος και κυστεΐνης και τελειώνοντας με την προσθήκη της γλυκίνης. Το ήπαρ και οι πνεύμονες είναι τα

κύρια μέρη σύνθεσης της γλουταθειόνης. Η γλυκίνη και το γλουταμινικό οξύ βρίσκονται σε αφθονία στα κύτταρα με αποτέλεσμα η διαθεσιμότητα της κυστεΐνης του οργανισμού να είναι αυτή που ελέγχει την ταχύτητα αντίδρασης και επομένως τα επίπεδα γλουταθειόνης στον ανθρώπινο οργανισμό. Λόγω του ότι τα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα γλουταθειόνης και άρα και κυστεΐνης στον οργανισμό τους, επιδίωξη της εργασίας ήταν να πετύχει άνοδο των επιπέδων αυτών με χορήγηση κυστεΐνης. Μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές χορήγησης NAC σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD. Ωστόσο χορήγηση της NAC έχει δώσει ελπιδοφόρα αποτελέσματα ενάντια στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης του. Επίσης βοηθά το ανοσοποιητικό σύστημα δεδομένου ότι αναστέλλει ή μειώνει την καταστροφή των νεφρών και του ήπατος με την εξάλειψη των τοξινών. Υποστηρίζει ακόμη και την ορθή λειτουργία των T – κυττάρων, B – κυττάρων και των φαγοκυττάρων τα οποία είναι κρίσιμα για τον ιό HIV και την πνευμονία. Χορήγηση NAC βρέθηκε επίσης να ελαττώνει την εξέλιξη της σκλήρυνσης κατά πλάκας.

Οξειδωτικό στρες σε άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD

Τα άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD εμφανίζουν αυξημένες πιθανότητες πρόκλησης οξειδωτικού στρες. Αυτό έγκειται στο γεγονός ότι η έλλειψη του ενζύμου G6PD συνεπάγεται μειωμένη δραστηριότητα αυτού με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση των επιπέδων NADPH με συνεπακόλουθη μείωση των επιπέδων γλουταθειόνης, και το αποτέλεσμα της όλης αυτής διεργασίας είναι το γεγονός πρόκλησης οξειδωτικού στρες.

Αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές τονίζουν ότι σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD όταν η δραστηριότητά του είναι χαμηλή και τα επίπεδα οξειδωτικού στρες αυξημένα μπορεί να παρατηρηθεί αύξηση στον αριθμό καταστροφής των ερυθρών αιμοσφαιρίων με αποτέλεσμα να έχουμε εμφάνιση αιμολυτικής αναιμίας (Cooper et al., 2002).

Το ότι άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD εμφανίζουν προδιάθεση πρόκλησης οξειδωτικού στρες ενδέχεται να οφείλεται στα χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών. Βιβλιογραφικές αναφορές έχουν επισημάνει χαμηλά επίπεδα σε βιταμίνη E, βιταμίνη C, καροτενοειδή και γλουταθειόνης (Cooper et al., 2002). Γι' αυτό το

γεγονός, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η αύξηση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού με χορήγηση ανάλογης δράσης ουσίας που ευελπιστεί ότι θα προκαλέσει και αύξηση των χαμηλών επιπέδων γλουταθειόνης.

Μεθοδολογία

Συμμετέχοντες

Στην έρευνα έλαβαν μέρος δύο ομάδες των δέκα ατόμων η καθεμία. Την πρώτη ομάδα αποτελούσαν άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD (ηλικία: 25 ± 3 ετών, ύψος: 179 ± 3 εκ, σωματικό βάρος: 83 ± 4 κιλά) ενώ την δεύτερη άτομα με φυσιολογική δραστικότητα του ενζύμου (ηλικία: 23 ± 1 ετών, ύψος: 177 ± 6 εκ, σωματικό βάρος: 73 ± 2 κιλά). Η διάρκεια της χορήγησης NAC καθορίστηκε στις δεκατέσσερις μέρες με αιμοληψία πριν την έναρξη λήψης και με το πέρας αυτής. Σε όλους τους συμμετέχοντες δόθηκε έγγραφο συναίνεσης αφού πρώτα ενημερώθηκαν για τους κινδύνους, επιπτώσεις και οφέλη που ενδεχομένως να προκύψουν από την συμμετοχή τους στην έρευνα. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες έγιναν σύμφωνα με τη διακήρυξη του Ελσίνκι του 1975 και εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Παράρτημα 1).

Ανθρωπομετρικές μετρήσεις

Οι συμμετέχοντες χρειάστηκε να παρουσιαστούν στο εργαστήριο τρεις φορές. Την πρώτη φορά έγινε ενημέρωση για τη διαδικασία του πειράματος (Παράρτημα 2), υπεγράφησαν οι συναινέσεις των συμμετεχόντων (Παράρτημα 3) και δόθηκαν τα φύλλα και οι οδηγίες για τη συμπλήρωση της τριήμερης διατροφής (Παράρτημα 4). Στους συμμετέχοντες δόθηκε οδηγία επίσης να ακολουθήσουν την ίδια διατροφή πριν από τη δεύτερη αιμοληψία με αυτή που θα είχαν πριν την πρώτη αιμοληψία. Το κάθε άτομο που συμμετείχε στο πείραμα παρουσιάστηκε πρωί στο εργαστήριο και αφού προηγήθηκε ολονύκτια νηστεία και αποχή από αλκοόλ και καφεΐνη για 24 ώρες. Κατά την δεύτερη τους επίσκεψη μετρήθηκε το σωματικό τους βάρος κατά προσέγγιση 0.5 kg (Beam Balance, Seca, UK), με τους συμμετέχοντες ελαφρά ντυμένους και ξυπόλυτους, μετρήθηκε το σωματικό τους ύψος κατά προσέγγιση 0,5 cm (Stadiometer 208, Seca, UK) και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η πρώτη αιμοληψία. Τέλος, οι συμμετέχοντες έλαβαν το συμπλήρωμα της NAC (TREBON N[®], UNI-PHARMA S.A., GR). Η ποσότητα της NAC

που χορηγήθηκε στον καθένα ξεχωριστά καθορίστηκε σε 10 mg/kg σωματικού βάρους.

Συλλογή και χειρισμός του αίματος

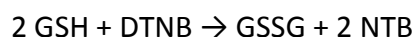
Το αίμα τοποθετήθηκε σε σωληνάρια EDTA, φυγοκεντρήθηκε αμέσως στα 1,370 g για 10 λεπτά και διαχωρίστηκε το πλάσμα από τα ερυθροκύτταρα. Στην συνέχεια έγινε αιμόλυση των ερυθροκυττάρων με 1:1 (ν/ν) αποϊοντισμένο νερό στο σωλήνα, αναδεύτηκαν σθεναρά και φυγοκεντρήθηκαν στα 4,020 g για 15 λεπτά. Στην συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -80 °C μέχρι να γίνουν οι βιοχημικές μετρήσεις.

