

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΛΑΡΙΣΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ (Π.Σ.Ε.)

ΘΕΜΑ: ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΦΟΙΤΗΤΗΣ: ΚΟΥΚΟΣΙΑΣ ΑΘ. ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΤΖΙΑΜΟΥΡΤΑΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

**ΤΟΠΟΣ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ: ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ -
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΣΙΚΗΣ
ΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ**

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΛΗΨΗΣ
ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Ε ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΠΟΥ
ΠΑΣΧΟΥΝ ΑΠΟ ΕΛΛΕΙΨΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΑΦΥΔΡΟΓΟΝΑΣΗ ΤΗΣ
6-ΦΩΣΦΟΡΙΚΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ**

ΙΟΥΛΙΟΣ 2003

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ
ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ
Ημερ.: 25/06/2003
Αρ. Πρωτ. 2563**



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

Αριθ. Εισ.: 2842/1
Ημερ. Εισ.: 29/06/2004
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ-ΠΣΕ-ΙΒ
2003
ΚΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000057004

✓

ΚΟΥΚΟΣΙΑΣ Α. ΝΙΚΟΛΑΟΣ, Η επίδραση της άσκησης και της συμπληρωματικής λήψης βιταμίνης E στην παραγωγή ελευθέρων ριζών σε άτομα που πάσχουν από έλλειψη του ενζύμου δεϋδρογονάση της 6 φωσφορικής γλυκόζης (G6PD)

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να εξετάσει την επίδραση της άσκησης και της συμπληρωματικής λήψης βιταμίνης E (800 IU/ημερησίως) για τέσσερις εβδομάδες, στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και στην υπεροξειδωση των λιπιδίων σε άτομα με έλλειψη ενζύμου δεϋδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD). Εννέα άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD (EG6PD) και εννέα φυσιολογικά άτομα (Φ) έλαβαν μέρος στην εργασία. Τα EG6PD είχαν 22 φορές μικρότερα επίπεδα ενζύμου (0.41 ± 0.16 U/g Hb) συγκριτικά με την ομάδα Φ (8.8 ± 0.57 U/g Hb). Οι συμμετέχοντες έκαναν άσκηση στο δαπεδοεργόμετρο με ένταση που αντιστοιχούσε στο ~75 % Μέγιστης Καρδιακής Συχνότητας. Στην ηρεμία και πριν από την πρώτη προπόνηση, η ομάδα Φ είχε σημαντικά υψηλότερες τιμές ανειγμένης γλουταθειόνης (GSH) συγκριτικά με την ομάδα EG6PD. Τα σωματιδία Heinz, τα επίπεδα των υπεροξειδίων των λιπιδίων (LPO), και της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην ηρεμία και πριν την προπόνηση δεν ήταν σημαντικά διαφορετικά μεταξύ των δύο ομάδων. Τα σωματιδία Heinz, τα επίπεδα των LPO, της GSH και της GSSG δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά με την άσκηση. Η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων των υπεροξειδίων των λιπιδίων και της ανειγμένης γλουταθειόνης στην ηρεμία και στις δύο ομάδες ενώ τα επίπεδα της GSSG εμφανίστηκαν αυξημένα μόνο στην ομάδα Φ. Συμπερασματικά, η αερόβια άσκηση μέτριας έντασης δε δημιουργεί οξειδωτικό στρες σε άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD, ενώ η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E σε αρκετά μεγάλη δόση μπορεί να δημιουργήσει προοξειδωτικό περιβάλλον αντί να επιφέρει αντιοξειδωτική δράση.

Koukosis A. Nikolaos, The effects of exercise and vitamin E supplementation in the production of free radicals in people with Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency

The purpose of this study was to investigate the effects of exercise and vitamin E supplementation (800 IU/day) for four weeks on the production of free radicals and lipid peroxidation in people with glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency. Nine people with G6PD deficiency (G6PDD) and nine people with normal levels of G6PD (N) volunteered to participate in this study. The G6PDD (0.41 ± 0.17 U/g Hb) group had 22 times lower levels compared to N (8.8 ± 0.57 U/g Hb). The participants exercised on the treadmill with an intensity corresponding to $\sim 75\%$ Maximum Heart Rate. Prior to first exercise bout, N had significantly higher reduced glutathione levels (GSH) compared to G6PDD. Lipid hydroperoxides (LPO) and oxidized glutathione (GSSG) were not significantly different between the two groups and no Heinz bodies were evident in any group. Exercise did not result in significant differences in the production of Heinz bodies nor in the levels LPO, GSH and GSSG. Vitamin E supplementation resulted in an increase in the levels of LPO and GSH at rest in both groups whereas the levels of GSSG appeared significantly elevated only in N. In conclusion, moderate intensity aerobic exercise did not result in increased oxidative stress, whereas vitamin E supplementation at this dose resulted in elevation of markers of lipid peroxidation.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
Σκοπός της εργασίας	7
Οριοθέτηση της εργασίας	8
Περιορισμοί της εργασίας	8
II. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	9
Οδός Φωσφορυλιωμένων Πεντοζών	9
Παραγωγή ελευθέρων ριζών και προϊόντα υπεροξειδωσης των λιπιδίων	14
Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και Αντιοξειδωτικά ένζυμα	16
Η γλουταθειόνη ως αντιοξειδωτικός μηχανισμός	18
Ο ρόλος της βιταμίνης E ως αντιοξειδωτικό	20
Παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την άσκηση	22
Έλλειψη ενζύμου G6PD	23
Οξειδωτικό στρες σε άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD	25
Οξειδωτικό στρες κατά την άσκηση σε άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD	27
III. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	28
Συμμετέχοντες	28
Σωματοδομή	28
Άσκηση	29
Τριήμερη διατροφική ανάλυση	30
Βιοχημικές αναλύσεις	30
Μέτρηση ενεργότητας G6PD	31
Αιματοκρίτης - Αιμοσφαιρίνη	32
Αναζήτηση σωματιδίων HEINZ	32
Υπεροξειδία λιπιδίων (LPO)	33
Μέτρηση ανειγμένης/οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSH/GSSG)	34
Στατιστική ανάλυση	37

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
Προσωπικά στοιχεία συμμετεχόντων	38
G6PD	38
Δεδομένα άσκησης	39
Αιματοκρίτης/Αιμοσφαιρίνη	39
Σωματίδια Heinz	39
LPO	41
Ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH)	42
Οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG)	43
V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
Μελλοντικές έρευνες	48
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49
VII. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ	54

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οξειδωτικό στρες είναι μία κατάσταση κατά την οποία ο οργανισμός παράγει ορισμένες ουσίες οι οποίες ονομάζονται ελεύθερες ρίζες και τις οποίες καλείται να αντιμετωπίσει το αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού. Υπάρχουν αρκετές έρευνες οι οποίες έχουν δείξει ότι η παραγωγή ελευθέρων ριζών εμπλέκεται στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών (Sies, 1991; Yu, 1994) όπως αθηροσκλήρυνση, σακχαρώδης διαβήτης κ.λ.π. Οι ελεύθερες ρίζες, όπως το ανιόν του υπεροξειδίου (O_2^-), το υπεροξείδιο του οξυγόνου (H_2O_2) και οι ρίζες υδροξυλίου (OH^\cdot), μπορεί να προκαλέσουν υπεροξείδωση των λιπιδίων, καταστροφή των κυτταροπλασματικών μεμβρανών, καταστροφή στο DNA κ.λ.π. (Halliwell & Gutteridge, 1985).

Η αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD) είναι ένα ένζυμο, που το συναντάμε στο μονοπάτι μεταβολισμού των φωσφορικών πεντοζών. Αυτό είναι μια εναλλακτική πορεία για το μεταβολισμό της γλυκόζης, ο οποίος επιτελεί τρεις κυρίως μεταβολικούς στόχους ανάλογα με τον οργανισμό, τον ιστό και τη μεταβολική κατάσταση που βρίσκεται. Ο κύριος στόχος του είναι η αναγέννηση αναγωγικών ισοδυνάμων με τη μορφή του NADPH στο κυτταρόπλασμα. Άλλη λειτουργία του είναι η παραγωγή πεντοζών, και κυρίως η 5-φωσφορική ριβόζη, που απαιτούνται στη σύνθεση των νουκλεοτιδίων. Τρίτος στόχος είναι η επαναφορά της οξειδωμένης γλουταθειόνης στην ανειγμένη μορφή, κάτι που επιτυγχάνεται έμμεσα με την παρουσία του NADPH και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης.

Η ανεπάρκεια της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης είναι μια κοινή κληρονομική ενζυμική διαταραχή διαδεδομένη σε πληθυσμούς της Μεσογείου, της Αφρικής και της Ασίας. Έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή NADPH και όπως ξέρουμε στα ερυθρά αιμοσφαίρια η μόνη πηγή NADPH είναι οι δύο πρώτες αντιδράσεις του μεταβολικού δρόμου των φωσφορικών πεντοζών. Οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο γονίδιο του G6PD έχουν ως αποτέλεσμα τη μειωμένη λειτουργία του ενζύμου. Επακολουθεί η μειωμένη παραγωγή NADPH και επαγωγικά η μειωμένη αναπαραγωγή ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) από οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG) μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR). Τελικά επισυμβαίνει οξείδωση λόγω των μειωμένων επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης και των αυξημένων επιπέδων των ενδοκυτταρικών οξειδωτικών (πχ. H_2O_2 , O_2^-). Κάποιες ιδιαίτερες καταστάσεις, όπως η λήψη συγκεκριμένων φαρμάκων, μπορούν να επιφέρουν στον πάσχοντα από έλλειψη G6PD αιμολυτική αναιμία.

Αυτά τα συστατικά μπορούν να προκαλέσουν οξειδωση των SH ομάδων στις πρωτεΐνες και πιθανόν υπεροξειδωση λιπιδίων στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων, προκαλώντας έτσι λύση στη μεμβράνη. Μετά την έκθεση των ερυθρών σε τοξικές ουσίες, μετουσιωμένη αιμοσφαιρίνη κατακρημνίζεται ενδοκυττάρια και σχηματίζει σωμάτια Heinz. Δεν φαίνονται στις κοινές χρώσεις και η αναζήτηση τους απαιτεί έμβιο χρώση (methyl violet). Η παρουσία τους δείχνει ότι τα ερυθρά έχουν υποστεί οξειδωτικό στρες και αυτό παραπέμπει σε αιμόλυση (Murray R K, 1993).

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι οι επιπτώσεις της ανεπάρκειας του ενζύμου φαίνεται να σχετίζεται με πολλές άλλες ασθένειες. Φαίνεται ότι σε τόπους όπου το πλασμώδιο της ελονοσίας (*plasmodium falciparum*) υπήρξε απειλητικός παράγοντας για τη ζωή των ανθρώπων, μεταλλάξεις δημιούργησαν ένα αφιλόξενο περιβάλλον για τα παράσιτα της ελονοσίας. Προφανώς υπάρχει μια θετική βιολογική επιλεκτική πίεση για την εμφάνιση αυτών των μεταλλάξεων. Τα παράσιτα της ελονοσίας, τα οποία εμφανίζουν μια υψηλή ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες, απαιτούν γλουταθειόνη και τα προϊόντα της οξειδωτικού δρόμου της G6PD για άριστη ανάπτυξη. Συνεπώς η ανεπάρκεια του ενζύμου αποθαρρύνει την επιβίωση των πρωτοζώων στα ερυθροκύτταρα (Stryer L, 1997).

