

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

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

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

**ΓΕΩΡΓΑΚΟΥΛΗ ΚΑΛΛΙΟΠΗ**

**«ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΤΟΜΩΝ ΜΕ ΕΛΛΕΙΨΗ  
ΕΝΖΥΜΟΥ G6PD ΜΕΤΑ ΤΗ ΛΗΨΗ ΛΙΠΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ»**

**ΛΑΡΙΣΑ 2012**

1

**Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ατόμων με έλλειψη ενζύμου  
G6PD μετά τη λήψη λιποϊκού οξέος**

### **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

---

1ος Επιβλέπων: Τζαμούρτας Αθανάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας της Άσκησης, Τμήμα Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

---

2ος Επιβλέπων: Κουρέτας Δημήτριος, Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

---

3ος Επιβλέπων: Στάγκος Δημήτριος, Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

## Ευχαριστίες

Θα θελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Αθανάσιο Τζιαμούρτα κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την υποστήριξη κατά τη διάρκεια της υλοποίησης της παρούσης μεταπτυχιακής διατριβής, καθώς και την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του για την επίλυση διάφορων θεμάτων. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους υπόλοιπους καθηγητές που μου παρείχαν πολύτιμες γνώσεις κατά τη διάρκεια των σπουδών μου, καθώς και την υποψήφια διδάκτορα κα. Δελή Χαρίκλεια για τη βοήθεια και τις συμβουλές της προς εμένα κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσης εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα επίσης να απευθύνω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου, η οποία στήριξε τις σπουδές μου με διάφορους τρόπους, φροντίζοντας για την καλύτερη δυνατή μόρφωση μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Γεωργακούλη Καλλιόπη: Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ατόμων με έλλειψη ενζύμου G6PD μετά τη λήψη λιποϊκού  
(Με την επίβλεψη του κ. Αθανασίου Τζιαμούρτα, Αναπλ. Καθηγητή)

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εξετάσει αν η χορήγηση α-λιποϊκού οξέος (ΛΟ) μπορεί να μεταβάλλει δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του αίματος ατόμων με έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD). Στην έρευνα συμμετείχαν 8 άτομα με έλλειψη του G6PD και 8 άτομα με κανονικά επίπεδα δραστηριότητας του ενζύμου. Σε όλους τους συμμετέχοντες έγινε χορήγηση σκευάσματος ΛΟ (600mg/ημέρα) για διάρκεια 28 ημερών (4 εβδομάδες). Πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες σε όλα τα άτομα πριν την χορήγηση (αρχική κατάσταση), στα μέσα της χορήγησης (τέλος 2<sup>ης</sup> εβδομάδας) και με το πέρας αυτής (τέλος 4<sup>ης</sup> εβδομάδας). Η μέτρηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) και της δραστηριότητας της καταλάσης έγινε στο ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα, η μέτρηση της χολερυθρίνης και του ουρικού οξέος στον ορό και η μέτρηση για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια στο πλάσμα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε πως η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων ( $M = 9,084$ ,  $SE = 0,44$  U/g Hb) είχε σημαντικά μεγαλύτερη δραστηριότητα G6PD σε σχέση με την ομάδα έλλειψης του ενζύμου ( $M = 0,512$ ,  $SE = 0,01$  U/g Hb). Επίσης, η συγκέντρωση της GSH παρουσίασε σημαντικές διαφορές για το χρόνο ( $F_{(2,28)} = 13,99$ ,  $p < 0.01$ ). Η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων ( $M = 3,06$ ,  $SE = 0,14$ ) είχε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές GSH στην αρχική κατάσταση, σε σχέση με την ομάδα έλλειψης ενζύμου G6PD ( $M = 2,36$ ,  $SE = 0,28$ ). Ωστόσο, οι διαφορές στο χρόνο δεν οφειλόταν στις αρχικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ( $p > 0.05$ ). Η δραστηριότητα της καταλάσης παρουσίασε σημαντικές διαφορές για το χρόνο ( $F_{(2,28)} = 5,45$ ,  $p < 0.05$ ) ενώ δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ( $F_{(1,14)} = 1,963$   $p > 0.05$ ), ούτε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδας και χρόνου ( $F_{(2,28)} = 0,287$   $p > 0.05$ ). Δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στην τιμή της αρχικής κατάστασης της καταλάσης ( $t(14) = 1,887$ ,  $p > 0.05$ ). Η συγκέντρωση της χολερυθρίνης και της αιμοσφαιρίνης δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές για την ομάδα, για το χρόνο, αλλά ούτε και σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδας και χρόνου. Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων παρουσίασε σημαντικές διαφορές για το χρόνο ( $F_{(2,28)} = 4,94$ ,  $p < 0.05$ ) ενώ δεν υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ( $F_{(1,14)} = 0,056$ ,  $p > 0.05$ ), ούτε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδας και χρόνου ( $F_{(2,28)} = 0,184$   $p > 0.05$ ). Ωστόσο, η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων ( $M = 0,807$ ,  $SE = 0,10$ ) δεν είχε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην αρχική κατάσταση, σε σχέση με την ομάδα έλλειψης ενζύμου G6PD ( $M = 0,826$ ,  $SE = 0,18$ ). Η συγκέντρωση του ουρικού οξέος δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές για το χρόνο ( $F_{(2,28)} = 0,086$ ,  $p > 0.05$ ) ούτε για την ομάδα ( $F_{(1,14)} = 2,344$ ,  $p > 0.05$ ), ενώ υπήρξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδας και χρόνου ( $F_{(2,28)} = 4,617$ ,  $p < 0.05$ ). Η συγκέντρωση του ουρικού οξέος για την ομάδα με την έλλειψη ενζύμου G6PD ( $M = 355,77$ ,  $SE = 22,381$ ) ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με την ομάδα φυσιολογικών ατόμων ( $M = 265,06$ ,  $SE = 22,381$ ) μετά τις τέσσερες εβδομάδες. Από τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας φαίνεται πως η βραχύχρονη συμπληρωματική χορήγηση ΛΟ ενδέχεται να μπορεί να μεταβάλλει τη συγκέντρωση της GSH τόσο στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD όσο και στα φυσιολογικά άτομα, χωρίς ωστόσο να επηρεάζονται όλοι οι δείκτες που εξετάστηκαν και

που σχετίζονται με το αντιοξειδωτικό σύστημα και τη λιπιδική υπεροξείδωση. Επιπρόσθετες έρευνες χρειάζονται για να εξεταστούν περισσότεροι δείκτες που σχετίζονται με το αντιοξειδωτικό σύστημα αλλά και τη λιπιδική υπεροξείδωση, με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, καθώς επίσης να εξεταστεί η μακρόχρονη επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης ΛΟ σε συνδυασμό με την απόκριση του οργανισμού μετά από υποβολή κάποιου στρεσογόνου παράγοντα, όπως η άσκηση.

Λέξεις κλειδιά: *Οξειδωτικό στρες, ελεύθερες ρίζες, γλουταθειόνη, α-λιποϊκό οξύ, συμπλήρωμα.*

## ABSTRACT

Georgakouli Kalliopi: Comparison of the antioxidant capacity in people with G6PD deficiency after lipoic acid (LA) supplementation (Under the supervision of Associate Professor Athanasios Jamurtas)

The purpose of this study was to examine the effects of  $\alpha$ -lipoic acid (LA) supplementation on blood redox status indices in people with glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD). Eight people with G6PD deficiency and 8 matched controls with normal levels of the enzyme participated in the study. All subjects received LA (600 mg per day) for 28 days (4 weeks). Blood was collected from all participants before (BASELINE), meantime (at the end of the 2<sup>nd</sup> week) and after supplementation (at the end of the 4<sup>th</sup> week). Whole blood lysate was used to measure reduced (GSH) and catalase activity, serum was used to measure bilirubin and uric acid, and plasma was used to measure protein carbonyls. Results showed that control group (M = 9,084, SE = 0,44 U/g Hb) had a significant higher G6PD activity in comparison with deficiency group (M = 0,512, SE = 0,01 U/g Hb). Furthermore, there were differences in GSH for time ( $F_{(2,28)} = 13,99, p < 0.01$ ). GSH levels in control group (M = 3,06, SE = 0,14) were significantly higher at the baseline compared with deficiency group (M = 2,36, SE = 0,28). However, differences in GSH for time were not due to initial (baseline) differences between the two groups ( $p > 0.05$ ). There were differences in catalase activity for time ( $F_{(2,28)} = 5,45, p < 0.05$ ) but no differences for group ( $F_{(1,14)} = 1,963, p > 0.05$ ) were observed, nor group X time interaction was found ( $F_{(2,28)} = 0,287, p > 0.05$ ). No differences in catalase activity at the baseline were found ( $t(14) = 1,887, p > 0.05$ ). No significance for group, time or group X time was observed for TBARS, bilirubin or uric acid levels. No significant differences for group or time, and no significance for group X time were observed for bilirubin and haemoglobin levels. There were significant differences in protein carbonyls for time ( $F_{(2,28)} = 4,94, p < 0.05$ ) but there were not significant differences for group ( $F_{(1,14)} = 0,056, p > 0.05$ ), nor significant group X time interaction ( $F_{(2,28)} = 0,184, p > 0.05$ ). However, protein carbonyls levels in control group there were not significant higher at the baseline (M = 0,807, SE = 0,10) compared to deficiency group (M = 0,826, SE = 0,18). There were not significant differences in uric acid for time ( $F_{(2,28)} = 0,086, p > 0.05$ ) or for group ( $F_{(1,14)} = 2,344, p > 0.05$ ) but there was significant group X time interaction ( $F_{(2,28)} = 4,617, p < 0.05$ ).

Uric acid levels in deficiency group were significantly higher after 4 weeks ( $M = 355,77$ ,  $SE = 22,381$ ) compared with control group ( $M = 265,06$ ,  $SE = 22,381$ ). The results from this study show that short term supplementation with LA is possible that alters GSH levels in G6PD deficient and control individuals with no changes in the tested antioxidant and lipid peroxidation indices. Further research is needed in order to measure more antioxidant and lipid peroxidation indices with a larger sample, as well to examine the effects of long term with LA supplementation on redox status and the response of these individuals following a stressful condition such as exercise.

*Key words: Oxidative stress, free radicals, glutathione,  $\alpha$ -lipoic acid, supplement.*



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	5
ABSTRACT .....	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ - ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	12
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	13
Η έλλειψη του G6PD.....	13
Οξειδωτικό στρες και αντιοξειδωτική άμυνα.....	13
Σημασία της έρευνας.....	15
Ερευνητικές υποθέσεις .....	15
Στατιστικές υποθέσεις.....	15
Περιορισμοί της έρευνας.....	16
II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	17
Το ένζυμο G6PD .....	17
Έλλειψη G6PD και επιδημιολογία αυτής.....	18
Πιθανές συνέπειες έλλειψης του G6PD.....	19
Οξειδωτικό στρες και αντιοξειδωτική άμυνα.....	21
Αντιοξειδωτικά.....	23
Γλουταθειόνη.....	24
Ουσίες που αυξάνουν την ανηγμένη γλουταθειόνη .....	26
α-Λιποϊκό οξύ (ΛΟ).....	34
Πιθανές ωφέλειες της χρήσης ΛΟ .....	35
III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	39
Συμμετέχοντες .....	39
Πειραματικό πρωτόκολλο .....	39

Σωματομετρικές αξιολογήσεις .....	40
Συλλογή και χειρισμός αίματος .....	41
Αναλύσεις στο πλάσμα, το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα και τον ορό .....	42
Στατιστική ανάλυση .....	45
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	46
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	53
VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ .....	55
VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	56

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ - ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Πίνακας 1.** Αντιοξειδωτικές δράσεις του λιποϊκού (ΛΟ) και του διυδρο-λιποϊκού οξέος (ΔΥΛΟ) όπως έχουν φανεί από διάφορες μελέτες ..... 36
- Σχήμα 1.** Δραστικότητα του G6PD στην ομάδα ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και φυσιολογικών ατόμων (N) ( $M \pm SE$ ). ..... 46
- Σχήμα 2.** Συγκέντρωση ανηγμένης γλουταθειόνης ( $\mu\text{mol/g}$ ) στην ομάδα ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και φυσιολογικών ατόμων (N) πριν (BASELINE), ενδιάμεσα (2W) και μετά (4W) τη χορήγηση του συμπληρώματος ( $M \pm SE$ ). ..... 47
- Σχήμα 3.** Δραστικότητα καταλάσης (U/mg Hb) στην ομάδα ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και φυσιολογικών ατόμων (N) πριν (BASELINE), ενδιάμεσα (2W) και μετά (4W) τη χορήγηση του συμπληρώματος ( $M \pm SE$ ). ..... 48
- Σχήμα 4.** Συγκέντρωση χολερυθρίνης ( $\mu\text{mol/L}$ ) στην ομάδα ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και φυσιολογικών ατόμων (N) πριν (BASELINE), ενδιάμεσα (2W) και μετά (4W) τη χορήγηση του συμπληρώματος ( $M \pm SE$ ). ..... 49
- Σχήμα 5.** Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (g/dL) στην ομάδα ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και φυσιολογικών ατόμων (N) πριν (BASELINE), ενδιάμεσα (2W) και μετά (4W) τη χορήγηση του συμπληρώματος ( $M \pm SE$ ). ..... 50
- Σχήμα 6.** Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg) στην ομάδα ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και φυσιολογικών ατόμων (N) πριν (BASELINE), ενδιάμεσα (2W) και μετά (4W) τη χορήγηση του συμπληρώματος ( $M \pm SE$ ) ..... 51
- Σχήμα 7.** Συγκέντρωση ουρικού οξέος (mg/dL) στην ομάδα ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και φυσιολογικών ατόμων (N) πριν (BASELINE), ενδιάμεσα (2W) και μετά (4W) τη χορήγηση του συμπληρώματος ( $M \pm SE$ ). ..... 52

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.</b> : G6PD και μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών .....	18
<b>Εικόνα 2.</b> Σχηματικό διάγραμμα του οξειδοαναγωγικού κύκλου .....	25

## I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### ***Η έλλειψη του G6PD***

Η έλλειψη του G6PD είναι μια από τις πιο κοινές ενζυμικές διαταραχές στον άνθρωπο, καθώς υπολογίζεται ότι περισσότερα από 400 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως την έχουν (Mehta et al, 2000; Turan, 2006). Και στην Ελλάδα υπάρχει μεγάλη διάδοση της έλλειψης, σε ποσοστό περίπου 3.2% του πληθυσμού. Ειδικά στην Θεσσαλία έχει υπολογιστεί ότι το ποσοστό φτάνει μέχρι το 10% (Missiou-Tsagaraki, 1991).

Το G6PD καταλύει την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Αποτελεί σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο των εμπύρηνων κύτταρων (Leopold et al, 2001) και ιδιαίτερα των ερυθροκυττάρων, όπου και αποτελεί τη μοναδική πηγή NADPH (Schuurman et al, 2009). Σε ερυθροκύτταρα με μειωμένη δραστηριότητα G6PD, η παραγωγή NADPH είναι ιδιαίτερα μειωμένη κι επομένως το οξειδωτικό στρες είναι αυξημένο (Chan et al, 1999). Έτσι, προκαλείται διαταραχή στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση που μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως εκφυλιστικές ασθένειες (Ho et al, 2007). Επίσης, τα ερυθροκύτταρα είναι πιο επιρρεπή σε αιμόλυση κάτω από συνθήκες στρες που μπορούν να προκληθούν από διάφορες αιτίες, όπως κατανάλωση κουκιών και κάποιων φαρμάκων, καθώς και από σοβαρές λοιμώξεις (Kwok et al, 2002; Lim et al, 2005). Για την πρόληψη ή την αντιμετώπιση των παθολογικών καταστάσεων που προκύπτουν από την οξειδοαναγωγική ανισορροπία, εξετάζονται οι πιθανές ευεργετικές δράσεις διάφορων αντιοξειδωτικών ουσιών.

### ***Οξειδωτικό στρες και αντιοξειδωτική άμυνα***

Όταν η αντιοξειδωτική άμυνα δεν μπορεί να συμβαδίσει με το ρυθμό που παράγονται τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS), τότε υπάρχει οξειδωτικό στρες (Finkel, 2000; Martindale & Holbrook, 2002). Ανάμεσα στα ROS συμπεριλαμβάνονται σουπεροξειδικά ανιόντα, υδροξυλικές ρίζες και υπεροξείδια του υδρογόνου (Finkel, 2000). Ένας γενικός ορισμός περιγράφει ότι οξειδωτικό στρες είναι η ανισορροπία

μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, που δυνητικά μπορούν να οδηγήσουν σε βλάβη (Sies, 1995).

Η ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH) είναι αντιοξειδωτικό ένζυμο και φαίνεται ότι είναι σημαντική για την υγεία του κυττάρου και συνεπώς ολόκληρου του οργανισμού. Πιθανότατα η βέλτιστη συγκέντρωση της GSH θα μπορούσε να αυξήσει τις αντιοξειδωτικές άμυνες και να σταθεροποιήσει ή να αυξήσει το όριο του κυττάρου για ευπάθεια σε τοξική προσβολή (Kidd PM, 1997).

Η GSH δεν μπορεί να διατηρηθεί σε υψηλά επίπεδα σε άτομα με έλλειψη του G6PD. Όπως προαναφέρθηκε, η αντιοξειδωτική άμυνα των ερυθροκυττάρων εξαρτάται από το G6PD, το οποίο καταλύει την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Αυτή η αντίδραση παράγει NADPH, το οποίο δίνει ηλεκτρόνια στην γλουταθειόνη. Η GSH είναι απαραίτητη για την αναγωγή των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου, προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο την αιμοσφαιρίνη και άλλες ερυθροκυτταρικές πρωτεΐνες από οξείδωση (Schuurman et al, 2009).

Διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες μελετούνται για την πιθανή επίδρασή τους στη συγκέντρωση της GSH. Μια από αυτές είναι το α-λιποϊκό οξύ (ΛΟ), το οποίο είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό με σημαντικές επιδράσεις σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις και κυρίως σε αυτές που σχετίζονται με τη γήρανση. Εξαιτίας των πολλών κυτταρικών και μοριακών λειτουργιών, η χρήση του ΛΟ ως θρεπτικό συμπλήρωμα και ως φαρμακοθεραπεία έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον επιστημόνων και μη (Petersen Shay et al, 2009). Αυξάνοντας τον εφοδιασμό του οργανισμού με κυστεΐνη ή πρόδρομα αυτής (π.χ. κυστίνη, N-ακετυλ κυστεΐνη και προκυστεΐνη) μέσω στοματικής ή ενδοφλέβιας χορήγησης, φαίνεται ότι αυξάνεται η σύνθεση GSH και προλαμβάνεται η έλλειψη GSH σε ανθρώπους και ζώα κάτω από διάφορες διατροφικές και παθολογικές καταστάσεις (όπως πρωτεϊνική δυσθρεψία, σύνδρομο αναπνευστικής καταπόνησης ενηλίκων, HIV και AIDS) (Townsend et al, 2003). Τα πρόδρομα της GSH που θεωρούνται πιο ασφαλή περιλαμβάνουν την NAC, την γλυκίνη, την L-γλουταμίνη, την L-ταυρίνη, την L-μεθειονίνη και την S-αδενοσυλ μεθειονίνη. Αντιθέτως, η συμπληρωματική χορήγηση L-κυστεΐνης θα έπρεπε να αποφεύγεται λόγω των σημαντικών παρενεργειών της (Kidd, 1997).

### **Σημασία της έρευνας**

Η αποκατάσταση της οξειδοαναγωγικής ομοιοστασίας αποτελεί ένα μεγάλο αντικείμενο μελέτης, καθώς η οξειδοαναγωγική ανισορροπία μπορεί να προκαλέσει διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Οξειδοαναγωγική ανισορροπία προκαλείται και στα εκατομμύρια των ατόμων με έλλειψη του G6PD παγκοσμίως (Ho et al, 2007). Στην παρούσα εργασία γίνεται μια προσπάθεια να διαπιστωθεί εάν η συμπληρωματική χορήγηση ΛΟ μπορεί να αυξήσει την αντιοξειδωτική ικανότητα ατόμων με έλλειψη του G6PD. Αυτό θα μπορούσε να καταστήσει το ΛΟ σύμμαχο αυτών των ατόμων στην αποκατάσταση της οξειδοαναγωγικής ανισορροπίας και συνεπώς στην πρόληψη των αρνητικών επιδράσεων αυτής.

### **Ερευνητικές υποθέσεις**

I. Η χορήγηση ΛΟ θα οδηγήσει σε άνοδο των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD.

II. Η χορήγηση ΛΟ θα οδηγήσει σε μείωση του οξειδωτικού στρες στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD εξαιτίας της αύξησης των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης.

### **Στατιστικές υποθέσεις**

#### Μηδενικές υποθέσεις

i) Μηδενική υπόθεση ( $\mu_1 = \mu_2$ ): Δεν θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μετρήσεων (πριν και μετά την χορήγηση) στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης στην ομάδα ατόμων με έλλειψη του G6PD.

ii) Μηδενική υπόθεση ( $\mu_1 = \mu_2$ ): Δεν θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD παρά τις μεταβολές των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης.

#### Εναλλακτικές υποθέσεις

i) Εναλλακτική υπόθεση ( $\mu_1 \neq \mu_2$ ): Θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των μετρήσεων (πριν και μετά την χορήγηση) στα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης στην ομάδα ατόμων με έλλειψη του G6PD.

ii) Εναλλακτική υπόθεση ( $\mu_1 \neq \mu_2$ ): Θα υπάρξουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD παρά τις μεταβολές των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης.