Δείκτες οξειδωτικού στρες

Το ουρικό οξύ, η χολερυθρίνη και το θειοβαρβιτουρικό οξύ μετρήθηκαν στο πλάσμα ενώ η ανηγμένη και οξειδωμένη γλουταθειόνη σε ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.

Προσδιορισμός GSH

Η σουλφυδρυλομάδα (-SH) της GSH αντιδρά με το 5,5'-διθεοδισ(2-νιτροβενζοϊκό οξύ) (DTNB) και δίνει το έγχρωμο προϊόν 2-νιτρο-5-θειοβενζοϊκό οξύ (NTB) σύμφωνα με την αντίδραση:



Το NTB απορροφά στα 412 nm και η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της GSH.

Για την εκτέλεση του προσδιορισμού αναμίξαμε σε φιαλίδιο erpendorf 20 μL από το υπερκείμενο που είχε προκύψει από την επεξεργασία των αιμολυμάτων, με 660 μL ρυθμιστικού διαλύματος $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 67 mmol/L και pH 7,95 και με 330 μL

διαλύματος DTNB 1 mmol/L σε διάλυμα κιτρικού νατρίου 1% (w/v). Για την παρασκευή του τυφλού, αντικαταστήσαμε το υπερκείμενο με νερό. Κάθε δείγμα προσδιορίστηκε εις διπλούν. Μετά από καλή ανακίνηση και επώαση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, μετρήσαμε την απορρόφηση των μιγμάτων στα 412 nm. Για κάθε δείγμα υπολογίσαμε το μέσο όρο των δύο απορροφήσεων που βρήκαμε και στη συνέχεια υπολογίσαμε τη συγκέντρωση C της GSH σε μmol/L σύμφωνα με τον τύπο:

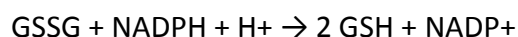
$$C = (A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}) / 13,6 \times 131,3 \times 1000$$

όπου:

- $A_{\text{δείγματος}}$ και $A_{\text{τυφλού}}$ οι απορροφήσεις του δείγματος και του τυφλού αντίστοιχα,
- 13,6 ο συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας του NTB σε L/mmol/cm,
- 131,3 ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου (1010 μL) προς τον όγκο του αιμολύματος (20 μL), από τον πολλαπλασιασμό επί 2, ώστε να ληφθεί υπόψη η αρχική αραιώση του αιμολύματος με το διάλυμα TCA, και από τον πολλαπλασιασμό επί 1,3, ώστε να ληφθεί υπόψη η δεύτερη αραιώση με το διάλυμα TCA, και
- 1000 ο συντελεστής μετατροπής των mmol/L σε μmol/L.

Προσδιορισμός GSSG

Η GSSG ανάγεται σε GSH χρησιμοποιώντας την αναγωγική ισχύ του NADPH και το ένζυμο αναγωγάση της γλουταθειόνης σύμφωνα με την αντίδραση:



Η συγκέντρωση της GSH που προκύπτει προσδιορίζεται με βάση την αρχή που περιγράφεται στην προηγούμενη ενότητα, αφού πρώτα η υπάρχουσα GSH δεσμευθεί από 2-βινυλοπυριδίνη.

Για την εκτέλεση του προσδιορισμού προσθέσαμε στο υπερκείμενο που είχε προκύψει από την επεξεργασία των αιμολυμάτων κατάλληλη ποσότητα διαλύματος NaOH 1 mmol/L, ώστε το διάλυμα που θα προέκυπτε να έχει pH 7,0-7,5. Στη συνέχεια προσθέσαμε ποσότητα 2-βινυλοπυριδίνης ίση με το 1,54% του όγκου του αιμολύματος που διαθέταμε και αφήσαμε τα δείγματα για 2 h. Στη συνέχεια αναμίξαμε: α) 600 μL ρυθμιστικού διαλύματος Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 143 mmol/L, 6,3 mmol/L EDTA, pH7,5, β) 100 μL διαλύματος NADPH 3 mmol/L, γ) 100 μL διαλύματος DTNB 10 mmol/L, δ) 194 μL αποσταγμένου νερού, και ε) 5 μL αιμολύματος. Για την παρασκευή του τυφλού αντικαταστήσαμε το αιμόλυμα με νερό. Για την παρασκευή του προτύπου αντικαταστήσαμε τα 194 μL αποσταγμένου νερού και 5 μL αιμολύματος με 124 μL αποσταγμένου νερού και 75 μL διαλύματος GSSG 10 μmol/L. Αφού αναδεύσαμε, αφήσαμε τα δείγματα για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προσθέσαμε 1 μL εναιωρήματος αναγωγάσης της γλουταθειόνης, ανακινήσαμε έντονα και μετρήσαμε την απορρόφηση στα 412 nm δύο φορές με διαφορά 1 min. Κάθε δείγμα το μετρήσαμε εις τριπλούν. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης C της GSSG σε μmol/L έγινε σύμφωνα με το τύπο:

$$C = (\Delta\text{Δειγμ} - \Delta\text{Ατυφλ}) / (\Delta\text{Απροτ} - \Delta\text{Ατυφλ}) \times 2 \times (\text{Οτελ} + \alpha + \beta) / \text{Οαρχ} \times 150$$

όπου:

- ΔΑδειγμ, ΔΑτυφλ, ΔΑπροτ, ο μέσος όρος των μεταβολών των απορροφήσεων των δειγμάτων, του τυφλού και του προτύπου αντίστοιχα σε 1 min,
- 2 ο συντελεστής της αρχικής αραίωσης των αιμολυμάτων με διάλυμα TCA,
- Οαρχ και Οτελ οι όγκοι του αιμολύματος στο φιαλίδιο πριν και μετά τη δεύτερη προσθήκη διαλύματος TCA,
- α ο όγκος του διαλύματος NaOH που είχαμε προσθέσει αρχικά,
- β ο όγκος της 2-βινυλοπυριδίνης που προσθέσαμε, και
- 150 ο συντελεστής που προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό της συγκέντρωσης του προτύπου (0,75 nmol/mL) επί το κλάσμα 1000/5 που εκφράζει την ποσότητα του συνολικού μίγματος προς αυτήν του αιμολύματος.

Προσδιορισμός TBARS

Στη μέθοδο προσδιορισμού του θειοβαρβιτουρικού οξέος τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξείδωσης αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ και δίνουν έγχρωμο προϊόν, του οποίου η απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσής τους.