Άτομα τα οποία πάσχουν από έλλειψη ενζύμου G6PD έχει βρεθεί ότι έχουν μεγαλύτερη προδιάθεση για εμφάνιση υπέρτασης και καταρράκτη, κυρίως όταν καταναλώνουν απλούς υδατάνθρακες, ενώ τα ίδια άτομα όταν καταναλώνουν κουκιά έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν αιμολυτική κρίση, γνωστή και σαν κύαμωση, εξαιτίας της μείωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης. Η μειωμένη ανασύνθεση της ανηγμένης γλουταθειόνης οδηγεί στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών και υπεροξειδίου του υδρογόνου. (Yahya HI & Alallawi NAS, 1993)

Η άσκηση αποτελεί ένα παράγοντα παραγωγής ελευθέρων ριζών και με αυτή την έννοια ο οργανισμός θα πρέπει να αντιτάξει ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό σύστημα αντιμετώπισης στη δημιουργία των ελευθέρων ριζών. Τα άτομα με έλλειψη G6PD παρουσιάζουν, θεωρητικά, μειωμένη ικανότητα αντιμετώπισης των ελευθέρων ριζών αφού η ικανότητα ανασύνθεσης της οξειδωμένης γλουταθειόνης σε ανηγμένη είναι περιορισμένη, εξαιτίας της έλλειψης δημιουργίας NADPH. Κάτι τέτοιο δεν είναι εξακριβωμένο πλήρως στη βιβλιογραφία και έρευνες ατομικών περιπτώσεων αναφέρουν πως άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD παρουσίασαν μυαλγίες, κράμπες και αιμογλομπινουρία ή μυοσφαιρινουρία. Ωστόσο, δεν είναι εξακριβωμένο τι

συμβαίνει στην ανθεκτικότητα του ερυθρού αιμοσφαιρίου όταν υποβάλλεται σε οξειδωτικό στρες προερχόμενο από την άσκηση.

Ο οργανισμός είναι προικισμένος με ένα πολλαπλό αντιοξειδωτικό σύστημα το οποίο τον βοηθάει να αντιμετωπίσει την ανάπτυξη των ελευθέρων ριζών. Το ενζυμικό αντιοξειδωτικό σύστημα περιλαμβάνει τη δισμουτάση του υπεροξειδίου, την καταλάση και άλλα ένζυμα που σχετίζονται με τη γλουταθειόνη (π.χ. υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, αναγωγάση της γλουταθειόνης). Το μη-ενζυμικό αντιοξειδωτικό σύστημα περιλαμβάνει διάφορες ουσίες όπως π.χ. η γλουταθειόνη, η βιταμίνη E, η βιταμίνη C, η β-καροτίνη. Αν και υπάρχει η διαθεσιμότητα των ενζύμων και των μη-ενζυματικών ουσιών για την αντιμετώπιση της παραγωγής των ελευθέρων ριζών, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία που υποδεικνύουν πως αυτό το σύστημα μπορεί να μην είναι επαρκές για την αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της άσκησης (Goldfarb AH 1993).

Η βιταμίνη E, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό παράγοντα και έρευνες έχουν δείξει πως η συμπληρωματική λήψη της μπορεί να μειώσει το οξειδωτικό στρες, τόσο σε φυσιολογικά άτομα κατά τη διάρκεια της άσκησης, όσο και σε άτομα τα οποία πάσχουν από έλλειψη ενζύμου G6PD στην ηρεμία. Βέβαια, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία που αναφέρουν πως σε ορισμένες περιπτώσεις η βιταμίνη E μπορεί να λειτουργήσει και σαν προοξειδωτικός παράγοντας παρά σαν αντιοξειδωτικός παράγοντας (Brown et al. 1997; Kontush et al. 1996).

Ωστόσο, δεν υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία που να δείχνουν ποια είναι η επίδραση της αερόβιας άσκησης στην παραγωγή ελευθέρων ριζών σε άτομα πάσχοντα από έλλειψη ενζύμου G6PD. Επίσης, δεν είναι γνωστό εάν η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E μπορεί να επάγει το αντιοξειδωτικό σύστημα των ατόμων με έλλειψη G6PD και να περιορίσει τη δημιουργία ελευθέρων ριζών κατά τη διάρκεια της άσκησης.

Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της εργασίας ήταν διπλός:

1) να εξετάσει την επίδραση της άσκησης στην παραγωγή οξειδωτικού στρες σε άτομα τα οποία πάσχουν από έλλειψη ενζύμου G6PD, και

2) να εξετάσει την επίδραση της συμπληρωματικής λήψης βιταμίνης E στην παραγωγή οξειδωτικού στρες μετά από άσκηση σε άτομα τα οποία πάσχουν από έλλειψη ενζύμου G6PD.

Οριοθέτηση της εργασίας

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε η βιταμίνη E σαν συμπληρωματική ουσία ενώ η δόση αυτής ήταν 800 IU ημερησίως. Η μορφή της άσκησης ήταν το αερόβιο τρέξιμο ενώ η ένταση της άσκησης ήταν μέτρια. Η γενίκευση των αποτελεσμάτων για άλλες συμπληρωματικές ουσίες, μορφές άσκησης και εντάσεις δεν είναι κατάλληλη.

Περιορισμοί της εργασίας

Οι περιορισμοί της συγκεκριμένης εργασίας έγκειται στο γεγονός ότι αν και πραγματοποιήθηκε συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E δεν μετρήθηκαν τα επίπεδα της βιταμίνης E στο αίμα για να βρεθεί εάν όντως η περίοδος της συμπληρωματικής λήψης ήταν αποτελεσματική. Επίσης δεν μετρήθηκαν τα επίπεδα άλλων θεωρούμενων αντιοξειδωτικών ουσιών.

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

ΟΔΟΣ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΜΕΝΩΝ ΠΕΝΤΟΖΩΝ

Το ώριμο ερυθροκύτταρο έχει φυσιολογικά σχήμα αμφίκουλο που του εξασφαλίζει την μεγαλύτερη δυνατή επιφάνεια σε σχέση με τον όγκο του. Η διάμετρος του είναι 7-8 μ, και το πάχος του στην περιφέρεια 2 μ. Εκτός από την αιμοσφαιρίνη το ερυθρό αιμοσφαίριο περιέχει πολυάριθμες άλλες ουσίες όπως υδατάνθρακες, λιποειδή, βιταμίνες, ιόντα κλπ καθώς και σύστημα παραγωγής ενέργειας που του είναι απαραίτητα για την εκτέλεση της βιολογικής του αποστολής και την ικανοποίηση δικών του μεταβολικών αναγκών (Φερτάκης 1992).

Η μεμβράνη του ερυθρού αιμοσφαιρίου αποτελείται κατά 40% από λιπίδια κατά 50% από πρωτεΐνες και κατά 10% από υδατάνθρακες. Οι λειτουργίες της μεμβράνης του ερυθρού αιμοσφαιρίου είναι η διατήρηση της ευκαμψότητας του ερυθρού ώστε να διέρχεται αλώβητο τη μικροκυκλοφορία κυρίως του σπλήνα, η διατήρηση του όγκου του ερυθροκυττάρου (με την είσοδο και έξοδο ηλεκτρολυτών), η εξασφάλιση της ομοιόστασης του ασβεστίου (διαθέτει ισχυρή αντλία εξόδου του ασβεστίου από το κυτταρόπλασμα) και ανταλλαγή των ανιόντων (μεταφορά HCO_3^- στους πνεύμονες) (Φερτάκης 1992).

Το ερυθρό αιμοσφαίριο έχει ως αποστολή την μεταφορά του οξυγόνου στους ιστούς, η οποία γίνεται με τη βοήθεια της αιμοσφαιρίνης (Φερτάκης 1992). Η κύρια αποστολή της αιμοσφαιρίνης και επομένως των ερυθρών αιμοσφαιρίων είναι η μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς και του CO_2 από τους ιστούς στους πνεύμονες (Φερτάκης 1992, σελ. 21).

Όταν το ερυθρό αιμοσφαίριο εισέρχεται στην κυκλοφορία από το μυελό των οστών, έχει ανάγκη ενέργειας για την εξασφάλιση της ακεραιότητάς του, του σχήματός του και στην διατήρηση της αιμοσφαιρίνης στην αναθεϊσα μορφή. Η καύσιμη ύλη του ερυθρού αιμοσφαιρίου είναι η γλυκόζη η οποία μετά την είσοδό της στα ερυθρά αιμοσφαίρια, φωσφορυλιώνεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη.

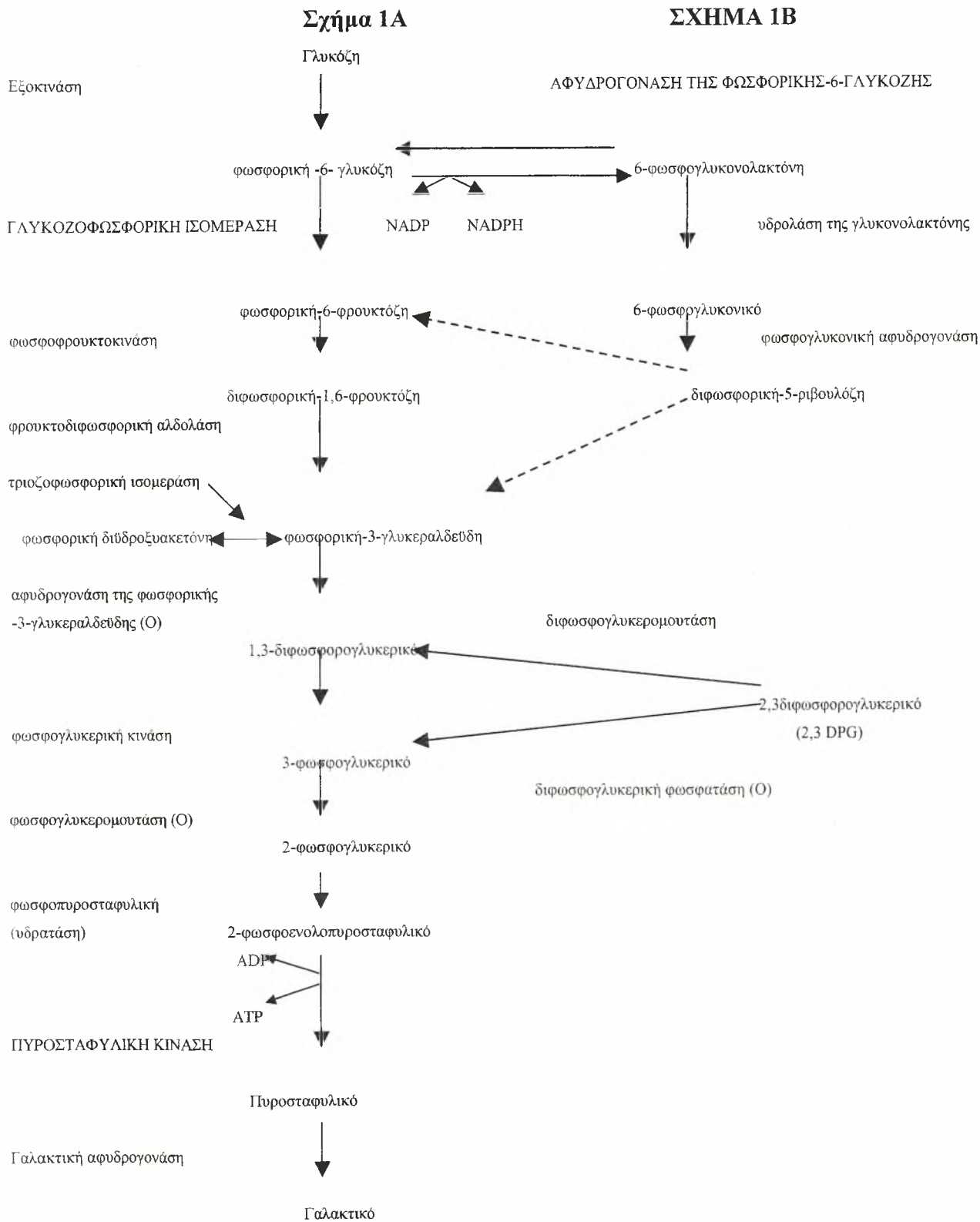
Ο παραπέρα μεταβολισμός της γίνεται με δύο οδούς:

A) της γλυκολυτικής αναερόβιας οδού των Embden-Meyedorf όπου μεταβολίζεται το 90% της φωσφορικής γλυκόζης (Σχήμα 1A) και καταλήγει μετά από μια σειρά ενδιάμεσων μεταβολικών προϊόντων στο σχηματισμό του γαλακτικού οξέος.

