

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ
ΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ**



**ΟΙ ΟΞΕΙΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΗΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΠΑΘΗΤΙΚΟΥ
ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΟΣ ΣΥΜΒΑΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ
ΤΣΙΓΑΡΟΥ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ**

της
Πουλιανίτη Κωνσταντίνας

Τριμελής Επιτροπή

Δρ. Τζιαμούρτας Αθανάσιος
Δρ. Κουτεντάκης Ιωάννης
Δρ. Καρατζαφέρη Χριστίνα

Επιβλέπων Καθηγητής
Τζιαμούρτας Αθανάσιος

Μεταπτυχιακή Διατριβή που υποβάλλεται στο καθηγητικό σώμα για τη μερική
εκπλήρωση των υποχρεώσεων απόκτησης του μεταπτυχιακού τίτλου του
Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Άσκηση και Υγεία» του Τμήματος
Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΤΡΙΚΑΛΑ
Ιούνιος 2012

Copyright © Κωνσταντίνα Πουλιανίτη 2012

Στον Δρ. Τζιαμούρτα Αθανάσιο οφείλω τις θερμές μου ευχαριστίες για την καθοδήγηση και την υποστήριξή του κατά τη διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους μου που συμμετείχαν εθελοντικά στο πειραματικό μέρος της διατριβής, καθώς και σε όλους τους συμμετέχοντες για τη συμβολή τους.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς την οικογένεια μου για την κατανόηση και τη συμπαράσταση που επέδειξε στη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Περίληψη

Πλήθος ερευνών καταδεικνύει ότι το κάπνισμα προκαλεί αρκετές αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία. Είναι επίσης γνωστό ότι το τσιγάρο περιέχει ένα μεγάλο αριθμό προοξειδωτικών μορίων που ίσως ευθύνονται για τις βλαβερές επιπτώσεις που προκαλεί στον οργανισμό. Πρόσφατα στην αγορά έχει εισέλθει έναν νέο προϊόν που αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο καπνίσματος, το ηλεκτρονικό τσιγάρο. Ωστόσο, μικρός αριθμός ερευνών έχει εξετάσει τις οξείες επιδράσεις του ενεργητικού και παθητικού καπνίσματος στην οξειδωαναγωγική κατάσταση σε ανθρώπους και ακόμη μικρότερος έχει εξετάσει τις αντίστοιχες επιπτώσεις του ηλεκτρονικού τσιγάρου. Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν να εξεταστούν πειραματικά οι επιπτώσεις της οξείας έκθεσης στο ενεργητικό και παθητικό κάπνισμα συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου υπό συνθήκες που προσομοιάζουν το περιβάλλον σε χώρους όπως μπαρ/εστιατόρια σε δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα καπνιστών και μη καπνιστών ανδρών και γυναικών. Τριάντα ενήλικα άτομα (15 καπνιστές και 15 μη καπνιστές) συμμετείχαν σε μια τυχαία τυφλή μελέτη με σχεδιασμό διασταύρωσης και εκτέθηκαν σε τρεις διαφορετικές καταστάσεις. Στην πειραματική κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος συμβατικού τσιγάρου ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να καπνίσουν 2 τσιγάρα της δικής τους μάρκας μέσα σε 30 λεπτά. Στην πειραματική κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος ηλεκτρονικού τσιγάρου, οι καπνιστές έπρεπε να πραγματοποιήσουν συγκεκριμένο αριθμό εισπνοών από ηλεκτρονικό τσιγάρο σε χρονικό διάστημα 30 λεπτών. Στην κατάσταση ελέγχου ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να «καπνίσουν» ένα μη αναμμένο τσιγάρο της δικής τους μάρκας για 30 λεπτά. Αντίστοιχα, στην πειραματική κατάσταση παθητικού καπνίσματος συμβατικού τσιγάρου οι συμμετέχοντες εκτέθηκαν για 1 ώρα στο παθητικό κάπνισμα

συμβατικού τσιγάρου σε ειδικά διαμορφωμένο θάλαμο στον οποίο η συγκέντρωση μονοξειδίου του άνθρακα ήταν 23 ± 1 ppm. Παρόμοια στην πειραματική κατάσταση ηλεκτρονικού τσιγάρου οι συμμετέχοντες εκτέθηκαν για 1 ώρα στο παθητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου. Στην κατάσταση ελέγχου οι συμμετέχοντες παρέμειναν στον ίδιο χώρο για μία ώρα αναπνέοντας φυσιολογικό ατμοσφαιρικό αέρα. Στις τρεις καταστάσεις αξιολογήθηκε η συγκέντρωση της κοτινίνης, η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), η δραστικότητα της καταλάσης (CAT), καθώς και η συγκέντρωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC), πριν από την έκθεση, αμέσως μετά καθώς επίσης και 1 ώρα μετά το τέλος της έκθεσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το ενεργητικό κάπνισμα συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου δε μεταβάλλει την οξειδοαναγωγική κατάσταση των καπνιστών. Επίσης, μετά την έκθεση σε περιβάλλον παθητικού καπνίσματος συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου παρουσιάστηκε μια μικρή διαφοροποίηση στους δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης.

Λέξεις κλειδιά: οξειδοαναγωγική κατάσταση, ελεύθερες ρίζες, οξεία έκθεση, κοτινίνη, ηλεκτρονικό τσιγάρο

Abstract

Data indicate that smoking provokes many negative effects to health. It is well established that the cigarette contains a large number of prooxidant molecules which may be responsible for health hazardous effects. Recently in the market was introduced a new product as an alternative way of smoking that is called electronic cigarette. However, few studies have examined the acute effects of active and passive smoking in antioxidant status in humans and even less have examined the respective effects of the electronic cigarette. The purpose of the present study was to assess the effects of acute exposure to active and passive smoking of conventional and electronic cigarette smoking in simulated bar/restaurant environment on blood redox status of active and passive men and women smokers. Thirty adults (15 smokers and 15 non-smokers) participated in a randomized single-blind crossover study and were exposed in three different conditions. In the experimental condition of active smoking of conventional cigarette participants were asked to smoke 2 cigarettes of their own brand within 30 minutes. In the experimental condition of active smoking of electronic cigarette, smokers had to inhale a certain number of puffs from an electronic cigarette over a period of 30 minutes. In the control condition, participants were asked to “smoke” a non-lit cigarette of their own brand for 30 minutes. Similarly, in the experimental condition of passive smoking of conventional cigarette participants were exposed to 1 hour of moderate passive smoking at a carbon monoxide concentration of 23 ± 1 ppm inside an environmental chamber. In the experimental condition of passive smoking of electronic cigarette participants exposed to 1 hour of moderate passive smoking of the electronic cigarette’s vapour. In the control condition participants remained in the same chamber for 1 hour breathing

atmospheric air. Concentration of cotinine, reduced glutathione (GSH), activity of catalase (CAT) and concentration of total antioxidant capacity (TAC) were measured before, immediately after and 1 hour after the exposure. Results indicate that active smoking of conventional and electronic cigarette did not result in changes in the redox status. Furthermore, the small changes in redox status following exposure to passive smoking of conventional and electronic cigarette need further elucidation.

Keywords: redox status, free radicals, acute exposure, cotinine, e-smoking

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract.....	6
Κατάλογος εικόνων.....	10
Κατάλογος πινάκων.....	10
Κατάλογος γραφημάτων.....	11
Εισαγωγή	12
Ηλεκτρονικό τσιγάρο	13
Οξειδωτικό στρες	14
Επιδράσεις του τσιγάρου στο οξειδωτικό στρες.....	17
Επιδράσεις του ηλεκτρονικού τσιγάρου στο οξειδωτικό στρες	19
Ερευνητικές υποθέσεις	22
Περιορισμοί της έρευνας.....	24
Ανασκόπηση Βιβλιογραφίας	25
I. Ανασκόπηση Βιβλιογραφίας σχετικά με τις οξείες επιδράσεις του παθητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες.....	25
II. Ανασκόπηση Βιβλιογραφίας σχετικά με τις οξείες επιδράσεις του ενεργητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες.....	33
Μεθοδολογία.....	40
Συμμετέχοντες.....	40
Πειραματικό πρωτόκολλο καπνιστών εθελοντών.....	41
Πειραματικό πρωτόκολλο μη καπνιστών εθελοντών.....	44
Συλλογή αίματος.....	46
Βιοχημική ανάλυση κοτινίνης	47
Πρωτόκολλα δεικτών εκτίμησης του οξειδωτικού στρες.....	48

Στατιστική ανάλυση	55
Αποτελέσματα.....	56
Κοτινίνη.....	56
Παθητικοί καπνιστές	57
Συζήτηση	65
Προτάσεις για μελλοντικές έρευνες	74
Συμπεράσματα	73
Βιβλιογραφία	75
Παράρτημα	79

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1. Σχηματισμός οξειδωσης της GSH σε GSSG με ταυτόχρονο σχηματισμό του 2-νιτρο-5-βενζοϊκού οξέως από το DTNB σελ. 49

Εικόνα 2. Αναγωγή της ρίζας DPPH* από σταθερό μόριο DPPH:H σελ. 53.

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης σελ. 50

Πίνακας 2. Προσδιορισμός της δραστηρότητας της καταλάσης σελ. 52

Πίνακας 3. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας σελ. 54

Κατάλογος γραφημάτων

- Γράφημα 1. Μεταβολές στη συγκέντρωση της κοτινίνης, στην κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος σελ. 56
- Γράφημα 2. Μεταβολές στη συγκέντρωση της κοτινίνης, στην κατάσταση παθητικού καπνίσματος .σελ. 57
- Γράφημα 3. Μεταβολές στη συγκέντρωση της γλουταθειόνης στην κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος σελ 58
- Γράφημα 4. Μεταβολές στη δραστικότητα της καταλάσης στην κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος σελ 59
- Γράφημα 5. Μεταβολές στη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στην κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος σελ 60
- Γράφημα 6. Μεταβολές στη συγκέντρωση της γλουταθειόνης στην κατάσταση παθητικού σελ. 62
- Γράφημα 7. Μεταβολές στη δραστικότητα της καταλάσης στην κατάσταση παθητικού καπνίσματος σελ. 63
- Γράφημα 8. Μεταβολές στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στην κατάσταση παθητικού καπνίσματος σελ 64

Εισαγωγή

Ο καπνός είναι ένα μονοετές, ποώδες φυτό, ανήκει στο γένος Νικοτιανή (*Nicotiana*) και καλλιεργείται για τα φύλλα του, τα οποία έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία χρησιμοποιούνται για κάπνισμα. Το συγκεκριμένο φυτό πιθανώς είναι περισσότερο υπεύθυνο για θανάτους από κάθε άλλο βότανο. Σήμερα, ο καπνός προκαλεί παγκοσμίως πάνω από 3 εκατομμύρια θανάτους ετησίως και αν η τάση για κάπνισμα συνεχιστεί με τον ίδιο ρυθμό, το 2030 οι θάνατοι θα ξεπεράσουν τα 10 εκατομμύρια (Peto, Lopez et al. 1996).

Αν σε αυτό το νούμερο προστεθεί και η θνησιμότητα εξαιτίας των διαφόρων μορφών καρκίνου που προκαλεί η στοματική χρήση του καπνού, τότε γίνεται εύκολα αντιληπτό πως ο αριθμός των θανάτων που προκαλεί, εκτοξεύεται στα ύψη. Αναμφίβολα, το κάπνισμα αποτελεί τη σημαντικότερη αποτρέψιμη αιτία πρόωρου θανάτου και νόσων παγκοσμίως (Royal College of Physicians, 1977).

Τα φύλλα του καπνού και ο καπνός που παράγεται κατά την καύση του περιέχουν πάνω από 4000 χημικές ουσίες, με περισσότερο γνωστή τη νικοτίνη, η οποία απομονώθηκε από τα φύλλα του καπνού από τους Posselt και Reinman το 1828. Η νικοτίνη είναι η ουσία που προκαλεί εθισμό στους χρήστες του τσιγάρου και μπορεί να αποβεί ακόμη και θανατηφόρα σε μικρές δόσεις (Dani, Jenson et al. 2011). Όταν ο καπνός του τσιγάρου εισπνέεται από το χρήστη, η νικοτίνη περνάει γρήγορα σε κάθε όργανο του ανθρώπινου σώματος. Ο εγκέφαλος και το νευρικό σύστημα διεγείρονται από μικρές δόσεις καπνού, ωστόσο, σε μεγάλες δόσεις, προκαλούνται σοβαρά προβλήματα . Η νικοτίνη και συνεπώς το κάπνισμα, αυξάνουν την καρδιακή συχνότητα, την αρτηριακή πίεση και πιθανόν συμβάλλουν απευθείας στη δημιουργία

θρομβώσεων και αθηρωμάτων στους καπνιστές (US Department of Health and Human Services, 1982).

Εδώ και μερικά χρόνια έχουν ανακαλυφθεί θεραπείες, οι οποίες βασίζονται στην αντικατάσταση της νικοτίνης ώστε να βοηθήσουν τους καπνιστές να διακόψουν το κάπνισμα. Με τη διακοπή του καπνίσματος, οι χρήστες δεν απαλλάσσονται μόνο από τις βλαβερές επιπτώσεις της νικοτίνης αλλά και από πλήθος άλλων χημικών ουσιών, όπως είναι οι καρκινογόνοι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, οι νιτροσαμίνες, η ακρολεΐνη, το βενζόλιο, η φορμαλδεΐδη, η αμμωνία, η ακετόνη το οξικό οξύ και το μονοξειδίο του άνθρακα { U.S. Department of Health and Human Services, 2006}.

Ηλεκτρονικό τσιγάρο

Για τους περισσότερους καπνιστές η προσπάθεια για μακροχρόνια αποχή από το τσιγάρο καταλήγει σε αποτυχία. Κάποιες θεραπείες που φαίνονται να βελτιώνουν τα ποσοστά της αποχής από το κάπνισμα συμπεριλαμβάνουν υποκατάστατα της νικοτίνης, όπως τσίχλες, αυτοκόλλητα, εισπνοές, ρινικά σπρέι, παστίλιες, βουπροπιόνη και βαρενικλίνη (Cahill, Stead et al. 2010).

Πρόσφατα ένα νέο προϊόν έχει κατακλύζει την αγορά των υποκατάστατων της νικοτίνης, το ηλεκτρονικό τσιγάρο. Το ηλεκτρονικό τσιγάρο είναι μία συσκευή που λειτουργεί με επαναφορτιζόμενη μπαταρία και αποτελείται από τον ατμοποιητή και τα αναλώσιμα φίλτρα. Το αναλώσιμο φίλτρο είναι το μέρος του τσιγάρου στο οποίο περιέχεται η νικοτίνη (εφόσον είναι επιθυμητό) και το υγρό, το οποίο ο ατμοποιητής, μέσα σε ειδικό θάλαμο, εξατμίζει ώστε να παραχθεί ο ατμός (Yamin, Bitton et al. 2010). Κάποια ηλεκτρονικά τσιγάρα έχουν μία φλογερή κόκκινη ένδειξη LED στην άκρη, η οποία ανάβει αυτόματα όταν εισπνέεται ατμός από το χρήστη δίνοντάς του

την εντύπωση ότι καπνίζει ένα συμβατικό τσιγάρο. Η προσθήκη προπυλενογλυκόλης στο αναλώσιμο φίλτρο συντελεί στη δημιουργία ατμού κατά τη θέρμανσή της. Η συγκέντρωση της νικοτίνης εξαρτάται από τον κατασκευαστή της και κυμαίνεται από μηδενική έως 16 και 18 mg ανά φίλτρο (WHO 2009). Επιπλέον, ορισμένα χημικά πρόσθετα που εισάγονται στο αναλώσιμο υγρό προσδίδουν άρωμα και γεύση καπνού, σοκολάτας, μέντας, φρούτων και καφέ.

Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται από την τάση ορισμένων μορίων και ατόμων, που έχουν απολέσει το ένα από τα δυο ηλεκτρόνια της εξωτερικής στιβάδας, να αναζητούν ένα ηλεκτρόνιο με σκοπό να αποκαταστήσουν της σταθερότητα τους. Αυτό συμβαίνει διότι το μόριο χάνοντας ένα ηλεκτρόνιο από την τελευταία στιβάδα είναι πλέον ανεξάρτητο, μετατρέπεται σε ελεύθερη ρίζα και αναζητά ένα ηλεκτρόνιο από άλλα γειτνιάζοντα μόρια ώστε να κατορθώσει να σταθεροποιηθεί.

Αυτή η κατάσταση μπορεί να βλάψει μόρια τα οποία είναι σημαντικά στην κυτταρική λειτουργία και μπορεί να οδηγήσει μέχρι και σε ολοκληρωτική απώλεια της (Evans, 2000). Σύμφωνα με τον ορισμό του Sies, το οξειδωτικό στρες χαρακτηρίζεται από μία κατάσταση κατά την οποία οι ελεύθερες ρίζες υπερισχύουν έναντι της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού (Sies and Cadenas 1985). Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οφείλεται είτε στην αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών, είτε στην μειωμένη ικανότητα απομάκρυνσης τους μέσω του αντιοξειδωτικού μηχανισμού, είτε στον συνδυασμό των ανωτέρω. Αποτέλεσμα αυτής της οξειδοαναγωγικής ανισορροπίας είναι η εμφάνιση οξειδωτικής βλάβης η οποία μεταφράζεται σε βλάβη των ιστών (Halliwell 2001).

Τα αίτια τα οποία μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες στον οργανισμό ποικίλουν, ωστόσο οι σημαντικότεροι παράγοντες οι οποίοι είναι ικανοί να προκαλέσουν διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών μηχανισμών από την μια μεριά και των αντιοξειδωτικών από την άλλη, είναι ο τρόπος ζωής, η διατροφή, το κάπνισμα, το περιβάλλον και η κληρονομικότητα (Moller, Wallin et al. 1996).

Σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς λειτουργούν αμυντικοί μηχανισμοί, οι οποίοι δρουν ενάντια στην καταστροφική επίδραση των ελευθέρων ριζών με τη βοήθεια μίας ομάδας ουσιών που ονομάζονται αντιοξειδωτικά. Στην πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού ανήκουν τα αντιοξειδωτικά εκείνα τα οποία δρουν ενάντια στη δημιουργία ελευθέρων ριζών και είναι τα εξής:

- Καταλάση
- Τρανσφερρίνη
- Λακτοφερρίνη
- Αιμοπηκτίνη
- Σερουλοπλασμίνη
- Αλβουμίνη
- Καροτενοειδή
- Βιταμίνη E

Η δεύτερη γραμμή άμυνας του οργανισμού περιλαμβάνει αντιοξειδωτικές ουσίες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να διακόψουν ή να αναστείλουν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες και είναι οι εξής:

- Ουρικό οξύ
- Χολερυθρίνη

- Αλβουμίνη
- Βιταμίνη C
- Βιταμίνη E
- Ουβικινόλη
- Καροτενοειδή
- Φλαβονοειδή

Η τρίτη γραμμή άμυνας του οργανισμού απαρτίζεται από αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία δρουν ως επιδιορθωτικοί παράγοντες στη ζημιά που έχει προκληθεί εξαιτίας της οξείδωσης. Τα ένζυμα αυτά είναι τα εξής:

- Λιπάσες
- Πρωτεάσες
- Επιδιορθωτικά ένζυμα του DNA
- Τρανσφεράσες

Σε ορισμένες περιπτώσεις τα αντιοξειδωτικά μπορούν να μετατραπούν σε προοξειδωτικά, δηλαδή μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση ενεργοποιώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις ή επιταχύνοντάς τις (Papas 1999).

Τα αντιοξειδωτικά είτε παράγονται από τον ίδιο τον οργανισμό είτε προέρχονται από τη διαίτα. Στα ενδογενή αντιοξειδωτικά συμπεριλαμβάνονται τα εξής:

- Γλουταθειόνη
- Καταλάση
- Συνένζυμο Q₁₀
- NADPH
- Ουρικό οξύ

- Λιποϊκό οξύ
- Μελατονίνη
- Μεταλλοδесμευτικές πρωτεΐνες (Papras 1999).

Στα αντιοξειδωτικά που προέρχονται από τη διαίτα συμπεριλαμβάνονται τα εξής:

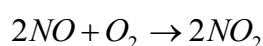
- Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
- Υπεροξειδική δισμουτάση
- Ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)
- Βιταμίνη A και καροτενοειδή (β-καροτένιο, λυκοπένη, λουτεΐνη)
- Σελήνιο, ψευδάργυρος
- Αντιοξειδωτικά των τροφίμων (BHA, BHT, TBHQ) (Papras 1999).