Για την εκτέλεση του προσδιορισμού προσθέσαμε σε σωλήνες falcon: α) 100 μL ορού (ή αποσταγμένου νερού για το τυφλό), β) 500 μL διαλύματος TCA 35% (w/v), και γ) 500 μL διαλύματος Tris-HCl 200 mmol/L, pH 7,4. Μετά από καλή ανάδευση και παραμονή 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, προσθέσαμε 1 mL διαλύματος Na_2SO_4 2 mol/L και θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) 55 mmol/L και θερμάνσαμε τα δείγματα στους 95°C για 45 min σε υδατόλουτρο. Μετά το πέρας της επώασης, μεταφέραμε τους σωλήνες σε πάγο για 5 min, προσθέσαμε 1 mL διαλύματος TCA 70% (w/v) και αναδεύσαμε καλά. Ύστερα, μεταφέραμε 1 mL από κάθε μίγμα σε φιαλίδια erpendorf, φυγοκεντρήσαμε στα 11200 g για 3 min στους 25°C και, αφού λάβαμε το υπερκείμενο, μετρήσαμε την απορρόφησή του στα 530 nm σε πλαστικές κυψελίδες. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης C των TBARS σε $\mu\text{mol/L}$ έγινε σύμφωνα με τον τύπο:

$$C = (\text{Αδείγματος} - \text{Ατυφλού}) / 156 \times 31 \times 1000$$

όπου:

- Αδείγματος και Ατυφλού η απορρόφηση του δείγματος και του τυφλού αντίστοιχα,
- 156 ο συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας του TBA σε L/mmol/cm,
- 31 ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου του μίγματος (3100 μL) με τον όγκο του ορού (100 μL), και
- 1000 ο συντελεστής μετατροπής των mmol/L σε $\mu\text{mol/L}$.

Προσδιορισμός χολερυθρίνης και ουρικού οξέος

Η χολερυθρίνη και το ουρικό οξύ μετρήθηκαν με αντιδραστήρια της εταιρείας Ζαφειρόπουλος (Αθήνα, Ελλάδα).

Διαιτητική ανάλυση

Από τους συμμετέχοντες στην έρευνα ζητήθηκε λεπτομερής καταγραφή της διατροφής τους την προηγούμενη ημέρα της αιμοληψίας. Από τους συμμετέχοντες ζητήθηκε να επαναλάβουν την ίδια διατροφή και τις τρεις προηγούμενες ημέρες της δεύτερης αιμοληψίας. Τα διατροφικά στοιχεία που προέκυψαν αναλύθηκαν με την χρήση του διατροφικού συστήματος ανάλυσης Science Fit Diet 200A (Sciencefit, Greece).

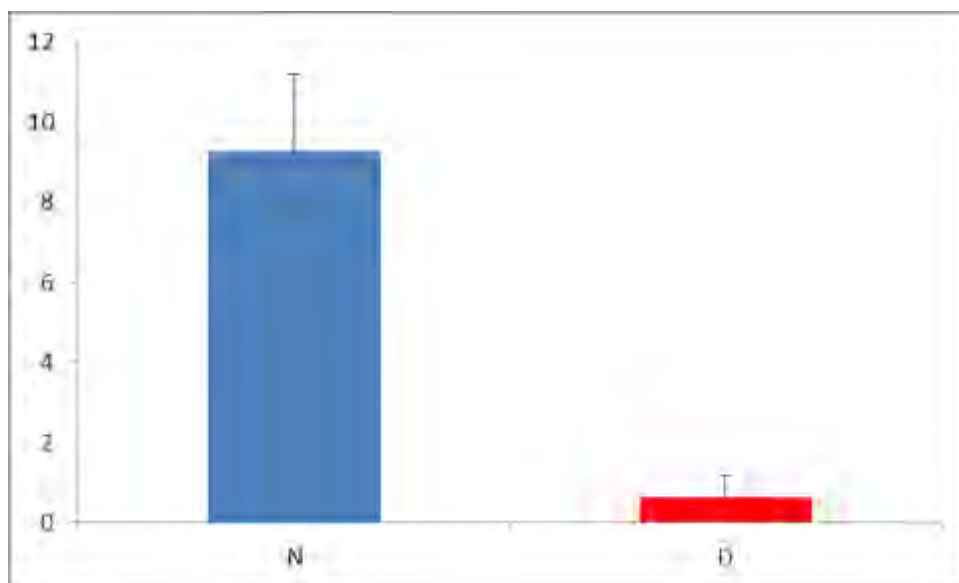
Στατιστική ανάλυση

Για την εξέταση των διαφορών στη δραστικότητα του G6PD μεταξύ των δύο ομάδων (φυσιολογικά και άτομα με έλλειψη του ενζύμου) χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση t-test για ανεξάρτητα δείγματα. Για την ανάλυση των υπόλοιπων δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης 2 παραγόντων ANOVA (ομάδα Χ χρόνος) με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στο χρόνο. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε $\alpha = 0.05$. Το στατιστικό πακέτο SPSS έκδοση 15.0 χρησιμοποιήθηκε για όλες τις αναλύσεις (SPSS Inc., USA). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση.

Αποτελέσματα

Δραστικότητα του G6PD

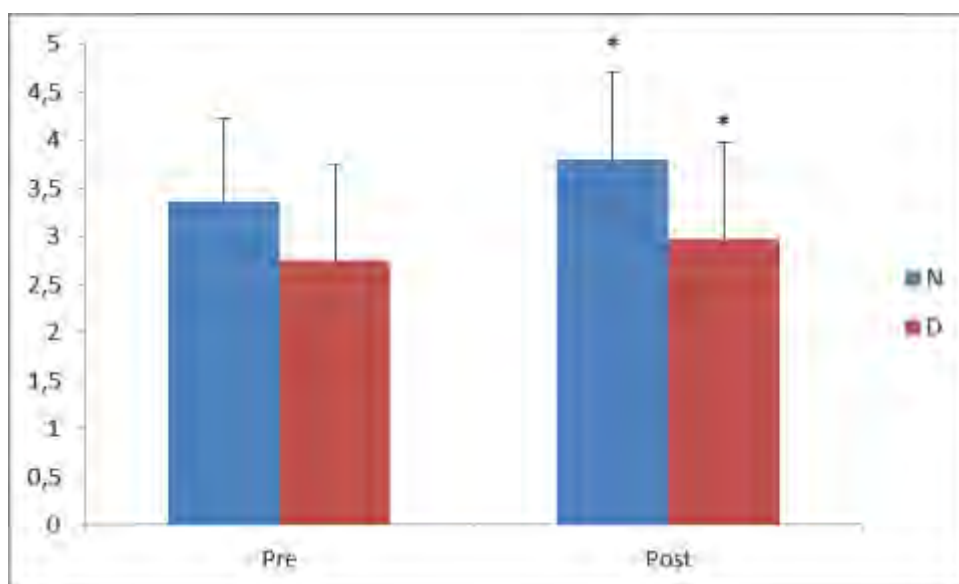
Η ανάλυση της δραστικότητας του ενζύμου G6PD έδειξε ότι τα φυσιολογικά άτομα παρουσίασαν 150 φορές μεγαλύτερη δραστικότητα ($p < 0.001$) σε σχέση με τα άτομα με έλλειψη του ενζύμου ($N = 9.27 \pm 1.9$ vs. $D = 0.62 \pm 0.55$ U/g Hb).