B) της μονοφωσφορικής εξόζης (Hexose Monophosphate Shunt) όπου μεταβολίζεται το υπόλοιπο 10% της γλυκόζης (Σχήμα 1B).

Η σημασία αυτής της οδού είναι μεγάλη γιατί εξασφαλίζει τη συνεχή παραγωγή ανηγμένης γλουταθειόνης, η οποία προφυλάσσει την αιμοσφαιρίνη και την μεμβράνη του ερυθροκυττάρου από την οξειδωτική δράση διαφόρων οξειδωτικών ουσιών ενδογενών ή εξωγενών. Με το μεταβολισμό της γλυκόζης του ερυθρού αιμοσφαιρίου εξασφαλίζονται οι ενεργειακές του ανάγκες: Το ATP εξασφαλίζει την λειτουργία της αντλίας Na - K και την ευκαμψία της μεμβράνης του, την διόρθωση των βλαβών του κατά την δίοδο του από την μικροκυκλοφορία κ.α.

Το ερυθρό αιμοσφαίριο ζει 120 ημέρες και καταστρέφεται με φαγοκυττάρωση κυρίως στον σπλήνα, από το σύστημα μονοπύρηνων μακροφάγων ή αλλιώς δυκτιοενδοθυλιακό σύστημα. Με την καταστροφή του η σφαιρίνη της αιμοσφαιρίνης διασπάται σε αμινοξέα που εισέρχονται στην κυκλοφορία, ο δακτύλιος της αίμης διανοίγεται για τον σχηματισμό των χολοχρωστικών, ενώ ο σίδηρος εναποθηκεύεται στα μόρια της φεριτίνης που αποτελεί μια μορφή αποθήκευσης του Fe^{++} (Φερτάκης 1992).



Σχήμα 1: Μεταβολικές οδοί του ερυθρού αιμοσφαιρίου μαζί με τα υπεύθυνα ένζυμα. Αν η ένδειξη του ενζύμου είναι συνή αναγράφεται με κεφαλαία στοιχεία. Τα ένζυμα στα οποία δεν έχει περιγραφεί ανεπάρκεια σημειώνονται με το (O).

Στο 1^ο Σχήμα παριστάνονται απλοποιημένες οι δύο κύριες μεταβολικές οδοί του ερυθρού αιμοσφαιρίου, η γλυκολυτική οδός (Α) και η οδός της μονοφωσφορικής εξόζης (Β). Ταυτόχρονα σημειώνονται και τα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για κάθε μεταβολικό βήμα. Κάθε ένα από αυτά τα ένζυμα ρυθμίζεται από ένα ζεύγος αλληλόμορφων γονιδίων. Εάν σε ένα άτομο υπάρχει κληρονομική έλλειψη του ενός γονιδίου, το άτομο αυτό είναι ετεροζυγώτης και δεν πάσχει.

Αυτές οι ενζυμικές ανεπάρκειες μπορούν να αφορούν οποιοδήποτε ένζυμο (Α) αναερόβιας γλυκολυτικής οδού και (Β) της οδού της μονοφωσφορικής εξόζης. Στην (Α) περίπτωση παράγεται χρόνια αιμολυτική αναιμία ενώ στη (Β) αναπτύσσεται μια ιδιαίτερη ευαισθησία σε ορισμένα φάρμακα (ουσίες) με πρόκληση οξείας αιμόλυσης (Φερτάκης 1992, Ninfali 1993)

Όπως έχει λεχθεί το 10% του μεταβολισμού των υδατανθράκων ακολουθεί την οδό της μονοφωσφορικής εξόζης. Η οδός αυτή είναι επίσης γνωστή και σαν οδός των φωσφορικών πεντοζών, σαν αερόβια γλυκόλυση ή σαν οδός φωσφογλυκονικού οξέος.

Όπως φαίνεται στο 1^ο σχήμα ένα μέρος της 6-φωσφορικής γλυκόζης με τη βοήθεια του ενζύμου αφυδρογονάση (δευδρογενάση) της 6-φωσφορικής γλυκόζης (ή G6PD) (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) μετατρέπεται σε 6-φωσφογλυκολακτόνη και στη συνέχεια σε 6-φωσφογλυκονικό.

Το 6-φωσφογλυκονικό μετατρέπεται σε μια πεντόζη τη διφωσφορική 5-ριβουλόζη. Η πεντόζη αυτή μετατρέπεται αφενός σε φωσφορική - 6 - φρουκτόζη και αφετέρου σε φωσφορική - 3 - γλυκεραλδεύδη οπότε και ακολουθείται ο γλυκολυτικός κύκλος ανάποδα προς τον επανασχηματισμό δηλαδή της γλυκόζης. Εντούτοις από τα 6 μόρια γλυκόζης που ακολουθούν την οδό των πεντοζών επανασχηματίζονται τα 5 και "χάνεται" το ένα σε κάθε κύκλο (Φερτάκης 1998).

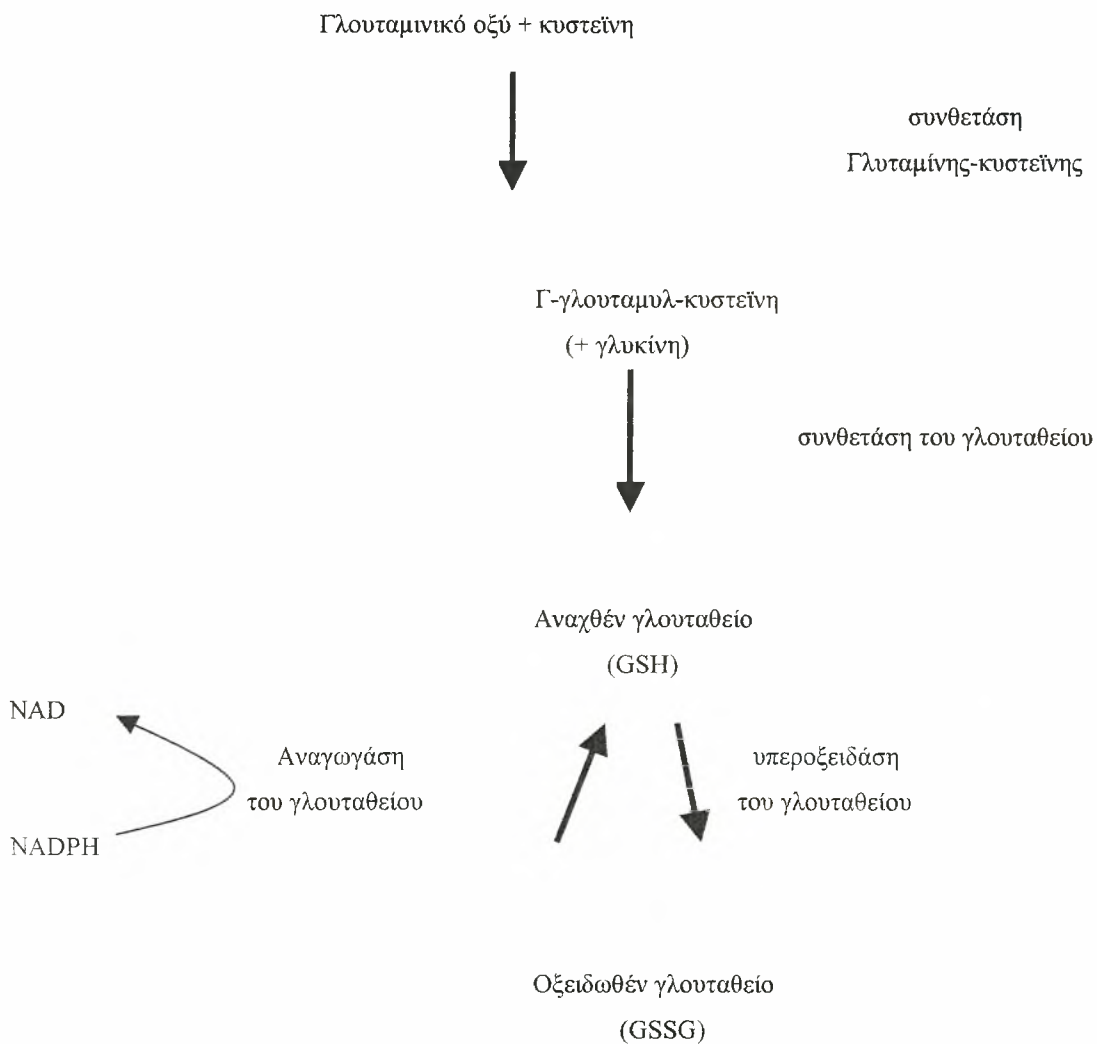
Η βιολογική σημασία της οδού της μονοφωσφορικής εξόζης είναι τεράστια διότι:

Α) Κατά τη μετατροπή της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε 6-φωσφατογλυκολακτόνη το NADP (Νικοτιναμο-Αδενινο-Φωσφορικό Νουκλεοτίδιο) μετατρέπεται στην αναχθείσα μορφή NADPH (Σχήμα1). Το ένζυμο αυτό είναι απαραίτητο συνένζυμο και σκοπό έχει την διατήρησή της γλουταθειόνης στην ανηγμένη μορφή (GSH) (Σχήμα 2). Επίσης η πορεία των φωσφορικών πεντοζών είναι η μόνη πηγή του NADPH για τα ερυθρά αιμοσφαίρια, λόγω της έλλειψης αυτών

σε μιτοχόνδρια, άρα και η παραγωγή NADPH από αυτά μειώνεται στο ελάχιστο από τη συγκεκριμένη ανεπάρκεια (Stryer 1997, p.460).

B) Προσφέρει πεντόζη για την σύνθεση των πυρινηκών οξέων και νουκλεοτιδίων.

Όταν λείπει το ένζυμο αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης ο κύκλος της 6-μονοφωσφορικής εξόζης δεν μπορεί να λειτουργήσει κανονικά (Φερτάκης 1998).



Σχήμα 2: Ο μεταβολισμός του γλουταθειού

Η αφυδρογονάση της 6 φωσφορικής γλυκόζης το πρώτο ένζυμο της πορείας των φωσφορικών πεντοζών ή μονοφωσφορικών εξοζών ανακαλύφθηκε από τον Otto Warburg το 1931 και το ολοκληρωμένο σχήμα της πορεία προτάθηκε στη συνέχεια

από τους Friz Limann - Frank Dickeus - Bernard Horecker και Racker (Stryer L, 1997).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Όπως γνωρίζουμε, το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας για τις βιολογικές μας ανάγκες προέρχεται από την οξείδωση (καύση) των διαφόρων συστατικών της τροφής που προσλαμβάνουμε. Όλες οι οξειδώσεις όμως δεν είναι ωφέλιμες αλλά υπάρχουν και ορισμένες οι οποίες μπορεί να αποβούν βλαβερές για τον οργανισμό. Αυτές προκαλούνται από ουσίες που ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ROS) και αζώτου (RNS), που παράγονται από μεταβολικές αντιδράσεις (π.χ. αερόβιος μεταβολισμός του σώματός μας) και στην πλειονότητά τους είναι ελεύθερες ρίζες (Μούγιος 1999). Ελεύθερες ρίζες είναι χημικές ουσίες (άτομα ή μόρια, φορτισμένα και αφόρτιστα) που διαθέτουν ένα τουλάχιστον ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξώτατη στοιβάδα. Είναι πολύ δραστικές γιατί το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο έχει την τάση να γίνει ζεύγος αποσπώντας ηλεκτρόνιο από άλλη ουσία με αποτέλεσμα να την οξειδώνει και να την καταστρέφει. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται οξειδωτικό stress (Health on the net Foundation 2001). Επίσης οι ελεύθερες ρίζες εκτός από την παραγωγή τους κατά τον φυσιολογικό μεταβολισμό, δημιουργούνται και από την έκθεσή μας σε περιβαλλοντολογικά αίτια όπως: παράγοντες λοίμωξης, μολύνσεις, υπερϊώδης ακτινοβολία, ακτίνες X, χημικές ουσίες κλπ (Schroeder et al. 1993, Τρακατέλλης 1992). Οι κυριότεροι εκπρόσωποι αυτών είναι:

1. Το ανιόν Υπεροξειδίου(O_2^-)
2. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου(H_2O_2)
3. Το ανιόν του υδροξυλίου(HO^-)
4. Οι ρίζες του νιτρικού οξέος(NO^+) ή ενδογενές νιτρικό άλας.