Επιδράσεις του τσιγάρου στο οξειδωτικό στρες

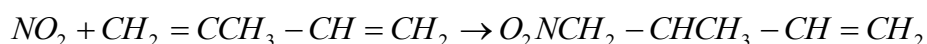
Ο ρόλος του καπνού του τσιγάρου στην πρόκληση ασθενειών όπως ο καρκίνος, το εμφύσημα και τα καρδιαγγειακά προβλήματα είναι ευρέως τεκμηριωμένος {Glantz, 1996 #1922} . Ωστόσο, λίγες είναι οι αναφορές που έχουν γίνει σχετικά με τις άμεσες επιπτώσεις του καπνού του τσιγάρου στα επίπεδα των μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών του οργανισμού. Πράγματι, μία ανισορροπία στις συγκεντρώσεις αυτών των συστατικών, συμβάλλει στην ανάπτυξη πολλών παθολογικών καταστάσεων.

Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει μεγάλο αριθμό ενώσεων, αρκετές από αυτές οξειδωτικές και προοξειδωτικές, ικανές να παράγουν ελεύθερες ρίζες και δραστικές ενώσεις διαταράσσοντας έτσι την οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού (Preston 1991). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες που περιέχονται

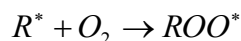
στον καπνό του τσιγάρου, χαρακτηρίζονται από την ιδιαίτερη ικανότητα διατήρησης τους στην ζωή για παρατεταμένο χρονικό διάστημα (Pryor, Stone et al. 1998). Η μοριακή φάση του καπνού περιέχει 10^{17} ρίζες ανά γραμμάριο οι οποίες διατηρούνται για μέρες, ενώ η αέρια φάση του καπνού περιέχει 10^{15} ρίζες ανά εισπνοή από τσιγάρο οι οποίες τυπικά έχουν χρόνο ζωής μικρότερο από ένα δευτερόλεπτο (Pryor, Stone et al. 1998). Παραδόξως, η συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών διατηρείται για περισσότερα από 10 λεπτά και επομένως όσο κυλά ο χρόνος, αυξάνεται σταδιακά και η συγκέντρωσή τους. Για να εξηγηθεί αυτό το φαινόμενο, προτάθηκε ότι οι ελεύθερες ρίζες της αέριας φάσης του καπνού, επιβιώνουν σε μια σταθερή κατάσταση κατά την οποία δημιουργούνται και καταστρέφονται συνεχώς Church, 1985 #1928}{Pryor, 1985 #1930}. Υπεύθυνος για το συνεχή κύκλο παραγωγής και απόπτωσης των ελευθέρων ριζών του καπνού του τσιγάρου είναι ένας μηχανισμός που βασίζεται στη χημική λειτουργία του νιτρικού οξειδίου (NO). Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει εξαιρετικά υψηλή περιεκτικότητα σε NO {Guerin, 1980 #1933}, το οποίο μπορεί να μην είναι δραστικό με τις περισσότερες οργανικές ουσίες, αντιδρά όμως με το O_2 του αέρα και σχηματίζει το περισσότερο δραστικό NO_2 .



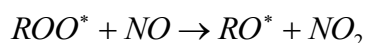
Όντας πιο δραστικό, το NO_2 μπορεί πλέον να αντιδράσει με πολλά συστατικά του καπνού και κυρίως με το ισοπρένιο {Church, 1985 #60}, το οποίο είναι ένα διένιο που βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στον καπνό του τσιγάρου.



Προϊόν της παραπάνω αντίδρασης είναι οι ανθρακικές ελεύθερες ρίζες R^* , οι οποίες αντιδρώντας με O_2 δίνουν peroxy- ελεύθερες ρίζες σύμφωνα με την αντίδραση:



Οι peroxy- ελεύθερες ρίζες αντιδρώντας με το NO μετατρέπονται σε alkoxy ελεύθερες ρίζες παράγοντας περισσότερο NO_2 .



Το NO_2 με την σειρά του αντιδρά με το υπεροξείδιο (O_2^-) και έτσι ολοκληρώνεται ένας μηχανισμός παραγωγής και αποπτώσεως ελεύθερων ριζών {Church, 1985 #60}.

Επιδράσεις του ηλεκτρονικού τσιγάρου στο οξειδωτικό στρες

Αν και η ζήτηση των ηλεκτρονικών τσιγάρων ολοένα και αυξάνεται, οι πληροφορίες για την ασφάλεια του βασιζόμενες σε φαρμακολογικά και τοξικολογικά ευρήματα είναι περιορισμένες. Οι διαθέσιμες πληροφορίες παρέχουν λεπτομέρειες για την παρουσία της νικοτίνης, των χημικών προσμίξεων του καπνού, της προπυλενογλυκόλης και των νιτροσαμινών στο υγρό αναλώσιμο των ηλεκτρονικών τσιγάρων διαφόρων εταιριών (Flouris and Oikonomou 2010). Η πώληση των ηλεκτρονικών τσιγάρων δεν συνοδεύεται από έρευνες που σχετίζονται με τις επιπτώσεις τους στην υγεία επειδή πιθανόν τα προϊόντα αυτά δεν έχουν νομοθετηθεί ως φαρμακευτικά στις περισσότερες χώρες.

Μία πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η προσπάθεια που απαιτείται για να καπνίσει κάποιος ένα ηλεκτρονικό τσιγάρο είναι μεγαλύτερη από αυτή για ένα συμβατικό. (Trtchounian, Williams et al. 2010). Αυτό το φαινόμενο εντείνεται έπειτα από

ορισμένο αριθμό εισπνοών κάνοντας τους ερευνητές να αναρωτηθούν κατά πόσο το ηλεκτρονικό τσιγάρο είναι μια αποτελεσματική συσκευή διάχυσης της νικοτίνης στους πνεύμονες. Έρευνες δείχνουν ότι ενώ οι καταναλωτές αγοράζουν το ηλεκτρονικό τσιγάρο για διάφορους λόγους, όπως η διακοπή του καπνίσματος ή η μη απαγόρευση του καπνίσματός του σε δημόσιους χώρους, ωστόσο, ενδιαφέρονται για τις πιθανές επιπτώσεις στην υγεία τους από τη χρήση αυτής της συσκευής (Etter 2010).

Οι κατασκευαστές του ηλεκτρονικού τσιγάρου ισχυρίζονται ότι το υγρό αναλώσιμο περιέχει κυρίως νικοτίνη και προπυλενογλυκόλη, ένα συστατικό χαμηλής τοξικότητας το οποίο συναντάται σε πολλά προϊόντα της καθημερινότητας. Ωστόσο έρευνες έδειξαν ότι η έκθεση στην προπυλενογλυκόλη σχετίζεται με ενοχλήσεις στο αναπνευστικό σύστημα και άσθμα (Choi, Schmidbauer et al. 2010).

Έχουν διεξαχθεί τρεις έρευνες σχετικά με την χημική ανάλυση των συστατικών του υγρού αναλώσιμου του ηλεκτρονικού τσιγάρου. Σε μία από αυτές ανιχνεύθηκαν σε χαμηλά επίπεδα, νιτροσαμίνες καπνού και άλλες προσμίξεις καπνού, όπως επίσης και διαιθυλενογλυκόλη, ένα συστατικό υψηλής τοξικότητας (Westenberger 2009). Σε άλλη έρευνα που έγινε στο υγρό αναλώσιμο ηλεκτρονικού τσιγάρου ιδιωτικής εταιρίας, ανιχνεύθηκαν και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες εκτός από καρκινογόνες νιτροσαμίνες (Laugesen 2008). Η τρίτη έρευνα που διεξήχθη δεν αναφέρει ίχνη τοξικών ή καρκινογόνων ουσιών στο υγρό αναλώσιμο του ηλεκτρονικού τσιγάρου (Leondiadis 2009).

Στο πρώτο εργαστηριακό μοντέλο που δημιουργήθηκε για την αξιολόγηση των οξείων επιπτώσεων του ηλεκτρονικού τσιγάρου σε 32 καπνιστές, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στη νικοτίνη του πλάσματος, στην καρδιακή συχνότητα και στο εκπνεόμενο CO μετά από τη χρήση 2 ηλεκτρονικών τσιγάρων

διαφορετικών εταιριών. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με την αύξηση που παρατηρείται στους παραπάνω δείκτες σε χρονικό διάστημα 5-15 λεπτών από τη χρήση συμβατικού τσιγάρου. Επίσης, ενδιαφέρον είναι το στοιχείο που προέκυψε από την ίδια μελέτη, το οποίο αναφέρει ότι το ηλεκτρονικό τσιγάρο καταστέλλει το σύμπτωμα στέρησης για 96 ώρες μετά τη χρήση του, αν και όχι τόσο αποτελεσματικά όσο το συμβατικό τσιγάρο, και γενικά είχε θετική αξιολόγηση ως προς την αποδοχή του προϊόντος (Vansickel 2010).

Σε αντίθεση με την παραπάνω έρευνα, σε μία άλλη κλινική μελέτη που πραγματοποιήθηκε, ανιχνεύτηκε νικοτίνη στο σάλιο των χρηστών των υποκατάστατων νικοτίνης και μάλιστα σε κοντινή περιεκτικότητα με αυτή των συμβατικών τσιγάρων. Σύμφωνα με τους ερευνητές, αυτό ίσως εξηγείται από τη άνιση διάχυση της νικοτίνης ανά ρουφηξιά ή σχετίζεται αποκλειστικά με τις συγκεκριμένες μάρκες ηλεκτρονικών τσιγάρων που χρησιμοποιήθηκαν (Etter 2011).

Σχετικά με τις επιδράσεις του ηλεκτρονικού τσιγάρου στο οξειδωτικό στρες, καμία εμπεριστατωμένη έρευνα δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής. Ωστόσο είναι γνωστό πως το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται σε μηχανισμούς που ευθύνονται για πλήθος ασθενειών (Papas 1999). Για το λόγο αυτό, μελετώντας την απόκριση του αντιοξειδωτικού συστήματος του ανθρώπινου οργανισμού στην έκθεση του στο ηλεκτρονικό τσιγάρο, πιθανόν να εξαχθούν συμπεράσματα για το ρόλο που παίζει το οξειδωτικό στρες στην εμφάνιση ασθενειών εξαιτίας του καπνίσματος του ηλεκτρονικού τσιγάρου.

Ερευνητικές υποθέσεις

1. Η οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου θα αυξήσει τα επίπεδα της κοτινίνης.
2. Η οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου θα αυξήσει τα επίπεδα της κοτινίνης
3. Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου θα αυξήσει τα επίπεδα της κοτινίνης.
4. Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου θα αυξήσει τα επίπεδα της κοτινίνης.
5. Η οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου θα προκαλέσει μεταβολή στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.
6. Η οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου θα προκαλέσει μεταβολή στη δραστικότητα της καταλάσης.
7. Η οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου θα προκαλέσει μεταβολή στη συγκέντρωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.
8. Η οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου θα προκαλέσει μεταβολή στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.
9. Η οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου θα προκαλέσει μεταβολή στη δραστικότητα της καταλάσης.
10. Η οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου θα προκαλέσει μεταβολή στη συγκέντρωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.
11. Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου θα προκαλέσει μεταβολή στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.

12. Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου θα προκαλέσει μεταβολή στη δραστικότητα της καταλάσης.
13. Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου θα προκαλέσει μεταβολή στη συγκέντρωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.
14. Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου θα προκαλέσει μεταβολή στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης.
15. Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου θα προκαλέσει μεταβολή στη δραστικότητα της καταλάσης.
16. Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου θα προκαλέσει μεταβολή στη συγκέντρωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.
17. Η οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου θα επηρεάσει σε μεγαλύτερο βαθμό τους τρεις αντιοξειδωτικούς δείκτες σε σχέση με την οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου.
18. Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου θα επηρεάσει σε μεγαλύτερο βαθμό τους τρεις αντιοξειδωτικούς δείκτες σε σχέση με την οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου.

Περιορισμοί της έρευνας

Στους περιορισμούς της συγκεκριμένης έρευνας συμπεριλαμβάνονται η αδυναμία να επιφέρουμε την άγνοια των συμμετεχόντων ως προς την κατάσταση στην οποία εκτίθεντο (φάση ελέγχου και πειραματική φάση), η έλλειψη επιπλέον βιοχημικών αναλύσεων δεικτών οξειδωτικού στρες, η μη αξιολόγηση δεικτών οξειδωτικού στρες σε περισσότερους ιστούς, η ανομοιογένεια του δείγματος που εξετάστηκε καθώς επίσης και η μη καταγραφή της διατροφής των συμμετεχόντων.

Ανασκόπηση Βιβλιογραφίας

I. Οι οξείες επιδράσεις του παθητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες.

Μεθοδολογία ανασκόπησης της βιβλιογραφίας

Η έκθεση στο παθητικό κάπνισμα αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα υγείας παγκοσμίως (Flouris, Metsios et al. 2008; Flouris, Vardavas et al. 2010). Οι περισσότερες από τις βλαβερές επιπτώσεις του καπνίσματος αποδίδονται στην παρουσία ελευθέρων ριζών στο καπνό του τσιγάρου όπως και στη δυνατότητα αρκετών συστατικών του να παράγουν ROS. Πλήθος ερευνών έχουν πραγματοποιηθεί σχετικά με την επίδραση του παθητικού καπνίσματος στην οξειδοαναγωγική κατάσταση χρόνια εκτεθειμένων παθητικών καπνιστών. Ωστόσο η παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση θα επικεντρωθεί στην επίδραση της οξείας έκθεσης ενός οργανισμού σε παθητικό κάπνισμα στην οξειδοαναγωγική κατάστασή του. Αυτός ο διαχωρισμός πραγματοποιείται λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το οξειδωτικό σύστημα των χρόνια παθητικών καπνιστών παρουσιάζει ήδη ανεπτυγμένες αλλαγές, ως απόκριση στην χρόνια έκθεση. Συνεπώς, υποθέσαμε ότι η μελέτη του μοντέλου της οξείας έκθεσης στο παθητικό κάπνισμα μπορεί να δώσει πιο ακριβείς πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς διαταραχής της οξειδοαναγωγικής κατάστασης. Η ανασκόπηση εστιάζεται σε μελέτες εργασιών που έχουν πραγματοποιηθεί σε ανθρώπους, ζώα και μοντέλα *in vitro* και αναλύεται η απόκριση διαφόρων ιστών, όπως η καρδιά, οι πνεύμονες, το ήπαρ, το αίμα, οι νεφροί, στο παθητικό κάπνισμα μέσω της μεταβολής δεικτών αντιοξειδωτικών μορίων και υπεροξειδωσης.

Για την διερεύνηση σχετικών μελετών εξετάστηκε η βάση δεδομένων του Medline (www.pubmed.com). Οι λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν στην αναζήτηση της βιβλιογραφίας ήταν: passive ή secondhand smoking, acute exposure, oxidative stress. Ως οξείες επιδράσεις θεωρήθηκαν αυτές οι οποίες μετρήθηκαν εντός 24 ωρών από το τέλος της έκθεσης.

Οξείες επιδράσεις του παθητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες σε ανθρώπους

Η πρώτη έρευνα που εξέτασε τις οξείες επιπτώσεις του παθητικού καπνίσματος στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του ανθρώπινου οργανισμού πραγματοποιήθηκε σε δώδεκα ενεργητικούς και δώδεκα παθητικούς καπνιστές (Schmid, Karanikas et al. 1996). Οι συμμετέχοντες εκτέθηκαν για 1 ώρα σε καπνό που δημιουργήθηκε από την καύση 30 τσιγάρων, σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία πριν την έκθεση, αμέσως μετά και 6 ώρες μετά την έκθεση στον καπνό και υπολογίστηκε η συγκέντρωση της μαλονδιαλδεϋδης (MDA) στο πλάσμα, η οποία αποτελεί δείκτη λιπιδικής υπεροξειδωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση της MDA στους μη καπνιστές αυξήθηκε έπειτα από την έκθεσή τους στον καπνό, ενώ αντίθετα, η αύξησή της στους καπνιστές δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Πιθανή εξήγηση για τη μη σημαντική αύξηση στους καπνιστές δίνεται από το γεγονός ότι οι καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές έχουν ήδη αυξημένες συγκεντρώσεις MDA στο πλάσμα. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Ahmadzadehfar, Oguogho, Efthimiou, Kritz και Sinzinger, (2006), σε 12 καπνιστές και 12 μη καπνιστές, αξιολογήθηκε η συγκέντρωση των ισοπροστανίων τύπου 8-epi-PGF2a που επίσης αποτελούν δείκτες

λιπιδικής υπεροξειδωσης. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η συγκέντρωση των ισοπροστανίων τύπου 8-epi-PGF2a αυξήθηκε στους μη καπνιστές.

Σε άλλη έρευνα όπου συμμετείχαν 15 ενεργητικοί καπνιστές και 15 μη καπνιστές, οι συμμετέχοντες εκτέθηκαν για μισή ώρα σε παθητικό καπνό από την καύση 15 τσιγάρων που έκαναν άτομα τα οποία δεν συμμετείχαν στην έρευνα. Πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία πριν την έκθεση, αμέσως μετά και 24 ώρες μετά την έκθεση. Αξιολογήθηκε η συγκέντρωση των 8-ισοπροστανίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση των 8-ισοπροστανίων αυξήθηκε σημαντικά μετά την έκθεση στους μη καπνιστές αγγίζοντας τα επίπεδα των ενεργητικών καπνιστών πριν από την έκθεση και επέστρεψε στα αρχικά επίπεδα 24 ώρες μετά την έκθεση (Kato, Inoue et al. 2006).

Στην έρευνα των Valkonen και Kuusi (1998), εξετάστηκε η επίδραση της οξείας έκθεσης στο παθητικό κάπνισμα σε παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση καρδιαγγειακών ασθενειών, όπως είναι το οξειδωτικό στρες και η λιπιδική υπεροξειδωση. Δέκα συμμετέχοντες μη καπνιστές (5 άντρες και 5 γυναίκες) εκτέθηκαν για 30 λεπτά σε παθητικό καπνό που προήλθε από την καύση 16 τσιγάρων από ενεργητικούς καπνιστές. Πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες, πριν την έκθεση, 1,5 ώρες και 6 ώρες μετά την έκθεση. Κατά την ανάλυση των δειγμάτων έγινε αξιολόγηση ορισμένων αντιοξειδωτικών μορίων του αίματος, της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του αίματος, καθώς και δεικτών λιπιδικής υπεροξειδωσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις της βιταμίνης E, της βιταμίνης A, του β-καροτενίου και του ουρικού οξέος παρέμειναν αμετάβλητες. Αντίθετα, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του αίματος εκτιμώμενη μέσω της TRAP μειώθηκε σημαντικά κατά 31% 1,5 ώρες μετά την έκθεση και επέστρεψε στα αρχικά επίπεδα 6 ώρες μετά.

Τέλος, στην έρευνα του Hockertz και των συνεργατών του (1994), μελετήθηκε η ικανότητα των πολυμορφικών ουδετερόφιλων να παράγουν ουσίες οι οποίες μεσολαβούν στη δημιουργία δραστικών στοιχείων οξυγόνου (ROI: reactive oxygen intermediates). Δέκα συμμετέχοντες (5 καπνιστές και 5 μη καπνιστές) εκτέθηκαν για 8 ώρες σε παθητικό καπνό που δημιουργήθηκε με την καύση 24 τσιγάρων. Πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες πριν και μετά την έκθεση και τα αποτελέσματα δεν έδειξαν καμία σημαντική μεταβολή σε κάποιον δείκτη.

Οξείες επιδράσεις του παθητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες σε ζώα.

Για τη μελέτη των επιδράσεων του παθητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες σε ζώα, η αξιολόγηση των δεικτών πραγματοποιήθηκε σε ιστούς όπως η καρδιά, το ήπαρ, οι πνεύμονες, οι νεφροί και το αίμα.

Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα προκάλεσε μείωση της δραστηριότητας της καταλάσης (CAT) στα ερυθρά κύτταρα ποντικών. Παράλληλα αυξήθηκε η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) η οποία είναι ένα ένζυμο που μετατρέπει την ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) σε οξειδωμένη (GSSG). Τέλος, παρατηρήθηκε μείωση της GSH στο πλάσμα των ποντικών (Swarnam, Sreekanth et al. 2005). Σε άλλη έρευνα που έγινε σε ποντίκια, η εξέταση που έγινε στο πλάσμα έδειξε ότι η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα επέφερε αύξηση των λιπιδικών υπεροξειδίων (ROOH) και των 8-epi-PGF2a ισοπροστανίων, ισχυρούς δείκτες λιπιδικής υπεροξειδωσης στο αίμα (Cavarra, Lucattelli et al. 2001). Στην ίδια έρευνα δεν παρατηρήθηκε κάποια μεταβολή στην συγκέντρωση της βιταμίνης E.

Σε αναλύσεις δειγμάτων πνευμονικού ιστού ποντικών που συλλέχθηκαν έπειτα από οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα, παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωση της GSH μειώθηκε. Παράλληλα εξετάστηκε και η δραστηριότητα της CAT η οποία βρέθηκε μειωμένη ως αποτέλεσμα της έκθεσης. Ενδεικτικό της εξασθένησης που προκαλεί το παθητικό κάπνισμα στο αντιοξειδωτικό σύστημα ήταν και η μείωση του glucuronide το οποίο είναι μόριο αποφασιστικής σημασίας στον μεταβολισμό της χολερυθρίνης από το ήπαρ, δείγμα της ανισορροπίας που προκαλείται ανάμεσα στην αντιοξειδωτική και την οξειδωτική δραστηριότητα του οργανισμού κατά την φάση της έκθεσης στο παθητικό κάπνισμα (Swarnam, Sreekanth et al. 2005).

Σε άλλη έρευνα, η οποία πραγματοποιήθηκε σε πνευμονικό ιστό ποντικών, ως αποτέλεσμα της οξείας έκθεσης στο παθητικό κάπνισμα, παρατηρήθηκε αύξηση της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) έπειτα από 1 ώρα έκθεσης και σταδιακή μείωση έως και 6 ώρες μετά (Li, Rahman et al. 1996). Ενδεικτικό της πρόκλησης οξειδωτικού στρες από την οξεία έκθεση σε παθητικό κάπνισμα είναι και το γεγονός ότι σε μετρήσεις που έγιναν στο λάρυγγα ποντικών, παρατηρήθηκε αύξηση των ελευθέρων ριζών (ROS) ως απόκριση στο ερέθισμα του καπνού του τσιγάρου (Uneri, Sari et al. 2006).

Σημαντικά είναι τα ευρήματα έρευνας σχετικά με τα επίπεδα της οξειδωτικής βλάβης που προκαλείται σε ιστούς ποντικών όπως οι πνεύμονες, το συκώτι και η καρδιά, από το οξειδωτικό στρες εξαιτίας της έκθεσης σε παθητικό καπνό. Σε ανάλυση που έγινε στο γενετικό υλικό αυτών των ιστών παρατηρήθηκε σημαντική οξειδωτική βλάβη στο DNA των κυττάρων (Howard, Briggs et al. 1998). Τέλος, στην έρευνα του Argacha και των συνεργατών του (2008), εξετάστηκε η παραγωγή

ανιόντων υπεροξειδίου στην θωρακική αορτή ποντικών, η οποία βρέθηκε σημαντικά αυξημένη.

Οξείες επιδράσεις του παθητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες σε μοντέλα in vitro

Οι περισσότερες έρευνες σχετικά με τις οξείες επιδράσεις του παθητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες, έχουν πραγματοποιηθεί σε μοντέλα in vitro. Σε μελέτες που έγιναν σχετικά με τις επιδράσεις του παθητικού καπνίσματος σε αντιοξειδωτικά μόρια του πλάσματος παρατηρήθηκε ότι η οξεία έκθεση στον καπνό μείωσε την συγκέντρωση του ουρικού οξέος, του ασκορβικού οξέος, του β-καροτενίου και του αντιοξειδωτικού συνενζύμου Q₁₀ (Eiserich, van der Vliet et al. 1995) καθώς της συγκέντρωσης της χολερυθρίνης (Frei, Forte et al. 1991).

Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα διάρκειας 24 ωρών των επιθηλιακών κυττάρων αμφιβληστροειδούς ενηλίκων και εμβρύων και των τύπου II επιθηλιακών κυττάρων των πνευμονικών κυψελίδων προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης της GSH (Kode, Yang et al. 2006; Jia, Liu et al. 2007; Bertram, Baglole et al. 2009). Παρόμοια, μείωση των επιπέδων της GSH παρατηρήθηκε στους πνευμονικούς ινοβλάστες ανθρώπων (Baglole, Bushinsky et al. 2006) έπειτα από οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα καθώς και στα λεμφοκύτταρα των ανθρώπων (Hasnis, Bar-Shai et al. 2007).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, σε έρευνα όπου μελετήθηκε η συγκέντρωση της GSH στα τύπου II επιθηλιακά κύτταρα των πνευμονικών κυψελίδων 24 ώρες μετά από έκθεση στο παθητικό κάπνισμα, παρατηρήθηκε μείωση της GSH και ταυτόχρονη αύξηση της συνθετάσης της γ-γλουτάμυλο-κυστεΐνης (γ-GCS), η οποία λειτούργησε

ως προστατευτικός μηχανισμός των κυττάρων ενάντια στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το παθητικό κάπνισμα (Rahman, Smith et al. 1996).

Η έκθεση στο παθητικό κάπνισμα επηρέασε και τη δραστικότητα ορισμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Η έκθεση στην τοξική ακρολεΐνη για 24 ώρες μείωσε την δραστικότητα της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του αμφιβληστροειδούς (Jia, Liu et al. 2007). Επίσης σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* σε καρδιακά και εγκεφαλικά κύτταρα παρατηρήθηκε μείωση της δραστικότητας της καταλάσης (Mendez-Alvarez, Soto-Otero et al. 1998).

Σε άλλες έρευνες, ανιχνεύτηκε αυξημένη η συγκέντρωση του O_2^- και του H_2O_2 στην μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων αμέσως μετά από 10 και 30 λεπτά έκθεσης στο παθητικό κάπνισμα, η προοξειδωτική δράση των οποίων περιορίστηκε εξ αιτίας τις παρουσίας των αντιοξειδωτικών (Bertram, Baglole et al. 2009). Τέλος, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στα επιθηλιακά κύτταρα της περιοχής των αναπνευστικών βρογχολίων, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης των ROS (Baglole, Bushinsky et al. 2006).

Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας τα παραπάνω ευρήματα των ερευνών, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως η έκθεση στο παθητικό κάπνισμα έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένηση του αντιοξειδωτικού συστήματος. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε σημαντική οξειδωτική βλάβη στους ιστούς, όπως αυτή διαφαίνεται από την μείωση των συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών μορίων, τη μείωση της δραστικότητας των

αντιοξειδωτικών ενζύμων, την αύξηση των προϊόντων της λιπιδικής υπεροξειδωσης και της οξειδωσης των πρωτεϊνών και του DNA.

Στους ανθρώπους, όλοι οι δείκτες οξειδωτικού στρες αυξάνονται αμέσως μετά την έκθεση στο παθητικό κάπνισμα και επιστρέφουν στα αρχικά επίπεδα μέσα σε 6 ώρες. Στα ζώα και στις καλλιέργειες κυττάρων προκαλούνται άμεσες μεταβολές στους δείκτες οξειδωτικής βλάβης οι οποίοι επιστρέφουν στα αρχικά επίπεδα 6 έως 24 ώρες μετά την έκθεση.

Επίσης παρατηρείται ότι κάθε ιστός ανταποκρίνεται διαφορετικά στην οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα, στοιχείο που πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη κατά την αξιολόγηση των δεικτών οξειδωτικού στρες. Συνεπώς είναι σημαντικό να αξιολογούνται περισσότεροι από ένας ιστός κάθε φορά έτσι ώστε να δίνεται μία σαφέστερη εικόνα για το ποιοι ιστοί υφίστανται περισσότερο ή λιγότερο τις συνέπειες της οξείας έκθεσης στον παθητικό καπνό, στο οξειδοαναγωγικό τους προφίλ.

II. Οι οξείες επιδράσεις του ενεργητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες

Μεθοδολογία ανασκόπησης της βιβλιογραφίας

Το κάπνισμα αποτελεί έναν πολύ σημαντικό παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου, καρδιαγγειακών και αναπνευστικών ασθενειών και για κάθε ένα άτομο που πεθαίνει εξαιτίας του καπνίσματος, είκοσι άτομα υποφέρουν το ελάχιστο από μία ασθένεια που σχετίζεται με το κάπνισμα (US Department of Health and Human Services, 2001). Οι καπνιστές ηλικίας 45-64 ετών έχουν τρεις φορές μεγαλύτερο ποσοστό θνησιμότητας συγκριτικά με τους μη καπνιστές, ενώ ανάμεσα σε καπνιστές 65-84 ετών ο ρυθμός θνησιμότητας διπλασιάζεται (United Nations. World population prospects 1990).

Ο καπνός του τσιγάρου είναι ένα μείγμα πάνω από 4000 χημικών ουσιών οι οποίες περιέχουν πολλά βιοενεργά μόρια που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις με το ανθρώπινο βιολογικό σύστημα (Cross, Traber et al. 1999). Ένα μονοπάτι το οποίο συμβάλλει σε όλες τις ανεπιθύμητες επιδράσεις του τσιγάρου, είναι η έκθεση του οργανισμού στο οξειδωτικό στρες (Alberg, Chen et al. 2000). Μία ρουφηξιά του τσιγάρου εκθέτει τον καπνιστή σε 10^{15} ελεύθερες ρίζες και άλλα οξειδωτικά και επιπροσθέτως παρόμοιες χημικές ουσίες περιέχονται και στην πίσσα του τσιγάρου (Winkel and Statland 1981).

Εξετάστηκε η βάση δεδομένων του Medline (www.pubmed.com). Οι λέξεις κλειδιά που χρησιμοποιήθηκαν στην αναζήτηση της βιβλιογραφίας ήταν: active smoking, acute exposure, oxidative stress και redox status. Ως οξείες επιδράσεις θεωρήθηκαν αυτές οι οποίες μετρήθηκαν εντός 24 ωρών από το τέλος της έκθεσης.

Επιλέχθηκαν τα άρθρα τα οποία περιέγραφαν τις οξείες επιδράσεις του ενεργητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες σε ανθρώπους, ζώα και μοντέλα *in vitro*.

Οξείες επιδράσεις του ενεργητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες σε ανθρώπους

Στις μελέτες που εντοπίστηκαν, οι οξείες επιδράσεις του ενεργητικού καπνίσματος εξετάστηκαν στον εκπνεόμενο αέρα, στο αίμα και στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF) των ανθρώπων. Στις πιο πολλές μελέτες τα αποτελέσματα έδειξαν άμεση αύξηση στους δείκτες οξειδωτικού στρες έπειτα από την έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα, σε μερικές όμως δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή.

Σε μελέτη που έγινε σε 12 καπνιστές και 10 μη καπνιστές για την οξεία επίδραση του καπνίσματος στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του ανθρώπινου οργανισμού, παρατηρήθηκε ότι 15 λεπτά μετά την έκθεση στο τσιγάρο το 8-ισοπροστάνιο, το οποίο αποτελεί προϊόν λιπιδικής υπεροξείδωσης, αυξήθηκε κατά 50% (Montuschi, Collins et al. 2000). Σε μία άλλη έρευνα στον εκπνεόμενο αέρα 12 καπνιστών και 10 μη καπνιστών, δείγματα συλλέχθηκαν πριν την έκθεση και μισή ώρα μετά την κατανάλωση ενός τσιγάρου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) αυξήθηκε στους καπνιστές (Guatura, Martinez et al. 2000).

Σε άλλη έρευνα, αφού δόθηκε σε 24 καπνιστές να καπνίσουν από ένα τσιγάρο, στη συνέχεια μετρήθηκε στον εκπνεόμενο αέρα τους η συγκέντρωση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) ένα λεπτό και 10 λεπτά μετά το κάπνισμα. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι η συγκέντρωση του eNO αυξήθηκε στα πρώτα 10 λεπτά και επέστρεψε στα φυσιολογικά επίπεδα 20 λεπτά έπειτα από την έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα

(Chambers, Tunnicliffe et al. 1998). Ωστόσο σε μία άλλη έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε 41 καπνιστές και 73 μη καπνιστές, η συγκέντρωση του NO μειώθηκε 5 λεπτά μετά την έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα (Kharitonov, Robbins et al. 1995).

Αναφορικά με το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα, σε έρευνα που έγινε, προέκυψε αύξηση της απελευθέρωσης των σουπεροξειδίων των λευκοκυττάρων, γεγονός που εξηγείται από το ότι οι συμμετέχοντες ήταν χρόνια καπνιστές και είχαν ήδη υψηλά επίπεδα σουπεροξειδίων (Morrison, Rahman et al. 1999). Στην ίδια έρευνα μετά την έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα παρατηρήθηκε αύξηση των TBARS στο πλάσμα και μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, ενώ τα επίπεδα των συγκεντρώσεων της GSH και της GSSG παρέμειναν αμετάβλητα.

Σε άλλη έρευνα, 20 καπνιστές κάπνισαν ένα τσιγάρο και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αιμοληψία. Από τις αναλύσεις που έγιναν στο πλάσμα προέκυψε ότι αντιοξειδωτικά μόρια όπως το ασκορβικό οξύ, η κυστεΐνη, η μεθειονίνη και το ουρικό οξύ σημείωσαν μείωση έπειτα από την έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα (Tsuchiya, Asada et al. 2002). Επίσης, στην ίδια έρευνα παρατηρήθηκε μείωση και στις συγκεντρώσεις των νιτρικών (NO^{3-}) και των νιτρωδών (NO^{2-}) αλάτων.

Τέλος, στην έρευνα του Morrow και των συνεργατών του (1995), έπειτα από την κατανάλωση 3 τσιγάρων μέσα σε 30 λεπτά, σε ανάλυση που έγινε στο πλάσμα των συμμετεχόντων δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή στον αριθμό των F_2 -ισοπροστανίων (προϊόν λιπιδικής υπεροξειδωσης), ίσως γιατί οι συμμετέχοντες ήταν χρόνιοι καπνιστές και ήδη είχαν αυξημένα ποσοστά των F_2 -ισοπροστανίων.

Οξείες επιδράσεις του ενεργητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες σε ζώα

Οι οξείες επιδράσεις του ενεργητικού καπνίσματος σε δείκτες οξειδωτικού στρες σε μοντέλα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ζώα, αξιολογήθηκαν σε ιστούς όπως οι πνεύμονες, η καρδιά, το ήπαρ, το αίμα και το βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα (BALF). Σε έρευνες που έγιναν στον πνευμονικό ιστό ποντικών βρέθηκε ότι η έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα είχε ως άμεσο αποτέλεσμα τη μείωση της GSH και μάλιστα στις 2-6 ώρες μετά την έκθεση, η συγκέντρωσή της ανέβηκε πιο πάνω και από το baseline (Ishizaki, Kishi et al. 1996). Ωστόσο, σε άλλη έρευνα η συγκέντρωση της GSH μειώθηκε και μετά από 1 ώρα από την έκθεση, επανήλθε στα φυσιολογικά επίπεδα (Bilimoria and Ecobichon 1992). Επίσης η συγκέντρωση της GSSG αυξήθηκε στη μία ώρα μετά την έκθεση και άρχισε να μειώνεται με το πέρασμα των ωρών ώσπου να σταθεροποιηθεί στις 24 ώρες (Li, Rahman et al. 1996).

Ως αποτέλεσμα της έκθεσης στο ενεργητικό κάπνισμα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση ενός δείκτη οξειδωτικού στρες στο πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA, το 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), όπως επίσης και μίας ιδιαιτέρως αντιδραστικής αλδεύδης που παράγεται κατά την υπεροξείδωση των λιπών, τη 4-hydroxy-2-nonenal (4-hydroxynonenal, 4-HNE) (Ishizaki, Kishi et al. 1996). Τέλος, σε μία άλλη έρευνα που έγινε σε πνευμονικό ιστό ποντικών παρατηρήθηκε αύξηση της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου (i-NOs και e-NOs) (Wright, Dai et al. 1999).

Σε μελέτες που έγιναν στο BALF ποντικών, παρατηρήθηκε και εκεί μείωση της συγκέντρωσης της GSH (Cotgreave, Johansson et al. 1987; Li, Rahman et al. 1996) και αντίστοιχα αύξηση της GSSG (Cavarra, Lucattelli et al. 2001). Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα της έρευνας που έγινε στο βρογχοκυψελιδικό έκπλυμα

ποντικίων και έδειξαν αύξηση των επιπέδων του 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) και μείωση της αντιοξειδωτικής ικανότητας (TEAC) στο BALF (Aoshiba, Koiuma et al. 2003).

Μελετώντας την απόκριση των δεικτών οξειδωτικού στρες στο πλάσμα των ζώων και συγκεκριμένα των ποντικών, μετά από οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα, παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρξε καμία μεταβολή στη συγκέντρωση της GSH πριν και μετά την έκθεση (Cotgreave, Johansson et al. 1987). Ενδεικτικό του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το ενεργητικό κάπνισμα είναι τα αποτελέσματα έρευνας που δείχνουν αύξηση του 8-epi-PGF_{2α}, δείκτη λιπιδικής υπεροξείδωσης στο πλάσμα (Cavarra, Lucattelli et al. 2001). Τέλος, σε δύο άλλες έρευνες παρατηρήθηκε μείωση στους αντιοξειδωτικούς δείκτες methylumbelliferone και ferroxidase του πλάσματος των ποντικών έπειτα από έκθεση σε ενεργητικό κάπνισμα (Uotila 1982; Ishizaki, Kishi et al. 1996).

Οξείες επιδράσεις του ενεργητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες σε μοντέλα in vitro

Στις έρευνες που εξετάζουν τις οξείες επιδράσεις του ενεργητικού καπνίσματος στο οξειδωτικό στρες σε μοντέλα in vitro, λαμβάνουν μέρος διάφορα κύτταρα όπως τα τύπου II επιθηλιακά κύτταρα των ανθρώπινων κυψελίδων και τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Μείωση της συγκέντρωσης της GSH έπειτα από οξεία έκθεση σε ενεργητικό κάπνισμα παρατηρήθηκε σε τρεις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες (Carnevali, Petruzzelli et al. 2003), σε τύπου II επιθηλιακά κύτταρα των ανθρώπινων κυψελίδων (Li, Donaldson et al. 1994), σε φαγοκύτταρα του αναπνευστικού και επιθηλιακά κύτταρα (Bridgeman, Marsden et al. 1994).

Ωστόσο σε μετρήσεις που έγιναν στα τύπου II επιθηλιακά κύτταρα των ανθρώπινων κυψελίδων, 24 ώρες μετά την έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα παρατηρήθηκε αύξηση της GSH και της συνθετάσης της γ - γλουταμιλκυστεΐνης (γ -GCS) (Rahman, Smith et al. 1996). Η αύξηση των δεικτών αυτών ερμηνεύεται σαν προσπάθεια του οργανισμού να δημιουργήσει έναν προστατευτικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό σαν απόκριση στο ενεργητικό κάπνισμα.

Ως επιβεβαίωση της ισχυρής οξειδωτικής δράσης των ελευθέρων ριζών του καπνού του τσιγάρου, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα, παρατηρήθηκε απελευθέρωση της GSSG έπειτα από 30 λεπτά έκθεσης σε περιβάλλον ενεργητικού (Noronha-Dutra, Epperlein et al. 1993).

Σε μία άλλη έρευνα που έγινε σε κύτταρα τραχείας ποντικών, στην ιστοχημική ανάλυση φάνηκε συνεχής παραγωγή H_2O_2 και ανιόντα του υπεροξειδίου O_2^- στην μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων, έπειτα από οξεία έκθεση σε ενεργητικό κάπνισμα (Hobson, Wright et al. 1991). Αύξηση της συγκέντρωσης του NO στα ενδοθηλιακά κύτταρα παρατηρήθηκε έπειτα από το πέρας 24 ωρών από την έκθεση (Tuder, Wood et al. 2000) , σε αντίθεση με άλλη έρευνα όπου υπήρξε μείωση του NO και των iNOs (Hoyt, Robbins et al. 2003).