Σχήμα 5: Δραστικότητα της G6PD στην ομάδα φυσιολογικών ατόμων (N) και ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D)

Συγκέντρωση ανηγμένης γλουταθειόνης

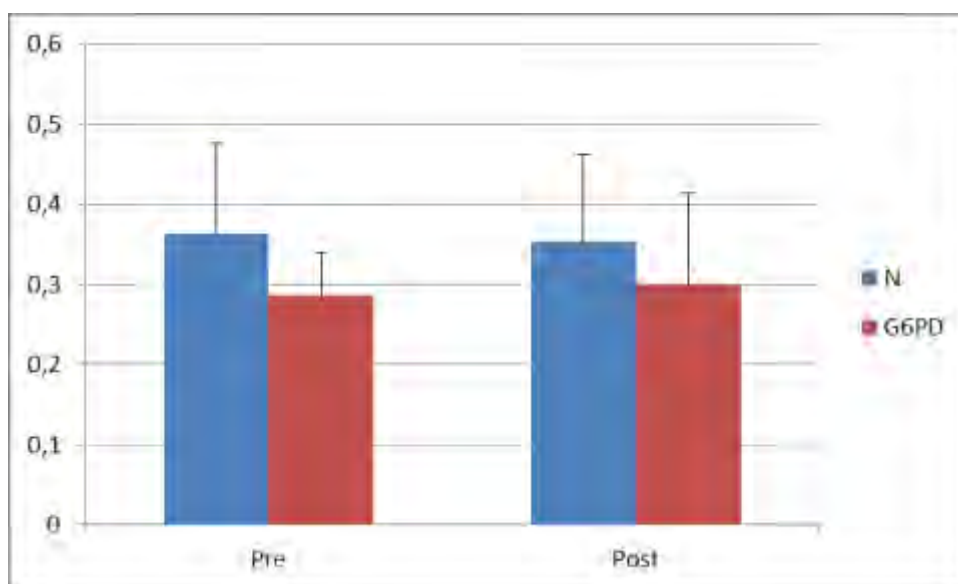
Η στατιστική ανάλυση για τη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης έδειξε σημαντικές διαφορές τόσο για την ομάδα ($F_{1,9}= 6.25$, $p<0.05$) όσο και για το χρόνο ($F_{1,9}= 11.73$, $p<0.005$). Η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων είχε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές ανηγμένης γλουταθειόνης σε σχέση με την ομάδα έλλειψης ενζύμου G6PD τόσο πριν ($N = 3.36 \pm 0.86$ $\mu\text{mol/g Hb}$ vs. $D = 2.75 \pm 0.55$ $\mu\text{mol/g Hb}$) όσο και μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος ($N = 3.80 \pm 0.90$ $\mu\text{mol/g Hb}$ vs. $D = 2.98 \pm 0.50$ $\mu\text{mol/g Hb}$). Δεν παρουσιάστηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδος και χρόνου ($F_{1,9}= 0.366$, $p=0.56$).



Σχήμα 6: Συγκέντρωση ανηγμένης γλουταθειόνης ($\mu\text{mol/g}$) στην ομάδα φυσιολογικών ατόμων (N) και ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) πριν (pre) και μετά (post) τη χορήγηση του συμπληρώματος. * Σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με το pre ($p<0.05$).

Συγκέντρωση οξειδωμένης γλουταθειόνης

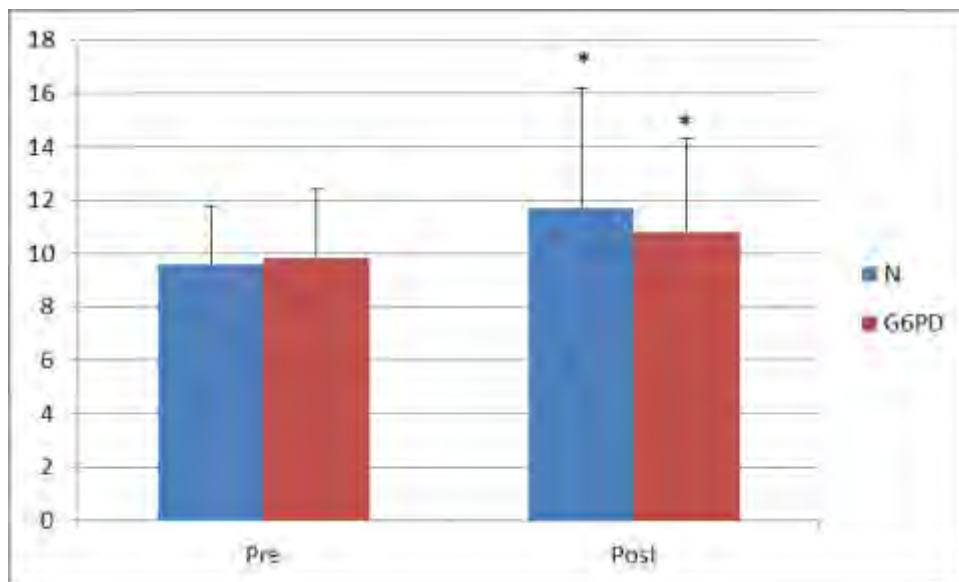
Η στατιστική ανάλυση για τη συγκέντρωση της οξειδωμένης γλουταθειόνης δεν έδειξε σημαντικές διαφορές τόσο για την ομάδα ($F_{1,9}= 2.22$, $p=0.17$) όσο και για το χρόνο ($F_{1,9}= 0.009$, $p=0.93$). Η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων δεν είχε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές οξειδωμένης γλουταθειόνης σε σχέση με την ομάδα έλλειψης ενζύμου G6PD τόσο πριν ($N = 0.36 \pm 0.11$ $\mu\text{mol/g Hb}$ vs. $D = 0.29 \pm 0.53$ $\mu\text{mol/g Hb}$) όσο και μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος ($N = 0.35 \pm 0.11$ $\mu\text{mol/g Hb}$ vs. $D = 0.30 \pm 0.12$ $\mu\text{mol/g Hb}$). Δεν παρουσιάστηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδος και χρόνου ($F_{1,9}= 0.20$, $p=0.67$).



Σχήμα 7: Συγκέντρωση οξειδωμένης γλουταθειόνης ($\mu\text{mol/g}$) στην ομάδα φυσιολογικών ατόμων (N) και ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) πριν (pre) και μετά (post) τη χορήγηση του συμπληρώματος.