Έχει βρεθεί πως το οξειδωτικό stress αυξάνει την πιθανότητα εκφυλισμού των κυττάρων πράγμα που έχει συσχετισθεί με το προηγμένο γήρας, την αρτηριακή υπέρταση, την υπερτριγλυκεριδαιμία, τον καρκίνο, τον σακχαρώδη διαβήτη, την στεφανιαία νόσο, τις εκφυλιστικές παθήσεις του Κ.Ν.Σ. και του ανοσολογικού συστήματος, την ρευματοειδή αρθρίτιδα (Diplock A, 1998) και αλλοιώσεις στο DNA (Poulsen et al. 1999).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν μέσω της δράσης πολλών οξειδωτικών ενζύμων σε διάφορες θέσεις του κυττάρου π.χ. κυτταρόπλασμα, μιτοχόνδρια, λυσοσώματα και πλασματικές μεμβράνες (Schroeder et al. 1993, Τρακατέλλης 1992) και διαμέσου της αλληλεπίδρασης με μέταλλα (πχ. Σίδηρος, χαλκός) (στην αντίδραση του Fenton H_2O_2) ($Mt^{n+} + H_2O_2 \rightarrow Mt^{(n+1)+} + HO\cdot + HO^-$). Συνήθως ο περισσότερος σίδηρος είναι τρισθενής Fe^{+++} και ανάγεται σε δισθενή Fe^{++} ώστε να είναι δραστικός στην αντίδραση Fenton. Άλλη περίπτωση παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι διαμέσου της Heber-Weiss αντίδρασης ($O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + HO\cdot + HO^-$).

Οι κυριότερες επιδράσεις αυτών των δραστικών ειδών είναι επί των μεμβρανών των λιπιδίων, των σουφλυδρικών ομάδων, πρωτεϊνών καθώς και των νουκλεϊκών οξέων του DNA. Αλληλεπιδράσεις με το DNA επάγουν μεταλλάξεις στο γενετικό κώδικα, οι οποίες εφόσον δεν επισκευασθούν επιφέρουν κυτταρικές διαταραχές, αλλά και αναστολή της αντιγραφής του DNA. Όλες οι προαναφερθείσες ρίζες περιλαμβάνονται στην καταστροφή του DNA. Επίσης μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιπιδίων της πλασματικής μεμβράνης, του ενδοπλασματικού δικτύου των μιτοχονδρίων και άλλων μικροσωμικών συστατικών. Διασύνδεση των μεμβρανικών πρωτεϊνών μπορεί να γίνει με το σχηματισμό δισουλφιδικού δεσμού (τα πλέον ασταθή αμινοξέα είναι η μεθειονίνη ή ιστιδίνη, κυστεΐνη και λυσίνη), ή επίσης να συμβεί «πανωλεθρία» στο κύτταρο απενεργοποιώντας ένζυμα που περιέχουν σουφλυδρίλια. Η οξείδωση των λιπιδίων είναι ένας από τους καλύτερα μελετημένους μηχανισμούς, (όμως όχι πάντοτε ο κύριος) βλάβης από ελεύθερες ρίζες. Αρχίζει με ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες αντιδρούν με ακόρεστα λιπαρά οξέα φωσφολιπιδίων της μεμβράνης, για να σχηματισθούν ελεύθερες ρίζες οργανικών οξέων, οι οποίες με την σειρά τους αντιδρούν ταχέως με το οξυγόνο για να σχηματιστούν ανιόντα υπεροξειδίου. Τα ανιόντα υπεροξειδίου δρουν κατόπιν σαν ελεύθερες ρίζες, ξεκινώντας μια αποκαλυπτική αλυσίδα αντιδράσεων, συντελώντας έτσι σε ευρεία απώλεια ακόρεστων λιπαρών οξέων και σε εκτεταμένες μεμβρανικές καταστροφές (Schroeder et al. 1993, Τρακατέλλης 1992).

Θεωρείται απαραίτητο τέλος να αναφερθούμε, πως αν και οι ελεύθερες ρίζες κατηγορούνται για την επικίνδυνη δράση τους και τις καταστροφικές τους ιδιότητες στα κύτταρα, η δημιουργία τους είναι μια κατά βάση βιολογική και φυσιολογική διαδικασία απαραίτητη για την κυτταρική σύνθεση, στην δημιουργία του DNA και του RNA όπως και συγκεκριμένων ορμονών. Χαρακτηριστικό είναι ότι τα λευκά

αιμοσφαίρια «εκμεταλλεύονται» τις ιδιότητες αυτών και τις χρησιμοποιούν για άσηπτες και ανοσοποιητικές λειτουργίες τους (Radak et al. 2000, Karlsson 1997).

ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΑ

Η προσεγμένη διατροφή, η αποφυγή αλκοόλ και καπνίσματος και η άσκηση έχει αποδειχθεί ότι συμβάλουν στην καλή υγεία του οργανισμού μας. Σε καθημερινή βάση ο οργανισμός «βομβαρδίζεται» κυριολεκτικά από ελεύθερες ρίζες οι οποίες έχουν ως στόχο την φθορά των κυττάρων και του γενετικού τους υλικού. Ο οργανισμός διαθέτει ισχυρούς μηχανισμούς εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών, τις αντιοξειδωτικές ουσίες, στις οποίες οι επιστήμονες στηρίζουν πολλές ελπίδες για την αντιμετώπιση σοβαρών παθήσεων όπως του καρκίνου και της νόσου Αλτσχάιμερ (Health on the net foundation 2001).

Τα αντιοξειδωτικά λειτουργούν με τέτοιο τρόπο ώστε προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο που τους λείπει και έτσι εμποδίζεται η καταστρεπτική δράση τους. Πρόκειται για ουσίες που κατά κάποιο τρόπο θυσιάζονται στον αγώνα που δίνει ο οργανισμός για την καταπολέμηση των ελεύθερων ριζών: Η κάθε μια από αυτές τις ουσίες ενεργεί και εξουδετερώνει συγκεκριμένη ομάδα ελεύθερων ριζών, ενισχύοντας τους ήδη υπάρχοντες μηχανισμούς εξουδετέρωσης του οργανισμού. Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει κάποιους ενζυμικούς και μη ενζυμικούς μηχανισμούς αντιμετώπισης της παραγωγής ελευθέρων ριζών. Οι αντιοξειδωτικοί κυτταρικοί μηχανισμοί άμυνας μπορούν να ταξινομηθούν σε πρωτογενείς και δευτερογενείς.

Οι πρωτογενείς λαμβάνουν τα συνήθη θρεπτικά συστατικά όπως (βιταμίνες E & C), καροτεινοειδή (β-καροτένιο, λυκοπένιο), θειόλες (γλουταθειόνη, λιποϊκό οξύ), ουβεκινόλες, φλαβινοειδή και πολυφαινόλες (από λαχανικά, τσάι, φλοιούς σταφυλιών) και μια ποικιλία από ενζυμικά συστήματα (καταλάση), δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης(GPX) και αναγωγή της γλουταθειόνης (GR). Οι πρωτογενείς μηχανισμοί αλληλεπιδρούν άμεσα με τις βλαβερές ρίζες. Οι δευτερογενείς μηχανισμοί άμυνας ασχολούνται κυρίως με την επισκευή των κατεστραμμένων πρωτεϊνών και λιπιδίων (Linder M 1991, Πανελλήνια Ένωση Ελεύθερων ριζών 1998). Τα κυριότερα ένζυμα και ενδογενείς ουσίες είναι:

1) Καταλάση (CAT). Παρούσα στα υπεροξεισωμάτια η οποία αποσυνθέτει H₂O₂

2) Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) η οποία μετατρέπει ανιόντα του υπεροξειδίου (O_2 σε H_2O_2)

3) Το φλεβοένζυμο αναγωγή της θειορεδουξίνης (TR) η οποία με το NADPH ανάγει την θειορεδουξίνη. Αυτή δρα ως δότης υδρογόνου στην αναγωγή των ριβονουκλεοτιδίων, ένα ένζυμο που συνθέτει τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια. Η θειορεδουξίνη προστατεύει από TNF επαγόμενη κυτταροτοξικότητα, οξειδωτικό στρες ανάγει το H_2O_2 και εκκαθαρίζει ελεύθερες ρίζες (Human Genetics G6PD).

ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΟΥΣΙΕΣ

1) Η τρανσφερίνη ενεργεί ως αντιοξειδωτικό, δεσμεύοντας τον ελεύθερο σίδηρο (Fe^{+++}) που όπως είδαμε επάγει τον σχηματισμό ελεύθερων ριζών.

2) Η χολερυθρίνη παράγεται κατά την αποδόμηση της αίμης με συμμετοχή του NADPH, αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό και είναι αυξημένη σε ορισμένες καταστάσεις όπως αιμόλυση και νεογνικός ίκτερος (Stryer L 1997). Η χολερυθρίνη, το ουρικό και το σκορβικό οξύ, είναι τα κύρια αντιοξειδωτικά στο πλάσμα. Στις μεμβράνες η χολερυθρίνη είναι ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό, συναγωνιζόμενη την βιταμίνη E (Stryer L 1997).

3) Η σερουλοπλασμίνη είναι ένα σπουδαίο εξωκυτταρικό αντιοξειδωτικό και εκκαθαριστής των ελεύθερων ριζών και ανιόντος O_2 . Οξειδώνει τον σίδηρο ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) για να δεσμευθεί από την τρανσφερίνη. Ο σίδηρος εκτός της παραγωγής ελεύθερων ριζών, συμβάλει και στην απαλλαγή απ' αυτή μέσω των κυτοχρωμάτων που περιέχουν αίμη (Linder M 1991). Επίσης η σερουλοπλασμίνη αναστέλλει την οξείδωση των LDL λιποπρωτεϊνών (Ninfali 1995).

ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΟΥΣΙΕΣ

1) Σελήνιο (Se): Είναι ιχνοστοιχείο το οποίο μαζί με την βιταμίνη E προστατεύει ουσίες του οργανισμού που είναι ευαίσθητες σε οξείδωση (Harper' s 1984). Περιέχεται στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης η οποία είναι ένζυμο με 4 υπομονάδες και σε κάθε μια βρίσκεται Se με την μορφή σεληνοκυστεΐνης (Linder 1991).

2) Βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ: Αποτελεί αντιοξειδωτικό παράγοντα και μάλιστα ισχυρό. Είναι πηγή ηλεκτρονίων (e^-) για την διατήρηση του O_2 σε μορφή μη ελεύθερης ρίζας. Λειτουργεί ως προστατευτικός μηχανισμός και διατηρεί τον Fe^{++} και τον Cu^+ στην ανηγμένη μορφή. Προστατεύει άλλα αντιοξειδωτικά (με την καταστροφή της) όπως την βιταμίνη E και A και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Υπάρχουν ενδείξεις πως η βιταμίνη C μπορεί να επαναφέρει την βιταμίνη E πίσω

στην ανηγμένη της μορφή από την οξειδωμένη της κατάσταση. Βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες στα λευκοκύτταρα (φαγοκύτταρα) που προστατεύει από την αυτοοξείδωση τους απ' τις ελεύθερες ρίζες (Linder M 1991). Θεωρείται εκτός από ισχυρό, αλλά και πιο γρήγορο και άμεσο για την εξουδετέρωσή ελεύθερων ριζών (wysiwyg //38/http, Αντιοξειδωτικά και ελεύθερες ρίζες).