### ***Περιορισμοί της έρευνας***

Οι περιορισμοί της εργασίας αφορούν το γεγονός ότι οι μετρήσεις των δεικτών οξειδωτικού στρες έγιναν μόνο στο αίμα. Επίσης περιοριστικός παράγοντας είναι η ηλικία και το βάρος των συμμετεχόντων, καθώς και οι διαφορετικές συνήθειες (διατροφή, φυσική δραστηριότητα).

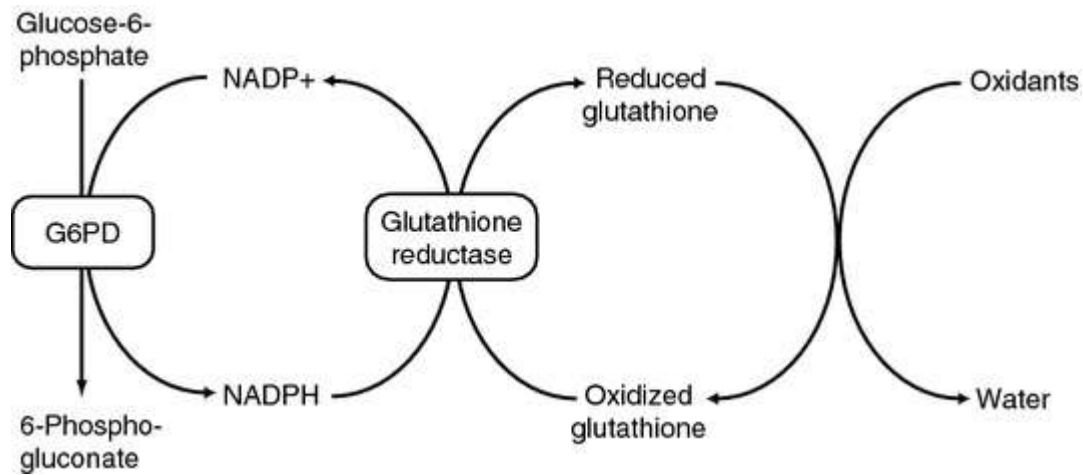


## II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

### ***Το ένζυμο G6PD***

Το G6PD είναι το πρώτο και περιοριστικό ένζυμο του μεταβολικού μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών. Καταλύει τη σύνθεση της ριβόζης και τη μετατροπή του NADP στην ανηγμένη του μορφή, το NADPH (Leopold et al, 2001; Frank et al, 2005). Το NADPH, με την σειρά του, χρησιμοποιείται ως ένα ενδοκυτταρικό αναγωγικό ισοδύναμο για προστασία από οξειδωτική βλάβη, καθώς συμβάλλει στη διατήρηση της γλουταθειόνης στην ανηγμένη της μορφή (GSH) όταν τα κύτταρα υφίστανται οξειδωτικό στρες (Gaetani et al, 1996). Αυξημένα επίπεδα των βλαβερών ενδοκυτταρικών αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) εξουδετερώνονται από την GSH, η οποία μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) σε μια αντίδραση κατάλυσης από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx). Για να επαναφερθεί η ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση, η γλουταθειόνη ανακυκλώνεται από την αναγωγή της GSSG, η οποία απαιτεί NADPH ως αναγωγικό ισοδύναμο (Leopold et al, 2001).

Το G6PD έχει αναγνωριστεί ως αντιοξειδωτικό ένζυμο. Συμβάλλει στην άμυνα κατά του οξειδωτικού στρες γενικά στα εμπύρνηνα κύτταρα (Leopold et al, 2001), ενώ είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα ερυθροκύτταρα, αφού αποτελεί τη μοναδική πηγή NADPH για αυτά (Εικ. 1). Έτσι, όταν η δραστηριότητα του G6PD είναι μειωμένη, τα ερυθροκύτταρα είναι πιο επιρρεπή σε αιμόλυση κάτω από συνθήκες στρες που μπορούν να προκληθούν από διάφορες αιτίες, όπως κατανάλωση κουκιών και κάποιων φαρμάκων, καθώς και από σοβαρές λοιμώξεις (Kwok et al, 2002; Lim et al, 2005).



**Εικ. 1:** G6PD και μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Η αντιοξειδωτική άμυνα των ερυθροκυττάρων εξαρτάται από το G6PD, το οποίο καταλύει την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Το NADPH που παράγεται από αυτή την αντίδραση δίνει ηλεκτρόνια στη γλουταθειόνη. Η GSH είναι απαραίτητη για την αναγωγή των ROS, προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο την αιμοσφαιρίνη και άλλες ερυθροκυτταρικές πρωτεΐνες από οξείδωση (Schuurman et al, 2009).

Κάθε μόριο G6PD που βρίσκεται στα ερυθροκύτταρα δεν μπορεί να αντικατασταθεί σε περίπτωση μετουσίωσης ή πρωτεόλυσης. Ο χρόνος ημιζωής του G6PD φυσιολογικών ερυθροκυττάρων είναι περίπου 60 ημέρες. Η εξάρτηση της δραστηριότητας του ερυθροκυτταρικού G6PD από την ηλικία είναι χαρακτηριστική και πιθανώς μπορεί να θεωρηθεί ως ένας δείκτης της ηλικίας των ερυθροκυττάρων (Piomelli et al, 1968; Beutler 1988, Marks & Johnson, 1958).

**Έλλειψη G6PD και επιδημιολογία αυτής.** Το G6PD βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα του σώματος. Το επίπεδο δραστηριότητας του ενζύμου στα ερυθροκύτταρα ατόμων που έχουν την έλλειψη είναι γενικά χαμηλότερο από ότι σε άλλα κύτταρα, ενώ όταν η έλλειψη είναι σοβαρή, υπάρχει επίσης σε κάποιο βαθμό έλλειψη και σε άλλα σωματικά κύτταρα (Luzzatto & Battistuzzi, 1985). Είναι δυνατό και σε πολύ χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας του ενζύμου να υπάρχουν λίγα ή και κανένα κλινικό σύμπτωμα. Ολική έλλειψη του G6PD είναι ασύμβατη με τη ζωή (Beutler, 1994). Σε φυσιολογικά άτομα η δραστηριότητα του ενζύμου στα ερυθροκύτταρα, όταν δεν υπάρχει οξειδωτικό στρες, είναι περίπου 2% της ολικής ικανότητας (Ruwende, 1998).

Η έλλειψη του G6PD είναι μια από τις πιο διαδεδομένες ενζυμικές διαταραχές στον άνθρωπο, αφού υπολογίζεται ότι πάνω από 400 εκατομμύρια άτομα παγκοσμίως την έχουν (Mehta et al, 2000; Turan, 2006). Στην Ελλάδα το ποσοστό στον γενικό πληθυσμό είναι περίπου 3.2% ενώ στη Θεσσαλία φτάνει μέχρι το 10% (Missiou-Tsagaraki, 1991). Το μεγαλύτερο ποσοστό των ατόμων με την έλλειψη είναι αρσενικά, καθώς η έλλειψη του G6PD είναι μια φυλοσύνδετη γενετική διαταραχή (Laosombat et al, 2006; Usanga & Ameen, 2000). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί περίπου 140 μεταλλάξεις ή συνδυασμοί τέτοιων μεταλλάξεων, με τις περισσότερες να είναι σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούν αντικατάσταση αμινοξέων στο γονίδιο του G6PD. Η ποικιλία των σημειακών μεταλλάξεων και οι πιθανές αλληλεπιδράσεις με άλλα γονίδια εξηγούν τη φαινοτυπική ετερογένεια της έλλειψης του G6PD (Beutler & Vulliamy, 2002; Vulliamy et al, 1988).

Η διάδοση της έλλειψης σχετίζεται με τη γεωγραφική κατανομή της ελονοσίας. Αυτό οδήγησε στην υπόθεση ότι άτομα με έλλειψη του G6PD μπορεί να έχουν μερική ανοσία στη μόλυνση από ελονοσία. Περιπτώσεις σποραδικής γενετικής μετάλλαξης απατώνται σε όλους τους πληθυσμούς (Frank, 2005), ωστόσο η κατανομή της έλλειψης του G6PD διαφέρει αρκετά μεταξύ διαφορετικών πληθυσμών. Αυτό αντανακλά γεωγραφικές και εθνικές διαφορές, με μεγάλη διάδοση να υπάρχει στη Μέση Ανατολή (Turan, 2006; Lim et al, 2005) και σε πολλούς πληθυσμούς στα περισσότερα τροπικά και υποτροπικά μέρη του κόσμου, λόγω της φυσικής επιλογής απέναντι στην ελονοσία (WHO Working Group, 1989). Πιο συγκεκριμένα συναντάται με αυξημένη συχνότητα στην Αφρική, στην Ασία, στη Μεσόγειο και στη Μέση Ανατολή. Στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής πιο συχνά προσβάλλονται οι έγχρωμοι άντρες σε ποσοστό 10% (Frank, 2005).

**Πιθανές συνέπειες της έλλειψης του G6PD.** Τα άτομα με έλλειψη του G6PD μπορεί να εκδηλώσουν διάφορες ασθένειες, όπως νεογνική υπερχολερουθριναιμία (ίκτερο), οξεία αιμόλυση και χρόνια αιμόλυση. Μπορεί ωστόσο να είναι ασυμπτωματικά, εφόσον δεν εκτεθούν σε παράγοντες οξειδωτικού στρες που μπορούν να προκαλέσουν αιμόλυση, όπως μολύνσεις, οξειδωτικά φάρμακα ή κουκιά (φαβισμός) (Frank, 2005).

Η πιθανή συμμετοχή της έλλειψης του G6PD στην παθογένεια άλλων ασθενειών δεν έχει τεκμηριωθεί καλά μέχρι σήμερα (Ho et al, 2007). Διαφορετικές γενετικές

μεταλλάξεις προκαλούν και διαφορετικά επίπεδα ενζυμικής έλλειψης. Έτσι υπάρχουν κατηγορίες ανάλογα με το βαθμό έλλειψης και εκδήλωσης ασθένειας (Frank, 2005).

Η έλλειψη του G6PD προκαλεί διαταραχή στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε καταστάσεις όπως δυσλειτουργία της κυτταρικής ανάπτυξης και σηματοδότησης, ανώμαλη εμβρυϊκή ανάπτυξη, αυξημένη ευαισθησία σε ιογενείς λοιμώξεις και εκφυλιστικές ασθένειες (Ho et al, 2007).

*G6PD και καρδιαγγειακές παθήσεις.* Φαίνεται ότι το G6PD είναι σημαντικό για την ομαλή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος. Πειράματα σε ζώα έχουν δείξει ότι η έλλειψη του G6PD σχετίζεται με υπέρταση (Matsui et al, 2006; Matsui et al, 2005). Η έλλειψη του ενζύμου αυτού σχετίζεται και με σημαντική μείωση του πολλαπλασιασμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και του σχηματισμού του σωλήνα των τριχοειδών αγγείων (Leopold et al, 2003). Επίσης, το G6PD έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη συσσώρευση ROS, γεγονός που δείχνει ότι η δραστηριότητά του μπορεί να επηρεάζει την καρδιαγγειακή λειτουργία. Σε μια μελέτη φάνηκε να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της καρδιαγγειακής βλάβης που προκαλείται από ισχαιμία με την εξάντληση της ολικής γλουταθειόνης και τη μειωμένη παραγωγή της GSH σε ποντίκια (Jain et al, 2004). Κάποιες άλλες μελέτες, όμως, έχουν δείξει ότι η έλλειψη του G6PD μειώνει την αγγειακή παραγωγή υπεροξειδάσης, τη χοληστερόλη ορού και την περιοχή της αορτικής βλάβης σε ποντίκια με  $\alpha$ -λιποπρωτεΐνη E-/- (Matsui et al, 2006).

*G6PD και ιογενείς λοιμώξεις.* Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι το οξειδοαναγωγικό περιβάλλον επηρεάζει την έκβαση των ιογενών λοιμώξεων. Φαίνεται ότι η οξειδοαναγωγική ανισορροπία ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των ιών και τη νοσηρότητα. Έτσι, είναι πιθανό η έλλειψη του G6PD να ενισχύει την κυτταροπαθογόνο δράση και τον αριθμό των ιών-απογόνων που παράγονται (Ho et al, 2007).

*G6PD και καρκίνος.* Η συσχέτιση μεταξύ G6PD και καρκίνου δεν είναι ακόμα σαφής. Μελέτες έχουν δείξει ότι η δραστηριότητα του G6PD είναι αυξημένη σε κακοήθεις ιστούς διαφόρων μορφών καρκίνων (Schaffer, 1985; Sun, 1990; Sulis, 1972; Bezwoda et al, 1985). Πιθανολογείται ότι τα άτομα με έλλειψη του G6PD μπορεί να βρίσκονται σε μικρότερο κίνδυνο για ανάπτυξη καρκίνου, εξαιτίας της μειωμένης ικανότητας πολλαπλασιασμού και της πρόωρης γήρανσης των κυττάρων τους (Ho et al, 2007).

*G6PD και άλλα θέματα υγείας.* Φαίνεται ότι τα άτομα με έλλειψη του G6PD είναι πιο ευάλωτα από τα φυσιολογικά στην ανάπτυξη και κάποιων άλλων ασθενειών. Για παράδειγμα, τα άτομα με έλλειψη του G6PD βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο για διαβήτη (Niazi, 1991; Wan, 2002), ενώ φαίνεται ότι μπορεί να επηρεαστεί ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η σηματοδότηση της ινσουλίνης και η έκφραση των κυτοκινών στα λιποκύτταρα αυτών των ατόμων (Ho et al, 2007). Πιθανές αιτίες του παθολογικού ρόλου της μειωμένης δραστηριότητας του G6PD είναι η αυξημένη οξειδωτική βλάβη σε συνδυασμό με τη μειωμένη ικανότητα πολλαπλασιασμού και αναδιοργάνωσης των τραυματισμένων κυττάρων που προκαλεί. Δεδομένα από έρευνες δείχνουν ότι η παθογένεια των εκφυλιστικών ασθενειών σχετίζεται με την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ασθενών, γεγονός που σημαίνει ότι αυξάνεται η πιθανότητα της θεραπευτικής παρέμβασης με αντιοξειδωτικά (Ho et al, 2007).

*G6PD και απόπτωση.* Στο παρελθόν είχε γίνει η υπόθεση ότι εφόσον η γλουταθειόνη (η οποία προστατεύει τα κύτταρα από οξειδωτικό στρες) αναστέλλει την απόπτωση, τα εμπύρνηνα κύτταρα ατόμων με έλλειψη του G6PD μπορεί να είναι πιο επιρρεπή σε βλάβη του DNA και απόπτωση που προκαλείται από οξειδωτικό στρες (Efferth et al, 2006). Πράγματι, έχει φανεί ότι το G6PD συμμετέχει στην προστασία των κυττάρων από απόπτωση (που προκαλείται από οξειδοαναγωγική ισορροπία) και νέκρωση (Fico et al, 2004).

### ***Οξειδωτικό στρες και αντιοξειδωτική άμυνα***

***Οξειδωτικό στρες.*** Το ατμοσφαιρικό οξυγόνο αποτελεί μια από τις σημαντικότερες απειλές για τη ζωή των κυττάρων. Κύρια παρενέργεια της ζωής σε οξειδωτικό περιβάλλον είναι η παραγωγή ιδιαίτερα αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), τα οποία αντιμετωπίζονται από τα κύτταρα με την αποτελεσματική αντιοξειδωτική αμυντική ικανότητα που έχουν αναπτύξει. Με τον όρο ROS περιγράφονται διάφορα χημικά είδη, όπως σουπεροξειδικά ανιόντα, υδροξυλικές ρίζες και υπεροξειδία του υδρογόνου. Εκτιμάται ότι η πλειοψηφία της ενδοκυτταρικής παραγωγής ROS γίνεται στα μιτοχόνδρια (Finkel, 2000).

Οξειδωτικό στρες υπάρχει όταν η αντιοξειδωτική άμυνα δεν μπορεί να συμβαδίσει με τον ρυθμό που παράγονται τα ROS (Finkel, 2000; Martindale & Holbrook, 2002). Ένας γενικός ορισμός για το οξειδωτικό στρες περιγράφει ότι είναι μια ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, που δυνητικά μπορούν να οδηγήσουν σε βλάβη (Sies, 1995). Τα οξειδωτικά μπορεί να προέρχονται από εξωτερική για τα κύτταρα πηγή ή να αποτελούν το παραπροϊόν του φυσιολογικού αερόβιου μεταβολισμού.

Έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει αυξημένη οξειδωτική βλάβη στα ερυθροκύτταρα ατόμων με έλλειψη του G6PD, η οποία έχει αποδοθεί σε επιταχυμένη καταστροφή των ερυθροκυττάρων. Ένα άλλο χαρακτηριστικό που απαντάται σε αυτά τα άτομα είναι μια συνολική επιταχυμένη παραγωγή αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) που τείνουν να εξαντλούν τα κυτταρικά αντιοξειδωτικά (Chan et al, 1999). Η χρόνια οξειδοαναγωγική ανισορροπία που υπάρχει στα ερυθροκύτταρα ατόμων με έλλειψη του G6PD αυξάνει την πιθανότητα - σε σχέση με υγιή άτομα - για οξειδωτική βλάβη, οδηγώντας έτσι συχνά σε κλινική εκδήλωση ήπιας μέχρι σοβαρής αιμόλυσης (Chan et al, 1999).

Το οξειδωτικό στρες φαίνεται ότι εμπλέκεται στη διαδικασία της γήρανσης και ότι είναι η κύρια αιτία πολλών εκφυλιστικών ασθενειών (Gutteridge & Halliwell, 1994) που σχετίζονται με τη γήρανση, συμπεριλαμβανομένων νευροεκφυλιστικών διαταραχών, όπως η νόσος Πάρκινσον (Lotharius & Brundin, 2002), η εμφάνιση διαβήτη Τύπου II (Brownlee, 2001), η καρδιακή ανεπάρκεια, η νόσος Αλτσχάιμερ και το εγκεφαλικό επεισόδιο (Behl & Moosmann, 2002).

Διάφορες είναι οι αιτίες που μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ROS, όπως είναι η ύπαρξη φλεγμονής, ο μεταβολισμός φαρμάκων και η έλλειψη αντιοξειδωτικών βιταμινών. Καθώς η ανεξέλεγκτη παραγωγή ROS μπορεί να έχει βλαπτικές επιδράσεις στα διάφορα κυτταρικά μακρομόρια (π.χ. DNA, πρωτεΐνες) και σε άλλα μικρά αντιοξειδωτικά μόρια, υπάρχουν διάφοροι κυτταρικοί μηχανισμοί άμυνας για την εξουδετέρωσή τους (Chan et al, 1999). Η απόκριση των κυττάρων στο οξειδωτικό στρες ποικίλει, ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια του στρες, από τη διέγερση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων μέχρι την αναστολή του κυτταρικού κύκλου, τον κυτταρικό θάνατο από απόπτωση ή νέκρωση (Finkel, 2000; Martindale & Holbrook, 2002).

**Αντιοξειδωτικά.** Στον οργανισμό και τη διατροφή του ανθρώπου περιέχονται πολλές ενώσεις οξειδωτικής και αντιοξειδωτικής φύσης. Ο ορισμός των Halliwell και Gutteridge (1989) αναφέρει ότι αντιοξειδωτικό είναι «κάθε ουσία που όταν υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με αυτές ενός οξειδώσιμου υποστρώματος, καθυστερεί σημαντικά ή αναστέλλει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος». Ο ορισμός αυτός περιλαμβάνει ενζυμικές και μη ενζυμικές ενώσεις.

Τα κύτταρα όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών περιέχουν ισχυρά αντιοξειδωτικά ένζυμα. Οι τρεις κύριες κατηγορίες αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι: οι υπεροξειδικές δισμουτάσες, η καταλάση και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Sies, 1995). Διαφορετικά τμήματα των κύτταρων και διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι μπορεί να περιέχουν διάφορες ποσότητες αντιοξειδωτικών ενζύμων (Sies, 1997).

Κάποιες ενώσεις δρουν ως μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά απομακρύνοντας τα αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Η μη ενζυμική άμυνα αποτελείται είτε από ενδογενή μόρια (GSH, ουμπικινόλες, ουρικό οξύ) είτε από εξωγενή - προερχόμενα από τη διαίτα - μόρια (π.χ. βιταμίνες C και E, λιποϊκό οξύ και καροτενοειδή), κάποια από τα οποία μπορούν και ανακυκλώνουν άλλα αντιοξειδωτικά μόρια (Chan et al, 1999). Από τα εξωγενή μόρια, τα πιο σημαντικά είναι οι τοκοφερόλες (βιταμίνη E), οι οποίες δρουν κυρίως στις κυτταρικές μεμβράνες εξαιτίας της λιπόφιλης φύσης τους (Jiala, 1995), καθώς και το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) που δρα κυρίως στο κυτοσόλιο και το πλάσμα (Buettner and Jurkiewicz, 1996). Έχει φανεί ότι η χορήγηση συνδυασμού των βιταμινών E και C μπορεί να βελτιώσει την αντιοξειδωτική κατάσταση ασθενών με έλλειψη του G6PD και να μειώσει τα συμπτώματα της αιμολυτικής κρίσης (El-Zoghby et al, 2007).