Λόγος ανηγμένης / οξειδωμένη γλουταθειόνη

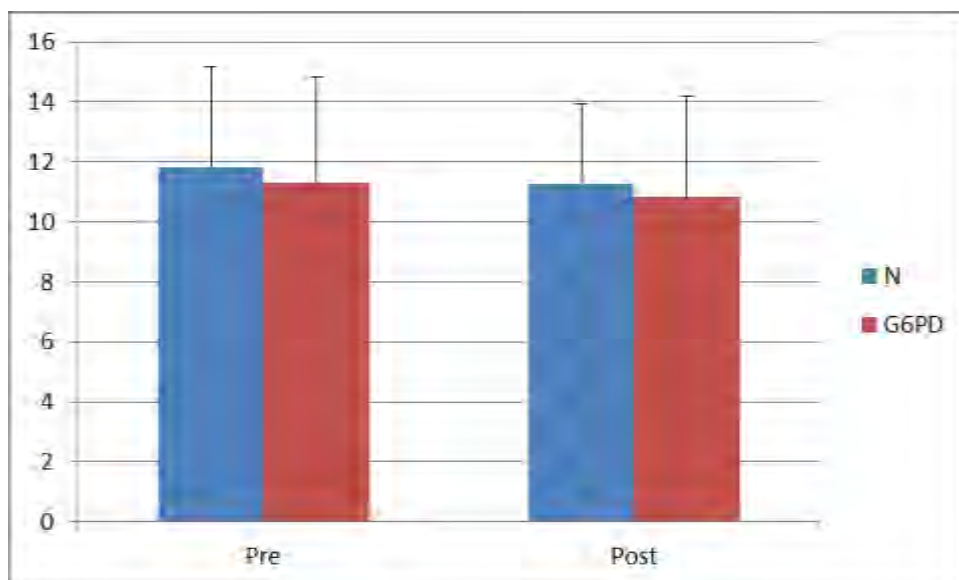
Η στατιστική ανάλυση για το λόγο της ανηγμένης / οξειδωμένη γλουταθειόνη δεν έδειξε σημαντικές διαφορές για την ομάδα ($F_{1,9}= 0.19$, $p=0.67$) αλλά προσέγγισε τη σημαντικότητα για το χρόνο ($F_{1,9}= 4.205$, $p=0.07$). Η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων δεν είχε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές λόγου ανηγμένης / οξειδωμένη γλουταθειόνη σε σχέση με την ομάδα έλλειψης ενζύμου G6PD τόσο πριν ($N = 9.61 \pm 2.18$ vs. $D = 9.85 \pm 2.57$) όσο και μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος ($N = 11.70 \pm 4.51$ vs. $D = 10.40 \pm 2.95$). Δεν παρουσιάστηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδος και χρόνου ($F_{1,9}= 0.37$, $p=0.56$).



Σχήμα 8: Λόγος ανηγμένης / οξειδωμένη γλουταθειόνη στην ομάδα φυσιολογικών ατόμων (N) και ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) πριν (pre) και μετά (post) τη χορήγηση του συμπληρώματος. * Σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με το pre ($p=0.07$).

Συγκέντρωση ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS)

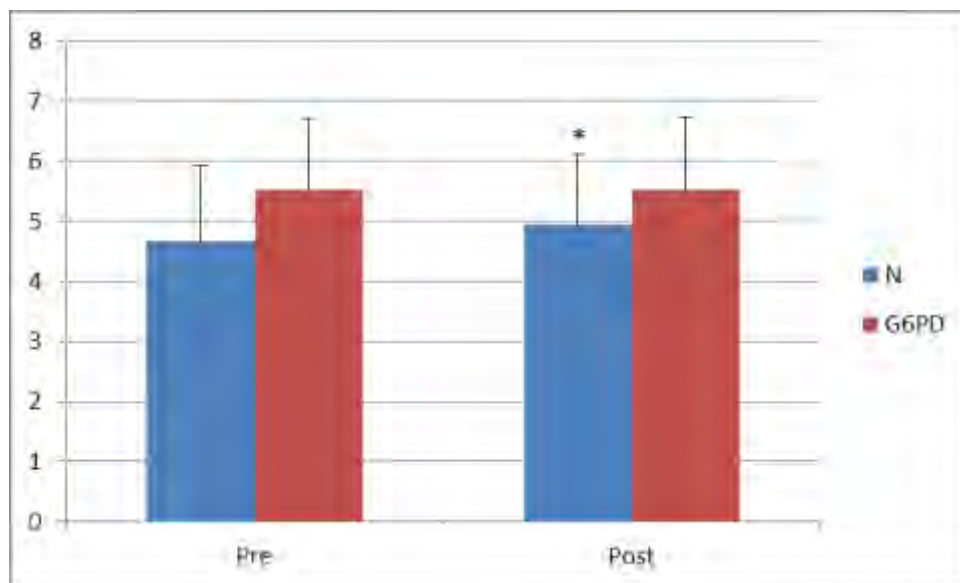
Η στατιστική ανάλυση για τη συγκέντρωση των TBARS δεν έδειξε σημαντικές διαφορές τόσο για την ομάδα ($F_{1,9} = 0.77$, $p=0.79$) όσο και για το χρόνο ($F_{1,9} = 2.87$, $p=0.124$). Η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων δεν είχε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές TBARS σε σχέση με την ομάδα έλλειψης ενζύμου G6PD τόσο πριν ($N = 11.81 \pm 3.35$ mM vs. $D = 11.32 \pm 3.51$ mM) όσο και μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος ($N = 11.28 \pm 2.66$ mM vs. $D = 10.83 \pm 3.34$ mM). Δεν παρουσιάστηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδος και χρόνου ($F_{1,9} = 0.007$, $p=0.93$).



Σχήμα 9: Συγκέντρωση TBARS (mM) στην ομάδα φυσιολογικών ατόμων (N) και ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) πριν (pre) και μετά (post) τη χορήγηση του συμπληρώματος.

Συγκέντρωση Ουρικού Οξέος

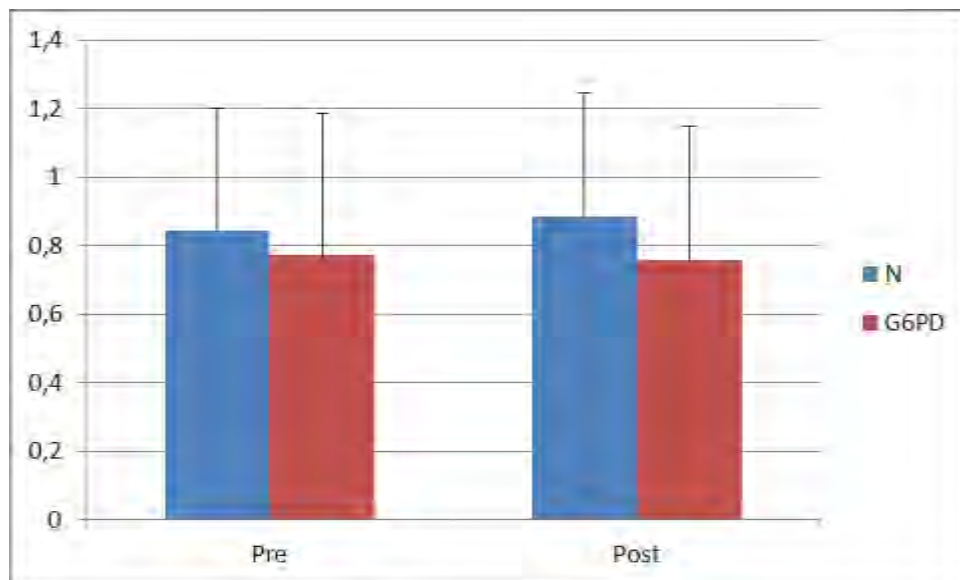
Η στατιστική ανάλυση για τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος δεν έδειξε σημαντικές διαφορές τόσο για την ομάδα ($F_{1,9}= 3.19$, $p=0.108$) όσο και για το χρόνο ($F_{1,9}= 0.65$, $p=0.44$). Ωστόσο, παρουσιάστηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδος και χρόνου ($F_{1,9}= 6.44$, $p<0.05$). Η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων δεν είχε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές ουρικού οξέος σε σχέση με την ομάδα έλλειψης ενζύμου G6PD πριν τη χορήγηση του συμπληρώματος ($N = 4.67 \pm 1.24$ mg/dl vs. $D = 5.53 \pm 1.19$ mg/dl) αλλά μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος τα επίπεδα του ουρικού οξέος ήταν σημαντικά μεγαλύτερα στην ομάδα των φυσιολογικών ατόμων ($N = 4.94 \pm 1.17$ mg/dl vs. $D = 5.52 \pm 1.22$ mg/dl).