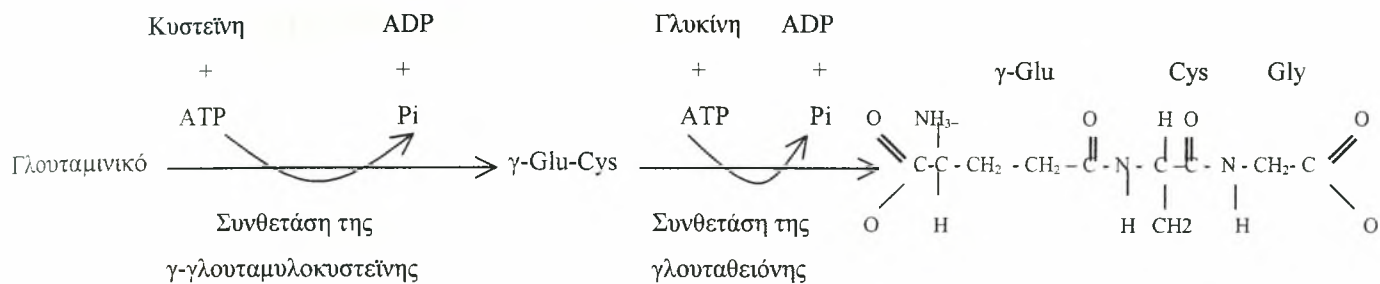
3) Βιταμίνη B3 ή Νιασίνη: Περιέχει τις μορφές NAD και NADP που αποτελούν συνένζυμα πολλών οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Μπορεί να παραχθεί στον οργανισμό μας από την τρυπτοφάνη, 1/60 μετατρέπεται σε νιασίνη όμως απαιτεί και την δράση της B6. Οπότε η νιασίνη αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο αύξησης του NADPH στον οργανισμό, όταν δεν καθίσταται δυνατό αυτό να παραχθεί όπως στην ανεπάρκεια της G6PD. Η νιασίνη (B3) είναι μια ουσία που συναντάται στους κεντρικούς φορείς ηλεκτρονίων (NAD⁺ και NADH) στην οξειδωτική φωσφορυλίωση στην αναερόβια γλυκόλυση και στην οξείδωση και σύνθεση των λιπαρών οξέων (Linder 1991, Harper' s 1984).

4) Βιταμίνη A: Η αντιοξειδωτική βιταμίνη A, βρίσκεται σε ζωικά και φυτικά προϊόντα, στα ζωικά με την μορφή εστέρων της ρετινόλης με λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, στα φυτικά η διαιτητική βιταμίνη A βρίσκεται ως προβιταμίνη A, με τη μορφή των β-καροτενίων, τα οποία είναι κίτρινες χρωστικές (Linder M & Harper' s 1984).

5) Βιταμίνη E ή κυκλική αλκοόλη: Θεωρείται το σημαντικότερο αντιοξειδωτικό όλων των παραπάνω, γι' αυτό και ακολουθεί ξεχωριστά αναφορά γι' αυτή.

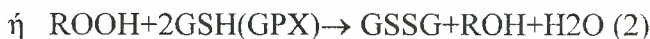
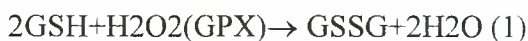
Η ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ ΩΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ

Η γλουταθειόνη αποτελεί μία ενδογενή αντιοξειδωτική ουσία η οποία είναι άμεσα εξαρτώμενη από την ενεργότητα του ενζύμου G6PD. Η γλουταθειόνη βρίσκεται σε όλα τα ζωικά κύτταρα όπου συντίθεται με την δράση των ενζύμων, συνθετάση της γ-γλουταμιλοκυστείνης και συνθετάση της γλουταθειόνης.

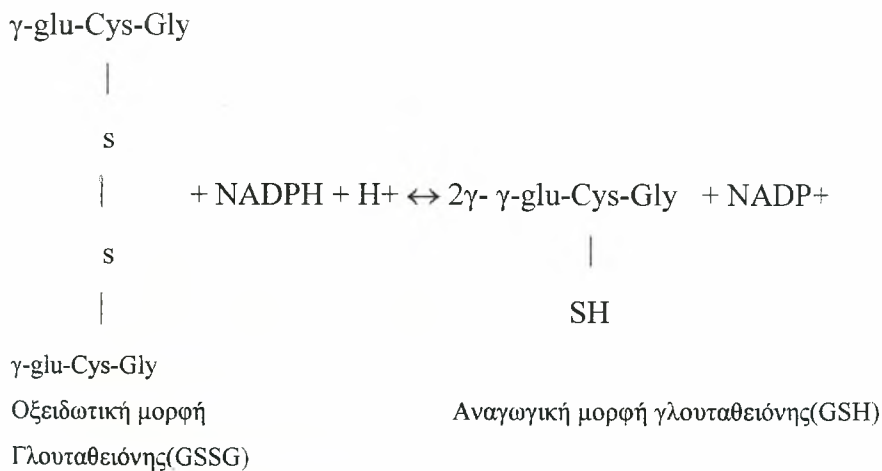


Σχήμα 3: Βιοσύνθεσης της Γλουταθειόνης

Η γλουταθειόνη (GSH) χρησιμοποιείται στην εξουδετέρωση H₂O₂ (αντίδραση1) και οργανικών υπεροξειδίων (αντίδραση2), που δημιουργούνται ύστερα από την επίδραση οξειδωτικών ουσιών κατά την αναπνοή, με τις τροφές ή ακόμα με ορισμένα φάρμακα.



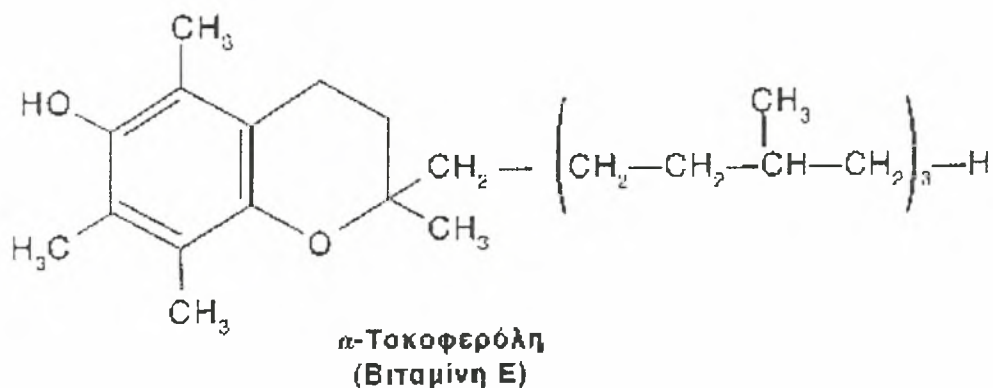
Αυτές οι αντιδράσεις καταλύονται από το ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX, glutathione peroxidase) που περιέχει σελήνιο και η οποία καταλύει την ικανότητα της ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες όπως τις παραπάνω. Ακόμη η γλουταθειόνη δρα με αντιδράσεις αλληλοανταλλαγής δισουλφιδρυλικές ομάδες πρωτεϊνών και οξειδώνεται στη μορφή (GSSG). Η αναγέννηση της μορφής της θειόλης (GSH) από (GSSG) γίνεται με την ενζυμική δράση μιας φλαβοπρωτεΐνης, της αναγωγάσης της γλουταθειόνης παρουσία NADPH.



Στα περισσότερα κύτταρα η σχέση GSH/GSSG είναι μεγαλύτερη από 500 (Τρακατέλλης 1992, SCHROEDER 1993)

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Ε ΩΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ

Η βιταμίνη E, η οποία αναφέρεται και σαν τοκοφερόλη, εμφανίζεται σαν 8 ουσίες με παρόμοια δράση εκ των οποίων η πιο δραστική είναι η α-τοκοφερόλη. Πήρε το όνομά της από την διαπίστωση κάποιων ότι η έλλειψη της στα ποντίκια δημιουργούσε προβλήματα στη γονιμότητα, πράγμα που όμως ποτέ δεν διαπιστώθηκε και δεν επιβεβαιώθηκε στον άνθρωπο. Η βιταμίνη E οξειδώνεται πολύ εύκολα και με αυτό τον τρόπο, δεσμεύει άλλες ουσίες από οξειδώσεις δεσμεύοντας το οξυγόνο του περιβάλλοντός τους. Με τον τρόπο της αυτό, καταστρέφεται μεν η ίδια αλλά προστατεύει ουσίες στα τρόφιμα, όπως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και την βιταμίνη A.



Ασκεί αντιοξειδωτική δράση στους πνεύμονες, προστατεύοντας τα ερυθρά και τα λευκά αιμοσφαίρια από την ρήξη των μεμβρανών τους. Η εν λόγω προστασία από την ρήξη των μεμβρανών των ερυθρών αιμοσφαιρίων (αιμόλυση ερυθροκυττάρων) προστατεύει ιδίως τα παιδιά από αιμολυτική αναιμία, ενώ η προστασία των λευκών αιμοσφαιρίων, παρέχει προστασία της άμυνας του οργανισμού κατά των ασθενειών. (Ζερφυρίδης Γ 1998). Επίσης η βιταμίνη E λειτουργεί ως προστατευτικός παράγοντας της καταστροφής των κυττάρων, προστατεύει τους ιστούς από την διάσπαση και πιθανόν από διάφορες εκφυλιστικές διεργασίες και αυτή του γήρατος (Goldfarb et al. 1994). Ως αντιοξειδωτική ουσία, προστατεύει τα κύτταρα από τοξικές ενώσεις που

σχηματίζονται από την οξείδωση πολυακόρεστων λιπών. Από πειράματα αποδείχθηκε ότι τα ζώα που τρέφονται με τροφές, οι οποίες δεν περιέχουν βιταμίνη E, παθαίνουν την λεγόμενη μυϊκή δυστροφία, η οποία παρατηρείται και στον άνθρωπο. Από τα όσα είναι γνωστά, φαίνεται ότι ο οργανισμός του ανθρώπου και των ζώων δεν έχει την ικανότητα να συνθέτει βιταμίνη E, η οποία συντίθεται στα κύτταρα των φυτών, μολονότι έχει παρατηρηθεί, ότι στον πλακούντα και στην υπόφυση υπάρχουν μεγάλες ποσότητες της βιταμίνης αυτής.

Όπως αναφέραμε και πιο πάνω, η βιταμίνη E αποτελεί μία πολύ ισχυρή αντιοξειδωτική ουσία που απαντάται στην φύση. Τα επίπεδα της βιταμίνης E, στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και στα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, εξαρτώνται από 4 κυρίως παράγοντες:

- α) Το ποσό πρόσληψης βιταμίνης E, με την τροφή και συμπληρωμάτων.
- β) Το επίπεδο προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών της τροφής.
- γ) Την επάρκεια σεληνίου στην τροφή.
- δ) Την διαιτητική πρόσληψη αμινοξέων που περιέχουν θείο.

Η βιταμίνη E φαίνεται πως αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας έναντι υπεροξειδωσης, των κυτταρικών και υποκυτταρικών μεμβρανικών φωσφολιπιδίων, ενώ η υπεροξειδωση της γλουταθειόνης, της οποίας το σελήνιο είναι αναπόσπαστο συστατικό, αποτελεί τη δεύτερη γραμμή άμυνας (αλλά για να υπάρχει GSH που θα οξειδωθεί, απαιτείται NADPH, που αναγεννάται με την βοήθεια της G6PD). Έτσι οι βιοχημικές δράσεις της βιταμίνης E και του σεληνίου, φαίνεται να είναι επιτυχής αντιμετώπιση, των ενδογενών φυσικών και χημικών περιβαλλοντολογικών προσβολών και λοιπών καταστάσεων οξειδωτικού στρες.

Από την μία το σελήνιο ελαττώνει τις απαιτήσεις σε βιταμίνη E με 3 τρόπους:

α) Το σελήνιο είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική παγκρεατική λειτουργία και επομένως για την πέψη και απορρόφηση λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένης και της βιταμίνης E (Harper's, 1984).