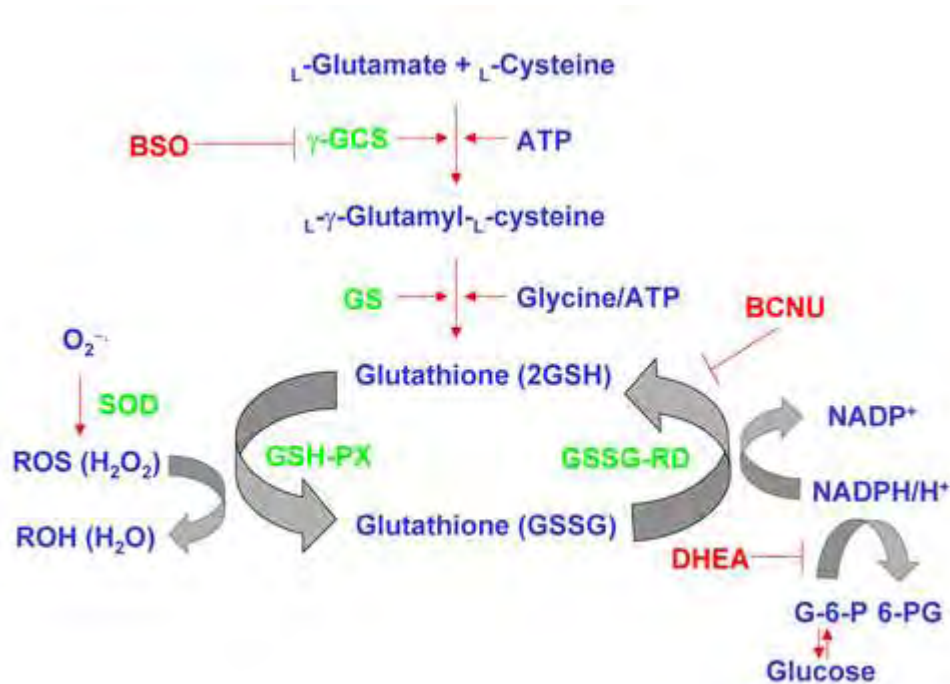
Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί πάρα πολύ το ενδιαφέρον για τη χρήση συμπληρωμάτων διατροφής που περιέχουν αντιοξειδωτικές ουσίες (Gigante et al, 2007; Simpre et al, 2006). Από επιδημιολογικά στοιχεία φαίνεται ότι η πρόσληψη ορισμένων βιταμινών, μετάλλων και άλλων συστατικών των τροφίμων είναι πιθανό να συμβάλλουν στην προστασία του οργανισμού από καρδιακές νόσους, καρκίνο και γήρανση. Επιπλέον φαίνεται ότι τα αντιοξειδωτικά μπορεί να έχουν προστατευτική δράση στην πρόληψη των νόσων αυτών ή στη μείωση της σοβαρότητάς τους (Wu et al, 2005; Hsia, 2007; Luchsinger et al, 2007; Marcason, 2007).

**Γλουταθειόνη.** Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο που παίζει κεντρικό ρόλο στην συνολική διατήρηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης (Chan et al, 1999). Η γλουταθειόνη υπάρχει σε δυο μορφές: Την ανηγμένη γλουταθειόνη, που συμβατικά αποκαλείται γλουταθειόνη και συντομευμένα GSH, και την οξειδωμένη γλουταθειόνη ή GSSG. Ο λόγος GSSG/GSH μπορεί να είναι ένας ευαίσθητος δείκτης οξειδωτικού στρες (Kidd, 1997). Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση της γλουταθειόνης κυμαίνεται πάνω από 10 mM, όπου το 95% αυτής βρίσκεται στην ανηγμένη μορφή (2,3) (Chan et al, 1999).

Η GSH (γ-γλουταμυλκυστεΐνυλογλυκίνη) έχει πολλούς ρόλους. Κάποιοι από αυτούς είναι η διατήρηση των σουλφυδρυλικών ομάδων των πρωτεϊνών, η προστασία των κυττάρων ενάντια στις οξειδωτικές βλάβες και στις βλάβες που προκαλούνται από ακτινοβολία, η αποτοξίνωση ιδιαίτερα αντιδραστικών ξеноβιοτικών μεταβολιτών ή υπεροξειδίων και η αναγέννηση των αντιοξειδωτικών βιταμινών. Η GSH αλληλεπιδρά με άλλα σημαντικά κυτταρικά αντιοξειδωτικά (Εικ.1). Η διατήρηση της GSH σε σταθερό επίπεδο συνδέεται με την ενεργειακή κατάσταση των οργανισμών και την ορθή λειτουργία του μονοπατιού των φωσφορικών πεντοζών. Έτσι, η νηστεία θα μπορούσε να μειώσει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση GSH στο μισό (Chan et al, 1999).

Η αναγωγική ισχύς της GSH είναι μια μέτρηση της ικανότητάς της να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες (Meister, 1994). Αυξημένα επίπεδα ROS εξουδετερώνονται από την GSH, η οποία μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή (GSSG) σε μια αντίδραση κατάλυσης από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px). Η GSH-Px επίσης απομακρύνει υπεροξείδια από τα ερυθροκύτταρα (Gaetani et al, 1989). Για να επαναφερθεί η ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση, η γλουταθειόνη ανακυκλώνεται από την αναγωγή της GSSG (Leopold et al, 2001) (Εικ. 2).





**Εικ. 2:** Σχηματικό διάγραμμα του οξειδοαναγωγικού κύκλου. Παρουσιάζεται συνοπτικά η σχέση μεταξύ αντιοξειδωτικών ενζύμων και γλουταθειόνης. Με γκρι χρώμα απεικονίζονται τα ένζυμα, με μπλε τα υποστρώματα και τα προϊόντα και με κόκκινο οι αναστολείς (Haddad, 2002).

Το μόριο της GSH αποτελείται από τρία αμινοξέα – το γλουταμινικό οξύ, την κυστεΐνη και τη γλυκίνη. Είναι υδατοδιαλυτό μόριο και βρίσκεται στα ζωικά και φυτικά κύτταρα καθώς και στους μικροοργανισμούς (Kosower & Kosower, 1978; Meister, 1976; Kidd, 1991; Lomaestro & Malone, 1995). Η GSH είναι ένα από τα πιο υψηλής συγκέντρωσης ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά. Η εξάντληση της GSH οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο, κι έχει τεκμηριωθεί σε πολλές εκφυλιστικές καταστάσεις. Η εξάντληση της GSH των μιτοχονδρίων μπορεί να είναι βασικός παράγοντας που καθορίζει την ευπάθεια στην οξειδωτική προσβολή (Kidd, 1997).

Η γλουταθειόνη βρίσκεται μέσα στα κύτταρα κυρίως στην ανηγμένη της μορφή (GSH). Στο υγιές κύτταρο η GSSG, η οξειδωμένη μορφή, σπάνια ξεπερνά το 10% της ολικής κυτταρικής γλουταθειόνης (Kosower & Kosower, 1978). Η ενδοκυτταρική συγκέντρωση της GSH φαίνεται ότι είναι ένας ευαίσθητος δείκτης της συνολικής υγείας του κυττάρου, και της ικανότητάς του να αντιστέκεται σε τοξική πρόκληση (Kidd, 1997). Πειραματική εξάντληση της GSH μπορεί να προκαλέσει αυτοκτονία του κυττάρου μέσω απόπτωσης (Duke et al, 1996; Slater et al, 1995).

### **Ουσίες που αυξάνουν την ανηγμένη γλουταθειόνη**

Άφθονα είναι τα στοιχεία που υποστηρίζουν τη σπουδαιότητα της GSH στην υγεία του κυττάρου και συνεπώς ολόκληρου του οργανισμού. Έτσι, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την εύρεση ασφαλών, εύκολων και οικονομικών μέσων για την αύξηση της ενδοκυτταρικής GSH. Ειδικά όσον αφορά τα κύτταρα με έλλειψη του G6PD, η GSH που περιέχουν δεν μπορεί να διατηρηθεί σε υψηλά επίπεδα. Αυτό συμβαίνει διότι τα κύτταρα αυτά δεν είναι ικανά να παράγουν αρκετό NADPH, το οποίο - όπως έχει αναφερθεί - είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της γλουταθειόνης στην ανηγμένη της μορφή. Η στενή σχέση μεταξύ GSH και NADPH οφείλεται στο γεγονός ότι η αναγωγή της γλουταθειόνης, το ένζυμο που ευθύνεται για την ανακύκλωση της GSSG, χρησιμοποιεί NADPH ως συμπράγοντα. Το NADPH χρησιμοποιείται επίσης ως συμπράγοντας από την καταλάση, ένα άλλο αντιοξειδωτικό ένζυμο που μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) σε νερό και οξυγόνο (Stryer, 1995).

Πιθανότατα η βέλτιστη συγκέντρωση της GSH θα μπορούσε να αυξήσει τις αντιοξειδωτικές άμυνες και να σταθεροποιήσει ή να αυξήσει το όριο του κυττάρου για ευπάθεια σε τοξική προσβολή (Kidd, 1997). Έτσι, η διαιτητική αναπλήρωση της συστημικής GSH υπόσχεται την διαχείριση διαφόρων καταστάσεων, όπως της νόσου Αλτσχάιμερ, της αθηροσκληρωτικής αγγειακής εκφύλισης, του καταρράκτη, της ανεπάρκειας των πνευμόνων, της νόσου Πάρκινσον και πολλών άλλων. Ιδιαίτερα όταν συνεργάζεται με το ασκορβικό, άλλα αντιοξειδωτικά και διατροφικούς παράγοντες, η αναγωγική ισχύς της GSH είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ποιότητα και τη διάρκεια της ζωής (Kidd, 1997).

**Γλουταθειόνη στις τροφές.** Παραδοσιακά πιστεύεται ότι η GSH δεν είναι βιοδιαθέσιμη όταν χορηγείται από το στόμα, καθώς ο οργανισμός τη διασπά κατά τη διαδικασία της πέψης και η περισσότερη αποβάλλεται (Kidd, 1993). Ωστόσο, άφθονα στοιχεία επιβεβαιώνουν ότι απορροφάται αποτελεσματικά σε ολόκληρο το εντερικό ενδοθήλιο, μέσω ενός ειδικού συστήματος πρόσληψης (Deleve & Karlowitz, 1990; Mandl et al, 1995). Έχει αποδειχθεί σε ζώα και σε ανθρώπους ότι η GSH που χορηγείται από το στόμα αυξάνει την GSH in vivo: Η προσλαμβανόμενη γλουταθειόνη απορροφάται άθικτη με παθητική διάχυση από τα εντερικά κύτταρα που επικαλύπτουν τον εντερικό αυλό και

αργότερα περνά στην κυκλοφορία του αίματος (Lomaestro & Malone, 1995). Μπορεί επίσης να απορροφάται άθικτη από επιθηλιακά κύτταρα εκτός των εντεροκυττάρων. Έτσι, παρέχοντας την GSH ως ολόκληρο μόριο ίσως να μπορεί να χρησιμεύσει ως μέσο για την άμεση αναπλήρωση GSH στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα ή άλλα επιθήλια in vivo. Διαφορετικά, δεν είναι ένας ιδιαίτερος οικονομικά αποδοτικός τρόπος για να επιτευχθεί αναπλήρωση GSH (Kidd, 1997).

Η GSH βρίσκεται σε φυτικούς και ζωικούς ιστούς, οι οποίοι αποτελούν το μεγαλύτερο τμήμα της ανθρώπινης διατροφής (Kidd, 1997). Σύμφωνα με μια μελέτη του Jones και των συνεργατών του (1992), τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα δημητριακά και τα αρτοσκευάσματα είναι γενικά φτωχά σε GSH. Τα φρούτα και τα λαχανικά έχουν μέτριες με υψηλές ποσότητες GSH, ενώ και τα νωπά κρέατα έχουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις GSH. Τα κατεψυγμένα τρόφιμα γενικά βρέθηκαν να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε GSH με τα φρέσκα τρόφιμα, ενώ άλλες μορφές επεξεργασίας και συντήρησης είχαν ως αποτέλεσμα μεγάλη απώλεια GSH (Jones et al, 1992). Μια άλλη έρευνα που έγινε λίγο αργότερα από τον Flagg και τους συνεργάτες του (1994) έδειξε ότι στη συνήθη διαιτητική πρόσληψη GSH συμμετέχουν τα φρούτα και τα λαχανικά σε ποσοστό πάνω από 50%, ενώ τα κρέατα σε ποσοστό μικρότερο από 25%.

Πέρα όμως από αυτά τα στοιχεία, φαίνεται ότι οι παράγοντες που ρυθμίζουν τη συγκέντρωση GSH στο πλάσμα είναι πολύπλοκοι και δε σχετίζονται μόνο με τη διαιτητική πρόσληψη της γλουταθειόνης ή την συμπληρωματική χορήγηση των πρόδρομων αμινοξέων αυτής (Flagg et al, 1994). Για παράδειγμα, σε μια μελέτη που έγινε σε ανθρώπους το 1985 από τους Hunjan & Evered, λήψη σε μορφή χαπιού των 15 mg/kg από το στόμα φάνηκε να αυξάνει την GSH πλάσματος δυο με πέντε φορές, με μεγάλη μεταβλητότητα στην επίδραση μεταξύ των πέντε υποκειμένων που εξετάστηκαν. Από την άλλη πλευρά, σε μια άλλη μελέτη που έγινε το 1992 από τον Witschi και τους συνεργάτες του και χρησιμοποιήθηκαν υγιή, νηστικά υποκείμενα, η GSH πλάσματος δεν αυξήθηκε μετά από στοματική χορήγηση γλουταθειόνης. Μια πιθανή εξήγηση για αυτά τα αντιφατικά αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών είναι ότι η GSH πλάσματος είναι τόσο καλά ρυθμισμένη σε υγιή υποκείμενα που είναι δύσκολο να επηρεαστεί από στοματική δόση (Kidd, 1997). Παρόλα αυτά, κάποιες φορές η από του στόματος

χορήγηση μεγάλων ποσοτήτων GSH και NAC (όπως και η ενδοφλέβια χορήγηση) μπορεί να είναι σωτήρια (Kidd, 1997).

**L-Κυστεΐνη.** Το θειούχο αμινοξύ L-κυστεΐνη (αποκαλείται και ελεύθερη κυστεΐνη) είναι ένα μη απαραίτητο αμινοξύ, που σημαίνει ότι μπορεί να δημιουργηθεί από τον ανθρώπινο οργανισμό. Η περισσότερη κυστεΐνη μέσα στα κύτταρα απαντάται στην GSH, αφού είναι ένας από τους τρεις δομικούς λίθους αυτής. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η κυστεΐνη αποτελεί γενικά το περιοριστικό αμινοξύ για την σύνθεση GSH σε διάφορα ζώα και στους ανθρώπους (Lyons et al, 2000; Jahoor et al, 1999; Chung et al, 1990). Έλλειψη κυστεΐνης έχει προταθεί ότι συμβαίνει και οδηγεί σε αλλαγές στον μεταβολισμό της GSH (Jahoor et al, 1999; Badaloo et al, 2002; Erden-Inal et al, 2002; Hack et al, 1998; Sido et al, 1998; Brok et al, 2002; Kretzschmar et al, 2003; Lyons et al, 2001; Luo et al, 1998; Martensson et al, 1987). Όταν η χορήγηση ολικής πρωτεΐνης υποκαταστάθηκε μέσα στην δίαιτα από την κυστεΐνη, αυτή ήταν το ίδιο αποτελεσματική στην αναπλήρωση των επιπέδων GSH (Tateishi et al, 1981). Βρίσκεται σε τροφές όπως κρέας και γαλακτοκομικά προϊόντα, ενώ διατίθεται στο εμπόριο ως συμπλήρωμα διατροφής.

Ωστόσο, η κυστεΐνη είναι πιθανώς ανασφαλής για τακτική συμπληρωματική χορήγηση από το στόμα. Όταν κυκλοφορεί στο αίμα εύκολα αυτό-οξειδώνεται σε ενδεχομένως τοξικά προϊόντα αποδόμησης. Σε διάφορες έρευνες όπου χορηγήθηκε κυστεΐνη, παρατηρήθηκε υπερχοληστερολαιμία (Rukaj and Se'rougne, 1983; Aoyama et al, 1999; Aoyama et al 1992) και νευροτοξικότητα (Olney and Ho, 1970). Ανάμεσα στα τοξικά προϊόντα της κυστεΐνης είναι και η ιδιαίτερα αντιδραστική υδροξυλική ρίζα (Saez et al, 1982).

**L-Μεθειονίνη.** Η L-μεθειονίνη είναι ένα θειούχο αμινοξύ απαραίτητο για τον οργανισμό, που πρέπει να το προμηθεύεται από την δίαιτα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τον οργανισμό για να δημιουργήσει κυστεΐνη, εφόσον αρκετή μεθειονίνη είναι διαθέσιμη. Είναι διαθέσιμη σε τροφές, φαρμακευτικά και διατροφικά σκευάσματα.

Η μεθειονίνη πρέπει πρώτα να μετατραπεί σε κυστεΐνη, η οποία έπειτα είναι διαθέσιμη για σύνθεση της GSH. Αυτό το μονοπάτι απαιτεί πολλούς συμπαράγοντες και

μπορεί να είναι ανενεργό στα νεογνά και σε κάποιους ενήλικες, όπως σε ασθενείς με ηπατικές ασθένειες (Lomaestro & Malone, 1995).

Ο τρόπος που η μεθειονίνη μετατρέπεται σε γλουταθειόνη είναι πολύ περίπλοκος. Ένας από τους κινδύνους που μπορεί να προκύψει από τη μεθειονίνη είναι ότι μπορεί να προάγει και υπερομοκυστεϊναιμία (Boers et al, 1983), η οποία αυξάνει την πιθανότητα εμφάνισης αθηροσκλήρωσης.

***N-ακετυλ-κυστεΐνη.*** Με κάποια κύτταρα του σώματος ανάκανα να χρησιμοποιούν άμεσα GSH, με τη διαθεσιμότητα της κυστεΐνης να είναι ο κύριος παράγοντας που περιορίζει την σύνθεση GSH στα κύτταρα, και με τη διαιτητική L-κυστεΐνη γνωστή για την ενδεχόμενη τοξικότητά της, η N-ακετυλ κυστεΐνη (NAC) λαμβάνει σπουδαία σημασία ως διαιτητική πηγή GSH. Η NAC είναι ένα αποτελεσματικό πρόδρομο της γλουταθειόνης που σχηματίζεται από την κυστεΐνη αντικαθιστώντας ένα άτομο υδρογόνου με μια ακετυλομάδα (CH<sub>3</sub>CO). Έτσι, αποτελεί μια παραλλαγή του αμινοξέος L-κυστεΐνη, το οποίο έχει τροποποιηθεί ούτως ώστε να απορροφάται καλά από το έντερο, να μετατρέπεται σε κυστεΐνη μετά από από-ακετυλίωση και να εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος. Δε φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα της GSH εάν βρίσκονται ήδη μέσα στη φυσιολογικά επίπεδα, αλλά μπορεί να αυξήσει μη φυσιολογικά χαμηλά επίπεδα GSH ώστε να γίνουν πάλι φυσιολογικά. Αυτή είναι και η βάση για τη χρησιμοποίησή της ως αντίδοτο σε ηπατική τοξικότητα από ακεταμινοφαΐνη (Hoyumpa & Schenker, 1996; Corcoran & Wong, 1986).

Η NAC χρησιμοποιείται για πολλά χρόνια ως βλεννολυτικός παράγοντας σε διάφορες ασθένειες. Παράλληλα, έχει αντιμεταλλαξιγόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες και είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό. Η Thorn Research Inc. (2000) αναφέρει εννέα κλινικές χρήσεις για τη NAC: σύνδρομο Sjogren, τοξικότητα από κάπνισμα, γρίπη, ηπατίτιδα Γ, μυοκλονική επιληψία, μόλυνση με HIV, καρκίνος/χημειοπροστασία, δηλητηρίαση από ακεταμινοφαΐνη και δημιουργία χηλικών συμπλόκων βαρέων μετάλλων (υδράργυρος, μόλυβδος, χαλκός, χρυσός, άργυρος).

Ωστόσο, η NAC μπορεί να μην είναι η τέλεια πηγή GSH, αφού μπορεί η πρόσληψή της να προκαλεί κάποιες παρενέργειες. Σε μια κλινική μελέτη βρέθηκε ότι ημερήσια δόση

των 600 mg ήταν ευεργετική και αβλαβής, ενώ δόση των 1200 mg και 1800 mg ανά ημέρα προκάλεσαν σημαντικές αρνητικές επιδράσεις (van Zandwijk, 1995).

Έχει ήδη αναφερθεί ότι η κυστεΐνη μάλλον δεν αποτελεί ασφαλές στοματικό συμπλήρωμα. Για λόγους που έχουν προαναφερθεί, από όλα τα πρόδρομα της GSH που λαμβάνονται στοματικά, πιθανώς το λιγότερο ακατάλληλο και πιο οικονομικά αποδοτικό είναι η NAC (Kidd, 1997).

**S-Αδενοσυλ-Μεθειονίνη (SAM).** Είναι μια μορφή μεθειονίνης που έχει μερικώς μετατραπεί σε κυστεΐνη. Η SAM (S-αδενοσυλ-μεθειονίνη), είναι δραστική στην αύξηση της ερυθροκυτταρικής και της ηπατικής GSH όταν δίνεται από το στόμα σε δόση των 1600 mg ανά ημέρα (Lomaestro & Malone, 1995). Έχει αποδειχθεί κλινικά ωφέλιμη ενάντια σε κίρρωση και χολόσταση (Almasio et al, 1990).