Συμπεράσματα

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτει το συμπέρασμα ότι η οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα προκαλεί οξειδωτικό στρες και στα τρία μοντέλα (άνθρωποι, ζώα, *in vitro*). Η αναλογία GSH/GSSG η οποία αντικατοπτρίζει την ισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών, μειώνεται έπειτα από οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα και στα τρία μοντέλα. Ωστόσο σε μία έρευνα που έγινε στο BALF των ανθρώπων, δεν παρουσιάστηκε κάποια μεταβολή στη συγκεκριμένη αναλογία. Πιθανή εξήγηση για αυτό ίσως δίνεται από το γεγονός ότι υπάρχει διαφορετικότητα μεταξύ των ποσοτήτων καπνού ή των ιστών όπου πραγματοποιούνται αναλύσεις.

Επίσης, από τα ευρήματα των ερευνών παρατηρήθηκε πρόκληση λιπιδικής υπεροξειδωσης στους ανθρώπους και στα ζώα εξαιτίας της έκθεσης στο ενεργητικό κάπνισμα όχι όμως και στα μοντέλα *in vitro*.

Αναφορικά με το πώς μεταβάλλεται χρονικά η αντιοξειδωτική ισορροπία του οργανισμού, παρατηρήθηκε ότι την αρχική μείωση της GSH ακολουθεί η επαναφορά της σε φυσιολογικές τιμές μέσα σε χρονικό διάστημα 90 λεπτών. Μάλιστα σε μία έρευνα σημειώθηκε και αύξηση της GSH από τις baseline τιμές έπειτα από 24 ώρες, γεγονός που υποδεικνύει έναν προστατευτικό μηχανισμό των κυττάρων ενάντια στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από το ενεργητικό κάπνισμα.

Συνοψίζοντας, φαίνεται ότι το ενεργητικό κάπνισμα αυξάνει τους δείκτες οξειδωτικού στρες σε όλα τα μοντέλα και οδηγεί ακόμη και σε σημαντικές βλάβες της κυτταρικής μεμβράνης. Η ισορροπία GSH/GSSG παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην προστασία του οργανισμού ενάντια στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα.

Μεθοδολογία

Συμμετέχοντες

Το πειραματικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Εσωτερική Επιτροπή Δεοντολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού (ΤΕΦΑΑ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Δύο ομάδες ενήλικων εθελοντών προσφέρθηκαν εθελοντικά να συμμετάσχουν δίνοντας την προφορική και την ενυπόγραφη συγκατάθεση τους αφού πρώτα ενημερώθηκαν για όλους τους κινδύνους, τις επιπτώσεις και τα οφέλη που προκύπτουν από τη μελέτη. Η μία ομάδα αποτελούνταν από 15 καπνιστές (≥ 15 τσιγάρα/ημέρα; 8 άντρες; 7 γυναίκες; 36.8 ± 9.9 έτη; Δείκτης Μάζας Σώματος $25.6 \pm 4.1 \text{ kg/m}^2$) και η άλλη ομάδα από 15 μη καπνιστές (8 άντρες; 7 γυναίκες; 28.87 ± 10.5 έτη; Δείκτης Μάζας Σώματος $23.6 \pm 3.0 \text{ kg/m}^2$). Κριτήρια αποκλεισμού των εθελοντών αποτελούσαν: εγκυμοσύνη, συμπτώματα οξείας ασθένειας, μη φυσιολογικές τιμές σπιρομέτρησης, παθήσεις του καρδιαγγειακού και του αναπνευστικού συστήματος και/ή φαρμακευτική αγωγή αυτών, άτομα που έπασχαν από οποιαδήποτε μορφής ασθένεια ή νόσημα ή ελάμβαναν φαρμακευτική αγωγή η οποία να επηρεάζει τη λειτουργία των πνευμόνων, λήψη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων. Επίσης κριτήριο αποκλεισμού αποτέλεσε και η χρήση ηλεκτρονικού τσιγάρου από τους καπνιστές κατά το παρελθόν. Για τους μη καπνιστές επιπλέον κριτήριο αποκλεισμού αποτελεί το κάπνισμα.

Οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε τρεις διαφορετικές δοκιμασίες οι οποίες έλαβαν χώρα στο εργαστήριο Εργοφυσιολογίας του ΤΕΦΑΑ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με τυχαία χρονική σειρά. Απαραίτητη προϋπόθεση ήταν να μεσολαβεί ελάχιστο χρονικό διάστημα 5 ημερών ανάμεσα στις τρεις διαφορετικές συνθήκες έκθεσης των εθελοντών. Οι συμμετέχοντες όφειλαν κατά την προσέλευσή τους στο

εργαστήριο να έχουν κάνει νηστεία 10 ωρών, να έχουν αποφύγει έντονη σωματική δραστηριότητα για 72 ώρες και να έχουν αποφύγει το κάπνισμα ή της έκθεση σε καπνό το προηγούμενο βράδυ. Κατά την διάρκεια του πειράματος απαγορεύονταν η πρόσληψη τροφής, επιτρέπονταν ωστόσο η πρόσληψη νερού.

Πειραματικό πρωτόκολλο καπνιστών εθελοντών

Η ομάδα των καπνιστών υποβλήθηκε σε τρεις συνολικά δοκιμασίες οι οποίες περιελάμβαναν την κατάσταση ελέγχου (ACTIVE_{CON}), την κατάσταση δοκιμής συμβατικού τσιγάρου (ACTIVE_{TOB}) και την κατάσταση δοκιμής ηλεκτρονικού τσιγάρου (ACTIVE_{E-CIG}). Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν πριν την κάθε δοκιμασία, αμέσως μετά και μία ώρα μετά την κάθε δοκιμασία. Επίσης, πριν από κάθε δοκιμασία πραγματοποιήθηκε μέτρηση του εκπνεόμενου μονοξειδίου του άνθρακα (CO) και αν τα επίπεδα του CO ≤ 15 parts per million (ppm) η δοκιμασία συνεχιζόταν όπως αρχικά είχε προγραμματιστεί. Αντιθέτως, εάν CO > 15 ppm ή οι δοκιμαζόμενοι δήλωναν ότι κάπνισαν ή ότι εκτέθηκαν σε παθητικό κάπνισμα τις προηγούμενες 10 ώρες, η δοκιμασία προγραμματιζόνταν εκ νέου.

Αναλυτικά, στην κατάσταση ελέγχου (ACTIVE_{CON}), ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να «καπνίσουν» ένα μη αναμμένο τσιγάρο της δικής τους μάρκας για 30 λεπτά. Στην κατάσταση συμβατικού τσιγάρου (ACTIVE_{TOB}), οι συμμετέχοντες έπρεπε να καπνίσουν δύο τσιγάρα της μάρκας τους μέσα σε 30 λεπτά. Τέλος στην κατάσταση ηλεκτρονικού τσιγάρου (ACTIVE_{E-CIG}), ζητήθηκε από τους καπνιστές να καπνίσουν συγκεκριμένο αριθμό ρουφηξιών από ηλεκτρονικό τσιγάρο (συσκευή: GIANT, NOBACCO G.P., Greece), σε χρονική διάρκεια 30 λεπτών. Το υγρό αναλώσιμο (NOBACCO USA MIX, NOBACCO G.P., Greece) του ηλεκτρονικού

τσιγάρου που χρησιμοποιήθηκε είχε γεύση καπνού και περιείχε νικοτίνη 11mg/ml, τιμή που αποτελεί ένα μέσο όρο περιεκτικότητας μιας και το εύρος των υγρών αναλώσιμων σε νικοτίνη κυμαίνεται από 0 έως 36 mg/ml.

Σύμφωνα με προηγούμενες έρευνες, έχει παρατηρηθεί μία σημαντικά χαμηλότερη απορρόφηση της νικοτίνης μέσω του ηλεκτρονικού τσιγάρου συγκριτικά με το συμβατικό τσιγάρο. Έτσι, υπολογίστηκε ο αριθμός των ρουφηξιών που απαιτείται από τους χρήστες του ηλεκτρονικού τσιγάρου, ώστε η ποσότητα της νικοτίνης που εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό να ισοδυναμεί με την ποσότητα της νικοτίνης που εισπνέεται μέσω του καπνίσματος ενός συμβατικού τσιγάρου. Για τον υπολογισμό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω δεδομένα:

- i. Η περιεκτικότητα του συμβατικού τσιγάρου σε νικοτίνη.
- ii. Ο λόγος της απορρόφησης της νικοτίνης ενός συμβατικού τσιγάρου προς αυτή του ηλεκτρονικού τσιγάρου.
- iii. Η περιεκτικότητα σε νικοτίνη του υγρού αναλώσιμου του ηλεκτρονικού τσιγάρου.
- iv. Ο αριθμός των ρουφηξιών του ηλεκτρονικού τσιγάρου που απαιτείται, ώστε να καταναλωθεί 1 ml νικοτίνης.

Οι πληροφορίες που απαιτούνται για τα παραπάνω δεδομένα αποκτήθηκαν μέσω μιας υπο-μελέτης που πραγματοποιήθηκε σε 178 καπνιστές ηλεκτρονικού τσιγάρου οι οποίοι ήταν πρώην καπνιστές συμβατικού τσιγάρου. Δεδομένου ότι η πλειοψηφία των ηλεκτρονικών τσιγάρων πωλείται στον διαδικτυο, φυσικό ήταν αυτό να αποτελέσει το πιο κατάλληλο μέσο εύρεσης χρηστών ηλεκτρονικού τσιγάρου. Τη χρονική περίοδο από 14 Σεπτεμβρίου έως 13 Δεκεμβρίου 2011 αναρτήθηκαν στην ιστοσελίδα www.surveymonkey.com δύο έντυπα έρευνας στην ελληνική και αγγλική

γλώσσα. Οι συμμετέχοντες δήλωσαν ότι υπήρξαν στο παρελθόν καπνιστές συμβατικού τσιγάρου- μάλιστα δήλωσαν και τη μάρκα τους- και νυν καπνιστές του ηλεκτρονικού τσιγάρου. Στο έντυπο έρευνας, ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να απαντήσουν στις πέντε παρακάτω ερωτήσεις:

1. Πόσα συμβατικά τσιγάρα συνηθίζατε να καπνίζετε ημερησίως; (απάντηση: από 1 έως >120, με προσαύξηση στο 1).
2. Ποιάς μάρκας τσιγάρα συνηθίζατε να καπνίζετε;
3. Ποιά είναι η ποσότητα (σε mg) νικοτίνης των αναλώσιμων που χρησιμοποιείτε για το ηλεκτρονικό τσιγάρο; (απάντηση: από 1 έως >36 με προσαύξηση στο 1)
4. Πόσα ml υγρού αναλώσιμου χρησιμοποιείτε κατά μέσο όρο ημερησίως; (απάντηση: από 0.5 έως 10 με προσαύξηση στο 1)
5. Πόσες ρουφηξιές πραγματοποιείτε με το ηλεκτρονικό τσιγάρο ώστε να καπνίσετε 1 ml νικοτίνης; (απάντηση: από 1 έως > 200 με προσαύξηση στο 1)

Τα αποτελέσματα της έρευνας και συγκεκριμένα οι τέσσερις πρώτες ερωτήσεις έδειξαν ότι η κατανάλωση νικοτίνης μέσω της χρήσης ηλεκτρονικού τσιγάρου ήταν 1.5 φορές μεγαλύτερη από το συμβατικό τσιγάρο. Οπότε, ο λόγος της απορρόφησης νικοτίνης συμβατικού τσιγάρου προς την απορρόφηση νικοτίνης του ηλεκτρονικού τσιγάρου ισούται με 1.5. Τα αποτελέσματα της 5^{ης} ερώτησης έδειξαν ότι ο μέσος αριθμός ρουφηξιών του ηλεκτρονικού τσιγάρου μπορεί να διορθωθεί ώστε να συμφωνεί με το συμβατικό τσιγάρο λαμβάνοντας υπόψη την περιεκτικότητα σε νικοτίνη του υγρού αναλώσιμου. Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω ο αριθμός των ρουφηξιών ενός ηλεκτρονικού τσιγάρου που ισούται με αυτόν ενός συμβατικού τσιγάρου μπορεί να υπολογιστεί από τον τύπο:

$$\text{e-cigarette puffs} = (\text{TOB}_{\text{NIC}} \cdot 1.5 \cdot 50) / \text{eCIG}_{\text{NIC}}$$

όπου:

TOB_{NIC} : είναι η περιεκτικότητα ενός συμβατικού τσιγάρου σε νικοτίνη (σε mg),

1.5 : είναι ο λόγος απορρόφησης νικοτίνης συμβατικού τσιγάρου / απορρόφησης νικοτίνης ηλεκτρονικού τσιγάρου,

50 : είναι ο μέσος όρος ρουφηξιών ώστε να καταναλωθεί 1 ml υγρού αναλώσιμου,

eCIG_{NIC} : είναι τα mg νικοτίνης ανά ml υγρού αναλώσιμου.

Η παραπάνω εξίσωση χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί ο συνολικός αριθμός ρουφηξιών κατά τη δοκιμή του ηλεκτρονικού τσιγάρου από τους καπνιστές και πολλαπλασιάστηκε με 2 γιατί κατά τη διάρκεια της δοκιμής του συμβατικού τσιγάρου, οι καπνιστές κάπνισαν δύο τσιγάρα.

Πειραματικό πρωτόκολλο μη καπνιστών εθελοντών

Στην κατάσταση ελέγχου ($\text{PASSIVE}_{\text{CON}}$) οι συμμετέχοντες ανέπνεαν φυσιολογικό ατμοσφαιρικό αέρα ανάλογο του επιπέδου της θάλασσας για 1 ώρα μέσα σε ειδικά διαμορφωμένο θάλαμο 60m^3 . Στην κατάσταση έκθεσης σε συμβατικό τσιγάρο ($\text{PASSIVE}_{\text{TOB}}$), οι συμμετέχοντες εκτέθηκαν για 1 ώρα σε παθητικό κάπνισμα και στη κατάσταση έκθεσης σε ηλεκτρονικό τσιγάρο ($\text{PASSIVE}_{\text{E-CIG}}$), οι συμμετέχοντες εκτέθηκαν για μία ώρα σε ατμό ηλεκτρονικού τσιγάρου στον ίδιο θάλαμο των 60m^3 . Κατά την διάρκεια των τριών καταστάσεων οι συμμετέχοντες κάθισαν αναπαυτικά για 1 ώρα εντός ενός ειδικά διαμορφωμένου και μονωμένου δωματίου (διαστάσεις: 6 x 5 x 4) στο χώρο του ΤΕΦΑΑ στο οποίο η θερμοκρασία, η ταχύτητα αέρα και η υγρασία παρέμειναν σταθερές σε όλη την διάρκεια της έκθεσης (24°C , $0.05\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$, 45% αντίστοιχα). Στην πειραματική κατάσταση έκθεσης σε καπνό

συμβατικού τσιγάρου (PASSIVE_{CON}), οι συμμετέχοντες εκτέθηκαν στο παθητικό κάπνισμα στο οποίο η συγκέντρωση μονοξειδίου του άνθρακα (CO) του καπνού διαμορφώθηκε στα 23 ± 1 ppm σύμφωνα με επίπεδα μπαρ/εστιατορίων (Jo, Oh και Dong, 2004). Κατά την διάρκεια της έκθεσης πραγματοποιούνταν συνεχώς έλεγχος της συγκέντρωσης του CO και στην περίπτωση που εντοπίζονταν μείωση, καταναλώνονταν εκ νέου τσιγάρα μέχρι να επανακτηθούν οι αρχικές συγκεντρώσεις. Οι τιμές αερίων, σωματιδίων του καπνού και μονοξειδίου του άνθρακα αξιολογούνταν συνεχώς σε διάφορα σημεία του δωματίου κατά τη διάρκεια του πειράματος με ειδικό αναλυτή (CO90 CO-CO₂ analyzer, Martindale Electric Ltd., Watford, UK) CO90-CO2 analyzer. Οι προσδοκώμενες συγκεντρώσεις του μείγματος αερίων επιτεύχθηκαν καίγοντας κανονικά τσιγάρα από διάφορες δημοφιλείς εταιρίες με τη χρήση μίας αντλίας (DYN, Volos, Greece) η οποία ρύθμιζε τη ροή του καπνού στα 4 l/min. Κατά την πειραματική κατάσταση έκθεσης σε ατμό ηλεκτρονικού τσιγάρου (PASSIVE_{E-CIG}), οι συμμετέχοντες παρέμειναν για μία ώρα στον ίδιο θάλαμο ο οποίος αυτή τη φορά περιείχε ατμό ηλεκτρονικού τσιγάρου στις ίδιες συγκεντρώσεις με τη προηγούμενη κατάσταση του συμβατικού τσιγάρου. Στην κατάσταση ελέγχου (PASSIVE_{CON}), ο αέρας εντός του δωματίου ήταν ανάλογος φυσιολογικών τιμών (O₂, 20,93%; CO₂, 0,04%; N, 78,1%) καθ' όλη την διάρκεια της έκθεσης.

Συλλογή αίματος

Πριν από την έκθεση στις τρεις καταστάσεις , αμέσως μετά το τέλος της έκθεσης, καθώς και μία ώρα μετά την ολοκλήρωσή της πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες φλεβικού αίματος με χρήση σύριγγας. Κατά την αιμοληψία τηρούνταν όλοι οι προβλεπόμενοι κανόνες ασηψίας και αντισηψίας και τα υλικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν μιας χρήσης.

Ποσότητα αίματος ίση με 5 ml συλλέχθηκε σε ειδικά σωληνάρια τα οποία περιείχαν πηκτικούς παράγοντες και έπειτα από το περάς 20 min φυγοκεντρήθηκαν στην ειδική ψυχόμενη φυγόκεντρο (Heraeus Biofigure Primo). Η φυγοκέντριση έγινε στα 1370 x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4° C. Ακολούθησε η συλλογή του πλάσματος σε φιαλίδια τύπου Eppendorf™, τα οποία και ψύχθηκαν – χωρίς καθυστέρηση - στους -20°C μέχρι να αναλυθούν για τον προσδιορισμό της κοτινίνης.

Μία άλλη ποσότητα αίματος, ίση με 8 ml, συλλέχθηκε σε ειδικά σωληνάρια στα οποία προστέθηκε EDTA (αναλογία: 20μl/ml αίματος) και στη συνέχεια αναμίχθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 1370 x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4° C για τον διαχωρισμό του πλάσματος. Ακολούθησε η συλλογή του πλάσματος το οποίο τοποθετήθηκε σε φιαλίδια τύπου Eppendorf™ που αποθηκεύτηκαν στους -80°C και αποψύχτηκαν μόνο μια φορά πριν την μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC).

Αιμολύματα για ολόκληρο το αίμα παρήχθησαν με την προσθήκη απιονισμένου ύδατος 1:1 (v/v), στα εναπομείναντα ερυθρά κύτταρα τα οποία αναδεύτηκαν σθεναρά και φυγοκεντρήθηκαν στις 4.000 g στροφές για 15 λεπτά στους 4°C. Τα καθαρά υπερκείμενα μεταφέρθηκαν μέσα σε φιαλίδια τύπου

Erppendorf™ αποθηκεύτηκαν στους -80°C και αποψύχτηκαν μόνο μια φορά πριν την ανάλυση της GSH και της CAT. Όλες οι μετρήσεις έγιναν φασματοφωτομετρικά με την χρήση φασματοφωτομετρικού συστήματος HITACHI U-1900.

Βιοχημική ανάλυση κοτινίνης

Η κοτινίνη αποτελεί το σημαντικότερο βιοδείκτη έκθεσης στον καπνό του τσιγάρου (Benowitz 1996). Το τελικό δείγμα προς ανάλυση περιείχε 1ml ορού και 1ml ρυθμιστικού διαλύματος (pH=6.88). Η βιοχημική ανάλυση για τον προσδιορισμό της νικοτίνης έγινε με τη χρήση συστήματος φασματομετρίας μάζας Finnigan Mat GCQ™ system (J&W Scientific, USA), με τριχοειδή στήλη HP-5MSI (J&W Scientific, Folsam, CA). Ο χρόνος έκλουσης της κοτινίνης προσδιορίστηκε στα 6.16 min. Από κάθε δείγμα εγχύθηκε στο σύστημα ποσότητα ίση με 2μL. Κατά την εκκίνηση της διαδικασίας, η αρχική θερμοκρασία της στήλης ήταν στους 90°C για 1 min και αυξήθηκε στους 280°C με σταθερό ρυθμό 20°C/min. Η έγχυση έγινε στους 280°C.

DTNB 1mM

Ποσότητα 1g κιτρικού οξέος διαλύθηκε σε 100 ml H₂O και στη συνέχεια προστίθεται και 0.0396 g DTNB.