β) Ως συστατικό της υπεροξειδωσης της γλουτοθειόνης που έτσι υποβοηθά στην καταστροφή των υπεροξειδίων.

γ) Κατά κάποιο άγνωστο τρόπο, το σελήνιο υποβοηθά στην κατακράτηση της βιταμίνης E, στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος.

Από την άλλη η βιταμίνη E, φαίνεται ότι ελαττώνει τις απαιτήσεις σε σελήνιο, τουλάχιστον σε πειραματόζωα, προλαμβάνοντας την απώλεια σεληνίου από το σώμα, ή διατηρώντας το σε δραστική μορφή.

Επίσης η βιταμίνη Ε αποτρέπει την οξειδωση των μεμβρανικών λιπιδίων και άρα ελαττώνει το ποσό της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης που χρειάζεται για την καταστροφή αυτών των υπεροξειδίων. (LINDER M. 1991 & HARPER'S 1984).

Η βιταμίνη Ε ανακυκλώνεται στην αρχική της μορφή με αλληλεπίδραση με την βιταμίνη C. Η δε βιταμίνη C ανακυκλώνεται, αλληλεπιδρώντας με κάποια άλλα αντιοξειδωτικά, όπως η γλουταθειόνη. Ακόμη δεν είναι πολλές οι γνώσεις μας για αυτές τις ανακυκλώσεις των αντιοξειδωτικών και την διατήρησή τους (Antioxidant Nutrients). Από άποψη τοξικότητας η βιταμίνη Ε φαίνεται να είναι μη τοξική. Οι ημερήσιες δόσεις είναι 10 mg για τους άντρες και 8 mg για τις γυναίκες, μπορούν όμως να φτάνουν ως και 300 mg την ημέρα χωρίς κανένα πρόβλημα. (Ζερφυρίδης Γ 1998).

Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία που υποδεικνύουν πως η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης Ε δεν επιφέρει σημαντική μείωση στην παραγωγή οξειδωτικού στρες (Ikemoto et al. 2002) αλλά και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να επιτείνει την παραγωγή οξειδωτικού στρες (Brown et al. 1997; Kontush et al. 1996).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ

Όπως είναι γνωστό, οι ωφέλειες που έχει ο οργανισμός του ανθρώπου από τη φυσική δραστηριότητα είναι πάρα πολλές και αποδεδειγμένες. Είναι επίσης γνωστό πως ο αερόβιος μεταβολισμός κατά την άσκηση αυξάνεται έτσι ώστε να μπορέσουν να οξειδωθούν τα θρεπτικά στοιχεία και να παραχθεί ενέργεια η οποία θα χρησιμοποιηθεί για την πραγματοποίηση των μυϊκών συστολών. Ωστόσο, με την αύξηση της πρόσληψης οξυγόνου παρατηρείται και μία αύξηση στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Υπάρχουν ερευνητές που υποστηρίζουν ότι η αύξηση των ελευθέρων ριζών, μπορεί να υπερνικήσει τις φυσικές άμυνες του οργανισμού, αποτελώντας έτσι κίνδυνο για την υγεία, λόγω του αυξημένου οξειδωτικού στρες. Με δύο τρόπους τουλάχιστον η άσκηση παράγει ενεργά οξυγόνο ή ρίζες οξυγόνου. Ο ένας συμβαίνει με την μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την διάρκεια της μιτοχονδριακής αναπνευστικής αλυσίδας. Κάποια ηλεκτρόνια διαφεύγουν, πιθανόν σε επίπεδο κυτοχρωμάτων και παράγουν ρίζες υπεροξειδίου. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μπορεί επίσης να αποδειχθεί ως μία πιθανή πηγή ελευθέρων ριζών σε ιστούς και όργανα, αλλά και μύες που δεν δραστηριοποιούνται κατά την άσκηση. Τα όργανα αυτά υποβάλλονται σε μερική ισχαιμία εξαιτίας της μείωσης παροχής αίματος. Το

οξυγόνο είναι «αναγκασμένο» να αλληλεπιδράσει με τη διαρκώς ελλειπούμενη αναπνευστική αλυσίδα και αυτό ενισχύει την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Με το σταμάτημα της άσκησης, η αιμάτωση επανέρχεται στους υποξικούς ιστούς, με σκοπό την επαναοξυγόνωση. Το μιμητικό αυτό φαινόμενο, ισχαιμίας, υπεραιμάτωσης (γνωστό από τις περιπτώσεις ασθενών με έμφραγμα) προκαλεί εξαιρετική παραγωγή ελευθέρων ριζών (Goldfarb et al. 1993). Επιπρόσθετα, σημαντικά στοιχεία υποδηλώνουν την υπεραυξημένη δράση των ελευθέρων ριζών μετά από άσκηση σε παχύσαρκα άτομα (Saiki S, 2001).

Αντίθετα κάποιοι άλλοι, ισχυρίζονται ότι ενώ κατά την άσκηση όντως αυξάνεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών, το αντιοξειδωτικό σύστημα του οργανισμού είναι επαρκές και μπορεί να αντεπεξέλθει στην αυξημένη πρόσληψη οξυγόνου κατά την άσκηση (Mc Ardle, Katch & Katch 2000). Η καλή φυσική κατάσταση ενός ατόμου φαίνεται πως επιδρά ευεργετικά. Μετά από πειράματα σε νέους αλλά και ηλικιωμένους με αρκετά μεγάλη προπονητική ηλικία, οι διάφοροι δείκτες οξειδωτικού στρες, δεν έδειξαν κάποια εξάντληση του αντιοξειδωτικού συστήματος, ακόμα και όταν επαναλήφθηκαν πολλές συνεδρίες άσκησης (Bruunsgard H & Pedersen 2000). Σε γενικές γραμμές το αντιοξειδωτικό σύστημα ενός ατόμου επάγεται με τη συχνή άσκηση και επομένως μπορεί να αντεπεξέλθει στις αυξημένες απαιτήσεις για πρόσληψη οξυγόνου και η παραγωγή οξειδωτικού στρες είναι μειωμένη συγκριτικά με άλλα απροπόνητα άτομα.

ΕΛΛΕΙΨΗ ΕΝΖΥΜΟΥ G6PD

Η ανεπάρκεια της G6PD είναι κοινή κληρονομική ενζυμική διαταραχή που χρονολογείται από τον 5^ο π.Χ αιώνα. Περιγράφηκε στο παρελθόν σαν αναιμία της Βαγδάτης και κυάμωση, μια ευαισθησία στις γύρεις και τα κουκιά αντίστοιχα. Οι υποφέροντες πάσχοντες συχνά εμφανίζουν σημάδια ίκτερου με σκοτεινά και συχνά μαύρα ούρα (Senozan & Thielman 1991). Σήμερα εκτιμάται ότι 200 - 400 εκατομμύρια σε όλο τον κόσμο υποφέρουν από ανεπάρκεια της G6PD (Beutler E 1991).

Η ανεπάρκεια της G6PD δεν ήταν πολύ γνωστή μέχρι νωρίς το 1950 όταν χρησιμοποιήθηκε ο στρατός των Η.Π.Α. για να προσδιοριστεί η αιτία της ευαισθησίας σε κάποιο φάρμακο, η οποία εμφανιζόταν σε ποσοστό 15% στους μαύρους στρατιώτες (Senozan & Thielman 1991). Το φάρμακο αυτό ήταν η

πριμακίνη, ένα ανθελονοσιακό φάρμακο το οποίο είχε εισαχθεί στην αγορά το 1926 (Stryer L 1997).

Ένας από τους ερευνητές ο Carson ανακάλυψε ότι τα ερυθροκύτταρα των ευαίσθητων στο φάρμακο ασθενών, παρουσίαζαν ανεπάρκεια του ενζύμου G6PD (Senozan & Thielman 1991). Ακόμη και σήμερα η εκδήλωση της ανεπάρκειας της G6PD κατανοείται από τις συνέπειες της αιμόλυσης των ερυθροκυττάρων. Η αιμόλυση που επισυμβαίνει οφείλεται σε συνδυασμό ερυθροκυτταρικού (ένδοια G6PD) και εξωερυθροκυτταρικού αιτίου (οξειδωτικοί παράγοντες) (Παπαδημητρίου 1998).

Η G6PD είναι ένζυμο απαραίτητο για την επιβίωση του ερυθρο-κυττάρου, η βιολογική γήρανση του οποίου εξαρτάται από την μείωσή της. Όσο νεαρότερα είναι τα ερυθροκύτταρα τόσο μεγαλύτερη ποσότητα G6PD περιέχει (Παπαδημητρίου 1998). Στα ερυθροκύτταρα που πάσχουν από οξειδωτικό stress το 10% της γλυκόζης μεταβολίζεται στην αεροβική οδό της μονοφωσφορικής εξόζης. Αυτή η οδός μέσω του ενζύμου G6PD δίνει περισσότερο NADPH στα κύτταρα απαραίτητο στις αντιδράσεις διαφόρων βιοσυνθετικών μονοπατιών, στην σταθερότητα της καταλάσης και την αναγέννηση της γλουταθειόνης (GSH) από την οξειδωμένη γλουταθειόνη (Παπαδημητρίου 1998). Το NADPH, η καταλάση και η GSH είναι τα κύρια ενδογενή αντιοξειδωτικά του κυττάρου. Με τον τρόπο αυτό η G6PD είναι μια πηγή αναγόμενης ισχύος στη μορφή του ρυθμιστού σουλφυδριλίων (SH) η οποία διατηρεί την ακεραιότητα των SH των κυτταρικών μεμβρανικών πρωτεϊνών και τα SH των λιπιδίων και βοηθάει στην αποτοξίνωση από τις ελεύθερες ρίζες και υπεροξείδια (Τρακατέλλης 1992).

Η G6PD είναι ένα πολυπεπτίδιο 515 αμινοξέων δομημένο από αυτόνομες υπομονάδες με M.B 59.625 η κάθε μια. Το ένζυμο είναι πλούσιο σε σουλφυδριλικές ομάδες περιέχοντας έντεκα SHs ανά υπομονάδα (Senozan & Thielman 1991). Το γονίδιο βρίσκεται στη Xq 28 περιοχή του μακρού σκέλους του X χρωματοσώματος. Η νόσος είναι κληρονομική και φυλοσύνδετου τύπου. Η πλειοψηφία των μεταλλάξεων οφείλεται σε σημειακή μετάλλαξη και επιτρέπει την αντικατάσταση ενός αμινοξέος στον κώδικα δομής του γονιδίου για την G6PD. Η ανεπάρκεια της G6PD είναι ουσιαστικά μια ετερογενής κατάσταση (Mehta AB 1994).

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η έλλειψη G6PD έχει κατανομή στις χώρες της Μεσογείου και της Αφρικής όπου παλιά κατά κύριο λόγο ενδημούσε η ελονοσία.

Φαίνεται ότι είναι μια αντίσταση του οργανισμού για μη προσβολή του από το πλασμώδιο της ελονοσίας (*Plasmodium falciparum*) (Παπαδημητρίου 1998, Τρακατέλλης 1992). Η ανεπάρκεια λοιπόν της G6PD δημιουργεί ένα αφιλόξενο περιβάλλον για τα παράσιτα της ελονοσίας, αποθαρρύνοντας έτσι την επιβίωση των πρωτόζωων στα ερυθροκύτταρα (Τρακατέλλης 1992).

Υπάρχουν δύο τύποι ενζυμικής ανεπάρκειας: Αφρικάνικου(-A) και Μεσογειακού(-B). Τα άτομα με Αφρικάνικου τύπου ανεπάρκεια όπου τα δυκτιοκύτταρα και τα νεαρά ερυθροκύτταρα διατηρούν το 10% της ενεργότητας της G6PD είναι συνήθως ασυμπτωματικά μέχρι την έκθεσή τους σε οξειδωτικό στρες. Τα επεισόδια της αιμόλυσης είναι συνήθως σύντομα επειδή τα νεοπαραγόμενα ερυθροκύτταρα έχουν συχνά ενεργότητα G6PD, συγκρίσιμη με τα κανονικά. Αντιθέτως εκείνα του Μεσογειακού τύπου έχουν μειωμένη ενεργότητα G6PD ακόμη και στα νεαρά ερυθροκύτταρα με συνέπεια να υποφέρουν από πολλά σοβαρά αιμολυτικά επεισόδια (Senozan & Thielman 1991, Παπαδημητρίου 1998).