Σχήμα 10: Συγκέντρωση ουρικού οξέος (mg/dl) στην ομάδα φυσιολογικών ατόμων (N) και ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) πριν (pre) και μετά (post) τη χορήγηση του συμπληρώματος. * Σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με το pre ($p<0.05$).

Συγκέντρωση χολερυθρίνης

Η στατιστική ανάλυση για τη συγκέντρωση της χολερυθρίνης δεν έδειξε σημαντικές διαφορές τόσο για την ομάδα ($F_{1,9} = 0.39$, $p=0.55$) όσο και για το χρόνο ($F_{1,9} = 0.29$, $p=0.602$). Η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων δεν είχε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές TBARS σε σχέση με την ομάδα έλλειψης ενζύμου G6PD τόσο πριν ($N = 0.84 \pm 0.36$ mg/dl vs. $D = 0.77 \pm 0.41$ mM) όσο και μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος ($N = 0.89 \pm 0.36$ mM vs. $D = 0.76 \pm 0.39$ mM). Δεν παρουσιάστηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδος και χρόνου ($F_{1,9} = 0.57$, $p=0.47$).



Σχήμα 11: Συγκέντρωση χολερυθρίνης (Mg/dl) στην ομάδα φυσιολογικών ατόμων (N) και ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) πριν (pre) και μετά (post) τη χορήγηση του συμπληρώματος.

Συζήτηση

Στην εργασία αυτή έγινε προσπάθεια να εξεταστεί ένας σημαντικός αριθμός από βιοχημικούς δείκτες, έπειτα από χορήγηση NAC τόσο σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD όσο και σε άτομα με φυσιολογική δραστικότητα του ενζύμου. Σκοπός ήταν να διερευνηθούν πιθανές διαφορετικές απαντήσεις του οργανισμού των ατόμων με έλλειψη G6PD σε σχέση με τα άτομα που παρουσίαζαν φυσιολογική δραστικότητα του ενζύμου όσον αφορά τα επίπεδα ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης, ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS), χολερυθρίνης και ουρικού οξέος. Εκτελέστηκαν αιμοληψίες και μετρήσεις των βιοχημικών δεικτών πριν και μετά την χορήγηση NAC έτσι ώστε να δοθεί μια πλήρη και σωστή εικόνα της αντίδρασης του οργανισμού στους δείκτες που εξετάστηκαν. Η υπόθεση μας ήταν ότι τα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD θα εμφάνιζαν αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης στον οργανισμό τους λόγω των χαμηλών επιπέδων που παρουσιάζουν. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου τα επίπεδα ανοιγμένης γλουταθειόνης αυξήθηκαν σημαντικά ενώ η οξειδωμένη γλουταθειόνη παρέμεινε στα ίδια επίπεδα. Ο λόγος ανηγμένης/οξειδωμένης γλουταθειόνης παρουσίασε αύξηση με τάση για στατιστική σημαντικότητα ($p=0,007$). Όλοι οι υπόλοιποι βιοχημικοί δείκτες (TBARS, χολερυθρίνη, ουρικό οξύ) δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων τους. Επομένως από τις δύο υποθέσεις που κάναμε η πρώτη επαληθεύτηκε ενώ η δεύτερη απορρίφθηκε.

Στην βιβλιογραφία δεν υπάρχει καμία αναφορά που να μελετά το αποτέλεσμα χορήγησης NAC σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD. Μοναδικές βιβλιογραφικές αναφορές είναι αυτές που βασίζονται στην χορήγηση NAC και μελέτης της αντίδρασης του ανθρώπινου οργανισμού με την ανάλυση διάφορων βιοχημικών δεικτών κάτω από συνθήκες πρόκλησης αυξημένου οξειδωτικού στρες. Σε έρευνα που μελετήθηκε η επίδραση χορήγησης NAC (400 mg την ημέρα) σε άτομα που παρέμειναν σε αυξημένο υψόμετρο (3600 μέτρα), όπου παρατηρείται αυξημένο οξειδωτικό στρες (Vats et al., 2008) τα αποτελέσματα έδειξαν μικρότερη

μείωση των επιπέδων ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης όσο και του λόγου αυτών μετά τη χορήγηση της NAC. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο οργανισμός ανταποκρίθηκε θετικά στη συμπληρωματική λήψη της NAC δείχνοντας προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες.

Σε έρευνα όπου εξετάστηκε η επίδραση της χορήγησης NAC ως πρόδρομος ουσία της γλουταθειόνης σε μεταμνηνοπαυσιακές γυναίκες και η επίδρασή της κατά του γήρατος (Arranz L. Et all., 2008), τα αποτελέσματα έδειξαν παρατεταμένη ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος των μεταμνηνοπαυσιακών γυναικών πιθανόν εξαιτίας της αύξησης των επιπέδων της γλουταθειόνης στα λευκά αιμοσφαίρια. Έτσι η χορήγηση NAC μπορεί να συμβάλει στην διατήρηση της καλής υγείας και ποιότητας ζωής στις μεταμνηνοπαυσιακές γυναίκες μειώνοντας την πιθανότητα εμφάνισης ασθενειών όπως λοιμώξεις κατά το γήρας και που συνδέονται με το αδύνατο ανοσοποιητικό σύστημα των γυναικών αυτών.

Σε χορήγηση NAC σε παιδιά που πάσχανε από οιδηματώδη υποσιτισμό (edematous malnutrition) τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση του ρυθμού σύνθεσης ερυθροκυτταρικής γλουταθειόνης στην ομάδα χορήγησης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Badaloo et al., 2002). Στην ομάδα χορήγησης υπολογίστηκε ότι η συγκέντρωση γλουταθειόνης αυξήθηκε κατά 150% περίπου ενώ ο ρυθμός σύνθεσης γλουταθειόνης σημείωσε αύξηση περίπου 510%. Τα αποτελέσματα της προαναφερθείσας εργασίας είναι παραπλήσια με αυτά της δικής μας εργασίας αφού αυτά τα παιδιά παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα ερυθροκυτταρικής ανηγμένης γλουταθειόνης. Επομένως κάτω από συνθήκες ένδειας γλουταθειόνης η συμπληρωματική χορήγηση NAC θα μπορούσε να αυξήσει τα επίπεδα αυτής της αντιοξειδωτικής ουσίας.