**Δεκαρβοξυλάση της ορνιθίνης και προκυστεΐνη.** Διάφορες συνθετικές, παρεχόμενες από το στόμα πηγές GSH έχουν αναπτυχθεί (Anderson, 1997) και αυτές οι δυο ενώσεις αποτελούν παραδείγματα αυτών. Η γενική ιδέα είναι ότι μεταφέρουν χημικά στο ήπαρ ώστε να παρακινηθεί αυτό να παράγει γλουταθειόνη. Η ένωση L-2-οξοθειαζολιδίνη-4-καρβουλιλικό (ή αλλιώς προκυστεΐνη) είναι υπόστρωμα για το ένζυμο 5-οξοπρολινάση, το οποίο τη μετατρέπει σε S-καρβοξυ-κυστεΐνη. Αυτή έπειτα υδρολύεται και ως κυστεΐνη πλέον μεταφέρεται μέσα στα ηπατοκύτταρα, όπου ενσωματώνεται στην GSH. Όμως η 5-οξοπρολινάση δεν βρίσκεται σε όλους τους ιστούς και δεν είναι ξεκάθαρο εάν η προκυστεΐνη μπορεί με συνέπεια να αυξάνει την GSH σε συστηματική βάση (Kidd, 1997). Απαιτείται περισσότερη έρευνα πάνω στη δράση αυτών των ενώσεων.

**Εστέρες γλουταθειόνης.** Οι εστέρες της γλουταθειόνης είναι συνθετικές ενώσεις που προκύπτουν από τη σύνδεση του γλυκυλ-τέλους της GSH στους εστερικούς δεσμούς. Έχουν υπάρξει το αντικείμενο πολλής έρευνας ως ενώσεις που πιθανώς θα χρησιμοποιούνται για τη χορήγηση GSH από το στόμα (Kidd, 1997). Ο μονοαιθυλικός εστέρας (GSHE), σε αντίθεση με την GSH, μεταφέρεται αποτελεσματικά στο κυτταρόπλασμα πολλών ειδών κυττάρων, όπου μετατρέπεται σε GSH. Αυτό έχει παρατηρηθεί ότι συμβαίνει και στα ερυθροκύτταρα των ανθρώπων. Έτσι, φαίνεται ότι ο

GSHE έχει θεραπευτικές δυνατότητες σε καταστάσεις έλλειψης GSH (Grattagliano et al, 1995).

Πράγματι, αυτοί οι εστέρες φαίνονται αποτελεσματικοί στην παροχή GSH, αλλά έχουν το μειονέκτημα ότι όλοι μεταφέρουν αλκοόλες in vino όταν οι εστερικοί τους δεσμοί σπάνε και η ασφάλειά τους μακροχρόνια δεν έχει ακόμα αποδειχθεί ικανοποιητικά. Περιστασιακές αναφορές για την τοξικότητά τους έχουν μέχρι τώρα αποδοθεί σε μεταλλικές ακαθαρσίες (Anderson, 1997).

**Γλουταμίνη.** Η γλουταμίνη είναι καύσιμο για τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα κι έχει θεωρηθεί ότι είναι «υπό όρους απαραίτητη» σε περιόδους μεταβολικού στρες (π.χ. σε αθλητές αντοχής) ή ασθένειας (Krissansen, 2007). Η γλουταμίνη είναι δραστικό πρόδρομο του γλουταμινικού για σύνθεση GSH σε πολλούς τύπος κυττάρων, όπως τα εντερικά κύτταρα, τα νευρικά κύτταρα, τα ηπατικά κύτταρα και τα λεμφοκύτταρα (Johnson et al, 2003). Έχει φανεί ότι η συμπληρωματική χορήγηση γλουταμίνης σε ολική παρεντερική διατροφή διατηρεί τα επίπεδα της GSH των ιστών και βελτιώνει τα ποσοστά επιβίωσης μετά από βλάβη επαναιμάτωσης, ισχαιμία, τοξικότητα από ακεταμινοφαίνη, χημειοθεραπεία, φλεγμονώδες στρες και μεταμόσχευση μυελού των οστών (Oehler & Roth, 2003).

**Μελατονίνη.** Η μελατονίνη (N-ακετυλ-5-μεθοξυτριπταμίνη) είναι μια ορμόνη που παράγεται κυρίως από την επίφυση και έχει διάφορους ρόλους στον οργανισμό. Για παράδειγμα συμβάλλει στον έλεγχο των αναπαραγωγικών λειτουργιών, στη ρύθμιση της δράσης του ανοσοποιητικού συστήματος, στον περιορισμό της ογκογένεσης. Επίσης, η μελατονίνη είναι γνωστή για την αντιοξειδωτική της δράση και την ικανότητά της να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες, συμβάλλοντας έτσι αποτελεσματικά στην αναστολή του οξειδωτικού στρες (Reiter, 1996).

Πολλά είναι τα στοιχεία που καταδεικνύουν τη σημαντική δράση της μελατονίνης να εξουδετερώνει τα αντιδραστικά μόρια οξυγόνου και αζώτου (Reiter et al (A), 2002; Reiter et al (B), 2002; Reiter et al, 2003; Lopez-Burillo et al, 2003; Sudnikovich et al, 2007). Επίσης, η μελατονίνη βοηθάει διάφορα ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px) (Rodriguez et al, 2004; Reiter & Tan, 2005).

Επιπρόσθετα, η μελατονίνη προάγει τη δραστικότητα της συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης, διεγείροντας με αυτό τον τρόπο την παραγωγή της ενδοκυττάριας GSH (Winiarska et al, 2006).

Η μελατονίνη έχει φανεί ότι περιέχεται σε διάφορα εδώδιμα φυτά, όπως στους σπόρους μαύρης και άσπρης μουστάρδας, στα αμύγδαλα και το φυτό ήλιος (Reiter & Tan, 2002; Manchester et al, 2000).

**Βιταμίνη C.** Η βιταμίνη C ή L-ασκορβικό οξύ είναι ένα απαραίτητο θρεπτικό συστατικό για τον ανθρώπινο και άλλους ζωικούς οργανισμούς. Ένας από τους πολλούς σημαντικούς του ρόλους είναι ότι δρα ως αντιοξειδωτικό που προστατεύει τον οργανισμό από οξειδωτικό στρες (Padayatty et al, 2003).

Η βιταμίνη C έχει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της γλουταθειόνης, καθώς εμπλέκεται στο ενζυμικό σύστημα της γλουταθειόνης που ανακυκλώνει το L-ασκορβικό οξύ όταν οξειδώνεται προς L-διυδροασκορβικό (Meister, 1994). Έτσι, το ασκορβικό οξύ που λαμβάνεται από το στόμα βοηθά να διατηρείται η GSH (Kidd, 1997). Από παλιά έχει παρατηρηθεί ότι μέσα στο κύτταρο το διυδροασκορβικό ανάγεται γρήγορα προς ασκορβικό οξύ από τη γλουταρεδοξίνη, με κατανάλωση γλουταθειόνης (Park & Levine, 1996). Επομένως, οι αντιδράσεις ανακύκλωσης του ασκορβικού εξαρτώνται ιδιαίτερα από ενδογενώς παραγόμενα αντιοξειδωτικά, όπως είναι το NADH και η γλουταθειόνη (Chan, 1999).

**Silymarin.** Το silymarin είναι ένα флаβονοειδές που εξάγεται από φυτό *Silybum marianum* και χρησιμοποιείται από τα αρχαία χρόνια για τη θεραπεία ηπατικών νόσων και την πρόληψη ηπατοτοξικότητας. Το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί πλέον και στις πιθανές του χρήσεις ως αντικαρκινογόνο, ως κυτταροπροστατευτικό και ως υποστηρικτική θεραπεία της δηλητηρίασης από είδη του μανιταριού *Amanita* (όπως το *Amanita phalloides*) (Rainone, 2005).

Το silymarin και το ενεργό συστατικό του, το silybin, έχει φανεί ότι δρα ως αντιοξειδωτικό εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες και αναστέλλοντας τη λιπιδική υπεροξειδωση. Το silybin διατηρεί την GSH στα ηπατοκύτταρα ενώ σταθεροποιεί τις μεμβράνες των ηπατοκυττάρων ενάντια σε οξειδωτική προσβολή (Flora et al, 1998).



Έχει φανεί από έρευνες που έγιναν σε αρουραίους ότι το silymarin αυξάνει την οξειδοαναγωγική κατάσταση και την ολική γλουταθειόνη που περιέχεται όχι μόνο στο ήπαρ, αλλά και στο έντερο και το στομάχι. Ωστόσο δεν επιδρά στα νεφρά, τους πνεύμονες και το σπλήνα (Valenzuela et al, 1989).

**Ορός γάλακτος.** Ο ορός γάλακτος ή τυρόγαλα διαχωρίζεται από το τυρόπηγμα κατά τη διαδικασία της παρασκευής τυριών. Είναι το υγρό που απομένει αφού το γάλα έχει πήξει και στραγγιστεί για να απομακρυνθούν οι καζεΐνες. Περιέχει πρωτεΐνες, λακτόζη, βιταμίνες, μεταλλικά στοιχεία, ίχνη λίπους, καθώς και βιοενεργές ουσίες όπως ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες (Sukkar & Bounous, 2004). Η πρωτεΐνη του ορού γάλακτος αντιπροσωπεύει το 20% της ολικής περιεκτικότητας πρωτεΐνης στο γάλα. Πωλείται ως συμπλήρωμα διατροφής και είναι ιδιαίτερα δημοφιλής στο άθλημα του bodybuilding.

*Πιθανές ωφέλειες της χρήσης των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος.* Ο ορός γάλακτος έχει προωθηθεί ως λειτουργικό τρόφιμο με πολλά οφέλη για την υγεία (Huth et al, 2006; Krissansen, 2007), ενώ επιπλέον έχει την ιδιότητα να δρα ως αντιοξειδωτικός (Counous, 2000), αντιυπερτασικός, αντικαρκινικός (Yoo et al, 1998), υπολιπιδαιμικός, αντικός (Low et al, 2003) και αντιβακτηριδιακός (Ajello et al, 2002) παράγοντας. Επίσης πιστεύεται ότι έχει την ικανότητα να σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα ιχνοστοιχείων, συμπεριλαμβανομένου του σιδήρου (Weinberg, 1996; Tong et al, 2000; Vegarud et al, 2000).

Κάποια στοιχεία δείχνουν ότι οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος είναι πιθανό να έχει ευεργετικές αντιοξειδωτικές ικανότητες που μπορούν να περιορίσουν την παραγωγή βλαβερών ROS, λόγω της κυστεΐνης που περιέχει. Η κυστεΐνη όπως έχει προαναφερθεί δρα ως πρόδρομη πηγή για την παραγωγή γλουταθειόνης (GSH), οπότε αυξημένη κατανάλωση ΠΣΤ μπορεί να έχει κάποια επίδραση στα επίπεδα της GSH.

Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος διατίθενται ως πρωτεϊνικό συμπύκνωμα ορού γάλακτος (ΠΣΟΓ) με πιθανό μειωνέκτημα την μεγάλη περιεκτικότητα σε λακτόζη, η οποία προκαλεί γαστρεντερικές διαταραχές σε άτομα με δυσανεξία σε αυτή. Γι'αυτό το λόγο υπάρχουν και άλλα συμπληρώματα που περιέχουν σε μεγαλύτερη αναλογία απομονωμένη πρωτεΐνη τυρογάλακτος που είναι πιο επεξεργασμένη μορφή και ελεύθερη λακτόζης.

### **α-Λιποϊκό οξύ (ΛΟ)**

Το α-λιποϊκό οξύ (αναφέρεται και απλά ως λιποϊκό οξύ) είναι μια φυσική διθειολική ένωση που συντίθεται ενζυμικά στο μιτοχόνδριο από οκτανοϊκό οξύ. Το ΛΟ είναι απαραίτητος συμπράγοντας για τις μιτοχονδριακές α-κετοξυ αφυδρογονάσες, παίζοντας συνεπώς σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της ενέργειας στο μιτοχόνδριο.

Εκτός όμως από την ενδογενή σύνθεση, το ΛΟ απορροφάται ανέπαφο από διαιτητικές πηγές και συσσωρεύεται παροδικά σε πολλούς ιστούς του σώματος. Πιθανολογείται ότι ΛΟ που λαμβάνεται από το στόμα μπορεί να μη χρησιμοποιείται ως μεταβολικός συμπράγοντας, αλλά να επάγει ένα μοναδικό σύνολο βιοχημικών δράσεων με πιθανή φαρμακοθεραπευτική αξία ενάντια σε διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

Το ΛΟ έχει περιγραφεί ως ισχυρό αντιοξειδωτικό, αποτοξινωτικός παράγοντας και διαβητικό φάρμακο. Έχει χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση σχετιζόμενων με τη γήρανση καρδιαγγειακών, γνωστικών και νευρομυϊκών ελλειμμάτων, και ως διαμορφωτής διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών φλεγμονής (Smith et al, 2004; Scott et al, 1994; Devasagayam et al, 1993; Liu, 2002; Suh et al, 2004; Lodge et al, 1998; Anuradha & Varalakshmi, 1999; Han et al, 1997). Εξαιτίας των πολλών κυτταρικών και μοριακών λειτουργιών, η χρήση του ΛΟ ως θρεπτικό συμπλήρωμα και ως φαρμακοθεραπεία έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον επιστημόνων και μη (Petersen Shay et al, 2009).

Συνηθισμένες πηγές ΛΟ είναι τα μυϊκά κρέατα, η καρδιά, τα νεφρά και το συκώτι, ενώ σε μικρότερο βαθμό είναι τα φρούτα και τα λαχανικά (Packer et al, 2001). Αν και το ΛΟ είναι εύκολα διαθέσιμο για πρόσληψη από αυτές τις συνηθισμένες διατροφικές πηγές, δεν καταναλώνονται σημαντικές ποσότητες του στην τυπική δυτική διατροφή. Αντιθέτως, κύριες πηγές ΛΟ αποτελούν τα συμπληρώματα διατροφής που το περιέχουν σε ποσότητες 50-600 mg. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα του ΛΟ προέρχονται από μελέτες που χρησιμοποιούν συμπληρώματα (Petersen Shay et al, 2009).

Δεν έχει καθοριστεί ανώτατο όριο πρόσληψης ΛΟ στον άνθρωπο, παρά μόνο ασφαλή επίπεδα για οξεία στοματική πρόσληψη σε διάφορα ζώα. Σε κάποιες κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους με ΛΟ, έχει φανεί ότι υπάρχουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία των συμμετεχόντων. Σε κάποιες άλλες φάνηκε ότι συμπληρώματα ΛΟ έως 2400 mg/ημέρα

δεν προκάλεσαν αρνητικές επιδράσεις σε σύγκριση με τη λήψη εικονικού φαρμάκου. Η ενδοφλέβια χορήγηση 600 mg/ημέρα ΛΟ για τρεις εβδομάδες επίσης δεν έδειξε να προκαλεί σοβαρές παρενέργειες (Ziegler et al, 1995). Τέλος, χορήγηση ΛΟ από το στόμα σε δόσεις των 1800 mg/ημέρα για έξι μήνες δεν οδήγησε σε σημαντικές αρνητικές επιδράσεις σε σύγκριση με τη λήψη εικονικού φαρμάκου (Ziegler et al, 1999). Συμπερασματικά, περισσότερη έρευνα απαιτείται πάνω στην ασφάλεια και τη βέλτιστη δόση ΛΟ, καθώς σε υψηλές δόσεις ενδέχεται να υπάρχουν διάφορες παρενέργειες, όπως να μεσολαβεί σε οξειδωτική προσβολή (Petersen Shay et al, 2009).

**Πιθανές ωφέλειες της χρήσης ΛΟ.** Η οξειδωμένη (α-λιποϊκό οξύ – ΛΟ) και η ανηγμένη (δυσδρο-λιποϊκό οξύ - ΔΥΛΟ) μορφή του ΛΟ δημιουργούν ένα ισχυρό οξειδοαναγωγικό ζεύγος με πρότυπο δυναμικό αναγωγής  $-0,32\text{ V}$ , γεγονός που καθιστά το ΔΥΛΟ ένα από τα πιο ισχυρά φυσικά αντιοξειδωτικά. Πράγματι, στοιχεία δείχνουν ότι το ΔΥΛΟ, αλλά και το ΛΟ, μπορεί να εξουδετερώνει διάφορα αντιδραστικά είδη οξυγόνου. Και τα δύο απομακρύνουν υδροξυλικές ρίζες και υποχλωριώδες οξύ, ωστόσο κανένα δεν είναι δραστικό ενάντια στο υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το ΛΟ, και ειδικά το ΔΥΛΟ, έχει την ικανότητα να αποτρέπει το σχηματισμό πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Το ΛΟ εξουδετερώνει το μονήρες οξυγόνο, ενώ το ΔΥΛΟ φαίνεται ότι αναγεννά άλλα ενδογενή αντιοξειδωτικά (π.χ. βιταμίνες C και E) και εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες χωρίς να γίνεται το ίδιο ελεύθερη ρίζα (Scott et al, 1994; Devasagayam et al, 1993; Biewenga et al, 1997; Suzuki et al, 1991; Kaiser et al, 1989; Devasagayam et al, 1991; Haenen & Bast, 1991; Yan et al, 1996; Bast & Haenen, 2003). Συνοπτικά οι ελεύθερες ρίζες που εξουδετερώνουν το ΛΟ και το ΔΥΛΟ αναφέρονται στον Πίνακα 1.

Oxidant	Scavenged by LA? Rate constant	Scavenged by DHLA? Rate constant
Peroxynitrite	Yes, $1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Yes, $2.5 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Nitric oxide	No	Yes, $3.19 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Hydroxyl radical	Yes, $4.7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	No
Superoxide	Yes	Yes
	No	No
Singlet oxygen	Yes, $1.3 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Yes, $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	Yes	No
Peroxyl radical	Yes, $1.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Yes, $2.3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	No	Yes
Hypochlorous acid	Yes	Yes
Hydrogen peroxide	No	No

**Πίνακας 1:** Αντιοξειδωτικές δράσεις του λιποϊκού (LA) και του διυδρο-λιποϊκού οξέος (DHLA) όπως έχουν φανεί από διάφορες μελέτες (Petersen Shay, 2009).

Όλα τα στοιχεία που υπάρχουν για το ρόλο του ζεύγους ΛΟ/ΔΥΛΟ ως ισχυρό αντιοξειδωτικό, προέρχονται από *in vitro* μελέτες. Έτσι, παραμένει ερώτημα εάν το ζεύγος είναι το ίδιο αποτελεσματικό εναντίον των ελευθέρων ριζών και *in vivo*. Αυξανόμενα στοιχεία δείχνουν ότι το ΛΟ μπορεί να δρα έμμεσα για τη διατήρηση της κυτταρικής αντιοξειδωτικής κατάστασης, είτε μέσω παρακίνησης της πρόσληψης είτε μέσω αύξησης της σύνθεσης ενδογενών χαμηλού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικών ή αντιοξειδωτικών ενζύμων. Για παράδειγμα, έχει φανεί ότι το ΛΟ ίσως βελτιώνει τα επίπεδα του ενδογενούς ασκορβικού οξέος έμμεσα, μέσω παρακινούμενης πρόσληψης από το πλάσμα του αίματος (Petersen Shay et al, 2009), ενώ ταυτόχρονα αυξάνει την ενδοκυτταρική GSH σε διάφορους τύπους κυττάρων και ιστούς (Bast & Haenen, 1988; Busse et al, 1992). Στοιχεία από διάφορες έρευνες καταδεικνύουν ότι το ΛΟ είναι ένας δραστικός παράγοντας για την επαναφορά της σχετιζόμενης με τη γήρανση μείωσης της θειολικής οξειδοαναγωγικής αναλογίας, όπως επίσης για την αύξηση των επιπέδων της GSH που κανονικά μειώνονται με την ηλικία (Petersen Shay et al, 2009).

Το ΛΟ είναι πλέον ένα συνηθισμένο συστατικό σε πολυβιταμινούχα σκευάσματα και αντιγηραντικά συμπληρώματα. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της διαβητικής

πολυνευροπάθειας, καθώς επίσης εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες, σχηματίζει χηλικά σύμπλοκα μετάλλων και αποκαθιστά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα GSH, τα οποία αλλιώς - όπως προαναφέρθηκε - μειώνονται με την ηλικία (Petersen Shay et al, 2009).

Αρκετές σημαντικές πτυχές του τρόπου μηχανισμού δράσης του ΛΟ in vivo δεν έχουν ακόμα αποκαλυφθεί. Ωστόσο, ευεργετικές επιδράσεις επιτυγχάνονται με χαμηλά μικρομοριακά επίπεδα ΛΟ, γεγονός που ενισχύει τα στοιχεία που δείχνουν ότι κάποιες από τις θεραπευτικές του δυνατότητες εκτείνονται πέρα από τον αυστηρό ορισμό ενός αντιοξειδωτικού. Για παράδειγμα, φάνηκε ότι βελτιώνει τη διαχείριση της γλυκόζης και του ασκορβικού, αυξάνει τη δραστικότητα της ενδοθηλιακής συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (eNOS), ενεργοποιεί τη Φάση II της αποτοξίνωσης μέσω του Nrf2 μεταγραφικού παράγοντα, και τη χαμηλότερη έκφραση του MMP-9 και του VCAM-1 μέσω της καταστολής του NF-kB.

Πλέον ερευνάται και η πιθανότητα οι ευεργετικές ιδιότητες του ΛΟ να το καθιστούν μια κατάλληλη θεραπεία όχι μόνο για τον διαβήτη, αλλά και για την πρόληψη αγγειακής νόσου, υπέρτασης, και φλεγμονής (Petersen Shay et al, 2009). Άλλα πεδία που στρέφεται η έρευνα για την χρήση του ΛΟ είναι στη δυνατότητά του να διατηρεί σταθερές ή να βελτιώνει νευρολογικές διαταραχές (π.χ. νόσος Αλτσχάιμερ), να περιορίζει την πρόοδο καρδιαγγειακής νόσου, να μετριάζει χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις, καθώς και να βελτιώνει ή να διατηρεί τις αντιοξειδωτικές/αποτοξινωτικές άμυνες που διαφορετικά μειώνονται με την ηλικία (Petersen Shay et al, 2009).