Η διάγνωση για την έλλειψη ενζύμου G6PD γίνεται σύμφωνα με την προτεινόμενη μέθοδο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO). Δηλαδή η μέτρηση ενεργότητας ενζύμου σε δείγμα αίματος. Υπάρχουν και άλλες αξιόπιστες μέθοδοι πάντα αφορώντας την ενεργότητα του ενζύμου G6PD στα ερυθροκύτταρα όπως αυτή του Beutler εκφρασμένη σε διεθνής μονάδες ανά gr αιμοσφαιρίνης (Hb) στους 37°C η οποία διαφέρει από τον WHO που γίνεται στους 25°C (Mehta AB 1994). Η θεραπεία έγκειται στην αποφυγή λήψης των βλαπτικών φαρμάκων και ουσιών, ενώ ευελπιστούμε στο μέλλον για γονιδιακή θεραπεία. Η έλλειψη G6PD έχει πρόσφατα ενοχοποιηθεί και για πολλές άλλες νόσους (όπως π.χ. οφθαλμικός καταρράχτης). Γι' αυτό το λόγο γίνονται εκτεταμένες μελέτες προς την κατεύθυνση αυτή για ταυτοποίηση.

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΕΛΛΕΙΨΗ ΕΝΖΥΜΟΥ G6PD

Όπως αναφέρθηκε η έλλειψη ενζύμου G6PD είναι η πιο συχνή ενζυμοπάθεια και εμφανίζεται σε πάνω από 200 εκατομμύρια στον κόσμο. Υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία που υποδεικνύουν πως τα άτομα τα οποία πάσχουν από έλλειψη ενζύμου παρουσιάζουν αυξημένο οξειδωτικό στρες σε διάφορους ιστούς. Jain (1998) αναφέρει σε μία εργασία πως τα άτομα τα οποία παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα G6PD και γλουταθειόνης παρουσιάζουν αυξημένη γλυκοσυλίωση

πρωτεϊνών, κυρίως αυτών που έχουν σχέση με τον κερατοειδή χιτώνα του ματιού. Αυτό, σύμφωνα με το συγγραφέα, ίσως να αποτελεί μία αιτία για αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καταρράκτη σε αυτά τα άτομα. Υπάρχουν επίσης αναφορές στη βιβλιογραφία που υποδεικνύουν πως όταν η ενεργότητα του ενζύμου είναι πολύ χαμηλή και οξειδωτικό στρες αυξημένο τότε αυτά τα άτομα μπορεί να οδηγηθούν σε αυξημένη καταστροφή των ερυθρών αιμοσφαιρίων και σαν συνέπεια αυτού να εμφανίσουν αιμολυτική αναιμία (Johnson et al. 1994). Ωστόσο, οι Newman et al. (1979) αναφέρουν πως άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD δεν παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα υπεροξειδωσίας των μεμβρανικών λιπιδίων των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Ένας από τους λόγους που τα άτομα με έλλειψη ενζύμου παρουσιάζουν μεγαλύτερη προδιάθεση για αυξημένο οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι και το γεγονός ότι αυτά τα άτομα παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών. Έχει αναφερθεί πως άτομα που παρουσιάζουν έλλειψη ενζύμου G6PD έχουν και χαμηλότερα επίπεδα βιταμίνης E, βιταμίνης C, καροτενοειδών και γλουταθειόνης (Chan et al. 1999).

Προσπάθειες έχουν γίνει να εξετάσουν ποια είναι η επίδραση της συμπληρωματικής λήψης βιταμίνης E στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες σε άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD. Ωστόσο, δεν υπάρχει ομοφωνία μεταξύ των ερευνητικών αποτελεσμάτων όσον αφορά την επίδραση της συμπληρωματικής λήψης βιταμίνης E στην παραγωγή οξειδωτικού στρες. Οι Eldamhough et al (1988) αναφέρουν πως η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E (800 IU ημερησίως) για 16 εβδομάδες από άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD επέφερε σημαντική μείωση στα επίπεδα αιμόλυσης. Αντίθετα, οι Newman et al. (1979) βρήκαν πως η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E από άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD δεν είχε καμία επίδραση στην άμυνα των ερυθρών αιμοσφαιρίων όταν αυτά υποβλήθηκαν σε δοκιμασία οξειδωτικού στρες *in vitro*. Όπως λοιπόν παρατηρείται δεν υπάρχει ομοφωνία σχετικά με την επίδραση της συμπληρωματικής λήψης βιταμίνης E στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες σε άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD.

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΣΚΗΣΗ ΣΕ ΑΤΟΜΑ ΜΕ ΕΛΛΕΙΨΗ ENZΥΜΟΥ G6PD

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η άσκηση αποτελεί ένα επιπλέον μέσο με το οποίο η παραγωγή οξειδωτικού στρες μπορεί να είναι μεγαλύτερη. Βέβαια, τα άτομα τα οποία πάσχουν από έλλειψη του ενζύμου G6PD, θεωρητικά, βρίσκονται σε μειονεκτικότερη θέση επειδή τα επίπεδα της γλουταθειόνης είναι μικρότερα, και επομένως υπολείπονται ένα από τα όπλα για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες κατά την άσκηση. Ωστόσο, δεν υπάρχουν επαρκείς αναφορές στην βιβλιογραφία που να υποδεικνύουν ποια είναι η απόκριση του οργανισμού ενός ατόμου που πάσχει από έλλειψη G6PD όταν ασκηθεί.

Οι μόνες περιπτώσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία είναι αυτές ατόμων που παρουσίασαν προβλήματα αιμόλυσης μετά από έντονη άσκηση. Οι Ninflali & Bresolin (1995) αναφέρουν πως ένα άτομο με έλλειψη ενζύμου G6PD παρουσίασε αυξημένη καταστροφή μυϊκού ιστού, η οποία ήταν εμφανής από τα αυξημένα επίπεδα μυοσφαιρίνης αλλά και από τα σκουρόχρωμα ούρα, μετά από ένα αγώνα ποδοσφαίρου. Οι Bresolin et al. (1989) αναφέρουν επίσης, πως ένα άτομο με έλλειψη ενζύμου G6PD παρουσίασε συμπτώματα σημαντικής μυϊκής καταστροφής όταν πραγματοποίησε έντονη μυϊκή άσκηση. Ωστόσο, το ποδόσφαιρο είναι ένα άθλημα το οποίο διαρκεί 90 λεπτά, ενώ ο μεταβολισμός του χαρακτηρίζεται τόσο από αερόβιες αλλά και αναερόβιες προσπάθειες, που σε ορισμένες περιπτώσεις αγγίζουν το 100% της μέγιστης αερόβιας ικανότητας (VO_{2max}). Επομένως, δεν είναι γνωστό ποια είναι η επίδραση της αερόβιας άσκησης, μέτριας έντασης στην παραγωγή οξειδωτικού στρες σε άτομα με έλλειψη G6PD, κάτι που πραγματεύεται η συγκεκριμένη έρευνα.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΕΣ

Στην εν λόγω μελέτη έλαβαν μέρος 9 άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD (8 άνδρες, 1 γυναίκα) και 9 άτομα με φυσιολογικά επίπεδα G6PD (8 άνδρες, 1 γυναίκα). Οι συμμετέχοντες δεν παίρνανε αντιφλεγμονώδη φάρμακα ή συμπληρώματα διατροφής εκτός της συμπληρωματικής λήψης της βιταμίνης E, ως μέρος του πειράματος, για 4 εβδομάδες 800 IU ημερησίως. Τα χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων φαίνονται αναλυτικά στον πίνακα 1. Οι συμμετέχοντες διάβασαν και υπέγραψαν ένα ενημερωτικό συμφωνητικό (Συναίνεση δοκιμαζομένου, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α σελ. 55), το οποίο ήταν σύμφωνο με τη διακήρυξη του Ελσίνκι για την ηθική μεταχείριση ανθρώπων συμμετεχόντων σε ερευνητικές μελέτες.

ΣΩΜΑΤΟΔΟΜΗ

Με την είσοδό τους στο εργαστήριο οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε μετρήσεις για την αξιολόγηση της σωματοδομής. Πιο συγκεκριμένα μετρήθηκε το βάρος, το ύψος, και το ποσοστό λίπους. Η μέτρηση του βάρους και του ύψους πραγματοποιήθηκε σε ζυγαριά ακριβείας (Gynpau, USA), στην οποία υπήρχε και αναστημόμετρο, της οποίας η βαθμονόμηση γινόταν πριν από κάθε μέτρηση.

Ο προσδιορισμός του ποσοστού λίπους έγινε με τη μέθοδο των 7 δερματοπτυχών με δερματοπτυχόμετρο (HARPENDEN, ENGLAND). Η αρχή της συγκεκριμένης μελέτης βασίζεται στο γεγονός ότι το ποσό 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%. Οι δερματοπτυχές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν είναι οι παρακάτω, όπως προβλέπει η εν λόγω μέθοδος σε συγκεκριμένα ανατομικά σημεία του σώματος: 1. κοιλιά 2. τρικέφαλος 3. στήθος/θώρακας 4. μεσομασχαλαία 5. υποπλάτιος 6. υπερλαγόνιος 7. μηρός. Για κάθε δερματοπτυχή πραγματοποιήθηκαν διπλές μετρήσεις ενώ όλες πραγματοποιήθηκαν στη δεξιά πλευρά του σώματος του συμμετέχοντα. Ακολουθήθηκαν οι αρχές της Αμερικάνικης Αθλητιατρικής Εταιρείας (American College of Sports Medicine, ACSM Guidelines, 2000) για να προσδιοριστεί η

πυκνότητα του σώματος. Το ποσοστό λίπους προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση του Siri (Siri SA 1961).

ΑΣΚΗΣΗ

Μετά τη διαδικασία της αξιολόγησης της σωματοδομής ο συμμετέχοντας ξεκουραζόταν καθιστός στο εργαστήριο για μισή ώρα πριν να τρέξει για 45 λεπτά στο δαπεδοεργόμετρο (POWERJOG GXC200, USA). Ένας ηλεκτρονικός παλμογράφος, που συνοδεύεται από οθόνη ένδειξης χειρός (polar tester) προσαρμοζόταν στο στήθος του κάθε συμμετέχοντα, έτσι ώστε να υπάρχουν καθ' όλη τη διάρκεια της άσκησης τιμές καρδιακής συχνότητας. Η ένταση της άσκησης με την οποία έπρεπε να ασκούνται οι δοκιμαζόμενοι ήταν μεταξύ 70-75% της μέγιστης καρδιακής συχνότητας (ΜΚΣ). Η ΜΚΣ προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση ΜΚΣ = 220-ηλικία.