Σημαντικά και ελπιδοφόρα μηνύματα έδωσε η χορήγηση υψηλών δόσεων NAC σε άτομα με πνευμονική ίνωση (fibrosing alveolitis). Το αποτέλεσμα της χορήγησης ήταν να παρατηρηθεί αύξηση της αντιοξειδωτικής άμυνας των πνευμόνων αυξάνοντας τα επίπεδα της ενδοκυττάριας γλουταθειόνης. Επίσης παρατηρήθηκε βελτίωση των λειτουργικών δοκιμασιών των πνευμόνων (PFTs) σε ασθενείς που βρισκόταν σε ανοσοκαταστολή (Behr J. et all., 1997).

Σημαντικά αποτελέσματα αναφέρονται και σε έρευνα που έγινε σε ασθενείς με διαβήτη τύπου II (Ozkilic AC. Et all., 2006). Στην παρούσα έρευνα τα επίπεδα υπεροξειδάσης

της γλουταθειόνης, καταλάσης και ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) δεν παρουσίασαν μεταβολή. Ωστόσο τα επίπεδα δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης ήτανε σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με τα επίπεδα πριν την χορήγηση. Επομένως χορήγηση NAC σε διαβητικούς τύπου ΙΙ έχει σημαντικά αποτελέσματα στα επίπεδα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης τα οποία είναι σε ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα.

Συμπεράσματα – Προτάσεις για μελλοντική εργασία

Το κύριο εύρημα της παρούσας εργασίας είναι ότι η χορήγηση NAC σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD οδηγεί σε μικρή αύξηση των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), διατηρεί αμετάβλητα τα επίπεδα οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) , ενώ παρατηρείται αύξηση του λόγου ανηγμένης / οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH / GSSG). Οι υπόλοιποι βιοχημικοί δείκτες που μελετήθηκαν (θειοβαρβιτουρικό οξύ, χολερυθρίνη, ουρικό οξύ) δεν παρουσίασαν μεταβολή, ένα εύρημα το οποίο μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι συμμετέχοντες της έρευνας δεν υποβλήθηκαν σε συνθήκες αύξησης του οξειδωτικού στρες.

Μελλοντικές εργασίες ενδεχομένως θα πρέπει να τροποποιήσουν την χρονική διάρκεια όπως και την ποσότητα χορήγησης της NAC. Επίσης, θα μπορούσε να εξεταστεί η επίδραση του φύλου στα αποτελέσματα αφού στην παρούσα εργασία ήταν μόνο δύο οι γυναίκες που πήραν μέρος. Ακόμα, περισσότεροι δείκτες οξειδωτικού στρες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν, όπως για παράδειγμα τα πρωτεϊνικά καρβονύλια, τα ισοπροστάνια και η μέτρηση της δραστηριότητας της καταλάσης θα μπορούσε να δώσει περισσότερες πληροφορίες για το ρόλο που παίζει η συμπληρωματική λήψη της NAC. Τέλος, η εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου άσκησης, όπου τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες αυξάνονται, θα μπορούσε να μας δώσει πληροφορίες σχετικά με την απόκριση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD μετά τη χορήγηση NAC.

Βιβλιογραφία

- Alving, A. S., Carson, P. E., Flanagan, C. L., & Ickes, C. E. (1956). Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science*, 124(3220), 484-485.
- Arranz L, Fernández C, Rodríguez A, Ribera JM, De la Fuente M.(2008). The glutathione precursor N-acetylcysteine improves immune function in postmenopausal women. *Department of Physiology (Animal Physiology II), Faculty of Biological Sciences, Madrid Complutense University, Spain.*
- Asha Badaloo, Marvin Reid, Terrence Forrester, William C Heird, and Farook Jahoor (2002). Cysteine supplementation improves the erythrocyte glutathione synthesis rate in children with severe edematous malnutrition. *Am J Clin Nutr* 2002;76:646–52. Printed in USA.646-651.
- Behr J, Maier K, Degenkolb B, Krombach F, Vogelmeier C. (1997). Antioxidative and clinical effects of high-dose N-acetylcysteine in fibrosing alveolitis. Adjunctive therapy to maintenance immunosuppression. *Abteilung für Pneumologie, Klinikum Grosshadern, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany.*1897-1901.
- Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T., & Wilson, M. T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 30(2), 280-285.
- 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*, 142(2), 231-255.

- 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*, 142(2), 231-255.
- Mehta, A., Mason, P. J., & Vulliamy, T. J. (2000). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 13(1), 21-38.
- Missiou-Tsagaraki, S. (1991). Screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency as a preventive measure: prevalence among 1,286,000 Greek newborn infants. *J Pediatr*, 119(2), 293-299.
- Murray, K.R., Granner, K.D., Mayes, A.P., Robwell, W.V. (1993). In Harper's Biochemistry. *Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, USA*, 692
- Ozkilic AC, Cengiz M, Ozaydin A, Cobanoglu A, Kanigur G.(2006). The role of N-acetylcysteine treatment on anti-oxidative status in patients with type II diabetes mellitus. *Department of Medical Biology, Cerrahpasa Medical Faculty, Istanbul University, Istanbul, Turkey*. 17(4):245-54.
- Ronquist, G., & Theodorsson, E. (2007). Inherited, non-spherocytic haemolysis due to deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 67(1), 105-111.
- Tsai, K. J., Hung, I. J., Chow, C. K., Stern, A., Chao, S. S., & Chiu, D. T. (1998). Impaired production of nitric oxide, superoxide, and hydrogen peroxide in glucose 6-phosphate-dehydrogenase-deficient granulocytes. *FEBS Lett*, 436(3), 411-414.
- Vats P, Singh VK, Singh SN, Singh SB (2008). Glutathione metabolism under high-altitude stress and effect of antioxidant supplementation. *Aviat Space Environ Med* 2008; 79: 1106 – 11 .

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα 1



Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας

Τρίκαλα: 12/05/2010

Αριθμ. Πρωτ.: 226

Αίτηση Εξέτασης της πρότασης για διεξαγωγή Έρευνας με τίτλο: Συμπληρωματική λήψη N-Ακετυλοκυστεΐνης (NAC) και οξειδωτικό στρες σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6 φωσφορικής γλυκόζης (G6PD)

Επιστημονικός Υπεύθυνος: Δρ. Τζιαμούρτας Αθανάσιος

Κύριος/α ερευνητής/τρια - φοιτητής/τρια: Λιάκος Ιωάννης

Ίδρυμα & Τμήμα: ΤΕΦΑΑ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

(να αναφερθούν και τα

συνεργαζόμενα αν υπάρχουν)

Η προτεινόμενη έρευνα θα είναι:

Ερευνητικό πρόγραμμα ☐ Μεταπτυχιακή διατριβή ☒ Διπλωματική εργασία ☐ Ανεξάρτητη έρευνα

☐

Email επικοινωνίας:

Η Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Τ.Ε.Φ.Α.Α., Πανεπιστημίου Θεσσαλίας μετά την υπ. Αριθμ. **21/14-4-2010** συνεδρίαση εγκρίνει την διεξαγωγή της προτεινόμενης έρευνας.