Το ΛΟ που προέρχεται από τη διατροφή θεωρείται ότι είναι παρακινητής σηματοδοτικών μονοπατιών, μιμητικό ινσουλίνης, υποτριγλυκεριδαιμικός παράγοντας, αγγειοδιασταλτικό / αντιυπερτασικό συστατικό, ότι δημιουργεί χηλικά σύμπλοκα μεταλλικών ιόντων και ότι βοηθά τη νευρογνωστική λειτουργία (Petersen Shay et al, 2009).

Συνοψίζοντας, το ΛΟ χρησιμοποιείται σε διαβητικές πολυνευροπάθειες, επιδρά στο αγγειακό σύστημα, δρα ως υποτασικός και αντιφλεγμονώδης παράγοντας (Petersen Shay et al, 2009). Η χορήγηση ΛΟ μπορεί να είναι επωφελής σε διάφορα μοντέλα οξειδωτικού στρες όπως σε διαβήτη, καταρράκτη, ενεργοποίηση του HIV, νευροεκφυλισμό, βλάβη από ακτινοβολία και γήρανση (Hagen et al., 1999; Demir et al., 2005; Cui et al., 2006; Kojima et al., 2007; Jariwalla et al., 2008). Έχει φανεί επίσης ότι η

χορήγηση ΛΟ ενισχύει την αντιοξειδωτική άμυνα, καθιστώντας τα κύτταρα πιο ανθεκτικά στις περιβαλλοντικές προκλήσεις, διαφυλάσσοντας έτσι τη λειτουργία του ανοσοποιητικού (Palaniyappan & Alphonse, 2011).

*ΛΟ και γήρανση.* Η γήρανση μπορεί να περιγραφεί ως το αποτέλεσμα της ανισορροπίας μεταξύ παραγωγής ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικής άμυνας, με ταυτόχρονη ύπαρξη οξειδωτικού στρες και λειτουργικής έκπτωσης οργάνων που εξαρτάται από την ηλικία. Η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα εμφανής στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία χρησιμοποιούν ελεύθερες ρίζες για τις λειτουργίες τους. Είναι γνωστό ότι η δραστηριότητα του ανοσοποιητικού συστήματος μειώνεται με την ηλικία (Chandra, 1989) και η χορήγηση συμπληρώματος ΛΟ φαίνεται ότι τη βελτιώνει αποτελεσματικά και αποκαθιστά την ισορροπία οξειδωτικών/αντιοξειδωτικών (Palaniyappan & Alphonse, 2011). Αυτή η δράση του ΛΟ είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς μελέτες δείχνουν ότι ηλικιωμένα άτομα που διατηρούν τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού τους σε ένα εξαιρετικά ψηλό επίπεδο τείνουν να έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής και πιθανώς γίνονται αιωνόβια (Wayne et al., 1990; Pawelek et al., 1999).

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι η διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της υγείας σε ηλικιωμένους, οι οποίοι έχουν αυξημένη ευαισθησία σε διατροφικές ελλείψεις και τις σχετικές συνέπειες αυτής. Το ΛΟ είναι ένα από τα αντιοξειδωτικά που μειώνουν το οξειδωτικό στρες και αποκαθιστά τα αποθέματα αντιοξειδωτικών που συνήθως εξαντλούνται με την ηλικία. (Packer et al., 1995; Arivazhagan et al., 2003). Επιπρόσθετα, ενισχύει την αποκατάσταση των τραυματισμένων από την οξείδωση βιομορίων με την αναπλήρωση των ενδογενών μορίων που εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, όπως η γλουταθειόνη, η βιταμίνη C και η βιταμίνη E, (Biewenga et al., 1997; Packer et al., 1997). Τέλος, συμπλήρωση χορήγηση ΛΟ αποτρέπει τη σχετιζόμενη με τη γήρανση οξειδωτική βλάβη και αντιστρέφει τη λειτουργική έκπτωση του ήπατος και της καρδιάς (Lykkesfeldt et al., 1998; Suh et al., 2001).

### III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

#### **Συμμετέχοντες**

Το πειραματικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού (ΤΕΦΑΑ) του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στην έρευνα έλαβαν μέρος δύο ομάδες των οκτώ ατόμων η καθεμία. Την πρώτη ομάδα αποτελούσαν άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD (ηλικία:  $33 \pm 12$  ετών, ύψος:  $175 \pm 14$  εκ, σωματικό βάρος:  $71 \pm 19$  κιλά), ενώ την δεύτερη άτομα με φυσιολογική δραστικότητα του ενζύμου (ηλικία:  $39 \pm 14$  ετών, ύψος:  $172 \pm 12$  εκ, σωματικό βάρος:  $68 \pm 19$  κιλά). Η διάρκεια της χορήγησης ΛΟ καθορίστηκε στις 28 ημέρες με αιμοληψία πριν την έναρξη λήψης, στα μέσα της χορήγησης (15<sup>η</sup> ημέρα) και με το πέρας αυτής (29<sup>η</sup> ημέρα). Όλα τα άτομα προσφέρθηκαν να συμμετάσχουν εθελοντικά, δίνοντας την προφορική και την ενυπόγραφη συγκατάθεση τους, αφού πρώτα ενημερώθηκαν για όλους τους κινδύνους και τα οφέλη που προκύπτουν από τη μελέτη. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Βιοηθικής και Δεοντολογίας του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Κριτήρια αποκλεισμού των εθελοντών αποτέλεσαν: άτομα με προβλήματα υγείας κατά το παρελθόν, τα οποία είναι πιθανό να επιδρούν αρνητικά στους εξεταζόμενους δείκτες, άτομα που εμφανίζουν αλλεργία και άτομα που έχουν προβλήματα στο ήπαρ και στο γαστρικό σωλήνα (π.χ. έλκος). Από τους εθελοντές ζητήθηκε να απέχουν από κάθε είδους έντονη φυσική δραστηριότητα, να μην έχουν λάβει φαρμακευτική αγωγή που να επηρεάζει τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό του οργανισμού το τελευταίο εξάμηνο, καθώς και συμπληρώματα διατροφής που περιέχουν αντιοξειδωτικά. Τέλος, δεν έπρεπε να έχουν πρόσφατο ιατρικό ιστορικό και η αρτηριακή τους πίεση έπρεπε να κυμαίνεται σε φυσιολογικά όρια.

#### **Πειραματικό πρωτόκολλο**

Οι συμμετέχοντες χρειάστηκε να παρουσιαστούν στο εργαστήριο τρεις φορές. Εγινε ενημέρωση για τη διαδικασία του πειράματος, υπεγράφησαν οι συναινέσεις των συμμετεχόντων (βλ. Παράρτημα 1) και δόθηκαν τα φυλλάδια και οι οδηγίες για τη συμπλήρωση αυτών με την τριήμερη διατροφή και το ιατρικό ιστορικό τους (βλ.

Παράρτημα 2). Στους συμμετέχοντες δόθηκε οδηγία επίσης να ακολουθήσουν την ίδια διατροφή πριν από τη δεύτερη και την τρίτη αιμοληψία με αυτή που είχαν ακολουθήσει πριν την πρώτη αιμοληψία. Τα άτομα που συμμετείχαν στο πείραμα παρουσιάστηκαν στο εργαστήριο πρωί, ενώ προηγήθηκε ολονύκτια νηστεία και αποχή από αλκοόλ και καφεΐνη για 24 ώρες. Κατά την πρώτη τους επίσκεψη μετρήθηκε το ποσοστό του σωματικού τους λίπους με δερματοπτυχόμετρο τύπου Harpenden (John Bull, UK), το σωματικό τους ύψος κατά προσέγγιση 0,5 cm (Stadiometer 208, Seca, UK) και το σωματικό τους βάρος κατά προσέγγιση 0.5 kg (Beam Balance, Seca, UK), με τους συμμετέχοντες να είναι ελαφρά ντυμένοι και ξυπόλυτοι. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η πρώτη αιμοληψία και οι συμμετέχοντες προμηθεύτηκαν το συμπλήρωμα ΛΟ. Η ποσότητα ΛΟ που χορηγήθηκε στον καθένα ξεχωριστά καθορίστηκε σε 600 mg/ημέρα (3 κάψουλες των 200 mg/ημέρα). Οι μετρήσεις του σωματικού βάρους και ποσοστού σωματικού λίπους επαναλήφθηκαν κατά την δεύτερη και τρίτη επίσκεψη.

#### **Σωματομετρικές αξιολογήσεις**

Ο προσδιορισμός του ποσοστού λίπους έγινε με τη μέθοδο των 7 δερματοπτυχών με δερματοπτυχόμετρο τύπου Harpenden (John Bull, UK). Η αρχή της συγκεκριμένης μελέτης βασίζεται στο γεγονός ότι το ποσοστό του λίπους που βρίσκεται υποδόρια (περίπου 50%) είναι ανάλογο με το συνολικό ποσοστό λίπους. Η εγκυρότητα στην πρόβλεψη της τιμής του ποσοστού λίπους με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι υψηλή και το ποσοστό λάθους υπολογίζεται στο 3,5% (ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription). Όπως προβλέπει η εν λόγω μέθοδος, η μέτρηση γίνεται σε συγκεκριμένα ανατομικά σημεία του σώματος. Οι δερματοπτυχές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

- α) στήθος
- β) μεσομασχαλιαία
- γ) τρικέφαλος
- δ) υποπλάτιος
- ε) κοιλιά
- στ) υπερλαγόνιος
- ζ) τετρακέφαλος



Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν στη δεξιά πλευρά του σώματος του συμμετέχοντα. Για να προσδιοριστεί η πυκνότητα του σώματος ακολουθήθηκαν οι αρχές της Αμερικάνικης Αθλητιατρικής Εταιρείας (American College of Sports Medicine, 2000). Το ποσοστό λίπους προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Siri.

### **Συλλογή και χειρισμός του αίματος**

Πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες φλεβικού αίματος από τη βασιλική ή μεσοβασιλική ή κεφαλική φλέβα των άνω άκρων με τη χρήση βελόνας ενώ οι συμμετέχοντες βρίσκονταν σε ύπτια θέση. Τηρήθηκαν όλοι οι προβλεπόμενοι κανόνες ασηψίας και αντισηψίας και τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μιας χρήσης.

*Γενική ανάλυση αίματος.* Μια ποσότητα αίματος συλλέχθηκε σε ειδικό φιαλίδιο, το οποίο περιείχε το αντιπηκτικό ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA) για τον προσδιορισμό των αιματολογικών παραμέτρων. Οι αιματολογικές μετρήσεις έγιναν σε αυτόματο αναλυτή Mythic 18 (Orphée).

*Πλάσμα.* Μια άλλη ποσότητα αίματος τοποθετήθηκε σε σωληνάριο διαχωρισμού και αναμείχθηκε με EDTA που είχε ήδη προστεθεί σε αναλογία 20μl/ml αίματος. Έπειτα έγινε φυγοκέντρηση στην ειδική ψυχόμενη φυγόκεντρο (Heraeus Biofigure Primo) για τον διαχωρισμό του πλάσματος. Η φυγοκέντρηση έγινε στα 1370 x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4° C. Ακολούθησε η συλλογή του υπερκείμενου (πλάσμα), το οποίο τοποθετήθηκε σε φιαλίδια τύπου Eppendorf™. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C και αποψύχτηκαν μόνο μια φορά πριν από την ανάλυση. Το πλάσμα χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

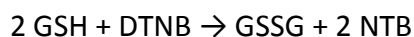
*Ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα.* Στα ερυθροκύτταρα που απέμειναν στο σωληνάριο από το διαχωρισμό του πλάσματος έγινε αιμόλυση με προσθήκη 1:1 (v/v) απιονισμένο νερό και σθεναρή ανάδευση. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση στα 4,000 g για 15 λεπτά. Τα καθαρά υπερκείμενα μεταφέρθηκαν μέσα σε σωληνάρια Eppendorf™ και αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Αποψύχτηκαν μόνο μια φορά και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της καταλάσης και της ανηγμένης γλουταθειόνης και της αιμοσφαιρίνης.

*Ορός.* Κάποια άλλη ποσότητα αίματος τοποθετήθηκε σε σωληνάρια διαχωρισμού ορού που περιείχαν ενεργοποιητή της πήξης. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση για τον

διαχωρισμό του ορού στα 1370 x g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4° C. Ακολούθησε η συλλογή του ορού που τοποθετήθηκε σε φιαλίδια Eppendorf™ και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Ο ορός χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ολικής χολερυθρίνης και του ουρικού οξέος.

### **Αναλύσεις στο πλάσμα, το ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα και τον ορό**

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



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

Για την εκτέλεση του προσδιορισμού αναμίξαμε σε φιαλίδιο eppendorf 20 μL από το υπερκείμενο που είχε προκύψει από την επεξεργασία των αιμολυμάτων, με 660 μL ρυθμιστικού διαλύματος KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 67 mmol/L και pH 7,95 και με 330 μL διαλύματος DTNB 1 mmol/L σε διάλυμα κιτρικού νατρίου 1% (w/v). Για την παρασκευή του τυφλού, αντικαταστήθηκε το υπερκείμενο με απιονισμένο νερό. Κάθε δείγμα προσδιορίστηκε εις διπλούν. Μετά από καλή ανακίνηση και επώαση για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, μετρήθηκε η απορρόφηση των μιγμάτων στα 412 nm. Για κάθε δείγμα έγινε υπολογισμός του μέσου όρου των δύο απορροφήσεων που βρέθηκαν και στη συνέχεια έγινε υπολογισμός της συγκέντρωσης C της GSH σε μmol/L σύμφωνα με τον τύπο:

$$C = (\text{Αδείγματος} - \text{Ατυφλού}) / 13,6 \times 131,3 \times 1000$$

όπου:

- Αδείγματος και Ατυφλού οι απορροφήσεις του δείγματος και του τυφλού αντίστοιχα,

- 13,6 ο συντελεστής γραμμομοριακής απορροφητικότητας του NTB σε L/mmol/cm,

- 131,3 ο συντελεστής αραιώσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου (1010 μL) προς τον όγκο του αιμολύματος (20 μL), από τον πολλαπλασιασμό επί 2, ώστε να ληφθεί υπόψη η αρχική αραιώση του αιμολύματος με το διάλυμα TCA, και από τον

πολλαπλασιασμό επί 1,3, ώστε να ληφθεί υπόψη η δεύτερη αραίωση με το διάλυμα TCA, και

- 1000 ο συντελεστής μετατροπής των mmol/L σε μmol/L.

#### *Προσδιορισμός δραστικότητας καταλάσης.*

Για την εκτέλεση του προσδιορισμού προσθέσαμε - για κάθε δείγμα - σε πλαστικό σωληνάριο των 7 ml 2,991 μL Phosphate buffer 67 mM (pH 7,4) και 4 μL ερυθροκυτταρικό αιμόλυμα αραιωμένο 1/10 με νερό. Κάθε δείγμα προσδιορίστηκε εις διπλούν. Μετά από μέτρια ανακίνηση (βόρτεξ) και επώση σε φούρνο στους 37°C για 10 min, το περιεχόμενο του σωληναρίου μεταφέρθηκε σε UV γυάλινη κιβέττα. Προστέθηκαν 5 μL υπεροξείδιο του υδρογόνου 30% και μετά από απαλή ανάδευση (με τη βοήθεια parafilm) μετρήθηκε αμέσως η απορρόφηση στα 5 και 125 sec, σε μήκος κύματος 240 nm.

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

όπου:

- $\Delta\text{Abs}_{\text{sample}}$  η διαφορά των απορροφήσεων του δείγματος στα 5'' και 125'' διαιρεμένη δια 2,
- $\Delta\text{Abs}_{\text{sample}}$  είναι πάντα μηδεν, επομένως δεν απαιτείται η μέτρηση του τυφλού,
- 40 ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε mol/L που πολλαπλασιάζεται με το 1000 για να μετατραπεί σε μmol/mL,
- 750 ο συντελεστής αραίωσης που προκύπτει από τη διαίρεση του τελικού όγκου (3000 μL) με τον όγκο του ερυθροκυτταρικού αιμολύματος (4 μL) (3000/4=750),
- 10 είναι η αραίωση του δείγματος (1/10),
- 2 είναι η αραίωση των ερυθροκυττάρων με  $\text{H}_2\text{O}$  όταν λύνονται,
- η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης μετατρέπεται σε mg/ml πολλαπλασιάζοντας την τιμή που προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά με 10x2. Η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης προσδιορίζεται φασματοφωτομετρικά σε g/dL. Πολλαπλασιάζοντας με το 10 μετατρέπεται σε g/L (mg/ml) και με το 2 λαμβάνεται υπόψη η αραίωση 1/1 κατά τη λύση των ερυθροκυττάρων,
- Η συγκέντρωση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  στην κιβέττα είναι περίπου 16 mM.

*Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων.* Η συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο του Patsoukis και των συνεργατών του (2004). Κάθε δείγμα (και κάθε τυφλό αυτού) προσδιορίστηκε εις διπλούν. Για την εκτέλεση του προσδιορισμού προσθέσαμε σε 4 φιαλίδια erpendorfs (2 για το τυφλό – 2 για το δείγμα) 50 μL πλάσματος και 50 μL TCA 20%, το μίγμα επώαστηκε σε πάγο για 15 min και φυγοκεντρήθηκε στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο ίζημα προστέθηκε DNPH (διαλυμένο σε 2,5 N HCL) συγκέντρωσης 10 mM για τα δείγματα ή HCL συγκέντρωσης 2,5 N για τα τυφλά. Τα δείγματα επώαστηκαν στο σκοτάδι για 1 ώρα με ανακίνηση κάθε 15 min (στα 15, 30 και 45 min) και φυγοκεντρήθηκαν στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και στο ίζημα προστέθηκε 1 mL TCA 10%, τα δείγματα ανακινήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, στο ίζημα προστέθηκε 1 mL μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v), τα δείγματα ανακινήθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε ακόμα 2 φορές. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, στο ίζημα προστέθηκε 1 mL ουρίας συγκέντρωσης 5M (pH 2,3). Τα δείγματα ανακινήθηκαν, επώαστηκαν στους 37°C για 15 min, φυγοκεντρήθηκαν στα 15000 g για 5 min στους 4°C και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 375 nm (Patsoukis, et al., 2004).

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων έγινε με βάση το συντελεστή μοριακής απόσβεσης του DNPH. Για τον υπολογισμό των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ακουλήθηκε η παρακάτω εξίσωση:

$$C \text{ (nmol/mg ολικής πρωτεΐνης)} = (\text{Απορ. Δείγματος} - \text{Απορ. Τυφλού}) / 0,022 \times 20$$

όπου:

- 0,022 ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH σε  $\text{nM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,
- 20 ο συντελεστής αραίωσης,
- οι συντελεστές μεταβλητότητας (intra-assay και inter assay coefficient of variation)

για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι 3,8% και 6,4%, αντίστοιχα.

*Προσδιορισμός ολικής χολερυθρίνης.* Η χολερυθρίνη αντιδρά με (DPD) σχηματίζοντας Azobilirubin, της οποίας η απορρόφηση είναι απ'ευθείας ανάλογη με την συγκέντρωση χολερυθρίνης στο δείγμα στα 546 nm.

Ολική χολερυθρίνη = Άμεση + Έμμεση χολερυθρίνη

Bilirubin + DPD → Direct Azobilirubin

Bilirubin + DPD + caffeine → Total Azobilirubin

Η ολική χολερυθρίνη μετρήθηκε με αντιδραστήρια της εταιρείας Ζαφειρόπουλος (Αθήνα, Ελλάδα) σε βιοχημικό αναλυτή (CLINICAL CHEMISTRY ANALYZER Z 1145 - ZAFIROPOULOS DIAGNOSTICA).

*Προσδιορισμός ουρικού οξέος.* Με τη μέθοδο PAP. Ο προσδιορισμός του ουρικού οξέος γίνεται με τη βοήθεια της ενζυματικής αντίδρασης με ουρικάση. Το παραγόμενο υπεροξείδιο του υδρογόνου αντιδρά με το υδροξυ-βενζοσουλφονικό οξύ και την 4-αμινοφαιναζόνη (οξειδωση χρωμογόνου), κάτω από την καταλυτική παρουσία της υπεροξειδάσης, δίνοντας μια κοκκινοβιολετί κυνονεΐμίνη.

Ουρικό οξύ + O<sub>2</sub> + 2H<sub>2</sub>O  $\xrightarrow{\text{ουρικάση}}$  αλλαντοΐνη + CO + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 3,5 διχλωρο-2-υδροβενζενσουλφονικό οξύ + 4-αμινοφαιναζόνη  $\xrightarrow{\text{υπεροξειδάση}}$  βρωμοσύνπλοκο + HCl + 4H<sub>2</sub>O

Το ουρικό οξύ μετρήθηκε με αντιδραστήρια της εταιρείας Ζαφειρόπουλος (Αθήνα, Ελλάδα) σε βιοχημικό αναλυτή (CLINICAL CHEMISTRY ANALYZER Z 1145 - ZAFIROPOULOS DIAGNOSTICA).