TCA 5%

Ποσότητα τριχλωροξικού οξέος ίση με 5 gr διαλύθηκε σε 95 ml H₂O

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης πραγματοποιήθηκε στα ερυθροκύτταρα και απαιτήθηκε αρχικά η κατακρήμνιση των πρωτεϊνών των δειγμάτων με επεξεργασία με διάλυμα TCA 5%, ώστε να μείνει καθαρό το δείγμα που περιείχε τη γλουταθειόνη. Για το σκοπό αυτό 500μL αιμολύματος προστέθηκαν σε 500μL TCA 5%. τα δείγματα ανακινήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 xg για 10 min στους 4° C. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν 300 μL αιμολύματος και αφού προστέθηκαν σε 90 μL 5% TCA, φυγοκεντρήθηκαν στα 16000 xg για 10 min στους 4° C. Το καθαρό υπερκείμενο συλλέχθηκε για τον προσδιορισμό της GSH.

Οι παρακάτω ποσότητες εισήχθησαν σε eppendorfs .

	Blank	Sample
Phosphate buffer 67mM pH 7.95	660 μL	660 μL
DTNB 1 mM	330 μL	330 μL
Water	20 μL	-
Hemolysate	-	20 μl

Πίνακας 1. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γλουταθειόνης.

Τα δείγματα επωάστηκαν στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 412 nm. Η συγκέντρωση της GSH υπολογίστηκε ως εξής:

$$\text{GSH concentration activity (mmol/L)} = (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}} / 13.6) \times 131.3$$

Όπου:

131.3 : ο συντελεστής αραίωσης ο οποίος προκύπτει διαιρώντας τον τελικό όγκο (1010 μL) με τον όγκο του δείγματος (20 μL) δηλαδή ($1010 / 20 = 50.5$), πολλαπλασιάζοντας με 2 ώστε να ληφθεί υπόψη η πρώτη αραίωση που έγινε με H_2O και με 1.3 για τη δεύτερη αραίωση που έγινε με TCA.

13.6 : ο συντελεστής μοριακής απόσβεση του DTNB.

2. Προσδιορισμός της δραστικότητας της καταλάσης

Η δραστικότητα της καταλάσης προσδιορίστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του (Aebi 1984). Στη μέθοδο αυτή, η δραστικότητα του ενζύμου υπολογίζεται από το ρυθμό διάσπασης του H_2O_2 , καθώς το ένζυμο καταλάση, καταλύει το H_2O_2 σε νερό (H_2O) και οξυγόνο (O_2) (Gutteridge and Halliwell 1982).

Αρχικά έγινε παρασκευή του διαλύματος Phosphate buffer 67mM (pH 7.4) με τη χρήση 100mM KH_2PO_4 (2,72 gr KH_2PO_4 / 200 mL H_2O) και 100mM Na_2HPO_4 (3,56 gr Na_2HPO_4 / 200 mL H_2O).

- Για την παρασκευή του διαλύματος KH_2PO_4 67mM : Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστέθηκαν 16,5 mL H_2O και 33,5 mL KH_2PO_4 .
- Για την παρασκευή του διαλύματος Na_2HPO_4 67mM : Σε ογκομετρικό κύλινδρο προστέθηκαν 16,5 mL H_2O και 33,5 mL Na_2HPO_4 .

Στη συνέχεια έγινε ανάμειξη των δύο διαλυμάτων έως ότου επετεύχθη pH ίσο με 7.4. Η συγκεκριμένη τιμή του pH επετεύχθη έπειτα από ανάμειξη 40 ml Na_2HPO_4 με 10 ml of KH_2PO_4 .

Έπειτα, σε ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε μικρή ποσότητα του H_2O_2 30% και σκεπάστηκε με αλουμινόχαρτο λόγω της φωτοευαισθησίας του.

	Sample
Phosphate buffer 67mM , pH 7.4	2991 μl
RBL diluted 1/10 in water	4 μl

Πίνακας 2. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης.

Σε δοκιμαστικό σωλήνα προστέθηκαν οι παραπάνω ποσότητες διαλύματος και ερυθροκυτταρικού αιμολύματος και αφού έγινε ανάδευση με χρήση VORTEX, ακολούθησε επώση στους 37° C (optimum temperature for the enzyme) για 10 min. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρθηκε σε γυάλινη κυβέτα και αφού προστέθηκαν 5 mL διαλύματος H_2O_2 μετρήθηκε η απορρόφησή του στα 240 nm και καταγράφηκε κάθε 30 sec για 2:30 min.

Υπολογισμός της δραστηριότητας της καταλάσης

Catalase activity = $(\Delta\text{Abs}_{\text{sample}} \text{ per min} / 40) * (750 * 1000 * 10 * 2) / \text{Conc. Hb}$
(mg/ml)

Catalase activity = ... $\mu\text{mol/min/mgHb}$ (unit of catalase activity)

όπου

$\Delta\text{Abs}_{\text{sample}} \text{ per min}$: η μεταβολή στην τιμή της απορρόφηση σε χρονική διάρκεια ενός λεπτού.

40 (mol/L) : ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης του H_2O_2 , ο οποίος πολλαπλασιάζεται με το 1000 ώστε να μετατραπούν τα mol/L σε $\mu\text{mol/ml}$.

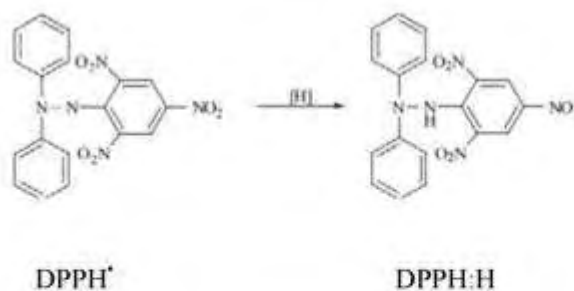
750 : ο συντελεστής αραίωσης, ο οποίος προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3000 μL) στον όγκο του ερυθροκυτταρικού αιμολύματος (4 μl) (3000/4 = 750).

10 : η αραίωση του διαλύματος (1/10)

2 : η αραίωση των ερυθροκυττάρων κατά την αιμόλυσή τους.

3. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (TAC)

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) είναι ένας γενικός δείκτης που συνυπολογίζει τη δράση της πλειονότητας των αντιοξειδωτικών ουσιών. Η μέθοδος βασίζεται στην εξουδετέρωση της σταθερής ελεύθερης ρίζας 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλδραζύλιο (DPPH⁺) από τα αντιοξειδωτικά συστατικά των δειγμάτων και η μετατροπή της σε DPPH:H. (Εικόνα 2)



Εικόνα 2 . Η αναγωγή της ρίζας DPPH[•] στο σταθερό μόριο DPPH:H.

Η TAC μετρήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των (Janaszewska and Bartosz 2002). Αρχικά έγινε παρασκευή του διαλύματος Phosphate buffer 10mM (pH 7.4) με τη χρήση 100 ml KH_2PO_4 (10mM) και 400ml Na_2HPO_4 (10mM).

- Για την παρασκευή του διαλύματος KH_2PO_4 10mM : Ζυγίστηκαν 0.136 g και διαλύθηκαν σε 100 ml απιονισμένου ύδατος.
- Για την παρασκευή του διαλύματος Na_2HPO_4 10mM : Ζυγίστηκαν 0.712 g και διαλύθηκαν σε 400 ml απιονισμένου ύδατος.
- Στη συνέχεια στο μαγνητικό αναδευτήρα και σε ποτήρι ζέσεως προστέθηκαν 350 ml Na_2HPO_4 10mM και σιγά σιγά προστέθηκε και το διάλυμα KH_2PO_4 10mM ώσπου η τιμή του pH να γίνει ίση με 7.4.

DPPH 0.1mM

MW= 394.32

Παρασκευάστηκε διάλυμα 10 mM διαλύοντας 0,02 g DPPH σε 5 ml μεθανόλης και αναδεύοντας σε μαγνητικό αναδευτήρα. Έπειτα παρασκευάστηκε το διάλυμα 0,1 mM αραιώνοντας 100 φορές το αρχικό διάλυμα με μεθανόλη, δηλαδή 200 μL από το διάλυμα DPPH 10 mM σε 19,8 ml μεθανόλης. Το διάλυμα που παρασκευάστηκε καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο για την αποφυγή φωτόλυσης.

Οι παρακάτω ποσότητες εισήχθησαν σε eppendorfs .

	Blank	Sample
Phosphate buffer 10mM pH 7.4	660 μL	660 μL
DPPH 0.1 mM	330 μL	330 μL
Plasma	-	20 μl

Πίνακας 3. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας.

Τα δείγματα ανακινήθηκαν ελαφρά, επώστηκαν στο σκοτάδι για 60 min και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 7 min στα 16000 g. Στη συνέχεια 900 μL από το υπερκείμενο διάλυμα τοποθετήθηκε σε πλαστική κυβέτα και η απορρόφησή του μετρήθηκε στα 520 nm.

Υπολογισμός της δραστηρότητας της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας

$$\% \text{ Abs reduction} = (\text{Abs blank} - \text{Abs sample}) / \text{Abs blank} \times 100$$

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης 15.0. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι περιγραφικής στατιστικής, όπου υπολογίστηκαν ο μέσος όρος (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD), και το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (standard error of the mean, SEM).

Προηγούμενες έρευνες έδειξαν ότι 15 συμμετέχοντες από κάθε ομάδα (καπνιστές και μη καπνιστές) παρέχουν μία αξιοπιστία της τάξεως του 95% power analysis). Πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος της κανονικότητας των κατανομών των εξεταζόμενων (εξαρτημένων) μεταβλητών, που αποτελεί τη βασική παραδοχή για τη αξιόπιστη χρήση παραμετρικών μεθόδων στατιστικής ανάλυσης, με τη χρήση του κριτηρίου Kolmogorov-Smirnov.

Στη συνέχεια, για το πείραμα της επίδρασης του ενεργητικού και παθητικού καπνίσματος συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου, αξιολογήθηκαν οι διαφορές των εξαρτημένων μεταβλητών με την πάροδο του χρόνου (πριν, αμέσως μετά, μία ώρα μετά την έκθεση. Η αξιολόγηση αυτή έγινε μέσω της μη παραμετρικής ανάλυσης διακύμανσης παραγόντων με τη χρήση της μεθόδου Kruskal-Wallis. Στη συνέχεια, οι διαφορές των εξαρτημένων μεταβλητών μεταξύ των δύο πειραματικών ομάδων αξιολογήθηκαν με τη χρήση του μη παραμετρικού τεστ Mann-Whitney.

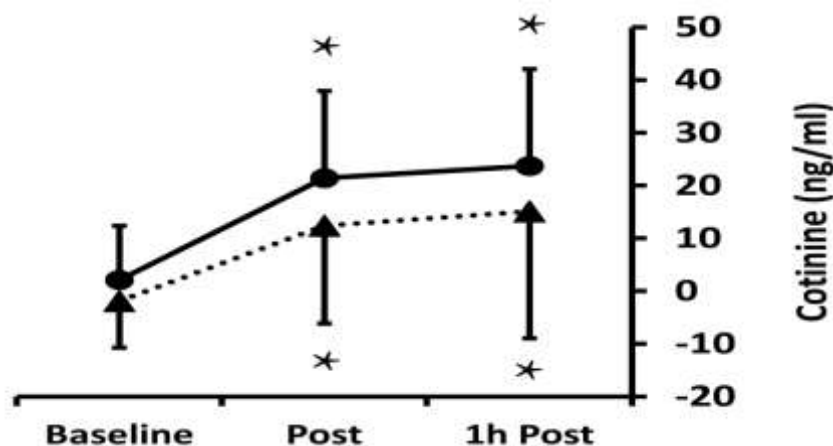
Στη στατιστική ανάλυση το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο $P < 0.05$.

Αποτελέσματα

Κοτινίνη

Ενεργητικοί καπνιστές

Από την ανάλυση μέσω Friedman test φάνηκε ότι η κοτινίνη ($\chi^2=14,93$, $p=0,001$) παρουσίασε στατιστικά σημαντική μεταβολή κατά τη δοκιμασία του ενεργητικού καπνίσματος συμβατικού τσιγάρου (ACTIVE_{conv}). Με τη χρήση Post hoc Wilcoxon test φάνηκε ότι υπήρξε αύξηση στην τιμή της κοτινίνης ($z=-3,24$, $p=0,001$) αμέσως μετά το ενεργητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου, όσο και μία ώρα μετά τη δοκιμασία ($z= -2.90$, $p=0.004$). Στο ενεργητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου (ACTIVE_{E-CIG}) τα αποτελέσματα του Friedman test έδειξαν ότι η κοτινίνη μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας. Με τη χρήση Post hoc Wilcoxon test φάνηκε ότι υπήρξε αύξηση της τιμής της κοτινίνης τόσο αμέσως μετά ($z= -3.29$, $p=0.001$) όσο και μία ώρα μετά την ενεργητική έκθεση στον καπνό του ηλεκτρονικού τσιγάρου ($z= -3.32$, $p=0.001$) (Γράφημα 1).

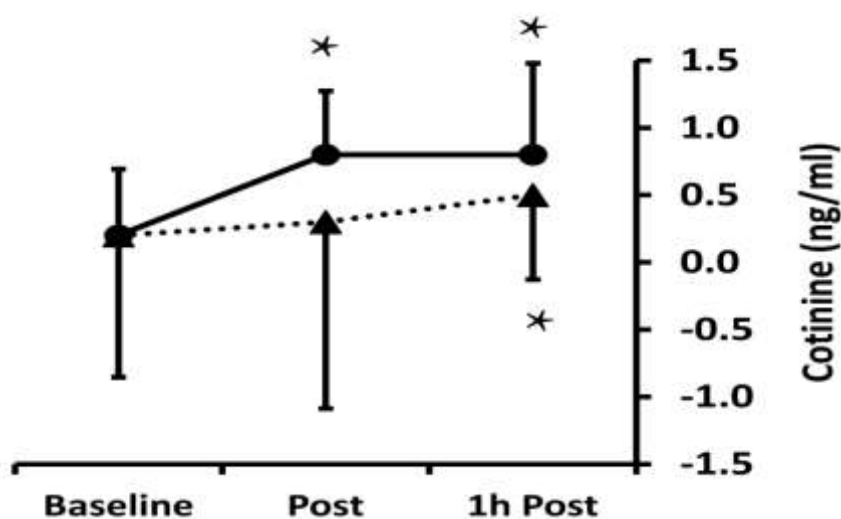


Γράφημα 1. Μεταβολές στη συγκέντρωση της κοτινίνης, στην κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος ηλεκτρονικού τσιγάρου (διακεκομμένη καμπύλη) και στην κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος συμβατικού τσιγάρου (συνεχής καμπύλη) ($M.T. \pm T.A$).

*Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των καταστάσεων (post, 1-hour post και baseline), ($P < 0,05$).

Παθητικοί καπνιστές

Από την ανάλυση μέσω Friedman test φάνηκε ότι η κοτινίνη ($\chi^2=10.13$, $p=0.006$) παρουσίασε στατιστικά σημαντική μεταβολή κατά τη δοκιμασία του παθητικού καπνίσματος συμβατικού τσιγάρου ($PASSIVE_{conv}$). Με τη χρήση Post hoc Wilcoxon test φάνηκε ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση στην τιμή της κοτινίνης ($z=-2.96$, $p=0.003$) αμέσως μετά το παθητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου, όσο και μία ώρα μετά τη δοκιμασία ($z=-2.62$, $p=0.009$). Στο παθητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου ($PASSIVE_{E-CIG}$) τα αποτελέσματα του Friedman test έδειξαν ότι η κοτινίνη δεν μεταβλήθηκε στατιστικά σημαντικά κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας. Με τη χρήση Post hoc Wilcoxon test φάνηκε ότι η τιμή της κοτινίνης παρουσίασε μία αυξητική τάση αμέσως μετά την παθητική έκθεση στον καπνό του ηλεκτρονικού τσιγάρου, η οποία κατέστη στατιστικά σημαντική μία ώρα μετά την έκθεση ($z=-2.70$, $p=0.007$) (Γράφημα 2).



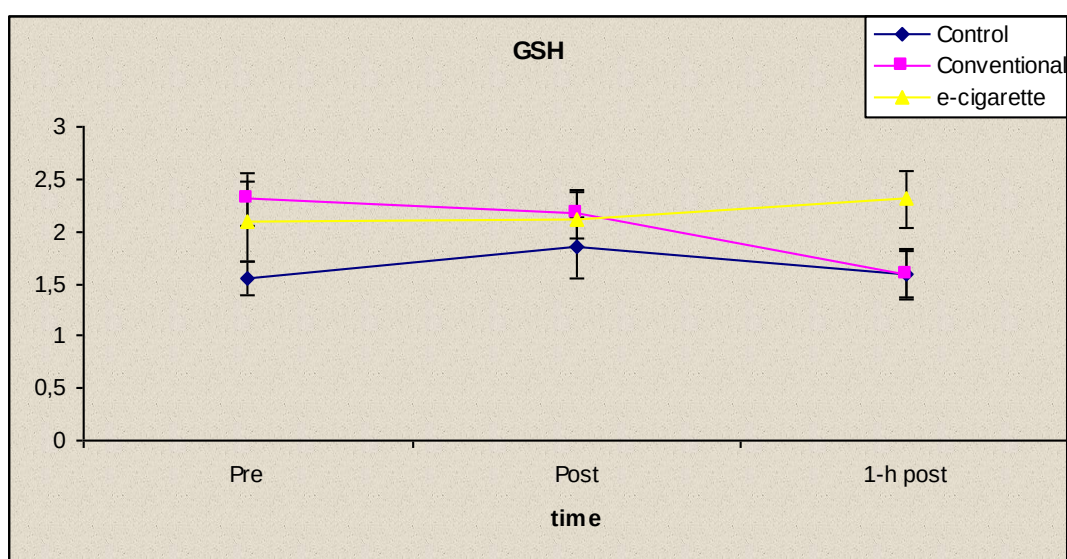
Γράφημα 2. Μεταβολές στη συγκέντρωση της κοτινίνης, στην κατάσταση παθητικού καπνίσματος ηλεκτρονικού τσιγάρου (διακεκομμένη καμπύλη) και στην κατάσταση παθητικού καπνίσματος συμβατικού τσιγάρου (συνεχής καμπύλη) ($M.T. \pm T.A$).

* Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των καταστάσεων ($P < 0,05$).

Οξειδωτικοί δείκτες

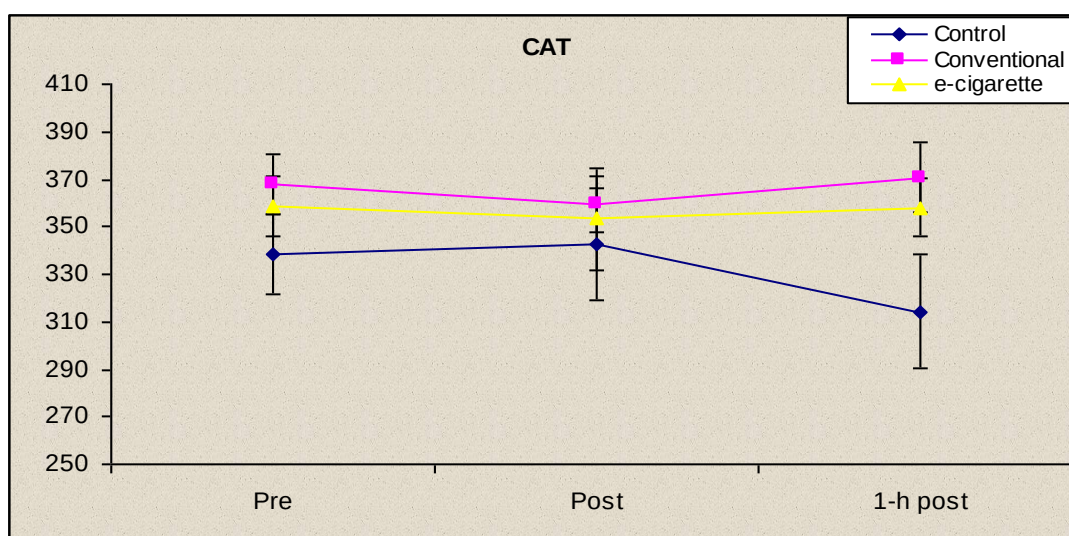
Ενεργητικοί καπνιστές

Οι τιμές των παραμέτρων προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες που εξετάστηκαν παρουσιάζονται στα γραφήματα 3-8. Όσον αφορά τη γλουταθειόνη, στην ομάδα των ενεργητικών καπνιστών δε παρουσιάστηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στη συγκέντρωσή της με το πέρας του χρόνου ($p > 0,05$) σε καμία από τις τρεις πειραματικές καταστάσεις (control, conventional, e-cigarette). Δηλαδή δεν υπήρξε καμία μεταβολή στην συγκέντρωση της γλουταθειόνης πριν, αμέσως μετά και μία ώρα μετά την ενεργητική έκθεση στο συμβατικό τσιγάρο, το ηλεκτρονικό τσιγάρο καθώς και στην κατάσταση ελέγχου (Γράφημα 3).