Ο πρόεδρος της
επιτροπής Βιοηθικής και
Δεοντολογίας



Τζιαμούρτας Αθανάσιος
Επίκουρος Καθηγητής

Παράρτημα 2

ΕΝΗΜΕΡΩΤΙΚΟ ΦΥΛΛΑΔΙΟ ΔΟΚΙΜΑΖΟΜΕΝΟΥ

Τίτλος Έρευνας: Οξειδωτικό στρες και συμπληρωματική λήψη N-ακέτυλκυστεΐνης (NAC) σε άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD.

Σκοπός της Έρευνας

Η έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-Φωσφορικής Γλυκόζης (G6PD) αποτελεί μια ενζυμική κληρονομική ανωμαλία η οποία μπορεί να προκαλέσει σοβαρή αιμολυτική διαταραχή. Η έλλειψη του ενζύμου G6PD αποτελεί την πιο συνηθισμένη ενζυμοπάθεια και περίπου το 7% του παγκόσμιου πληθυσμού πάσχει απ' αυτή την ανωμαλία. Τα άτομα αυτά ίσως υπόκεινται σε υψηλό κίνδυνο για εκδήλωση οξειδωτικού στρες εξαιτίας των μειωμένων επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης η οποία αποτελεί ένα πολύ σημαντικό ενδογενή αντιοξειδωτικό ένζυμο.

Μεθοδολογία

Στην παρούσα έρευνα θα λάβουν μέρος 20 άτομα τα οποία θα χωριστούν σε δύο ομάδες. Η μια ομάδα θα αποτελείτε απο άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD και η άλλη ομάδα απο άτομα με φυσιολογικές τιμές του ενζύμου. Όλοι οι συμμετέχοντες θα χρειαστεί να επισκεφτούν το εργαστήριο 2 φορές. Η κάθε επίσκεψη θα διαρκέσει 15 λεπτά και θα περιλαμβάνει μια αιμοληψία. Επίσης κατά την διάρκεια της πρώτης σας επίσκεψης στο εργαστήριο θα σας ζητηθεί να καταγράψετε την διαιτητική σας κατανάλωση σε ένα φύλο καταγραφής που θα σας χορηγηθεί και η οποία θα πρέπει να είναι ίδια και κατά την προηγούμενη ημέρα της τελευταίας επίσκεψης για αιμοληψία.

Στατιστική Ανάλυση

Η επεξεργασία των πληροφοριών που θα μας δώσετε θα γίνει από την ομάδα ερευνητών η οποία διεξάγει τα τεστ και η ανάλυση των δεδομένων θα γίνει με τη βοήθεια στατιστικών προγραμμάτων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου η ανωνυμία σας θα διατηρηθεί αυστηρά. Όταν η έρευνα ολοκληρωθεί μια συνολική αναφορά στα ευρήματα της έρευνας θα είναι διαθέσιμη σε εσάς. Επιπλέον, ο κύριος ερευνητής έχει σκοπό να δημοσιεύσει τα ευρήματα από αυτή την έρευνα σε επιστημονικό περιοδικό, όπου πιθανά δεν θα δίνονται συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με τους συμμετέχοντες στην έρευνα.

Πρέπει να πάρω μέρος;

Η συμμετοχή σας στην έρευνα είναι απόλυτα εθελοντική. Ακόμη και αν αποφασίσετε να πάρετε μέρος στην έρευνα, μπορείτε ανά πάσα στιγμή να αποσυρθείτε από αυτή. Εάν, όμως, επιλέξετε να συμμετέχετε δεσμεύεστε να ακολουθήσετε τις διαδικασίες της έρευνας. Παράλληλα θα πάρετε μια συνολική αναφορά στα ευρήματα της έρευνας, όταν αυτή ολοκληρωθεί.

Επικοινωνία

Εάν έχετε οποιαδήποτε ερώτηση σχετικά με την έρευνα παρακαλώ να επικοινωνήσετε με τον **Δρ Τζιαμούρτα Αθανάσιο**, Επίκουρο Καθηγητή Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο τηλέφωνο: 24310 47054 ή στην ηλεκτρονική διεύθυνση **ajamurt@pe.uth.gr**

Ευχαριστούμε για τη βοήθειά σας

Παράρτημα 3 :

Συναίνεση Δοκιμαζόμενου

Τίτλος Έρευνας: Οξειδωτικό στρες και συμπληρωματική λήψη N-ακετυλκυστεΐνης (NAC) σε άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD.

Ερευνητής: Λιάκος Ιωάννης, Μεταπτυχιακός Φοιτητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Υπεύθυνος έρευνας: Δρ Τζιαμούρτας Αθανάσιος, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Παρακαλώ να τσεκάρετε τα κουτάκια και να τυπώσετε το ονοματεπώνυμό σας στην παρακάτω γραμμή στην ένδειξη «ονοματεπώνυμο Συμμετέχοντα»:

1. Βεβαιώνω ότι διάβασα και κατανόησα το ενημερωτικό φυλλάδιο για την παρούσα έρευνα και είχα την ευκαιρία να κάνω ερωτήσεις ☐
2. Κατανοώ ότι η συμμετοχή μου είναι εθελοντική και μπορώ ανά πάσα στιγμή να αποσυρθώ από τις μετρήσεις ☐
3. Δέχομαι να συμμετάσχω στην παρούσα έρευνα και να ακολουθώ τις οδηγίες που αφορούν στη διεξαγωγή της. ☐

Ονοματεπώνυμο Συμμετέχοντα

Ημερ/νια

Υπογραφή

Ονοματεπώνυμο Μάρτυρα

Ημερ/νια

Υπογραφή

Ονοματεπώνυμο Ερευνητή

Ημερ/νια

Υπογραφή

Παράρτημα 4 :

ΗΜΕΡΟΛΟΓΙΟ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΟΥ 24ΩΡΟΥ:

- Ονοματεπώνυμο :
- Ημερομηνία :

ΓΕΥΜΑΤΑ	ΕΙΔΟΣ ΤΡΟΦΗΣ	<u>ΠΟΣΟΤΗΤΑ (gr)</u>
ΠΡΩΪΝΟ		
ΔΕΚΑΤΙΑΝΟ		
ΜΕΣΗΜΕΡΙΑΝΟ		
ΑΠΟΓΕΥΜΑΤΙΝΟ		
ΒΡΑΔΙΝΟ		
ΠΡΟ ΤΟΥ ΥΠΝΟΥ		