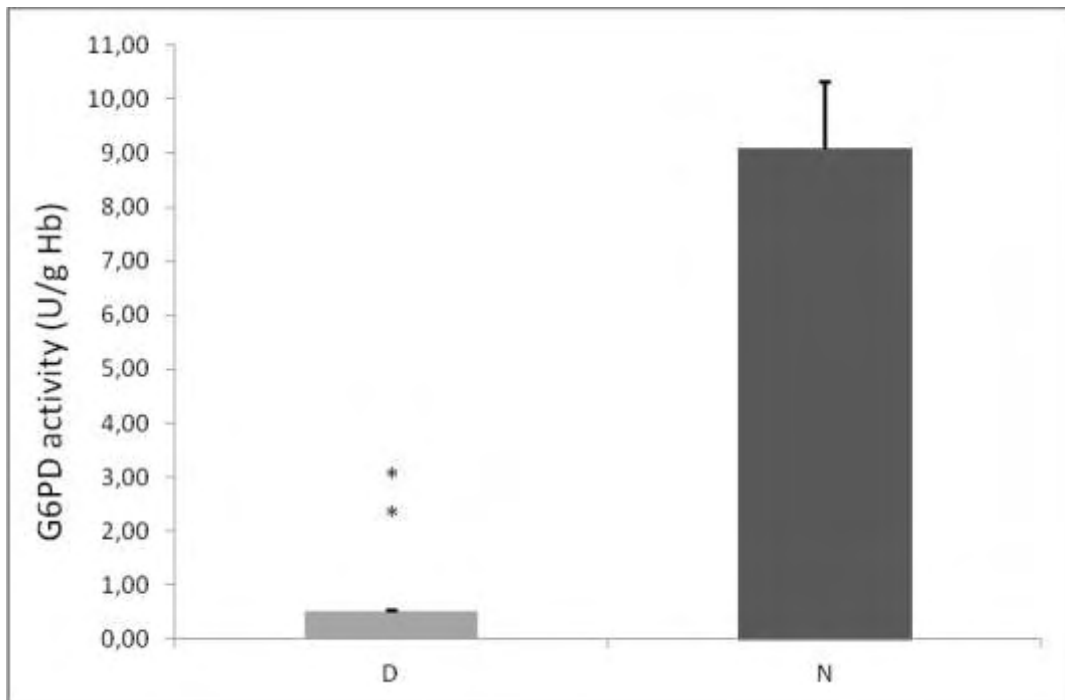
### **Στατιστική ανάλυση**

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± τυπικό σφάλμα. Ανάλυση διακύμανσης 2 παραγόντων (ομάδα Χ χρόνος) με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στο χρόνο (Repeated Measures ANOVA) πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθούν εάν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων και των χρονικών στιγμών που έγιναν οι μετρήσεις. Επίσης, πραγματοποιήθηκε t-test για ανεξάρτητα δείγματα (Independent t-test) για να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν αρχικές διαφορές στις εξετασθείσες μεταβλητές. Στην περίπτωση που διαπιστώθηκαν διαφορές στις αρχικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκε ανάλυση συνδιακύμανσης (ANCOVA) χρησιμοποιώντας σαν συνδιακυμαστή την αρχική μέτρηση. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας τέθηκε α = 0.05. Το στατιστικό πακέτο SPSS έκδοση 15.0 χρησιμοποιήθηκε για όλες τις αναλύσεις (SPSS Inc., USA).

#### IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

##### *Δραστικότητα του G6PD*

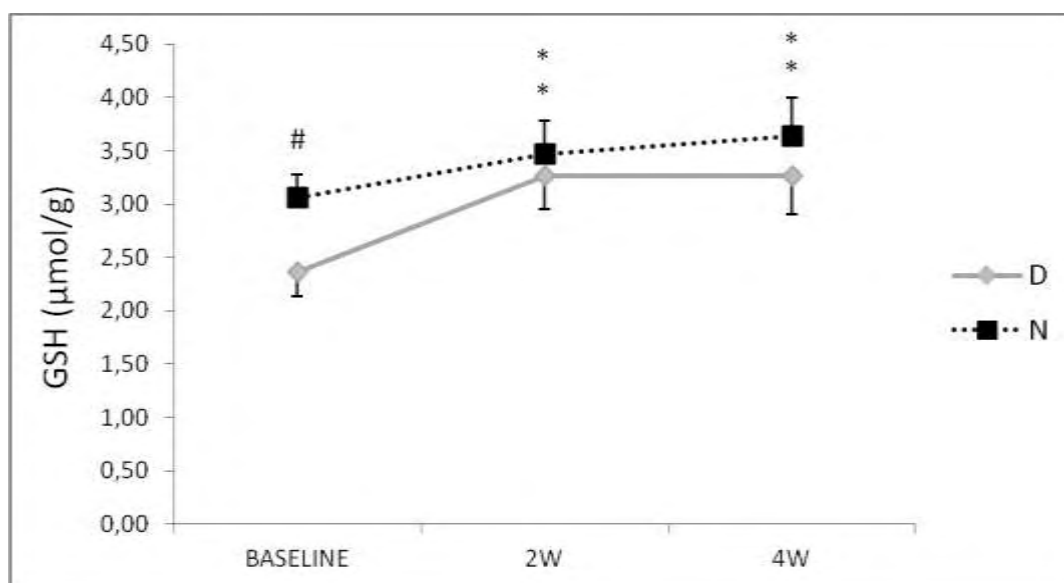
Το Independent t-test που εφαρμόστηκε έδειξε διαφορές στη δραστικότητα του G6PD μεταξύ των 2 ομάδων ( $t_{(7,006)} = 19,418$ ,  $p < 0.001$ ). Η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων ( $M = 9,084$ ,  $SE = 0,44$ ) είχε σημαντικά μεγαλύτερη δραστικότητα G6PD σε σχέση με την ομάδα έλλειψης του ενζύμου ( $M = 0,512$ ,  $SE = 0,01$ ) (Σχήμα 1).



**Σχήμα 1:** Δραστικότητα του G6PD στην ομάδα των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και των φυσιολογικών ατόμων (N) ( $M \pm SE$ ). \* Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ( $p < 0.01$ ).

### Συγκέντρωση ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH)

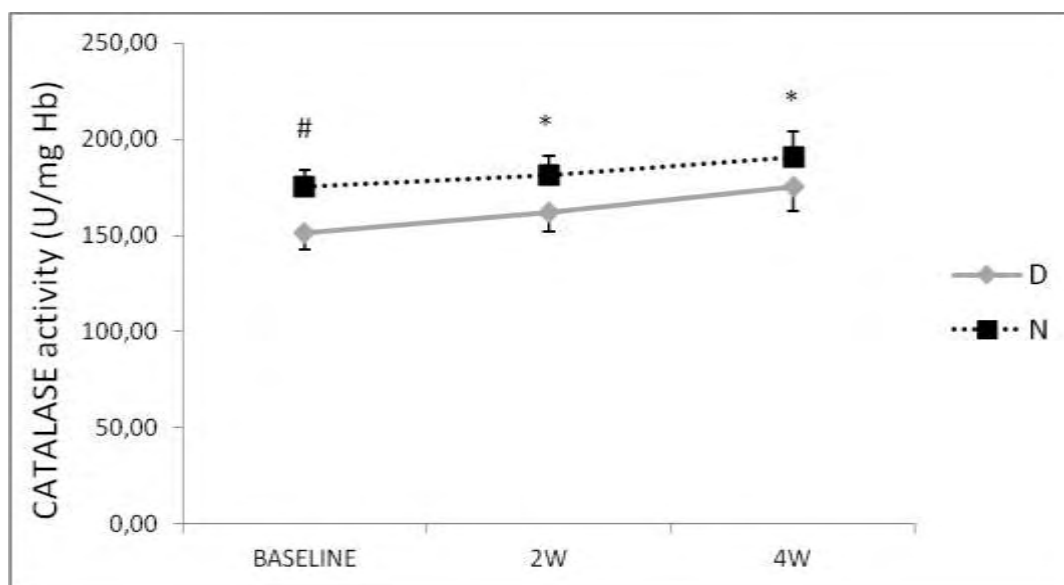
Η Repeated Measures ANOVA για τη συγκέντρωση της GSH έδειξε σημαντικές διαφορές για το χρόνο ( $F_{(2,28)} = 13,99$ ,  $p < 0.01$ ) ενώ δεν υπήρξε σημαντική αλληλεπίδραση για την ομάδα ( $F_{(1,14)} = 1,42$ ,  $p > 0.05$ ). Στο σύνολο των δοκιμαζόμενων, η αύξηση των τιμών της GSH ήταν σημαντική τόσο μετά τις δύο όσο και μετά τις τέσσερις εβδομάδες ( $p < 0.01$ ) σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στην αρχική κατάσταση. [(Baseline:  $M = 2,714$ ,  $SE = 0,157$ ), (2<sup>nd</sup> week:  $M = 3,366$ ,  $SE = 0,223$ ), (4<sup>th</sup> week:  $M = 3,453$ ,  $SE = 0,259$ )] (Σχήμα 2). Η διακύμανση των τιμών δεν ήταν ομαλά κατανομημένη. Από το Independent t-test που πραγματοποιήθηκε διαπιστώθηκαν διαφορές στην αρχική τιμή της GSH ( $t_{(9,946)} = 2,220$ ,  $p = 0.05$ ) μεταξύ των ατόμων με έλλειψη και των ατόμων χωρίς την έλλειψη. Η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων ( $M = 3,06$ ,  $SE = 0,14$ ) είχε σημαντικά μεγαλύτερες τιμές GSH στην αρχική κατάσταση, σε σχέση με την ομάδα έλλειψης ενζύμου G6PD ( $M = 2,36$ ,  $SE = 0,28$ ) (Σχήμα 2). Σύμφωνα με την ANCOVA που πραγματοποιήθηκε, οι διαφορές στο χρόνο δεν οφειλόταν στις αρχικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων ( $p > 0.05$ ) πριν την παρέμβαση.



**Σχήμα 2:** Συγκέντρωση GSH ( $\mu\text{mol/g}$ ) στην ομάδα των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και των φυσιολογικών ατόμων (N) πριν (BASELINE), δύο εβδομάδες (2W) και τέσσερις εβδομάδες (4W) μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος ( $M \pm SE$ ). \* Στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση της GSH τις δύο και τις τέσσερις εβδομάδες ( $p < 0.01$ ) σε σχέση με την αρχική κατάσταση. # Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων ( $p < 0.5$ ).

### Δραστικότητα καταλάσης

Η Repeated Measures ANOVA για τη δραστικότητα της καταλάσης έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές εξαιτίας του χρόνου ( $F_{(2,28)} = 5,45$ ,  $p < 0.05$ ) ενώ δεν υπήρξε σημαντική διαφορά εξαιτίας των ομάδων ( $F_{(1,14)} = 1,963$ ,  $p > 0.05$ ), ούτε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδας και χρόνου ( $F_{(2,28)} = 0,287$ ,  $p > 0.05$ ). Η αύξηση των τιμών της καταλάσης ήταν σημαντική τόσο μετά τις δύο ( $p < 0.05$ ) όσο και μετά τις τέσσερις εβδομάδες ( $p < 0.01$ ) (Σχήμα 3). Στο σύνολο των δοκιμαζομένων, οι τιμές της καταλάσης στις 2 εβδομάδες ( $M = 171,742$ ,  $SE = 7,05$ ) ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές στις 4 εβδομάδες ( $M = 183,274$ ,  $SE = 9,25$ ). Η διακύμανση των τιμών ήταν ομαλά κατανομημένη. Το Independent t-test που πραγματοποιήθηκε δεν διαπίστωσε διαφορές στην τιμή της καταλάσης ( $t_{(14)} = 1,887$ ,  $p > 0.05$ ) στην αρχική κατάσταση αλλά μια τάση ( $p < 0.08$ ) για μικρότερες τιμές στην ομάδα D (Σχήμα 3).

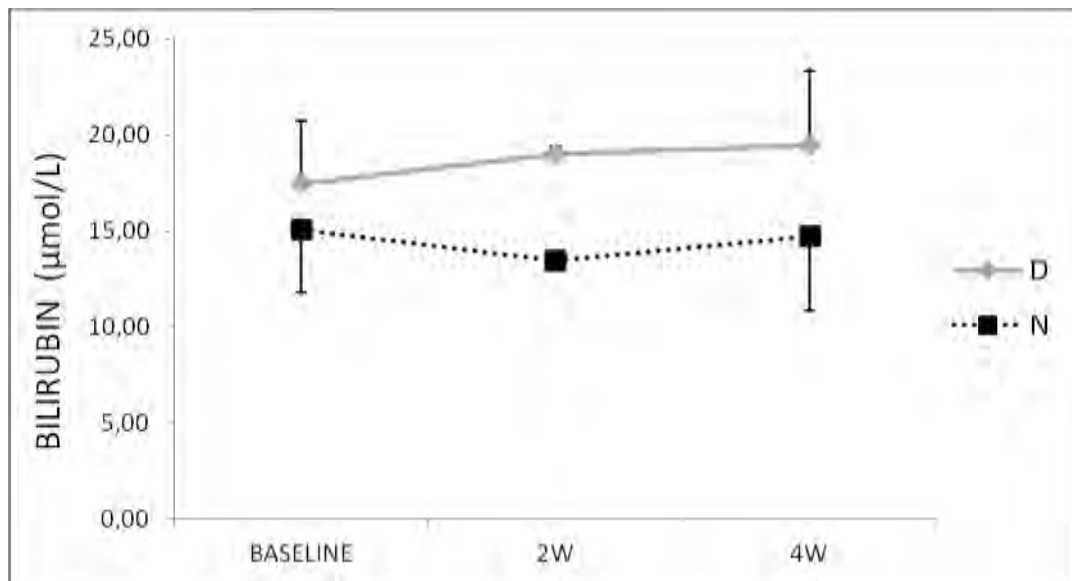


**Σχήμα 3:** Δραστικότητα καταλάσης (U/mg Hb) στην ομάδα των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και των φυσιολογικών ατόμων (N) πριν (BASELINE), δύο εβδομάδες (2W) και τέσσερις εβδομάδες (4W) μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος ( $M \pm SE$ ). \* Η συγκέντρωση της καταλάσης ήταν σημαντικά αυξημένη μετά τις δύο και μετά τις τέσσερις εβδομάδες ( $p < 0.05$ ) σε σχέση με την αρχική μέτρηση. # Οι τιμές της καταλάσης στην ομάδα με έλλειψη του ενζύμου ήταν χαμηλότερες από τις αντίστοιχες τιμές στην ομάδα φυσιολογικών ατόμων στην αρχική μέτρηση ( $p < 0.08$ ).



### Συγκέντρωση χολερυθρίνης

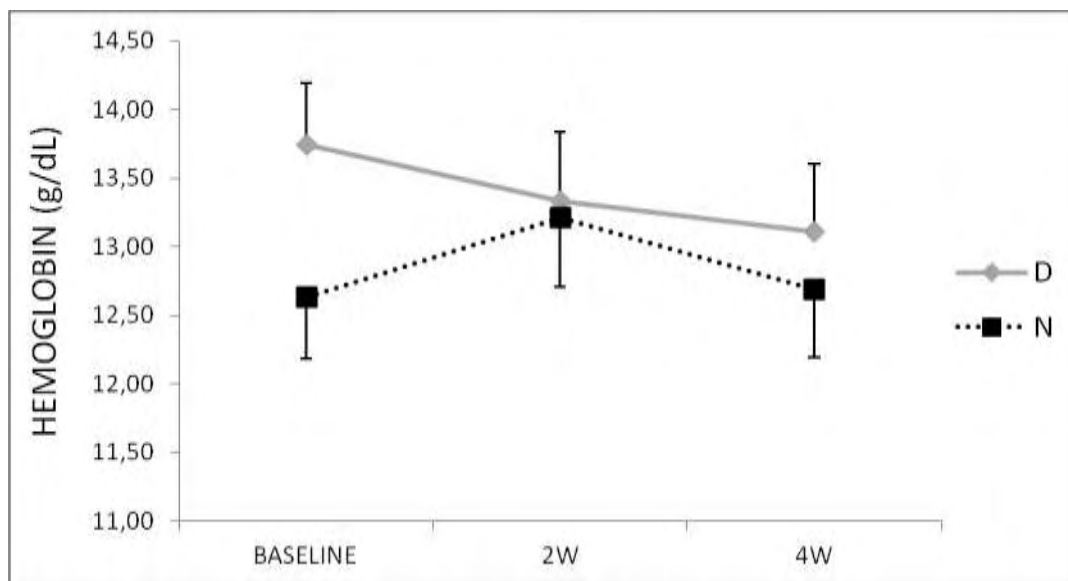
Η Repeated Measures ANOVA για τη συγκέντρωση της χολερυθρίνης έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ( $F_{(1,14)} = 0,719$ ,  $p > 0,05$ ), ούτε μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών μέτρησης ( $F_{(2,28)} = 0,295$ ,  $p > 0,05$ ), ενώ επίσης δεν υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδων και χρόνου ( $F_{(2,28)} = 0,813$ ,  $p > 0,05$ ) (Σχήμα 4).



**Σχήμα 4:** Συγκέντρωση χολερυθρίνης (μmol/L) στην ομάδα των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και των φυσιολογικών ατόμων (N) πριν (BASELINE), δύο εβδομάδες (2W) και τέσσερις εβδομάδες (4W) μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος ( $M \pm SE$ ).

### Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης

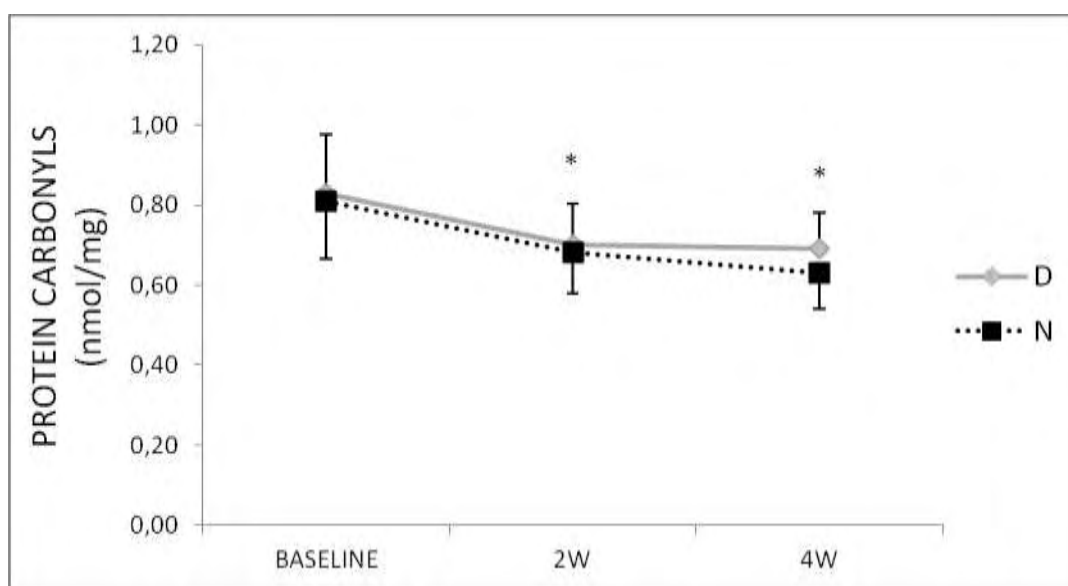
Η Repeated Measures ANOVA για τη συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης έδειξε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ( $F_{(1,14)} = 0,879$ ,  $p > 0,05$ ), ούτε μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών μέτρησης ( $F_{(2,28)} = 0,805$ ,  $p > 0,05$ ), ενώ επίσης δεν υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδων και χρόνου ( $F_{(2,28)} = 1,391$ ,  $p > 0,05$ ). Η διακύμανση των τιμών ήταν ομαλά κατανομημένη (Σχήμα 5).



**Σχήμα 5:** Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (g/dL) στην ομάδα των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και των φυσιολογικών ατόμων (N) πριν (BASELINE), δύο εβδομάδες (2W) και τέσσερις εβδομάδες (4W) μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος ( $M \pm SE$ ).

### Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων

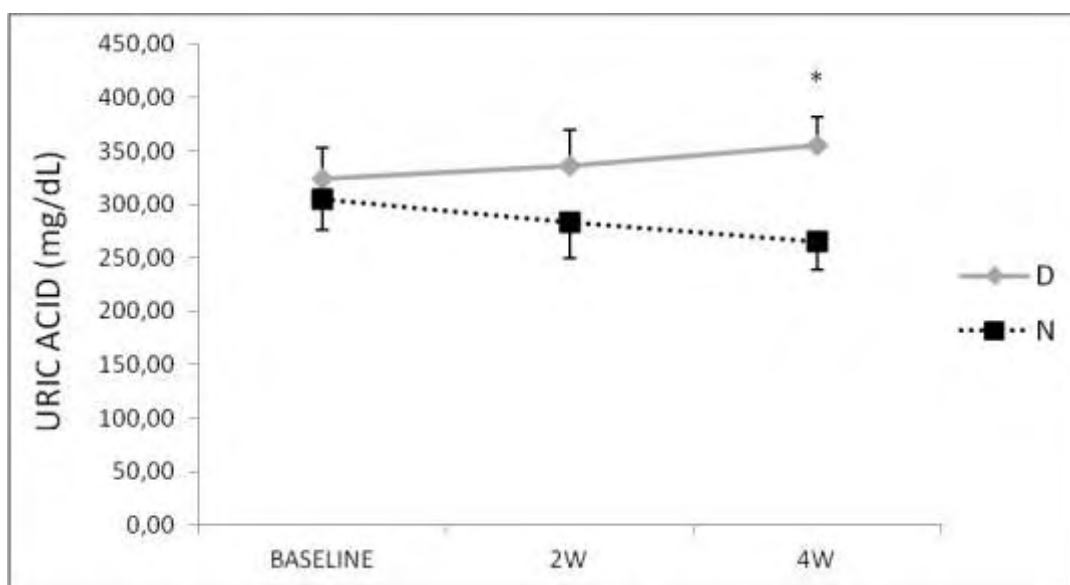
Η Repeated Measures ANOVA για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια έδειξε σημαντικές διαφορές για το χρόνο ( $F_{(2,28)} = 4,94$ ,  $p < 0.05$ ) ενώ δεν υπήρξε σημαντική διαφορά για τις ομάδες ( $F_{(1,14)} = 0,056$ ,  $p > 0.05$ ), ούτε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδας και χρόνου ( $F_{(2,28)} = 0,184$ ,  $p > 0.05$ ). Η μείωση των τιμών των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ήταν σημαντική τόσο μετά τις δύο ( $M = 0,689$ ,  $SE = 0,072$ ) όσο και μετά τις τέσσερις εβδομάδες ( $M = 0,661$ ,  $SE = 0,064$ ) και στις δύο ομάδες (Σχήμα 6). Η διακύμανση των τιμών ήταν ομαλά κατανομημένη. Το Independent t-test που πραγματοποιήθηκε δεν διαπίστωσε διαφορές στην τιμή των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ( $t_{(14)} = 0,089$ ,  $p > 0.05$ ) στην αρχική κατάσταση. Η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων ( $M = 0,807$ ,  $SE = 0,10$ ) δεν είχε σημαντικά μικρότερες τιμές πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με την ομάδα έλλειψης ενζύμου G6PD ( $M = 0,826$ ,  $SE = 0,18$ ) στην αρχική κατάσταση.