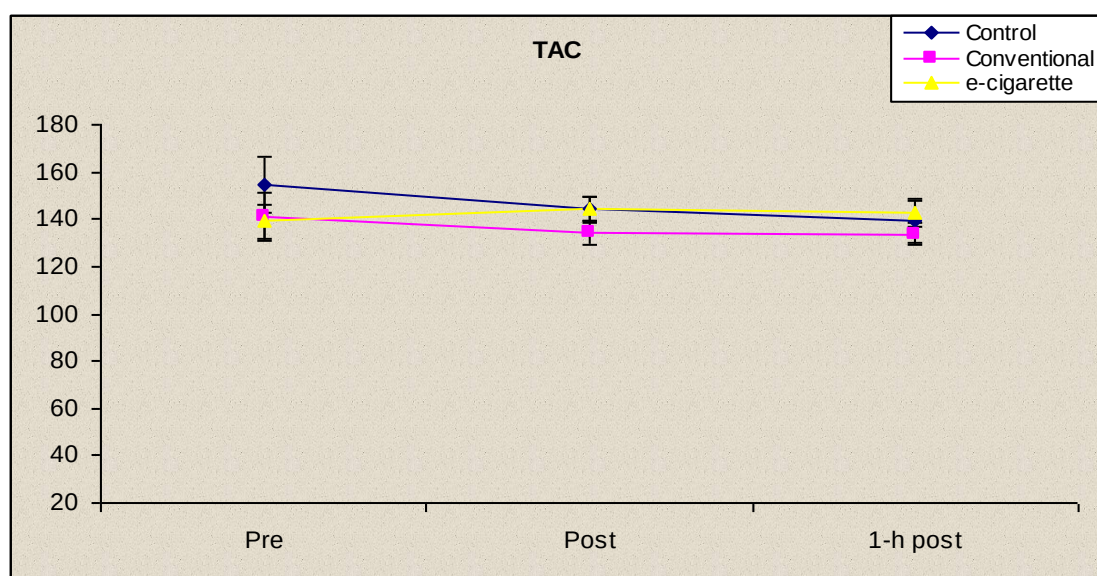
Γράφημα 3. Μεταβολές στη συγκέντρωση της γλουταθειόνης στην κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος συμβατικού τσιγάρου (ροζ γραμμή), στην κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος ηλεκτρονικού τσιγάρου (κίτρινη γραμμή) και στην κατάσταση ελέγχου (μπλε γραμμή) ($M.T. \pm T.Σ$).

Η δραστικότητα της καταλάσης επίσης δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή ($p>0,05$) με το πέρας του χρόνου και στις τρεις πειραματικές καταστάσεις. Παράλληλα δεν υπήρξε σημαντική κύρια επίδραση της κατάστασης και του χρόνου ή σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της κατάστασης και του χρόνου ($p>0,05$; Γράφημα 4).



Γράφημα 4. Μεταβολές στη δραστικότητα της καταλάσης στην κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος συμβατικού τσιγάρου (ροζ γραμμή), στην κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος ηλεκτρονικού τσιγάρου (κίτρινη γραμμή) και στην κατάσταση ελέγχου (μπλε γραμμή) ($M.T. \pm T.S$).

Αναφορικά με την συγκέντρωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των χρονικών σημείων και καμία αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών καταστάσεων ($p>0,05$; Γράφημα 5).



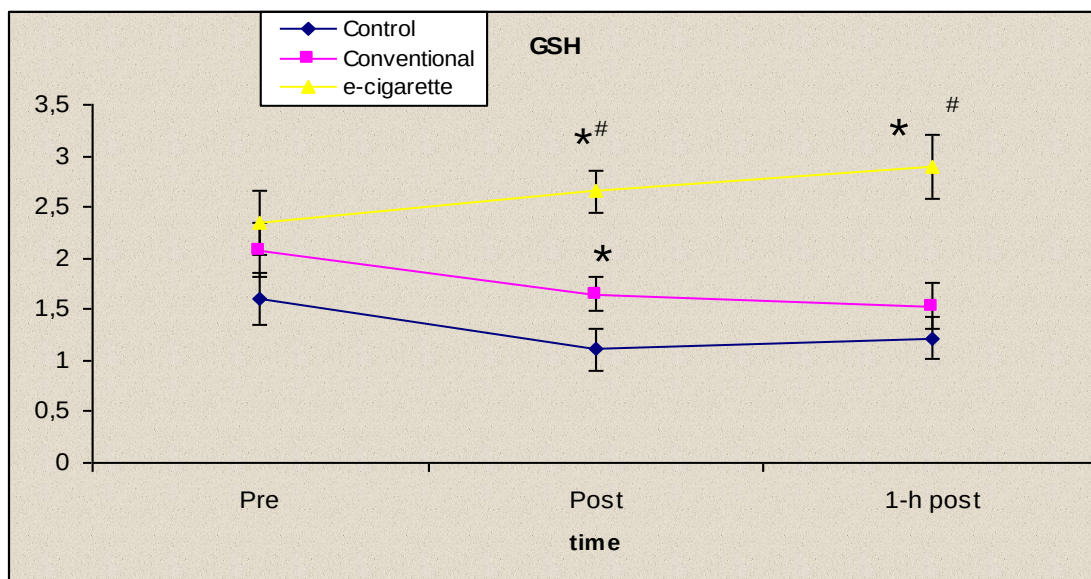
Γράφημα 5. Μεταβολές στη ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στην κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος συμβατικού τσιγάρου (ροζ γραμμή), στην κατάσταση ενεργητικού καπνίσματος ηλεκτρονικού τσιγάρου (κίτρινη γραμμή) και στην κατάσταση ελέγχου (μπλε γραμμή) ($M.T. \pm T.Σ$).

Παθητικοί καπνιστές

Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική μεταβολή στη συγκέντρωση της γλουταθειόνης μέσα στο χρόνο. Δηλαδή, δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωσή της πριν, μετά καθώς και μία ώρα μετά την παθητική έκθεση τόσο του συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου, όσο και για την κατάσταση ελέγχου ($p>0,05$).

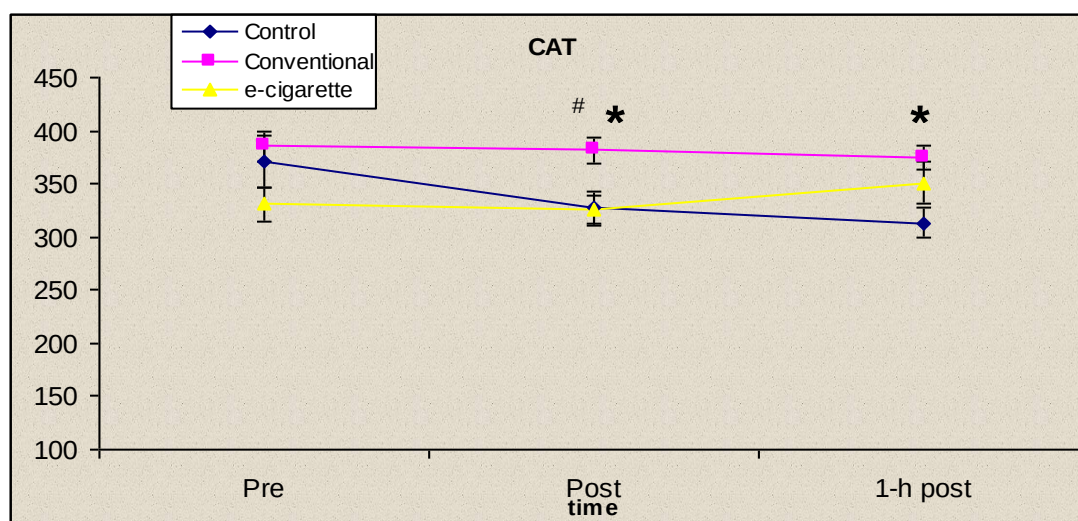
Ωστόσο, παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών διαφορετικών καταστάσεων όπου φάνηκε ότι τη χρονική στιγμή αμέσως μετά την έκθεση υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της κατάστασης παθητικής έκθεσης στον ατμό του ηλεκτρονικού τσιγάρου και της κατάστασης ελέγχου ($p=0,000$), όπως επίσης και μεταξύ της κατάστασης παθητικής έκθεσης στον ατμό του ηλεκτρονικού τσιγάρου και της κατάστασης παθητικής έκθεσης στον καπνό συμβατικού τσιγάρου ($p=0,003$). Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν επίσης και μεταξύ της κατάστασης παθητικής έκθεσης στον καπνό συμβατικού τσιγάρου και της κατάστασης ελέγχου ($p=0,040$).

Στη μία ώρα μετά το τέλος της έκθεσης παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στη συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης μεταξύ της κατάστασης παθητικής έκθεσης στον ατμό του ηλεκτρονικού τσιγάρου και της κατάστασης παθητικής έκθεσης στον καπνό συμβατικού τσιγάρου ($p=0,002$), όσο και μεταξύ της κατάστασης παθητικής έκθεσης στον ατμό ηλεκτρονικού τσιγάρου και της κατάστασης ελέγχου ($p=0,000$); (Γράφημα 6).



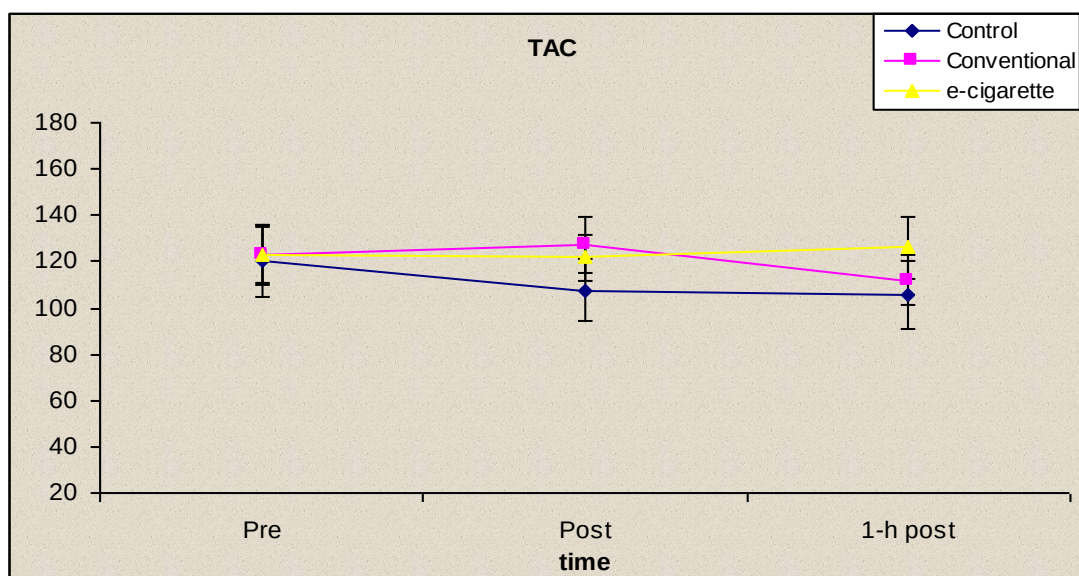
Γράφημα 6. Μεταβολές στη συγκέντρωση της γλουταθειόνης στην κατάσταση παθητικού καπνίσματος συμβατικού τσιγάρου (ροζ γραμμή), στην κατάσταση παθητικού καπνίσματος ηλεκτρονικού τσιγάρου (κίτρινη γραμμή) και στην κατάσταση ελέγχου (μπλε γραμμή) (M.T. ± T.Σ).

Η δραστηριότητα της καταλάσης, ομοίως δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ των χρονικών σημείων ($p>0,05$). Ωστόσο, παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών διαφορετικών καταστάσεων όπου φάνηκε ότι τη χρονική στιγμή αμέσως μετά την έκθεση υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ της κατάστασης παθητικής έκθεσης στον καπνό συμβατικού τσιγάρου και της κατάστασης παθητικής έκθεσης στον ατμό ηλεκτρονικού τσιγάρου ($p=0.006$) όσο και της κατάστασης ελέγχου ($p=0,011$). Μία ώρα μετά την έκθεση στατιστικά σημαντική παρέμεινε η διαφορά μεταξύ της κατάστασης παθητικής έκθεσης στον καπνό συμβατικού τσιγάρου και της κατάστασης ελέγχου ($p=0,005$);(Γράφημα 7).



Γράφημα 7. Μεταβολές στη δραστηριότητα της καταλάσης στην κατάσταση παθητικού καπνίσματος συμβατικού τσιγάρου (ροζ γραμμή), στην κατάσταση παθητικού καπνίσματος ηλεκτρονικού τσιγάρου (κίτρινη γραμμή) και στην κατάσταση ελέγχου (μπλε γραμμή) ($M.T. \pm T.S$).

Αναφορικά με την συγκέντρωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας, δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των χρονικών σημείων και καμία αλληλεπίδραση μεταξύ των τριών καταστάσεων ($p>0,05$; Γράφημα 8).



Γράφημα 8. Μεταβολές στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα στην κατάσταση παθητικού καπνίσματος συμβατικού τσιγάρου (ροζ γραμμή), στην κατάσταση παθητικού καπνίσματος ηλεκτρονικού τσιγάρου (κίτρινη γραμμή) και στην κατάσταση ελέγχου (μπλε γραμμή) ($M.T. \pm T.S.$).

Συζήτηση

Η παρούσα έρευνα αποτελεί την πρώτη προσπάθεια που πραγματοποιείται ώστε να εξεταστούν πειραματικά οι επιπτώσεις της οξείας έκθεσης του ενεργητικού και παθητικού καπνίσματος συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου σε δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα εθελοντών καπνιστών και μη καπνιστών. Η αρχική υπόθεση ήταν ότι η σύντομη και μέτριας περιβαλλοντικής επιβάρυνσης έκθεση στο ενεργητικό και παθητικό κάπνισμα συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου θα προκαλέσει μεταβολή στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των συμμετεχόντων. Ωστόσο τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οξεία έκθεση στο ενεργητικό και παθητικό κάπνισμα συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου δεν μετέβαλε σημαντικά τους δείκτες οξειδωτικού στρες στο αίμα των συμμετεχόντων, σε οποιοδήποτε χρονικό σημείο.

Για τον προσδιορισμό του μεγέθους της έκθεσης στο παθητικό κάπνισμα σε παθητικούς και ενεργητικούς καπνιστές έχουν προταθεί αρκετοί βιοδείκτες. Η κοτινίνη αποτελεί το σημαντικότερο μεταβολικό παράγωγο της νικοτίνης και χρησιμοποιείται εκτενώς ως δείκτης έκθεσης στον καπνό του τσιγάρου. Ο μεγάλος χρόνος ημιζωής της κοτινίνης αποτελεί το σημαντικότερο πλεονέκτημα στην αξιολόγηση αυτού του μορίου. Ωστόσο, το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την πλήρη απομάκρυνσή της από το αίμα εξαρτάται από τον κάθε οργανισμό και για το λόγο αυτό η χρησιμότητά της αμφισβητείται (Benowitz, 1996 #134). Στην παρούσα έρευνα η συγκέντρωση της κοτινίνης στο αίμα των ενεργητικών καπνιστών συμβατικού τσιγάρου αυξήθηκε από 43.7 ± 31.5 σε 61.3 ± 36.6 ng/ml και του ηλεκτρονικού τσιγάρου από 27.5 ± 25.8 σε 42.3 ± 33.5 ng/ml. Αντίστοιχα, η συγκέντρωση της κοτινίνης στο αίμα των παθητικών καπνιστών συμβατικού

τσιγάρου αυξήθηκε από 1.9 ± 0.5 σε 2.6 ± 0.6 ng/ml και του ηλεκτρονικού τσιγάρου από 1.8 ± 0.9 σε 2.3 ± 1.2 ng/ml. Αναφορικά με το παθητικό κάπνισμα, με βάση αυτή την συγκέντρωση, η έκθεση των συμμετεχόντων στο παθητικό κάπνισμα χαρακτηρίζεται ως μέτριας περιβαλλοντικής επιβάρυνσης προσομοιώνοντας τις συνθήκες όπως σε μπαρ/εστιατόρια (Benowitz, N.L. 1999; Jarvis, 1992). Παρόμοιες συγκεντρώσεις βρέθηκαν και σε άλλες εργασίες οι οποίες αξιολόγησαν την επίδραση της οξείας έκθεσης του παθητικού καπνίσματος σε χώρους όπως μπαρ/εστιατόρια (Flouris et al., 2005; 2008; 2009; Metsios et al., 2007).

Η εμφάνιση οξειδωτικού στρες εξαιτίας της οξείας έκθεσης σε ενεργητικό και παθητικό κάπνισμα συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου μπορεί να εκτιμηθεί μέσω της αξιολόγησης άμεσων και έμμεσων δεικτών οξειδωτικής βλάβης και από την δραστικότητα ή την συγκέντρωση αντιοξειδωτικών μορίων (Finaud, 2006 #142). Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα ενδογενές αντιοξειδωτικό το οποίο παράγεται από τα κύτταρα που συμμετέχουν άμεσα στην εξουδετέρωση ελεύθερων ριζών και βοηθά στη διατήρηση των εξωγενών αντιοξειδωτικών, όπως η βιταμίνη C και η E σε ενεργό μορφή (Giordano, 2007 #143). Η καταλάση αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά αντιοξειδωτικά ένζυμα καθώς μπορεί να εξουδετερώσει σημαντική ποσότητα δραστικών στοιχείων O_2 ανά λεπτό, παρέχοντας μια καθόλα ουσιαστική αντιοξειδωτική προστασία στα κύτταρα (Finaud et al., 2006). Η συγκέντρωση της TAC αντιπροσωπεύει την ικανότητα του αίματος να εξουδετερώνει δραστικές ρίζες και επηρεάζεται ιδιαίτερα από τις μεταβολές στην συγκέντρωση του ουρικού οξέος, της χολερυθρίνης, της βιταμίνης C και πιθανά της καταλάσης (Finaud et al., 2006).

Η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των ενεργητικών καπνιστών συμβατικού τσιγάρου δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε όλα τα χρονικά σημεία. Τα αποτελέσματα της παρούσας

έρευνας έρχονται να συμφωνήσουν με αυτά της έρευνας των Morrison, Rahman και των συνεργατών του (2006), όπου έπειτα από την έκθεση σε ενεργητικό κάπνισμα τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης στο πλάσμα των συμμετεχόντων παρέμειναν αμετάβλητα. Σε αντίθεση όμως με την παρούσα έρευνα, σε τρεις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in vitro*, παρατηρήθηκε μείωση της ανηγμένης γλουταθειόνης έπειτα από έκθεση σε ενεργητικό κάπνισμα σε ανθρώπινους πνευμονικούς ινοβλάστες (Carnevali, 2003 #52), σε τύπου II επιθηλιακά κύτταρα των ανθρώπινων κυψελίδων (Li, Donaldson et al. 1994), σε φαγοκύτταρα του αναπνευστικού και επιθηλιακά κύτταρα (Bridgeman, Marsden et al. 1994). Ωστόσο σε μετρήσεις που έγιναν στα τύπου II επιθηλιακά κύτταρα των ανθρώπινων κυψελίδων, 24 ώρες μετά την έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα παρατηρήθηκε αύξηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (Rahman, Smith et al. 1996). Η αύξηση των δεικτών αυτών ερμηνεύεται σαν προσπάθεια του οργανισμού να δημιουργήσει έναν προστατευτικό αντιοξειδωτικό μηχανισμό σαν απόκριση στο ενεργητικό κάπνισμα.

Η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των ενεργητικών καπνιστών ηλεκτρονικού τσιγάρου δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε όλα τα χρονικά σημεία. Σε έρευνες σχετικά με το αναλώσιμο υγρό του ηλεκτρονικού τσιγάρου, ανιχνεύθηκαν σε χαμηλά επίπεδα καρκινογόνες νιτροσαμίνες καπνού και άλλες προσμίξεις καπνού, διαιθυλενογλυκόλη, ένα συστατικό υψηλής τοξικότητας (Westenberger 2009), όπως επίσης και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (Laugesen 2008). Σε άλλη έρευνα που διεξήχθη δεν αναφέρονται ίχνη τοξικών ή καρκινογόνων ουσιών στο υγρό αναλώσιμο του ηλεκτρονικού τσιγάρου (Leondiadis 2009). Οι αδιαμφισβήτητες ενδείξεις που θέλουν τις ελεύθερες ρίζες του καπνού μέσω της οξειδωτικής ικανότητας τους να συμβάλλουν στην εξέλιξη αρκετών ασθενειών που σχετίζονται με το κάπνισμα

(Halliwell et al., 1987; Pryor, 1987) όπως είναι και ο καρκίνος καθιστά σημαντική την μελέτη της επίδρασης που έχει η χρήση του ηλεκτρονικού τσιγάρου σε αυτές στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του οργανισμού.

Η δραστικότητα της καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των ενεργητικών καπνιστών συμβατικού τσιγάρου δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε όλα τα χρονικά σημεία. Οι συμμετέχοντες διατήρησαν σταθερή την δραστικότητα της καταλάσης σε σχέση με την αρχική μέτρηση πριν από κάθε κατάσταση ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των τριών καταστάσεων σε όλα τα χρονικά σημεία. Η δραστικότητας της καταλάσης είναι δυνατό να μειωθεί εξ αιτίας των συστατικών που σχηματίζονται κατά την διαδικασία της καύσης του τσιγάρου και ιδιαίτερα των υδατοδιαλυτών συστατικών του καπνού που εμποδίζουν την σύνθεση της καταλάσης (Mendez-Alvarez, 1998 #144). Επίσης, είναι γνωστό ότι η καταλάση είναι μια αιμοπρωτεΐνη (πρωτεΐνη με 4 μόρια αίμης (Fe)) και το ότι CO παράγεται κατά την καύση του τσιγάρου. Είναι επομένως δυνατό μέσω της μεταφοράς του στην κυκλοφορία και την είσοδο του στο ερυθρό κύτταρο, το CO να προκαλέσει την μείωση της δραστικότητας της καταλάσης (Mendez-Alvarez, 1998 #144).

Η δραστικότητα της καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των ενεργητικών καπνιστών ηλεκτρονικού τσιγάρου δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε όλα τα χρονικά σημεία

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος των ενεργητικών καπνιστών συμβατικού τσιγάρου δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε όλα τα χρονικά σημεία. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με εκείνο της έρευνας των Morrison , Rahman και των συνεργατών του (199), όπου παρατηρήθηκε μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στο πλάσμα των ενεργητικών καπνιστών.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος των ενεργητικών καπνιστών ηλεκτρονικού τσιγάρου δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε όλα τα χρονικά σημεία.

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας συνεπάγεται ότι δεν ισχύουν οι ερευνητικές υποθέσεις σχετικά με τη μεταβολή των οξειδωτικών δεικτών έπειτα από οξεία έκθεση σε ενεργητικό κάπνισμα συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου. Επίσης, δεν ισχύει και η ερευνητική υπόθεση πως η οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου θα επηρεάσει σε μεγαλύτερο βαθμό τους τρεις αντιοξειδωτικούς δείκτες σε σχέση με την οξεία έκθεση στο ενεργητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου. Τα παρόντα αποτελέσματα ίσως να οφείλονται στον μικρό αριθμό των τσιγάρων που κάπνισαν οι συμμετέχοντες και οπωσδήποτε χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των παθητικών καπνιστών συμβατικού τσιγάρου δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε όλα τα χρονικά σημεία. Στην βιβλιογραφία ωστόσο, έχουν καταγραφεί αρκετές έρευνες στις οποίες παρουσιάζεται μείωση της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης έπειτα από παθητική έκθεση στον καπνό του τσιγάρου, όπως συνέβη στο πλάσμα των ποντικών στην έρευνα των Swarnam, Sreekanth και των συνεργατών του (2005). Σε αναλύσεις δειγμάτων πνευμονικού ιστού ποντικών που συλλέχθηκαν έπειτα από οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα, η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης μειώθηκε (Swarnam, Sreekanth et al. 2005). Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα διάρκειας 24 ωρών των επιθηλιακών κυττάρων αμφιβληστροειδούς ενηλίκων και εμβρύων και των τύπου II επιθηλιακών κυττάρων των πνευμονικών κυψελίδων προκάλεσε μείωση της συγκέντρωσης της

γλουταθειόνης (GSH) (Kode, Yang et al. 2006; Jia, Liu et al. 2007; Bertram, Baglole et al. 2009). Παρόμοια, μείωση των επιπέδων της GSH παρατηρήθηκε στους πνευμονικούς ινοβλάστες ανθρώπων (Baglole, Bushinsky et al. 2006) έπειτα από οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα Σε αντίθεση με τα παραπάνω, σε μία άλλη έρευνα, η οποία πραγματοποιήθηκε σε πνευμονικό ιστό ποντικών, ως αποτέλεσμα της οξείας έκθεσης στο παθητικό κάπνισμα, παρατηρήθηκε αύξηση της οξειδωμένης γλουταθειόνης έπειτα από 1 ώρα έκθεσης και σταδιακή μείωση έως και 6 ώρες μετά (Li, Rahman et al. 1996).

Η συγκέντρωση της ανηγμένης γλουταθειόνης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των παθητικών καπνιστών ηλεκτρονικού τσιγάρου δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε όλα τα χρονικά σημεία.

Η δραστικότητα της καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των παθητικών καπνιστών συμβατικού τσιγάρου δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε όλα τα χρονικά σημεία. Τα δεδομένα της παρούσας έρευνας έρχονται σε αντίθεση με άλλες εργασίες στις οποίες αξιολογήθηκε η οξεία επίδραση του παθητικού καπνίσματος στην δραστικότητα της καταλάσης σε καλλιέργεια κυττάρων και σε ποντίκια (Mendez-Alvarez, 1998 #144),(Peltola, 1994 #145),(Swarnam, 2005 #146). Στην πρώτη έρευνα η έκθεση διήρκεσε 1 ώρα και η μείωση της δραστικότητας της καταλάσης διατηρήθηκε για αρκετό χρονικό διάστημα μετά την έκθεση στο παθητικό κάπνισμα. Αντίστοιχα στην εργασία του Peltola και των συνεργατών του (1994), υπήρξε μείωση της δραστικότητας της καταλάσης στους όρχεις, μετά από 1 ώρα έκθεση στο παθητικό κάπνισμα η οποία δεν ήταν σημαντική. Παρόμοια στην έρευνα του Swarnam και των συνεργατών του (2005), παρατηρήθηκε μείωση της δραστικότητας της καταλάσης στους πνεύμονες και στο αίμα. Ως εκ τούτου, για να αποσαφηνιστεί επακριβώς ο μηχανισμός που ευθύνεται για την μείωση της

δραστικότητας της καταλάσης ως αποτέλεσμα του παθητικού καπνίσματος απαιτούνται επιπλέον εργασίες *in vivo*. Συμπερασματικά, το νέο στοιχείο που προκύπτει από την παρούσα έρευνα είναι ότι σύντομης διάρκειας έκθεση στο παθητικό κάπνισμα υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, δεν μεταβάλλει σημαντικά την δραστικότητα της καταλάσης *in vivo*.

Η δραστικότητα της καταλάσης στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα των παθητικών καπνιστών ηλεκτρονικού τσιγάρου δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε όλα τα χρονικά σημεία.

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος των παθητικών καπνιστών συμβατικού τσιγάρου δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε όλα τα χρονικά σημεία. Ωστόσο Στην έρευνα των Valkonen και Kuusi (1998), η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του αίματος μειώθηκε σημαντικά κατά 31% 1,5 ώρες μετά την έκθεση και επέστρεψε στα αρχικά επίπεδα 6 ώρες μετά. . Η ανεπάρκεια σημαντικής μεταβολής της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας στην παρούσα έρευνα υποδηλώνει ότι η σύντομη έκθεση στο παθητικό κάπνισμα σε συνθήκες μπαρ/εστιατορίων δεν φαίνεται να ενεργοποιεί την αντιοξειδωτική ικανότητα του αίματος

Η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα του πλάσματος των παθητικών καπνιστών ηλεκτρονικού τσιγάρου δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή σε όλα τα χρονικά σημεία. Η οξεία έκθεση στο παθητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου δεν ήταν ικανή να προκαλέσει την κινητοποίηση των αντιοξειδωτικών αποθεμάτων του αίματος στην κυκλοφορία και ως εκ τούτου την μεταβολή της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Στην βιβλιογραφία δεν έχει βρεθεί αντίστοιχη εργασία που να εξετάζει την απόκριση της συγκέντρωσης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ως αποτέλεσμα της έκθεσης στο παθητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι το αντιοξειδωτικό σύστημα του ανθρώπινου οργανισμού είναι ικανό να αντισταθεί στην οξειδωτική βλάβη που τείνουν να δημιουργήσουν οι ελεύθερες ρίζες του καπνού του συμβατικού τσιγάρου αλλά και του ατμού του ηλεκτρονικού τσιγάρου. Ωστόσο, η αξιολόγηση μικρού αριθμού δεικτών οξειδωτικού στρες σε ένα μόνο ιστό δεν αποδίδει μια σαφή εικόνα της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του οργανισμού και για το λόγο αυτό είναι προτιμότερο να αξιολογούνται περισσότεροι από ένας ιστός κάθε φορά ούτως ώστε να δίνεται η δυνατότητα να εντοπιστεί ακριβέστερα ποιοι ιστοί υφίστανται σημαντική βλάβη και σε ποίο βαθμό.

Συμπεράσματα

Η παρούσα έρευνα ήταν η πρώτη η οποία προσπάθησε να εξακριβώσει πειραματικά τις οξείες επιδράσεις του ενεργητικού και παθητικού καπνίσματος συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου στο οξειδωτικό στρες. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι το αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού μπορεί να αντισταθεί στην οξειδωτική βλάβη που τείνουν να δημιουργήσουν οι ελεύθερες ρίζες του καπνού. Η μικρή διαφοροποίηση των αντιοξειδωτικών δεικτών που παρατηρήθηκε έπειτα από έκθεση σε περιβάλλον παθητικού καπνίσματος ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι οι συμμετέχοντες δεν ήταν καπνιστές και οπωσδήποτε χρήζει περαιτέρω διερεύνησης

Προτάσεις για μελλοντικές έρευνες

Οι μελλοντικές έρευνες θα πρέπει να χρησιμοποιήσουν ένα πρωτόκολλο στο οποίο η εξέταση της απόκρισης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης να πραγματοποιηθεί έπειτα από κάπνισμα περισσότερων τσιγάρων. Αναφορικά με το παθητικό κάπνισμα, θα πρέπει να εξεταστεί η απόκριση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης έπειτα από μεγαλύτερης διάρκειας έκθεση σε περιβάλλον παθητικού καπνίσματος. Επίσης, είναι σημαντικό να εξεταστούν περισσότεροι δείκτες οξειδοαναγωγικής κατάστασης όπως είναι η λιπιδική υπεροξείδωση, η πρωτεϊνική καρβοξυλίωση και η καταστροφή του DNA. Επιπλέον η εξέταση δεικτών φλεγμονής αποτελεί μία παράμετρο η οποία θα βοηθούσε να διαπιστωθεί

Βιβλιογραφία

- Royal College of Physicians. Smoking or Health. Tunbridge Wells: Pitman Medical 1977.
- United Nations. World population prospects 1990. New York, USA: United Nations. (1991). p.226-31.
- US Department of Health and Human Services. (2001). Women and smoking: a report of the Surgeon General., Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US).
- US Environmental Protection Agency. Respiratory Effects of Passive Smoking: Lung Cancer and Other Disorders: The Report of the US Environmental Protection Agency, Monograph 4. NIH Publication No. 93-3605. US Department of Health and Human Services, 1993.
- Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." Methods Enzymol **105**: 121-126.
- Alberg, A. J., J. C. Chen, et al. (2000). "Household exposure to passive cigarette smoking and serum micronutrient concentrations." Am J Clin Nutr **72**(6): 1576-1582.
- Aoshiba, K., M. Koinuma, et al. (2003). "Immunohistochemical evaluation of oxidative stress in murine lungs after cigarette smoke exposure." Inhal Toxicol **15**(10): 1029-1038.
- Baglole, C. J., S. M. Bushinsky, et al. (2006). "Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains: implications for emphysema." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **291**(1): L19-29.
- Benowitz, N. L. (1996). "Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure." Epidemiol Rev **18**(2): 188-204.
- Bertram, K. M., C. J. Baglole, et al. (2009). "Molecular regulation of cigarette smoke induced-oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells: implications for age-related macular degeneration." Am J Physiol Cell Physiol **297**(5): C1200-1210.
- Bilimoria, M. H. and D. J. Ecobichon (1992). "Protective antioxidant mechanisms in rat and guinea pig tissues challenged by acute exposure to cigarette smoke." Toxicology **72**(2): 131-144.
- Bridgeman, M. M., M. Marsden, et al. (1994). "Effect of N-acetyl cysteine on the concentrations of thiols in plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and lung tissue." Thorax **49**(7): 670-675.
- Cahill, K., L. F. Stead, et al. (2010). "Nicotine receptor partial agonists for smoking cessation." Cochrane Database Syst Rev(12): CD006103.
- Carnevali, S., S. Petruzzelli, et al. (2003). "Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284**(6): L955-963.
- Cavarra, E., M. Lucattelli, et al. (2001). "Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **281**(2): L412-417.
- Chambers, D. C., W. S. Tunnicliffe, et al. (1998). "Acute inhalation of cigarette smoke increases lower respiratory tract nitric oxide concentrations." Thorax **53**(8): 677-679.
- Choi, H., N. Schmidbauer, et al. (2010). "Sources of propylene glycol and glycol ethers in air at home." Int J Environ Res Public Health **7**(12): 4213-4237.

- Cotgreave, I. A., U. Johansson, et al. (1987). "The effect of acute cigarette smoke inhalation on pulmonary and systemic cysteine and glutathione redox states in the rat." Toxicology **45**(2): 203-212.
- Cross, C. E., M. Traber, et al. (1999). "Micronutrient antioxidants and smoking." Br Med Bull **55**(3): 691-704.
- Dani, J. A., D. Jenson, et al. (2011). "Neurophysiology of Nicotine Addiction." J Addict Res Ther **S1**(1).
- Eiserich, J. P., A. van der Vliet, et al. (1995). "Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction." Am J Clin Nutr **62**(6 Suppl): 1490S-1500S.
- Etter, J. F. (2010). "Electronic cigarettes: a survey of users." BMC Public Health **10**: 231.
- Etter, J. F., & Bullen, C (2011). "Saliva cotinine levels in users of electronic cigarettes. Eur Respir J, 38(5), 1219-1220."
- Flouris, A. D., G. S. Metsios, et al. (2008). "Sexual dimorphism in the acute effects of secondhand smoke on thyroid hormone secretion, inflammatory markers and vascular function." Am J Physiol Endocrinol Metab **294**(2): E456-462.
- Flouris, A. D. and D. N. Oikonomou (2010). "Electronic cigarettes: miracle or menace?" BMJ **340**: c311.
- Flouris, A. D., C. I. Vardavas, et al. (2010). "Biological evidence for the acute health effects of secondhand smoke exposure." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **298**(1): L3-L12.
- Frei, B., T. M. Forte, et al. (1991). "Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. Protective effects of ascorbic acid." Biochem J **277 (Pt 1)**: 133-138.
- Guatura, S. B., J. A. Martinez, et al. (2000). "Increased exhalation of hydrogen peroxide in healthy subjects following cigarette consumption." Sao Paulo Med J **118**(4): 93-98.
- Gutteridge, J. M. and B. Halliwell (1982). "The role of the superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of DNA and deoxyribose induced by a copper-phenanthroline complex." Biochem Pharmacol **31**(17): 2801-2805.
- Halliwell, B. (2001). "Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment." Drugs Aging **18**(9): 685-716.
- Hasnis, E., M. Bar-Shai, et al. (2007). "Cigarette smoke-induced NF-kappaB activation in human lymphocytes: the effect of low and high exposure to gas phase of cigarette smoke." J Physiol Pharmacol **58 Suppl 5**(Pt 1): 263-274.
- Hobson, J., J. Wright, et al. (1991). "Histochemical evidence for generation of active oxygen species on the apical surface of cigarette-smoke-exposed tracheal explants." Am J Pathol **139**(3): 573-580.
- Howard, D. J., L. A. Briggs, et al. (1998). "Oxidative DNA damage in mouse heart, liver, and lung tissue due to acute side-stream tobacco smoke exposure." Arch Biochem Biophys **352**(2): 293-297.
- Hoyt, J. C., R. A. Robbins, et al. (2003). "Cigarette smoke decreases inducible nitric oxide synthase in lung epithelial cells." Exp Lung Res **29**(1): 17-28.
- Ishizaki, T., Y. Kishi, et al. (1996). "Effect of probucol, an oral hypocholesterolaemic agent, on acute tobacco smoke inhalation in rats." Clin Sci (Lond) **90**(6): 517-523.

- Janaszewska, A. and G. Bartosz (2002). "Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma." Scand J Clin Lab Invest **62**(3): 231-236.
- Jia, L., Z. Liu, et al. (2007). "Acrolein, a toxicant in cigarette smoke, causes oxidative damage and mitochondrial dysfunction in RPE cells: protection by (R)-alpha-lipoic acid." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(1): 339-348.
- Kato, T., T. Inoue, et al. (2006). "Short-term passive smoking causes endothelial dysfunction via oxidative stress in nonsmokers." Can J Physiol Pharmacol **84**(5): 523-529.
- Kharitonov, S. A., R. A. Robbins, et al. (1995). "Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide." Am J Respir Crit Care Med **152**(2): 609-612.
- Kode, A., S. R. Yang, et al. (2006). "Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells." Respir Res **7**: 132.
- Laugesen, M. (2008). "Safety report on Ruyan e-cigarette, cartridge and inhaled aerosol. Christchurch, New Zealand: Health New Zealand Ltd."
- Leondiadis, L. (2009). "Results of chemical analyses in NOBACCO electronic cigarette refills. . Athens, Greece: Mass Spectrometry and Dioxin Analysis Laboratory, National Centre for Scientific Research ("Demokritos")."
- Li, X. Y., K. Donaldson, et al. (1994). "An investigation of the role of glutathione in increased epithelial permeability induced by cigarette smoke in vivo and in vitro." Am J Respir Crit Care Med **149**(6): 1518-1525.
- Li, X. Y., I. Rahman, et al. (1996). "Mechanisms of cigarette smoke induced increased airspace permeability." Thorax **51**(5): 465-471.
- Mendez-Alvarez, E., R. Soto-Otero, et al. (1998). "In vitro inhibition of catalase activity by cigarette smoke: relevance for oxidative stress." J Appl Toxicol **18**(6): 443-448.
- Moller, P., H. Wallin, et al. (1996). "Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors." Chem Biol Interact **102**(1): 17-36.
- Montuschi, P., J. V. Collins, et al. (2000). "Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers." Am J Respir Crit Care Med **162**(3 Pt 1): 1175-1177.
- Morrison, D., I. Rahman, et al. (1999). "Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers." Am J Respir Crit Care Med **159**(2): 473-479.
- Morrow, J. D., B. Frei, et al. (1995). "Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage." N Engl J Med **332**(18): 1198-1203.
- Noronha-Dutra, A. A., M. M. Epperlein, et al. (1993). "Effect of cigarette smoking on cultured human endothelial cells." Cardiovasc Res **27**(5): 774-778.
- Papas, A. M. (1999). "Antioxidant Status, Diet, Nutrition And Health, USA, CRC Press LLC (3-19, 21-32, 37-57)."
- Papas, A. M. (1999). "Diet and antioxidant status." Food Chem Toxicol **37**(9-10): 999-1007.
- Peto, R., A. D. Lopez, et al. (1996). "Mortality from smoking worldwide." Br Med Bull **52**(1): 12-21.
- Preston, A. M. (1991). "Cigarette smoking-nutritional implications." Prog Food Nutr Sci **15**(4): 183-217.