**Σχήμα 6:** Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg ολικής πρωτεΐνης) στην ομάδα των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και των φυσιολογικών ατόμων (N) πριν (BASELINE), δύο εβδομάδες (2W) και τέσσερις εβδομάδες (4W) μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος ( $M \pm SE$ ). \* Η συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων ήταν σημαντικά μειωμένη μετά τις δύο όσο και μετά τις τέσσερις εβδομάδες ( $p < 0.05$ ) και για τις δύο ομάδες σε σχέση με τη baseline.

### Συγκέντρωση ουρικού οξέος

Η Repeated Measures ANOVA για τη συγκέντρωση του ουρικού οξέος δεν έδειξε σημαντικές διαφορές για το χρόνο ( $F_{(2,28)} = 0,086$ ,  $p > 0.05$ ) ούτε για την ομάδα ( $F_{(1,14)} = 2,344$ ,  $p > 0.05$ ), ενώ υπήρξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ ομάδας και χρόνου ( $F_{(2,28)} = 4,617$ ,  $p < 0.05$ ). Από τη μέθοδο των πολλαπλών συγκρίσεων του Sidak προέκυψε ότι η συγκέντρωση του ουρικού οξέος για την ομάδα με την έλλειψη ενζύμου G6PD ( $M = 355,77$ ,  $SE = 22,381$ ) ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με την ομάδα φυσιολογικών ατόμων ( $M = 265,06$ ,  $SE = 22,381$ ), αλλά μόνο μετά τις τέσσερες εβδομάδες ( $p < 0.05$ ) (Σχήμα 7).



**Σχήμα 7:** Συγκέντρωση ουρικού οξέος (mg/dL) στην ομάδα των ατόμων με έλλειψη του ενζύμου (D) και των φυσιολογικών ατόμων (N) πριν (BASELINE), δύο εβδομάδες (2W) και τέσσερις εβδομάδες (4W) μετά τη χορήγηση του συμπληρώματος ( $M \pm SE$ ). \* Η συγκέντρωση του ουρικού οξέος για την ομάδα με την έλλειψη ενζύμου G6PD ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με την ομάδα φυσιολογικών ατόμων μετά τις τέσσερες εβδομάδες (4W) ( $p < 0.05$ ).

## V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην εργασία αυτή έγινε προσπάθεια να εξεταστεί η οξειδοαναγωγική κατάσταση ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD όσο και ατόμων με φυσιολογική δραστικότητα του ενζύμου, πριν και μετά λήψη συμπληρώματος ΛΟ. Σκοπός ήταν να διερευνηθούν πιθανές διαφορές στις απαντήσεις του οργανισμού ατόμων με έλλειψη G6PD σε σύγκριση με άτομα με φυσιολογική δραστικότητα του ενζύμου όσον αφορά ουσίες που αποτελούν δείκτες της οξειδοαναγωγικής κατάστασης: ανηγμένη γλουταθειόνη, καταλάση, χολερυθρίνη, αιμοσφαιρίνη, πρωτεϊνικά καρβονύλια και ουρικό οξύ. Εκτελέστηκαν τρεις αιμοληψίες και μετρήσεις των βιοχημικών δεικτών πριν τη χορήγηση (baseline), στα μέσα της χορήγησης (15η ημέρα) και μετά (29η ημέρα) τη χορήγηση ΛΟ ώστε να δοθεί μια πλήρης και σωστή εικόνα της αντίδρασης του οργανισμού στους δείκτες που εξετάστηκαν. Υποθέσαμε ότι τα άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD θα εμφάνιζαν αύξηση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης στον οργανισμό τους μετά τη χορήγηση του ΛΟ, λόγω των χαμηλών επιπέδων που συνήθως παρουσιάζουν. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι τόσο στα άτομα με έλλειψη του ενζύμου όσο και στα φυσιολογικά άτομα τα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης και της καταλάσης αυξήθηκαν σημαντικά. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μια σημαντική μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και στις δύο ομάδες και αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο ομάδων στα επίπεδα του ουρικού οξέος. Στην βιβλιογραφία δεν υπάρχει καμία αναφορά που να μελετά το αποτέλεσμα χορήγησης ΛΟ σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD. Ωστόσο, ολοένα και περισσότερες μελέτες καταδεικνύουν τις πολυάριθμες από ότι φαίνεται ευεργετικές ιδιότητες του ΛΟ. Στοιχεία από διάφορες έρευνες υποδηλώνουν ότι το ΛΟ είναι ένας δραστικός παράγοντας για την επαναφορά της σχετιζόμενης με τη γήρανση μείωσης της θειολικής οξειδοαναγωγικής αναλογίας, όπως επίσης για την αύξηση των επιπέδων της GSH που κανονικά μειώνονται με την ηλικία (Petersen Shay et al, 2009). Αυτό το στοιχείο είναι πολύ σημαντικό, καθώς άτομα με έλλειψη του G6PD παρουσιάζουν διαταραχή στην οξειδοαναγωγική ομοιόσταση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα άτομα αυτά να είναι πιο επιρρεπή στην εμφάνιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις, δυσλειτουργία της κυτταρικής ανάπτυξης και σηματοδότησης, ανώμαλη εμβρυϊκή ανάπτυξη, αυξημένη ευαισθησία σε ιογενείς λοιμώξεις και εκφυλιστικές ασθένειες (Ho et al, 2007) και πολλές άλλες. Τα

αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η συμπληρωματική λήψη ΛΟ μπορεί να αυξήσει την αντιοξειδωτική ικανότητα αφού τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης και της καταλάσης, δύο πολύ σημαντικών ενδογενών αντιοξειδωτικών μορίων, αυξάνονται ακόμα και μετά τη συμπληρωματική λήψη δύο εβδομάδων. Έμμεση απόδειξη της αυξημένης αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού των συμμετεχόντων μετά τη λήψη του ΛΟ φαίνεται και από τη μειωμένη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ενός πολύ συχνά χρησιμοποιούμενου δείκτη οξειδωτικού στρες και από την αύξηση της συγκέντρωσης του ουρικού οξέος, που αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό παράγοντα του ορού του αίματος. Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι η συμπληρωματική λήψη πρόδρομων ουσιών για τη δημιουργία γλουταθειόνης από άτομα με φυσιολογικά επίπεδα G6PD μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα της (Lands et al. 1999). Ωστόσο, η συγκεκριμένη εργασία είναι η πρώτη που αναφέρει ότι η συμπληρωματική λήψη μιας πρόδρομης ουσίας για τη δημιουργία γλουταθειόνης, του ΛΟ, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων γλουταθειόνης σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD.

Θα πρέπει να τονιστεί πως είναι μεγάλη η ανάγκη να βρεθεί μια ουσία που θα προσφέρει κάποια προστασία στα άτομα με την έλλειψη του G6PD ενάντια στις καθημερινές προκλήσεις οξειδοαναγωγικής ανισορροπίας, έχοντας βεβαίως και τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες. Στη συγκεκριμένη εργασία ο μεγαλύτερος κίνδυνος που θα μπορούσε να προκληθεί ήταν εξαιτίας αυξημένου οξειδωτικού στρες να εμφανιστεί αιμόλυση. Ωστόσο, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η τόσο μετά τις 2 εβδομάδες όσο και μετά τις 4 εβδομάδες συμπληρωματικής λήψης δεν επηρεάστηκαν τα επίπεδα της χολερυθρίνης, υποδεικνύοντας απουσία αιμόλυσης.

## VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το κύριο εύρημα της παρούσας εργασίας είναι ότι η χορήγηση ΛΟ σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου G6PD οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH), της καταλάσης, και του ουρικού οξέος, ενώ οδηγεί σε μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Οι υπόλοιποι βιοχημικοί δείκτες που μελετήθηκαν (χολερυθρίνη, αιμοσφαιρίνη) δεν παρουσίασαν μεταβολή, ένα εύρημα το οποίο μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι συμμετέχοντες της έρευνας δεν υποβλήθηκαν σε συνθήκες αύξησης του οξειδωτικού στρες.

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

## VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ajello, M., Greco, R., Giansanti, F., Massucci, M.T., Antonini, G. & Valenti, P. (2002). Anti-invasive activity of bovine lactoferrin towards group A streptococci. *Biochem Cell Biol*, 80, 119–24.
- Almasio, P., Bortolini, M., Pagliaro, L. et al. (1990). Role of S-adenosyl methionine in the treatment of intrahepatic cholestasis. *Drugs*, 40(Suppl3), 111-123.
- Anderson, M.E. (1997). Glutathione and glutathione delivery compounds. *Adv Pharmacol*, 38, 65-78.
- Anuradha, B. & Varalakshmi, P. (1999). Protective role of DL-alpha-lipoic acid against mercury-induced neural lipid peroxidation. *Pharmacol. Res.*, 39, 67–80.
- Arivazhagan, P., Panneerselvam, S.R. & Panneerselvam, C. (2003). Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and lipids in aged rats. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 58, B788–B791.
- Aoyama, Y., Matsumoto, H., Hitomi-Ohmura, E. & Yoshida, A. (1992). Fatty liver induced by the addition of excess cystine to a soya-bean protein diet in rats. *Com. Biochem Physiol*, 102(A), 185–189.
- Aoyama, Y., Amano, N. & Yoshida, A. (1999). Cholesterol synthesis and degradation in normal rats fed a cholesterol-free diet with excess cysteine. *Lipids*, 34, 583–589.
- Badaloo, A., Reid, M., Forrester, T., Heird, W.C. & Jahoor, F. (2002). Cysteine supplementation improves the erythrocyte glutathione synthesis rate in children with severe edematous malnutrition. *Am J Clin Nutr*, 76, 646–52.



- Bast, A. & Haenen, G.R. (1988). Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*, 963, 558–561.
- Bast, A. & Haenen, G.R. (2003). Lipoic acid: a multifunctional antioxidant, *Biofactors*, 17, 207–213.
- Behl, C. & Moosmann, B. (2002). Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biol Chem*, 383, 521–536.
- Beutler, E. (1988). The relationship of red cell enzymes to red cell life-span. *Blood Cells*, 14, 69-91.
- Beutler, E. (1994). G6PD deficiency. *Blood*, 84, 3613-36.
- Beutler, E. & Vulliamy, T.J. (2002). Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells Mol, Dis*, 28, 93–103.
- Biewenga, G.P., Haenen, G.R. & Bast, A. (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol.*, 29, 315–331.
- Boers, G.H.J., Smals, A.G.H., Drayer, J.I.M., Trijbels, F.J.M., Leermakers, A.I. & Kloppenborg, P. W. (1983). Pyridoxine treatment does not prevent homocystinemia after methionine loading in adult homocystinuria patients. *Metabolism* 32: 390–397.
- Brok, J, Buckley, N, Gluud, C. (2002). Interventions for paracetamol (acetaminophen) overdoses. *Cochrane Database Syst Rev*, 3, CD003328.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, 813–820.

- Buettner, G.R. & Jurkiewicz, B.A. (1996). Catalytic Metals, Ascorbate and Free Radicals: Combinations to Avoid. *Radiation Research*, 145, (5), 532-541.
- Busse, E., Zimmer, G., Schopohl, B. & Kornhuber, B. (1992). Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung*, 42, 829–831.
- Chan, A.C., Chow, C.K. & Chiu, D. (1999). Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *P.S.E.B.M.*, 222, 274-282.
- Chandra, R.K., 1989. Nutritional regulation of immunity and risk of illness in old age. *Immunology* 67, 141–147.
- Chung, T.K., Funk, M.A. & Baker, D.H. (1990). L-2-oxothiazolidine- 4-carboxylate as a cysteine precursor—efficacy for growth and hepatic glutathione synthesis in chicks and rats. *J. Nutr.*, 120, 158–165.
- Corcoran, G.B. & Wong, B.K. (1986). Role of glutathione in prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity by N-acetyl-L-cysteine in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, 238, 54-61.
- Counous, G. (2000). Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res*, 20, 4785–9.
- Cui, X., Zuo, P., Zhang, Q., Li, X., Hu, Y., Long, J., Packer, L. & Liu, J. (2006). Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of R-alpha-lipoic acid. *J. Neurosci. Res.*, 83, 1584–1590.
- Deleve, L.D. & Kaplowitz, N. (1990). Importance and regulation of hepatic glutathione. *Seminars Liver Dis*, 10, 251-266.

- Demir, U., Demir, T. & Ilhan, N. (2005). The protective effect of alpha-lipoic acid against oxidative damage in rabbit conjunctiva and cornea exposed to ultraviolet radiation. *Ophthalmologica*, 219, 49–53.
- Devasagayam, T.P., di Mascio, P., Kaiser, S. & Sies, H. (1991). Singlet oxygen induced singlestrand breaks in plasmid pBR322 DNA: the enhancing effect of thiols. *Biochim. Biophys. Acta*, 1088, 409–412.
- Devasagayam, T.P., Subramanian, M., Pradhan, D.S. & Sies, H. (1993). Prevention of singlet oxygen-induced DNA damage by lipoate. *Chem. Biol. Interact.*, 86, 79–92.
- Duke, R.C., Ojcius, D.M. & Young, J.D-E. (1996). Cell suicide in health and disease. *Scientific American*, Dec, 79-87.
- Efferth, T., Schwarzl, S.M., Smith, J. & Osieka, R. (2006). Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase for oxidative stress and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 13, 527–528.
- El-Zoghby, S.M., Helmy, M.H., Ghanem, A.M., Hanafi, M.Y., El-Nabi Kamela, M.A., El-Sayed, A.A. (2007). The status of antioxidant defences in g-6-pd deficient patients. The role of antioxidants to ameliorate hemolytic crisis. *The Egyptian Journal of Biochemistry & Molecular Biology*, 25 (2), 114-133.
- Erden-Inal, M., Sunal, E. & Kanbak, G. (2002). Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochem Funct*, 20, 61–6.
- Fico, A. et al. (2004). *Cell Death Differ.*, 11, 823–831.
- Finkel, T. (2000). Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.*, 476, 52–54

- Flagg, E.W., Coates, R.J., Eley, J.W., Jones D.P., Gunter, E.W., Byers T.E., Block, G.S. & Greenberg, R.S. (1994). Dietary glutathione intake in humans and the relationship between intake and plasma total glutathione level. *Nutrition and Cancer*, 21(1), 33-46.
- Flora, K., Hahn, M., Rosen, H. & Benner, K. (1998). Milk Thistle (*Silybum marianum*) for the Therapy of Liver Disease. *American Journal of Gastroenterology*, 93, 139-143.
- Frank, J.E. (2005). Diagnosis and Management of G6PD Deficiency. *Am Fam Physician*, 72, 1277-82.
- Gaetani, G.F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A.M., Kirkman, H.N. (1989). Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, 73, 334.
- Gaetani, G.F., Rolfo, M., Arena, S., Mangerini, R., Meloni, G.F., Ferraris, A.M. (1996). Active Involvement of Catalase During Hemolytic Crises of Favism. *Blood*, 88(3), 1084-8.
- Gigante, D.P., Buchweitz, M., Helbig, E., Almeida, A.S., Araujo, C.L., Neumann, N.A., Victora, C. (2007). Randomized clinical trial of the impact of a nutritional supplement "multimixture" on the nutritional status of children enrolled at preschools. *J Pediatr*, 83, 363-9.
- Grattagliano, I., Wieland, P., Schranz, C. & Lauterburg, B.H. (1995). Disposition of glutathione monoethyl ester in the rat: glutathione ester is a slow release form of extracellular glutathione. *J Pharmacol Exp Ther*, 272, 484-8.
- Gutteridge, J.M. & Halliwell, B. (1994). Antioxidants in nutrition, health, and disease. New York. *Oxford University Press*, 111-123.

- Hack, V., Breitkreutz, R., Kinscherf, R., Rohrer, H., Bartsch, P., Taut, F., Benner, A., Droge, W. (1998). The redox state as a correlate of senescence and wasting and as a target for therapeutic intervention. *Blood*, 92, 59–67.
- Haddad, J.J. (2002). Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res*, 3, 26.
- Haenen, G.R. & Bast, A. (1991). Scavenging of hypochlorous acid by lipoic acid, *Biochem. Pharmacol*, 42, 2244–2246.
- Hagen, T.M., Ingersoll, R.T., Lykkesfeldt, J., Liu, J., Wehr, C.M., Vinarsky, V., Bartholomew, J.C., Ames, A.B. (1999). R-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J*, 13, 411–418.
- Han, D., Sen, C.K., Roy, S., Kobayashi, M.S., Tritschler, H.J., Packer L. (1997). Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiol antioxidants. *Am. J. Physiol.*, 273, R1771–R1778.
- Ho, H.Y., Cheng, M.L., Chiu, D.T. (2007). Glucose-6-phosphate dehydrogenase – from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Report*, 12(3), 109-118.
- Hoyumpa, A.M. & Schenker, S. (1996). Drugs and the liver. In: Maddrey WC, ed. *Gastroenterology and Hepatology: The Comprehensive Visual Reference*. Philadelphia: *Current Medicine*, 6(1-6), 22.
- Hsia, J., Heiss, G., Ren, H., Allison, M., Dolan, N.C., Greenland, P., et al. (2007). Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. *Circulation*, 115, 846–54.

- Hunjan, M.K. & Evered, D.F. (1985). Absorption of glutathione from the gastrointestinal tract. *Biochim Biophys Acta*, 815, 184-188.
- Huth, P.J., DiRenzo, D.B., Miller, G.D. (2006). Major scientific advances with dairy foods in nutrition and health. *J Dairy Sci*, 89, 1207–1221.
- Jain, M., Cui, L., Brenner, D.A. et al. (2004). Increased myocardial dysfunction after ischemia-reperfusion in mice lacking glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Circulation*, 109, 898–903.
- Jahoor, F., Jackson, A., Gazzard, B., Philips, G., Sharpstone, D., Frazer, M. E. & Heird, W. (1999). Erythrocyte glutathione deficiency in symptom-free HIV infection is associated with decreased synthesis rate. *Am. J. Physiol.*, 276(E), 205–211.
- Jariwalla, R.J., Lalezari, J., Cenko, D., Mansour, S.E., Kumar, A., Gangapurkar, B., Nakamura, D. (2008). Restoration of blood total glutathione status and lymphocyte function following alpha-lipoic acid supplementation in patients with HIV infection. *J. Altern. Complement. Med.*, 14, 139–146.
- Johnson, A., Kaufmann, Y.C., Luo, S., Todorova, V., Klimberg, S.V. et al. (2003). Effect of glutamine on glutathione, IGF-1, and TGF- $\beta$ 1. *J Surg Res*, 111: 222–228.
- Jones, D.P., Coates, R.J., Flagg, E.W., Eley, J.W., Block, G., Greenberg, R.S., Gunter, E.W. & Jackson, B. (1992). Glutathione in foods listed in the national cancer institute's health habits and history food frequency questionnaire. *Nutrition and Cancer*, 17(1), 57-75.
- Kaiser, S., di Mascio, P., Sies, H. (1989). Lipoat und Singulett-sauerstoff, in: H.O. Borbe, H. Ulrich (Eds.), *Thioctseure*, pmi Verlag GmbH, Frankfurt, pp. 69–76.

- Kidd, P.M. (1991). Natural antioxidants – first line defense. In: Kidd PM, Huber W. Living with the AIDS Virus: A strategy for Long-Term Survival. Albany, California: PMK Biomedical-Nutritional Consulting, 115-142.
- Kidd, P.M. (1993). Oxidant-Antioxidant Adaptation: Looking at Both Sides (conference presentation). Huston, Texas: American College of Advancement in Medicine (ACAM) Spring Meeting.
- Kidd, P.M. (1997). Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alt Med Rev*, 2(3):155-176.
- Kojima, M., Sun, L., Hata, I., Sakamoto, Y., Sasaki, H., Sasaki, K., 2007. Efficacy of alphalipoic acid against diabetic cataract in rat. *Jpn. J. Ophthalmol*, 51, 10–13.
- Kosower, N.S., Kosover, E.M. (1978). The glutathione status of cells. *Intl Rev Cytology*, 54:109-156.
- Kretzschmar, M., Kruger, A., Schirrmeister, W. (2003). Hepatic ischemia-reperfusion syndrome after partial liver resection (LR): hepatic venous oxygen saturation, enzyme pattern, reduced and oxidized glutathione, procalcitonin and interleukin-6. *Exp Toxicol Pathol*, 54:423–31.
- Krissansen, G.W. (2007). Emerging Health Properties of Whey Proteins and Their Clinical Implications. *Journal of the American College of Nutrition*, 26, (6), 713S–723S.
- Kwok, C.J., Martin, A.C., Au, S.W., Lam, V.M. (2002). G6PDdb, an integrated database of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations. *Hum Mutat*, 19(3), 217-24.

- Laosombat, V., Sattayasevana, B., Chotsampancharoen, T., Wongchanchailert, M. (2006). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Variants Associated with Favism in Thai Children. *Int J Hematol*, 83(2), 139-43.
- Leopold, J.A., Cap, A., Scribner, A.W., Stanton, R.C. & Loscalzo, J. (2001). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *FASEB J*, 15(10), 17771-3.
- Leopold, J.A., Walker, J., Scribner, A.W. et al. (2003). Glucose-6-phosphate Dehydrogenase modulates vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*, 278:32100-32106.
- Lim, F., Vulliamy, T. & Abdalla, S.H. (2005). An Ashkenazi Jewish woman presenting with favism. *J Clin Pathol*, 58(3), 317-9.
- Liu, J., Head, E., Gharib, A.M., Yuan, W., Ingersoll, R.T., Hagen, T.M., Cotman, C.W. & Ames, B.N. (2002). Memory loss in old rats is associated with brain mitochondrial decay and RNA/DNA oxidation: partial reversal by feeding acetyl-L-carnitine and/or Ralpha-lipoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 2356–2361.
- Lodge, J.K., Traber, M.G. & Packer, L. (1998). Thiol chelation of Cu<sup>2+</sup> by dihydrolipoic acid prevents human low density lipoprotein peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 287–297.
- Lomaestro, B.M. & Malone, M. (1995). Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Annals Pharmacother*, 29, 1263-73.
- Lopez-Burillo, S., Tan, D.X., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Manchester, L.C. & Reiter, R.J. (2003). Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and alpha-lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions. *J. Pineal Res.*, 34, 269–77.



- Lotharius, J. & Brundin, P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3, 932–942
- Low, P.P., Rutherford, K.J., Gill, H.S. & Cross, M.L. (2003). Effect of dietary whey protein concentrate on primary and secondary antibody responses in immunized BALB/c mice. *Int Immunopharmacol*, 3, 393–401.
- Luchsinger, J.A., Tang, M.X., Miller, J., Green, R. & Mayeux, R. (2007). Relation of higher folate intake to lower risk of Alzheimer disease in the elderly. *Arch Neurol*, 64, 86–92.
- Luo, J.L., Hammarqvist, F., Andersson, K. & Wernerman, J. (1998). Surgical trauma decreases glutathione synthetic capacity in human skeletal muscle tissue. *Am J Physiol*, 275(E), 359–365.
- Luzzatto, L. & Battistuzzi, G. (1985). Glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Adv Hum Genet*, 14, 217-329.
- Lykkesfeldt, J., Hagen, T.M., Vinarsky, V. & Ames, B.N. (1998). Age-associated decline in ascorbic acid concentrations recycling and biosynthesis in rat hepatocytes – reversal with (R)- $\alpha$ -lipoic acid supplementation. *FASEB J*, 12, 1183–1189.
- Lyons, J., Rauh-Pfeiffer, A., Yu, Y. M., Lu, X. M., Zurakowski, D., Tompkins, R. G., Ajami, A. M., Young, V. R. & Castillo, L. (2000). Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 5071–5076.
- Lyons, J., Rauh-Pfeiffer, A., Ming-Yu, Y., Lu, X.M., Zurakowski, D., Curley, M., Collier, S., Duggan, C., Nurko, S., et al. (2001). Cysteine metabolism and whole blood glutathione synthesis in septic pediatric patients. *Crit Care Med*, 29, 870–7.

- Manchester, L.C., Tan, D-X., Reiter, R.J., Park, W., Monis, K., Qi, W. (2000). High levels of melatonin in the seeds of edible plants. Possible function in germ tissue protection. *Life Sci*, 67, 3023–3029.
- Mandl, J., Banhegyi, G., Kalapos, M.P., et al. (1995). Increased oxidation and decreased conjugation of drugs in the liver caused by starvation. Altered metabolism of certain aromatic compounds and acetone. *Chem Biol Interact*, 96, 97-101.
- Marcason, W. (2007). Is supplementation of B vitamins still recommended to reduce the risk of heart disease? *J Am Diet Assoc*, 107, 525–31.
- Marks, P.A., Johnson, A.B. (1958). Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: a basis for separating young and old erythrocytes. *J Clin Invest*, 37, 1542-1548.
- Martensson, J., Larsson, J. & Nordstrom, H. (1987). Amino acid metabolism during the anabolic phase of severely burned patients: with special reference to sulphur amino acids. *Eur J Clin Invest*, 17, 130–5.
- Martindale, J.L. and Holbrook, N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J. Cell. Physiol.*, 192, 1–15
- Matsui, R., Xu, S., Maitland, K.A. et al. (2005). Glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency decreases the vascular response to angiotensin II. *Circulation*, 112, 257–263.
- Matsui, R., Xu, S., Maitland, K.A. et al. (2006). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency decreases vascular superoxide and atherosclerotic lesions in apolipoprotein E(–/–) mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 910–916.

- Mehta, A., Mason, P.J., Vulliamy, T.J. (2000). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 13(1), 21-38.
- Meister, A. (1976). Glutathione metabolism and transport. In: Nygaard OF, Simic MG, ed. Radioprotectors and Anticarcinogens. *New York, NY: Academic Press*.
- Meister, A. (1994). Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res*, 54(7 Suppl),1969-1975.
- Missiou-Tsagaraki, S. (1991). Screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency as a preventive measure: prevalence among 1,286,000 Greek newborn infants. *J Pediatr*, 119(2), 293-299.
- Oehler, R. & Roth, E. (2003) Regulative capacity of glutamine. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 6, 277–282.
- Olney, J. W. & Ho, O. L. (1970) Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature (Lond.)*, 227, 609–611.
- Packer, L., Witt, E.H. & Tritschler, H.J. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.*, 19, 227–250.
- Packer, L. (1997). Neuroprotection by the Metabolic Antioxidant  $\alpha$ -Lipoic Acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(1-2), 359-378.
- Packer, L., Kraemer, K. & Rimbach, G. (2001). Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 17, 888–895.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S., Corpe, C. et al. (2003). "Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention". *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 18–35.

- Palaniyappan, A. & Alphonse, R. (2011). Immunomodulatory effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid in aged rats. *Exp. Gerontol.*, 46(9), 709-15.
- Park, J.B. & Levine, M. (1996). Purification, cloning, and expression of dehydroascorbic acid reduction activity from human neutrophils: Identification as glutaredoxin. *Biochem J*, 315, 931-938.
- Pawelek, G., Effros, R.B., Caruso, C., Remarque, E., Barnett, Y., Solana, R., 1999. T cells and aging. *Front. Biosci.*, 4, 216–269.
- Petersen Shay, K., Moreau, R.F., Smith, E.J., Smith, A.R. & Hagen, T.M. (2009). Alpha-lipoic acid as a dietary supplement. Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790(10), 1149–1160.
- Piomelli, S., Corash, L.M., Davenport, D.D., et al. (1968). In vivo lability of glucose-6-phosphate dehydrogenase in Gd A and Gd Mediterranean deficiency. *J Clin Invest*, 47, 940-948.
- Rainone, F. (2005). Milk thistle. *Am Fam Physician*, 72(7), 1285-8.
- Reiter, R.J. (1996). Antioxidant actions of melatonin. *Adv. Pharmacol.*, 38, 103-117.
- Reiter, R.J., Tan, D.X. & Burkhardt, S. (A) (2002). Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech. Ageing Dev.*, 123, 1007–19.
- Reiter, R.J., Tan, D.X. & Allegra, M. (B) (2002). Melatonin: reducing molecular pathology and dysfunction due to free radicals and associated reactants. *Neuro. Endocrinol. Lett.*, 23(Suppl 1), 3–8.

- Reiter, R.J. & Tan, D-X. (2002). Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann NY Acad Sci.*, 957, 341–344.
- Reiter, R.J., et al. (2003). Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 527, 539–48.
- Reiter, R.J., Tan, D.X. & Maldonado, M.D. (2005). Melatonin as an antioxidant: physiology versus pharmacology. *J Pineal Res*, 39, 215–6.
- Rodriguez, C., et al. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, 36, 1–9.
- Rukaj, A. & Se´rougne, C. (1983) Effect of excess dietary cystine on the biodynamics of cholesterol in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 753, 1–5.
- Ruwende, C. & Hill, A. (1998). Glucose-6-phosphate Dehydrogenase deficiency and malaria. *J Mol Med*, 76, 581-8.
- Saez, G., Thornalley, P.J., Hill, H.A.O., et al. (1982). The production of free radicals during the autoxidation of cysteine and their effects on isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*, 719, 24-31.
- Schuurman, M., Waardenburg, D., Costa, J.D., Niemarkt, H. & Leroy, P. (2009). Severe hemolysis and methemoglobinemia following fava beans ingestion in glucose-6-phosphatase dehydrogenase deficiency: case report and literature review. *European Journal of Pediatrics*, 168(7), 779-782.
- Scott, B.C., Aruoma, O.I., Evans, P.J., O'Neill, C., Van der Vliet, A., Cross, C.E., Tritschler, H. & Halliwell, B. (1994). Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radic. Res.*, 20, 119–133.

- Sido B, Hack V, Hochlehnert A, Lipps H, Herfarth C & Droge W. (1998). Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.*, 42, 485–92.
- Sies, H. (1995). Strategies of antioxidant defense: Relations to oxidative stress. In: Signaling mechanisms - from transcription factors to oxidative stress, ed. Packer, L., Wirtz, K. *NATO ASI Series*, Berlin Heidelberg Springer-Verlag, 92, 165-186.
- Simpore, J., Kabore, F., Zongo, F., Dansou, D., Bere, A., Pignatelli, S., et al. (2006). Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spiruline and Misola. *Nutr J*, 5, 3–7.
- Slater, A.F.G., Stefan, C., Nobel, I., et al. (1995). Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Letts*, 82/83, 149-153.
- Smith, A.R., Shenvi, S.V., Widlansky, M., Suh, J.H. & Hagen, T.M. (2004). Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 11, 1135–1146.
- Stryer, L. (1995). *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Sudnikovich, E.J., et al. (2007). Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 569, 180–7.
- Suh, J.H., Shigeno, E.T., Morrow, J.D., Cox, B., Rocha, A.L., Frei, B. & Hagen, T.M.. (2001). Oxidative stress in the aging rat heart is reversed by dietary supplementation with (R)-( $\alpha$ )-lipoic acid. *FASEB J*, 15, 700–706.
- Suh, J.H., Shenvi, S.V., Dixon, B.M., Liu, H., Jaiswal, A.K., Liu, R.M. & Hagen, T.M. (2004). Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione

synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 3381–3386.

Sukkar, S.G. & Bounous, U.G. (2004). The role of whey protein in antioxidant defense. *Riv Ital Nutr Parent Enter*, 22(4), 193–200.

Suzuki, Y.J., Tsuchiya, M. & Packer, L. (1991). Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free Radic. Res. Commun.*, 15, 255–263.

Tateishi, N., Higashi, T., Naruse, A., et al. (1981). Relative contributions of sulfur atoms of dietary cysteine and methionine to rat liver glutathione and proteins. *J Biochem*, 90, 1603-1610.

Thorn research Inc. (2000). N-acetylcysteine monograph. *Alternative Medicine Review*, 5, 467-471.

Tong, L.M., Sasaki, S., McClements, D.J. & Decker, E.A. (2000). Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *J Agric Food Chem*, 48, 1473-8.

Townsend, D. M., Tew, K. D. & Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed. Pharmacother.*, 57, 145–155.

Turan, Y. (2006). Prevalence of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in the population of western Turkey. *Arch Med Res*, 37(7), 880-2.

Usanga, E.A. & Ameen, R. (2000). Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Kuwait, Syria, Egypt, Iran, Jordan and Lebanon. *Hum Hered*, 50(3), 158-61.

- Valenzuela, A., Aspillaga, M., Vial, S. & Guerra, R. (1989). Selectivity of Silymarin on the Increase of the Glutathione Content in Different Tissues of the Rat. *Planta Med*, 55(5), 420-422.
- van Zandwijk N. (1995). N-acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH): antioxidant and chemopreventive properties, with special reference to lung cancer. *J Cell Biochem (Suppl)*, 22, 24-32.
- Vegarud, C.E., Langsrud, T. & Svenning, C. (2000). Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *Br J Nutr*, 84(Suppl 1), 91-8.
- Vulliamy, T.J., D'Urso, M., Battistuzzi, G. et al. (1988). Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 5171–5175.
- Wayne, S.J., Rhyne, R.L., Garry, P.J., Goodwin, J.S. (1990). Cell-mediated immunity as a predictor of morbidity and mortality in subjects over 60. *J. Gerontol.* 45, M45–M48.
- Weinberg, E.D. (1996). The role of iron in cancer. *Eur J Cancer Prev*, 5, 19–36.
- WHO Working Group. (1989). Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ*, 67, 601-611.
- Winiarska, K., Fraczyk, T., Malinska, D., Drozak, J. & Bryla, J. (2006). Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in rabbits. *J Pineal Res*, 40, 168–76.
- Witschi, A., Reddy, S., Stofer, B. & Lauterburg, B.H. (1992). The systemic availability of oral glutathione. *Eur J Clin Pharmacol*, 43, 667-669.



- Wu, L.C., Ho, J.A., Shieh, M.C., Lu, I.W. (2005). Antioxidant and antiproliferative activities of Spirulina and Chlorella water extracts. *J Agric Food Chem*, 53, 4207–12.
- Yan, L.J., Traber, M.G., Kobuchi, H., Matsugo, S., Tritschler, H.J. & Packer, L. (1996). Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the prevention of protein carbonyl formation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 327, 330–334.
- Yoo, Y.C., Watanabe, S., Watanabe, R., Hata, K., Shimazaki, K. & Azuma, I. (1998). Bovine lactoferrin and lactoferricin inhibit tumor metastasis in mice. *Adv Exp Med Biol*, 443, 285–91.
- Ziegler, D., Hanefeld, M., Ruhnau, K.J., Meissner, H.P., Lobisch, M., Schutte, K. & Gries, F.A. (1995). Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN study). *Diabetologia*, 38, 1425–1433.
- Ziegler, D., Hanefeld, M., Ruhnau, K.J., Hasche, H., Lobisch, M., Schutte, K., Kerum, G. & Malessa, R. (1999). Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7-month multicenter randomized controlled trial (ALADIN III study). ALADIN III Study Group. Alpha-Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care*, 22, 1296–1301.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

### Παράρτημα 1

#### Έντυπο συναίνεσης δοκιμαζόμενου σε ερευνητική εργασία

**Επιστημονικός υπεύθυνος – επιβλέπων:** Τζιαμούρτας Αθανάσιος

**Τίτλος Μελέτης:** Σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας ατόμων με έλλειψη ενζύμου G6PD μετά τη λήψη λιποϊκού οξέος και ενός προϊόντος πλούσιου σε πρωτεΐνη τυρογάλακτος (Feedback)

**Εργαστήριο υλοποίησης της μελέτης:** Κέντρο Έρευνας και αξιολόγησης της Απόδοσης, ΤΕΦΑΑ, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

#### **Σκοπός της ερευνητικής εργασίας**

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να μελετηθεί η επίδραση του λιποϊκού οξέος και ενός προϊόντος πλούσιου σε πρωτεΐνη τυρογάλακτος στην αντιοξειδωτική ικανότητα ατόμων με έλλειψη του ενζύμου G6PD. Τα επίπεδα της γλουταθειόνης (ενδογενής αντιοξειδωτική ουσία) είναι πολύ χαμηλότερα σε αυτά τα άτομα σε σχέση με άτομα με φυσιολογικές τιμές δραστηριότητας του ενζύμου.

#### **Διαδικασία μετρήσεων**

Οι συμμετέχοντες θα επισκεφτούν το εργαστήριο τρεις φορές. Πριν την πρώτη επίσκεψη στο εργαστήριο θα δοθούν πλήρεις οδηγίες για τον τρόπο καταγραφής της διατροφής τους για τρεις ημέρες πριν την δεύτερη επίσκεψή τους στο εργαστήριο.

Κατά την πρώτη επίσκεψή τους θα γίνουν οι ανθρωπομετρικές μετρήσεις (ύψος, βάρος, ποσοστό σωματικού λίπους, μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου, μέγιστη δύναμη) και η πρώτη αιμοληψία. Έπειτα θα τους δοθεί σε καθέναν ξεχωριστά και η απαραίτητη ποσότητα λιποϊκού οξέος ή προϊόντος πλούσιου σε πρωτεΐνη τυρογάλακτος ή εικονικού συμπληρώματος (ανάλογα με την ομάδα στην οποία ανήκουν) ώστε να λάβουν συμπληρωματικά την ουσία για 4 εβδομάδες.

Στη δεύτερη επίσκεψη των συμμετεχόντων στο εργαστήριο μετά από 2 εβδομάδες λήψης του συμπληρώματος θα γίνει η δεύτερη αιμοληψία. Ο κάθε εθελοντής θα έχει επαναλάβει για τρεις ημέρες τη διατροφή που θα έχει ήδη καταγράψει πριν από την πρώτη αιμοληψία.

Όταν περάσουν οι 4 εβδομάδες, οι συμμετέχοντες θα επισκεφτούν ξανά το εργαστήριο, όπου θα γίνει η τρίτη αιμοληψία. Ο κάθε εθελοντής θα έχει επαναλάβει για τρεις ημέρες τη διατροφή που θα έχει ήδη καταγράψει πριν από την πρώτη αιμοληψία.

### **Κίνδυνοι και ενοχλήσεις**

Αιμοληψία:

Θα χρησιμοποιηθεί μία μικρή βελόνα σύριγγας για τη λήψη φλεβικού αίματος από τη μεσοβασίλική φλέβα. Υπάρχει πιθανότητα μικρού μώλωπα στο σημείο της αιμοληψίας ενώ ο εθελοντής μπορεί να αισθανθεί πόνο κατά τη διάρκεια της αιμοληψίας και ζαλάδα ή τάσεις λιποθυμίας τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά από την αιμοληψία. Σε κάθε δείγμα η συνολική ποσότητα αίματος που θα ληφθεί από έμπειρο γιατρό θα είναι 12ml η οποία δεν θα έχει απολύτως καμία αρνητική συνέπεια.

### **Προσδοκώμενες ωφέλειες**

Τα ευρήματα από την εργασία θα δώσουν την δυνατότητα στους συμμετέχοντες να μάθουν ποιο είναι το ποσοστό του σωματικού λίπους, τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής ικανότητας στο αίμα και η ποιότητα της διατροφής τους.

### **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.

### **Πληροφορίες**

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

### **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: \_\_/\_\_/\_\_

Όνοματεπώνυμο και  
υπογραφή συμμετέχοντος

Υπογραφή ερευνητή

Όνοματεπώνυμο και  
υπογραφή παρατηρητή

## Παράρτημα 2

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ ΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΚΑΡΥΕΣ

ΤΡΙΚΑΛΑ 42100

Όνοματεπώνυμο:

Ημερομηνία:

I.D.:

Ημερομηνία γέννησης:

( Σημειώστε X αν ισχύει)

### Ιστορικό

### ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ

( Είχατε ποτέ; )

- |   |     |
|---|-----|
| Ρευματικό πυρετό  | ( ) |
| Φύσημα στην καρδιά                                      | ( ) |
| Υψηλή αρτηριακή πίεση                                   | ( ) |
| Κάποιο καρδιακό πρόβλημα                                | ( ) |
| Αρτηριακή ασθένεια                                      | ( ) |
| Φλεβικούς κίρσους                                       | ( ) |
| Πνευμονική ασθένεια                                     | ( ) |
| Εγχειρήσεις   | ( ) |
| Τραυματισμούς στη μέση,<br>στα γόνατα, στην ποδοκνημική | ( ) |

Επιληψία ( )

Ο,τιδήποτε άλλο ( )

Εξηγήστε: \_\_\_\_\_

**Ιστορικό οικογενείας**

**Ηλικία**

**Συγγένεια**

( Είχε κάποιος από τους συγγενείς σας;)

Καρδιακή προσβολή ( )

Υψηλή αρτηριακή πίεση ( )

Υψηλά επίπεδα χοληστερίνης ( )

Διαβήτη ( )

Συγγενή καρδιοπάθεια ( )

Εγχειρήσεις καρδιάς ( )

Ο,τιδήποτε άλλο ( )

Εξηγήστε: \_\_\_\_\_

Φάρμακα: \_\_\_\_\_

**Συμπτωματολογία**

**Ημερομηνία**

( Είχατε πρόσφατα;)

Πόνο στο στήθος ( )

Λαχάνιασμα ( )

Αίσθηση παλμών ( )

Βήχα στην εξάντληση ( )

Αιμόπτυση ( )

Πόνο στη μέση ( )

Πρήξιμο, δυσκαμψία ή

πόνο στις αρθρώσεις ( )

Ξυπνάτε το βράδυ για κατούρημα;( )

### Παράγοντες επικινδυνότητας

#### 1. Κάπνισμα      Ναι Όχι

Καπνίζετε;      ( ) ( )

Τσιγάρα      ( ) ( ) Πόσα; \_\_\_\_ Πόσα χρόνια; \_\_\_\_

Πούρα      ( ) ( ) Πόσα; \_\_\_\_ Πόσα χρόνια;

Πίπα      ( ) ( ) Πόσες φορές τη μέρα; \_\_\_\_ Πόσα χρόνια; \_\_\_\_

Πόσων ετών ήσασταν όταν ξεκινήσατε;

Σε περίπτωση που σταματήσατε, πότε;

Γιατί;

#### 2. Δίαιτα

Πόσο είναι το τρέχον βάρος σας;

1 χρόνο πριν;

Στα 21 σας;

Κάνετε δίαιτα;

Γιατί;

### **3. Άσκηση**

Συμμετέχετε σε δραστηριότητες αναψυχής;

Σε ποιες;

Πόσο συχνά;

Πόση απόσταση νομίζετε ότι περπατάτε κάθε μέρα;

Η εργασία σας είναι: Καθιστική ( )

Δραστήρια ( )

Βαριά ( )

Έχετε δυσφορία, λαχάνιασμα ή πόνο σε υπομέγιστη άσκηση;