- Pryor, W. A., K. Stone, et al. (1998). "Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage." Chem Res Toxicol **11**(5): 441-448.
- Rahman, I., C. A. Smith, et al. (1996). "Induction of gamma-glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar epithelial cells." FEBS Lett **396**(1): 21-25.
- Schmid, P., G. Karanikas, et al. (1996). "Passive smoking and platelet thromboxane." Thromb Res **81**(4): 451-460.
- Sies, H. and E. Cadenas (1985). "Oxidative stress: damage to intact cells and organs." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **311**(1152): 617-631.
- Swarnam, J., K. S. Sreekanth, et al. (2005). "Effect of Smoke Shield-a herbal formulation on the mutagenicity and oxidative stress produced by cigarette smoke in rats." J Exp Clin Cancer Res **24**(2): 297-304.
- Trtchounian, A., M. Williams, et al. (2010). "Conventional and electronic cigarettes (e-cigarettes) have different smoking characteristics." Nicotine Tob Res **12**(9): 905-912.
- Tsuchiya, M., A. Asada, et al. (2002). "Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma." Circulation **105**(10): 1155-1157.
- Tuder, R. M., K. Wood, et al. (2000). "Cigarette smoke extract decreases the expression of vascular endothelial growth factor by cultured cells and triggers apoptosis of pulmonary endothelial cells." Chest **117**(5 Suppl 1): 241S-242S.
- Uneri, C., M. Sari, et al. (2006). "Effects of vitamin E on cigarette smoke induced oxidative damage in larynx and lung." Laryngoscope **116**(1): 97-100.
- Uotila, P. (1982). "Effect of cigarette smoke on glucuronide conjugation in hamster isolated lungs." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **38**(1): 173-176.
- Vansickel, A. R., Cobb, C. O., Weaver, M. F., & Eissenberg, T. E. (2010). "A clinical laboratory model for evaluating the acute effects of electronic "cigarettes": nicotine delivery profile and cardiovascular and subjective effects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 19(8), 1945-1953."
- Westenberger, B., J (2009). "Evaluation of e- cigarettes. : US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research."
- Winkel, P. and B. E. Statland (1981). "The acute effect of cigarette smoking on the concentrations of blood leukocyte types in healthy young women." Am J Clin Pathol **75**(6): 781-785.
- Wright, J. L., J. Dai, et al. (1999). "Effects of cigarette smoke on nitric oxide synthase expression in the rat lung." Lab Invest **79**(8): 975-983.
- Yamin, C. K., A. Bitton, et al. (2010). "E-cigarettes: a rapidly growing Internet phenomenon." Ann Intern Med **153**(9): 607-609.

Παραρτήματα

Παράρτημα Α.



Εσωτερική Επιτροπή Δεοντολογίας

Τρίκαλα: 26/5/2011
Αριθμ. Πρωτ.: 322

Αίτηση Εξέτασης της πρότασης για διεξαγωγή Έρευνας με τίτλο:

Βραχυπρόθεσμες επιπτώσεις ενεργητικού και παθητικού καπνίσματος συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου στην πνευμονική λειτουργικότητα και τη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος

Επιστημονικός υπεύθυνος – επιβλέπων: Δρ. Κουτεντάκης Ιωάννης

Επιστημονικός σύμβουλος: Δρ. Ανδρέας Φλουρής

Κύρια ερευνήτρια - φοιτήτρια: Χόρτη Μαρία

Ίδρυμα & Τμήμα: Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Η προτεινόμενη έρευνα θα είναι:

Ερευνητικό πρόγραμμα ☐ **Μεταπτυχιακή διατριβή X** Διπλωματική εργασία ☐ Ανεξάρτητη έρευνα ☐

Τηλ. επικοινωνίας: 2441023380 και 6936897470

Email επικοινωνίας: mariachorti@gmail.com

Η Εσωτερική Επιτροπή Δεοντολογίας του Τ.Ε.Φ.Α.Α., Πανεπιστημίου Θεσσαλίας μετά την υπ. Αριθμ. 2-9/13-4-2011 συνεδρίασή της εγκρίνει τη διεξαγωγή της προτεινόμενης έρευνας.

Η πρόεδρος της
Εσωτερικής Επιτροπής
Δεοντολογίας - ΤΕΦΑΑ

Χριστίνα Καρατζαφέρη
Επίκουρη Καθηγήτρια



Τρίκαλα: 26/5/2012

ΒΕΒΑΙΩΣΗ

Η τριμελής επιτροπή βεβαιώνει ότι η μεταπτυχιακή διατριβή της Κωνσταντίνας Πουλιανίτη με τίτλο «Οξειές επιδράσεις του ενεργητικού και παθητικού καπνίσματος συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου στο οξειδωτικό στρες» αποτελεί μέρος του ερευνητικού προγράμματος και έχει πάρει την έγκριση για την πραγματοποίησή του με την αρ. πρωτ. 322/26-5-2011 της Εσωτερικής Επιτροπής Δεοντολογίας του ΤΕΦΑΑ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Η Τριμελής Επιτροπή:

1. Τζιαμούρτας Αθανάσιος
2. Κουτεντάκης Ιωάννης
3. Καρατζαφέρη Χριστίνα

Παράρτημα Β.

Έντυπο συναίνεσης δοκιμαζόμενου σε ερευνητική εργασία

1. Σκοπός της ερευνητικής εργασίας

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να μελετηθούν οι βραχυπρόθεσμες επιπτώσεις του καπνίσματος, ενεργητικού και παθητικού, συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου, στον ανθρώπινο οργανισμό. Ειδικότερα, θα μελετηθούν τυχόν αλλαγές στην λειτουργία των πνευμόνων, στο καρδιαγγειακό, το ανοσολογικό και το ενδοκρινικό σύστημα. Το ηλεκτρονικό τσιγάρο είναι μια συσκευή προσομοίωσης του συμβατικού, που πρόσφατα έχει προωθηθεί στην αγορά ως εναλλακτική μορφή ή ως μέσο διακοπής του καπνίσματος. Είναι κατασκευασμένο ώστε να μιμείται τη διαδικασία του καπνίσματος, προσφέροντας όμως στο χρήστη τους έναν εναλλακτικό, πιο «υγιεινό» τρόπο καπνίσματος. Σύμφωνα με τους κατασκευαστές τους το ηλεκτρονικό τσιγάρο απαλλάσσει τον χρήστη του από τον καπνό, την πίσσα και χιλιάδες άλλες τοξικές ουσίες που περιέχουν τα συμβατικά τσιγάρα αλλά και τους ανθρώπους στον περιβάλλοντα χώρο από το παθητικό κάπνισμα.

2. Διαδικασία μετρήσεων

Θα χρειαστεί να έρθεις στο εργαστήριο τρεις φορές, με μεσοδιάστημα 7 ημερών. Θα πρέπει να προσέλθεις εγκαίρως, ώστε το πείραμα να ξεκινήσει στις 09:00 ακριβώς (τουλάχιστον 15 λεπτά πριν). Θα πρέπει να αποφύγεις την έντονη σωματική δραστηριότητα για 3 ημέρες πριν και να είσαι νηστικός (το τελευταίο γεύμα να έχει ολοκληρωθεί στις 11:00μμ το προηγούμενο βράδυ). Θα πρέπει να μην έχεις καπνίσει ούτε να έχεις εκτεθεί σε παθητικό κάπνισμα για 12 ώρες πριν την έναρξη της έρευνας, δηλαδή από τις 9:00μμ το προηγούμενο βράδυ. Κατά την διάρκεια του πειράματος απαγορεύεται η πρόσληψη τροφής, επιτρέπεται η πρόσληψη νερού.

Καπνιστές: Το πείραμα θα έχει διάρκεια 1,5 ώρας. Πριν το πείραμα θα πρέπει να δώσεις κάποια στοιχεία για την καπνιστική σου συνήθεια (από τι ηλικία ξεκίνησες να καπνίζεις, πόσα τσιγάρα καπνίζεις την ημέρα και για πόσα χρόνια) και να συμπληρώσεις ένα σύντομο ερωτηματολόγιο 6 ερωτήσεων που εκτιμά την εξάρτηση από τη νικοτίνη. Την πρώτη ημέρα θα καπνίσεις 2 τσιγάρα της επιλογής σου, μέσα σε διάστημα μισής ώρας. Τη δεύτερη φορά θα καπνίσεις ηλεκτρονικό τσιγάρο. Την τρίτη φορά θα «καπνίσεις» ένα μη αναμμένο τσιγάρο της επιλογής σου. Θα πραγματοποιηθούν μετρήσεις αμέσως πριν το πείραμα, αμέσως μετά τη λήξη του πειράματος και 1 ώρα μετά τη δεύτερη μέτρηση.

Μη καπνιστές: Το πείραμα θα έχει διάρκεια 2 ωρών. Την πρώτη φορά θα υποβληθείς για 1 ώρα σε μέτριο παθητικό κάπνισμα συμβατικού τσιγάρου μέσα σε έναν ειδικά διαμορφωμένο χώρο που θα εξομοιώνει τις συνήθειες συνθήκες που επικρατούν σε ένα εστιατόριο/μπαρ. Τη δεύτερη φορά θα υποβληθείς σε παθητικό κάπνισμα ηλεκτρονικού τσιγάρου για 1 ώρα. Την τρίτη φορά θα περάσεις 1 ώρα σε ένα δωμάτιο με καθαρό αέρα. Θα πραγματοποιηθούν μετρήσεις αμέσως πριν το πείραμα, αμέσως μετά τη λήξη του πειράματος, και 1 ώρα μετά τη δεύτερη μέτρηση.

Οι μετρήσεις θα είναι:

Κλινικές. Στην αρχή του πειράματος θα φορέσεις στον καρπό σου ένα όργανο σαν ρολόι, το καρδιοσυχνόμετρο, που θα μετράει αυτόματα την καρδιακή συχνότητα χρησιμοποιώντας ένα ελαστικό μάντα που θα περάσεις γύρω από το θώρακά σου. Στα χρονικά διαστήματα που αναφέρονται παραπάνω (αρχή, τέλος και 1 ώρα μετά το τέλος του πειράματος) θα γίνει μέτρηση κορεσμού οξυγόνου με οξύμετρο, ένα όργανο με αισθητήρα που φοράς για λίγα δευτερόλεπτα στον δείκτη του χεριού σου μέχρι να γίνει η μέτρηση. Τέλος, θα κληθείς να φουσήξεις όσο πιο δυνατά μπορείς στο

σπιρόμετρο για 3 συνεχόμενες φορές ώστε να γίνουν μετρήσεις της πνευμονικής σου λειτουργίας.

Εργαστηριακές. Για το σκοπό αυτό, θα πραγματοποιείται αιμοληψία κατά την οποία θα λαμβάνονται 15ml αίματος κάθε φορά.

3. Κίνδυνοι και ενοχλήσεις

Κατά την διάρκεια του πειράματος αν είσαι μη καπνιστής υπάρχει κίνδυνος να έχεις κάποια δυσφορία από τον καπνό, η οποία δεν θα είναι μεγαλύτερη από αυτήν όταν παρευρίσκεσαι σε ένα συνηθισμένο εστιατόριο/μπαρ που καπνίζουν. Οποιαδήποτε στιγμή αισθανθείς κάποιο σύμπτωμα που σε προβληματίζει σε παρακαλούμε να το αναφέρεις και θα ληφθεί μέριμνα για την προστασία της υγείας και της προσωπικότητάς σου. Ακόμα υπάρχει ένας πολύ μικρός κίνδυνος δημιουργίας μώλωπα στην περιοχή του αγκώνα όπου και βρίσκεται η φλέβα από την οποία θα πραγματοποιηθεί η αιμοληψία. Θα γίνει κάθε προσπάθεια να ελαχιστοποιηθούν αυτοί οι κίνδυνοι. Υπάρχει πρόβλεψη πρώτων βοηθειών και εκπαιδευμένο προσωπικό για κάθε ενδεχόμενο.

4. Προσδοκώμενες ωφέλειες

Τα ευρήματα από την εργασία θα σου δώσουν την δυνατότητα:

Να εκτιμήσεις τις βραχυπρόθεσμες επιπτώσεις του καπνίσματος (ενεργητικού και παθητικού) συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου στον οργανισμό σου.

Να διαπιστώσεις τις βλαβερές συνέπειες αλλά και τα πιθανά οφέλη για την υγεία σου που πιθανόν να προκύψουν από την σύγκριση των αποτελεσμάτων.

Να οδηγηθείς ακόμη και σε διακοπή του καπνίσματος.

5. Δημοσίευση δεδομένων – αποτελεσμάτων

Η συμμετοχή σου στην έρευνα συνεπάγεται ότι συμφωνείς με τη δημοσίευση των δεδομένων και των αποτελεσμάτων της, με την προϋπόθεση ότι οι πληροφορίες θα είναι ανώνυμες και δε θα αποκαλυφθούν τα ονόματα των συμμετεχόντων. Τα δεδομένα που θα συγκεντρωθούν θα κωδικοποιηθούν με αριθμό, ώστε το όνομα σου δε θα φαίνεται πουθενά.

6. Πληροφορίες

Μη διστάσεις να κάνεις ερωτήσεις γύρω από το σκοπό, τον τρόπο πραγματοποίησης της εργασίας ή τον υπολογισμό της λειτουργικής σου ικανότητας. Αν έχεις κάποιες αμφιβολίες ή ερωτήσεις, ζήτησέ μας να σου δώσουμε πρόσθετες εξηγήσεις.

7.Ελευθερία συναίνεσης

Η άδειά σου να συμμετάσχεις στην εργασία είναι εθελοντική. Είσαι ελεύθερος να μην συναινέσεις ή να διακόψεις τη συμμετοχή σου όποτε επιθυμείς.

Διάβασα το έντυπο αυτό και κατανοώ τις διαδικασίες που θα εκτελέσω. Συναινώ να συμμετέχω στην εργασία.

Ημερομηνία: __/__/__

Παράρτημα Γ.
Υπεύθυνη Δήλωση Πνευματικών Δικαιωμάτων

Υπεύθυνη Δήλωση

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Πουλιανίτη Κωνσταντίνα (ΑΕΜ) 07/10), μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «ΑΣΚΗΣΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ» του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

δηλώνω υπεύθυνα ότι αποδέχομαι τους παρακάτω όρους που αφορούν

(α) στα πνευματικά δικαιώματα της Μεταπτυχιακής Διπλωματικής Εργασίας (ΜΔΕ) μου με τίτλο «Οι οξείες επιδράσεις του ενεργητικού και παθητικού καπνίσματος συμβατικού και ηλεκτρονικού τσιγάρου στο οξειδωτικό στρες»

(β) στη διαχείριση των ερευνητικών δεδομένων που θα συλλέξω στην πορεία εκπόνησής της:

1. Τα πνευματικά δικαιώματα του τόμου της μεταπτυχιακής διατριβής που θα προκύψει θα ανήκουν σε μένα. Θα ακολουθήσω τις οδηγίες συγγραφής, εκτύπωσης και κατάθεσης αντιτύπων της διατριβής στα ανάλογα αποθετήρια (σε έντυπη ή/και σε ηλεκτρονική μορφή).

2. Η διαχείριση των δεδομένων της διατριβής ανήκει από κοινού σε εμένα και στον πρώτο επιβλέποντα καθηγητή.

3. Οποιαδήποτε επιστημονική δημοσίευση ή ανακοίνωση (αναρτημένη ή προφορική), ή αναφορά που προέρχεται από το υλικό/δεδομένα της εργασίας αυτής θα γίνεται με συγγραφείς εμένα τον ίδιο, τον κύριο επιβλέποντα ή και άλλους ερευνητές (όπως πχ μέλους –ών της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής), ανάλογα με τη συμβολή τους στην έρευνα ή στη συγγραφή των ερευνητικών εργασιών.

4. Η σειρά των ονομάτων στις επιστημονικές δημοσιεύσεις ή επιστημονικές ανακοινώσεις θα αποφασίζεται από κοινού από εμένα και τον κύριο επιβλέποντα της εργασίας, πριν αρχίσει η εκπόνησή της. Η απόφαση αυτή θα πιστοποιηθεί εγγράφως μεταξύ εμού και του κ. επιβλέποντα.

Τέλος, δηλώνω ότι γνωρίζω τους κανόνες περί λογοκλοπής και πνευματικής ιδιοκτησίας και ότι θα τους τηρώ απαρέγκλιτα καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησης και κάλυψης των εκπαιδευτικών υποχρεώσεων που προκύπτουν από το ΠΜΣ/τμήμα, αλλά και των διαδικασιών δημοσίευσης που θα προκύψουν μετά την ολοκλήρωση των σπουδών μου.

05/07/2012

Η δηλούσα



Πουλιανίτη Κωνσταντίνα

Παράρτημα Δ.
Βιβλίο Συναντήσεων

Ονοματεπώνυμο φοιτήτριας: Πουλιανίτη Κωνσταντίνα.....

Συνάντηση 1^η

Ημερομηνία: 15/03/2011 Ώρα:11:00 Υπογραφή Επιβλέποντος:.....

Σκοπός: Θέμα και σχεδιασμός διατριβής Υπογραφή φοιτητή:.....

Επόμενοι Στόχοι: Πρόταση προς επιτροπή βιοηθικής.

Συνάντηση 2^η

Ημερομηνία: 18/05/2011 Ώρα:12:00 Υπογραφή Επιβλέποντος:.....

Σκοπός: Οργάνωση έρευνας Υπογραφή φοιτητή:.....

Επόμενοι Στόχοι: Σχεδιασμός και οργάνωση του πειραματικού μέρους

Συνάντηση 3^η

Ημερομηνία:14/09/2011 Ώρα:17:00 Υπογραφή Επιβλέποντος:.....

Σκοπός: Οργάνωση έρευνας Υπογραφή φοιτητή:.....

Επόμενοι Στόχοι: Προετοιμασία χώρου για μετρήσεις. Πιλοτικές μετρήσεις. Καταγραφή απαραίτητων αναλωσίμων για την διεξαγωγή των βιοχημικών αναλύσεων.

Συνάντηση 4^η

Ημερομηνία: 03/10/2011 Ώρα:09:00 Υπογραφή Επιβλέποντος:

Σκοπός: Πιλοτικές μετρήσεις Υπογραφή φοιτητή:.....

Επόμενοι Στόχοι: Έναρξη επίσημων μετρήσεων, ημερολόγιο/χρονοδιάγραμμα εργαστηριακών μετρήσεων. Συνεννόηση με τους εθελοντές.

Συνάντηση 5^η

Ημερομηνία:15/10/2011 Ώρα:09:30 Υπογραφή Επιβλέποντος:.....

Σκοπός: Έναρξη επίσημων μετρήσεων Υπογραφή φοιτητή:.....

Επόμενοι Στόχοι: Πρόοδος μετρήσεων

Συνάντηση 6^η

Ημερομηνία:09/12/2011 Ώρα:10:00 Υπογραφή Επιβλέποντος:.....

Σκοπός: Πρώτη επεξεργασία των δεδομένων Υπογραφή φοιτητή:.....

Επόμενοι Στόχοι: Πρόοδος μετρήσεων – Επεξεργασίας δεδομένων.

Συνάντηση 7^η

Ημερομηνία:05/02/2012 Ώρα:12:00 Υπογραφή Επιβλέποντος:.....

Σκοπός: Δεύτερη επεξεργασία μετρήσεων - Συζήτηση Υπογραφή φοιτητή:.....

Επόμενοι Στόχοι: Πρόοδος- Ολοκλήρωση πειραματικού μέρους

Συνάντηση 8^η

Ημερομηνία:17/04/2012 Ώρα:18:30 Υπογραφή Επιβλέποντος:

Σκοπός: Στατιστική ανάλυση δεδομένων Υπογραφή φοιτητή:.....

Επόμενοι Στόχοι: Συγγραφή της διατριβής

Συνάντηση 9^η

Ημερομηνία:10/06/2013 Ώρα:12:00 Υπογραφή Επιβλέποντος:

Σκοπός: Συγγραφή διατριβής Υπογραφή φοιτητή:.....

Επόμενοι Στόχοι: Συγγραφή μεταπτυχιακής διατριβής εντός χρονοδιαγράμματος

Συνάντηση 10^η

Ημερομηνία:27/06/2012 Ώρα:10:00 Υπογραφή Επιβλέποντος:.....

Σκοπός: Παρουσίαση μεταπτυχιακής διατριβής Υπογραφή φοιτητή:.....

Επόμενοι Στόχοι: Ολοκλήρωση μεταπτυχιακού προγράμματος