Σύμφωνα με τις οδηγίες άσκησης της Αμερικανικής Αθλητιατρικής Εταιρείας, το 70-75% της ΜΚΣ αντιστοιχεί στο 50-60% της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (VO₂max). Για να επιβεβαιωθεί η ένταση με την οποία ασκούνταν οι ασκούμενοι πραγματοποιήθηκε ένα υπομέγιστο τεστ πρόβλεψης της VO₂max. Το τεστ αυτό πραγματοποιούνταν στην αρχή της άσκησης των 45 λεπτών και κατά τη διάρκεια αυτού οι δοκιμαζόμενοι βιάδιζαν στο δαπεδοεργόμετρο με μια σταθερή ταχύτητα (2.0-4.5 mph) και με κλίση 5% για 4 λεπτά. Στο τέλος της περιόδου των 4 λεπτών προσδιοριζόταν η καρδιακή συχνότητα και χρησιμοποιείτο η παρακάτω εξίσωση για την πρόβλεψη της VO₂max:

$$VO_{2max} = 48.3502 + [10.0651 \times \text{γένος (άνδρας}=1, \text{ γυναίκα}=0)] - (0.2769 \times \text{ηλικία}) - (0.2088 \times \text{βάρος}) + [10.1168 \times \text{ταχύτητα (mph)}] - [0.1633 \times \text{ΚΣ(καρδιακούς σφυγμούς/λεπτό)}].$$

Για να διαπιστωθεί το ποσοστό της VO₂max με το οποίο ασκούνταν οι συμμετέχοντες, χρησιμοποιήθηκε ένας αναλυτής αερίων (Vmax29, Sensormedics, USA) στον οποίο κάθε πέντε λεπτά παίρνονταν δείγματα εισπνεόμενου και εκπνεόμενου αέρα για να διαπιστωθεί η VO₂max, το αναπνευστικό πηλίκο και ο πνευμονικός αερισμός. Τροποποιήσεις στην ταχύτητα και στην κλίση του δαπεδοεργομέτρου γινόταν, ώστε τα άτομα να τηρούν το 70-75% της

προκαθορισμένης ΜΚΣ. Για να αποφευχθούν αλλαγές στον όγκο πλάσματος εξαιτίας της εφίδρωσης οι συμμετέχοντες έπιναν τουλάχιστον 500 ml νερού.

Μετά το τέλος της άσκησης και σε χρόνο λιγότερο από 2 λεπτά μετά το πέρας αυτής γινόταν η 2^η αιμοληψία. Ακριβώς η ίδια διαδικασία αξιολογήσεων της σωματοδομής και της άσκησης πραγματοποιήθηκε και μετά το πέρας της συμπληρωματικής λήψης της βιταμίνης Ε.

ΤΡΙΗΜΕΡΗ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες στο πείραμα να καταγράψουν εντός 4 εβδομάδων λήψης της βιταμίνης Ε, την ποιοτική και ποσοτική διατροφική ανάλυση τριών ημερών με ελεύθερη διατροφή. Αυτό έγινε για να καταγράψουμε την ποσότητα πρόσληψης εξωγενούς βιταμίνης Ε και τη συσχέτισή της με τα τελικά αποτελέσματα.

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Όπως προαναφέρθηκε, μετά την πραγματοποίηση των μετρήσεων της σωματοδομής και πριν να ξεκινήσει η άσκηση πραγματοποιήθηκε αιμοληψία φλεβικού αίματος από τη βασιλική ή μεσοβασιλική ή κεφαλική φλέβα των άκρων ενώ ο συμμετέχων βρισκόταν στην ύπτια θέση. Τηρήθηκαν όλοι οι προβλεπόμενοι κανόνες ασηψίας, αντισηψίας, ενώ τα υλικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν μιας χρήσης για την αποφυγή μολύνσεων. Σε κάθε αιμοληψία λαμβάνονταν 10ml αίματος, το οποίο προοριζόταν για τις εξής εξετάσεις:

1. μέτρηση ενεργότητας ενζύμου G6PD
2. μέτρηση αιματοκρίτη
3. μέτρηση αιμοσφαιρίνης
4. ανάλυση για ανίχνευση σωματιδίων Heinz
5. μέτρηση LPO (υπεροξειδία λιπιδίων)
6. μέτρηση GSH/GSSG (ανηγμένη/οξειδωμένη γλουταθειόνη)

ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ G6PD

Η ενεργότητα της G6PD μετρήθηκε χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια τα οποία αγοράστηκαν από τη φαρμακευτική εταιρεία Sigma (SIGMA #525). Η ενεργότητα μετρήθηκε σε ολικό αίμα ενώ όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Διαδικασία

1. Προετοιμάζουμε το μείγμα της αντίδρασης:
Χρησιμοποιώντας μονό φιαλίδιο χημικής ανάλυσης NO. 345-1
 - α) Προσθέτουμε 0.01mL αίματος κατευθείαν σε φιαλίδιο που περιέχει διάλυμα χημικής ανάλυσης G-6-PDH και αναμειγνύουμε έτσι ώστε να διασκορπίσουμε τα ερυθροκύτταρα. Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου (18-26°C) για 5-10 λεπτά.
 - β) Προσθέτουμε 2 mL διάλυμα υποστρώματος G-6-PDH κατευθείαν σε φιαλίδιο και αναμειγνύουμε προσεκτικά με ανατροπή αρκετές φορές.
 - γ) Μεταφέρουμε το περιεχόμενο του φιαλιδίου σε κιουβέττα, ονομασμένη TEST.
2. Τοποθετούμε την κιουβέττα σε σταθερή θερμοκρασία ή υδατόλουτρο και επωάζουμε για περίπου 5 λεπτά έτσι ώστε να επιτύχουμε θερμική ισορροπία.
3. Διαβάζουμε και καταγράφουμε την απορροφητικότητα (A) του TEST στα 340nm ενάντια σε νερό ή Potassium Dichromate Solution. Αυτό είναι INITIAL A (αρχικό A) (Αν χρησιμοποιούμε υδατόλουτρο ή επώαση, οι κιουβέττες επιστρέφονται σε αυτό).
4. Ακριβώς 5 λεπτά μετά, ξαναδιαβάζουμε και καταγράφουμε την απορροφητικότητα. Αυτό είναι FINAL A (τελικό A).

Υπολογισμοί

$$\text{Μεταβολή A ανά λεπτό} = \frac{\text{Τελικό A} - \text{Αρχικό A}}{5}$$

$$\begin{aligned} \text{G-6-PDH (U/g Hb)} &= \Delta A \text{ per min} \times \frac{100 \times 3.01}{0.01 \times 6.22 \times \text{Hb}_{(\text{g/dL})}} \times \text{TCF} = \\ &= \Delta A \text{ per min} \times \frac{4839}{\text{Hb}_{(\text{g/dL})}} \times \text{TCF} \end{aligned}$$

Όπου:

100 = Παράγοντας για τη μετατροπή της δραστηριότητας σε 100mL

3.01 = Ολικός όγκος αντίδρασης (mL)

0.01 = Όγκος δείγματος (mL)

6.22 = Μιλλιμοριακή ικανότητα απορρόφησης του NADPH στα 340nm

Hb (g/dL) = Συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης καθοριζόμενη από κάθε συστατικό

TCF = Παράγοντας διόρθωσης θερμοκρασίας (1 στους 30°C)

ΑΙΜΑΤΟΚΡΙΤΗΣ-ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ

Αναλυτικότερα, για τις αναλύσεις αιματοκρίτη, αιμοσφαιρίνης και σωματιδίων Heinz ολικό αίμα (3ml) τοποθετείτο σε φιαλίδιο το οποίο περιείχε αντιπηκτικό (K3 EDTA). Η γενική αίματος, ο αιματοκρίτης και η αιμοσφαιρίνη μετρήθηκαν σε αυτόματο αναλυτή τύπου SYSMEX NE 1500 με αντιδραστήρια της ίδιας εταιρείας. Όλες οι γενικές αίματος έγιναν στον ίδιο αιματολογικό αναλυτή για να υπάρχει κοινό μέτρο σύγκρισης. Σε κάθε συμμετέχοντα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, έγιναν 4 αιμοληψίες. Η πρώτη αιμοληψία πραγματοποιήθηκε πριν την έναρξη της άσκησης, η δεύτερη μετά το τέλος της άσκησης, η τρίτη αιμοληψία έγινε μετά το πέρας των 4 εβδομάδων συμπληρωματικής λήψης βιταμίνης E και πριν της έναρξη της άσκησης και η τέταρτη μετά το τέλος της άσκησης των 45 λεπτών.

ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ HEINZ

Κατά την αναζήτηση έγκλειστων χωρίς επώαση αναμείχθηκε ίση ποσότητα ολικού αίματος (3 σταγόνες) και χρωστικής Methyl – Violet (3 σταγόνες) και επιστρώθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα μετά παρέλευσης χρόνου 30 λεπτών.

Κατά την αναζήτηση έγκλειστων με επώαση, αναμείχθηκε 500ml ολικού αίματος και 10ml νιτρώδους νατρίου και αφού επώαστηκαν στο υδατόλουτρο (37° C) για 30 λεπτά αναμείχθηκε ίση ποσότητα του ανωτέρου μείγματος με χρωστική (3 σταγόνες) και 3 σταγόνες Methyl – Violet και επιστρώθηκε σε αντικειμενοφόρο πλάκα μετά από παρέλευση 30 λεπτών.

Όλα τα ανωτέρω πραγματοποιούνται σε περιπτώσεις Μεσογειακών Αναιμιών τύπου – β, δβ, -γδβ, α, Lepore ή Πύλος. Η ίδια ακριβώς τεχνική εφαρμόστηκε για αναζήτηση έγκλειστων στα δείγματα αίματος που εξετάσαμε.

Στη συνέχεια παρατηρούμε την ύπαρξη ή μη έγκλειστων στο μικροσκόπιο με τη μέθοδο σάρωσης σε μεγέθυνση 10X100. Σημειώνουμε ότι έγινε τροποποίηση στη μεθοδολογία και ως προς την ποσότητα του Νιτρώδους Νατρίου πριν την επώαση και

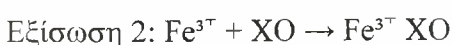
ως προς την ποσότητα της χρωστικής Methyl – Violet με και χωρίς επώαση, για να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη ή μη έγκλειστων σωματιδίων Heinz.

ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΑ ΛΙΠΙΔΙΩΝ (LPO)

Τα υπεροξειδία των λιπιδίων (LPO) μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια (LPO-560) τα οποία αγοράστηκαν από τη φαρμακευτική εταιρεία OXIS Research. Η χημική ανάλυση BIOXYTECH LPO-560 είναι βασισμένη στην οξείδωση σιδηρούχων σε σιδηρικά ιόντα από υδρουπεροξειδία κάτω από όξινες συνθήκες,



Το σιδηρικό ιόν συνδέεται με τη χρώση του δείκτη, xynenol orange, για να σχηματιστεί ένα σταθερό σύνθετο χρώμα,



Η σύνθετη ένωση μπορεί να μετρηθεί στα 500nm.

Προετοιμασία

Για κάθε δείγμα (συμπεριλαμβανομένων και control), σημειώνουμε - ονομάζουμε 2 σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης, τον έναν TEST και τον άλλο BLANK(κενό). Ονομάζουμε έναν σωλήνα για κάθε έλεγχο αντιδρώντος που πρόκειται να ελεγχθεί.

Χημική ανάλυση:

1. Προσθέτουμε 10μL του ενζύμου σε κάθε σωλήνα
2. Προσθέτουμε 90μL πλάσματος

Σημείωση: Για το Reagent control, χρησιμοποιούμε εξουδετερωτικό σαν δείγμα.

3. Ανακατεύουμε και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
4. α) Προσθέτουμε 10μL Reducing Agent σε κάθε σωλήνα με το όνομα BLANK.
β) Προσθέτουμε 10μL απιονισμένο νερό σε κάθε σωλήνα με το όνομα TEST.
5. Σκεπάζουμε και αναμειγνύουμε το δείγμα με περιδίνηση και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
6. Προσθέτουμε 900μL working Reagent σε κάθε σωλήνα.
7. Σκεπάζουμε και περιδινίζουμε το δείγμα για 30 δευτερόλεπτα. Μετά επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 60 λεπτά.
8. Γίνεται φυγοκέντρωση στις 10.000 – 12.000 x g για 10 λεπτά.

9. Μηδενίζουμε το φασματοφωτόμετρο με απιονισμένο νερό.
10. Μεταφέρουμε υπερκείμενο σε φασματοφωτομετρικές κιουβέττες και μετράμε την απορρόφηση στα 560nm.

Υπολογισμοί

1. Αφαιρούμε την απορρόφηση κάθε δείγματος BLANK, από την τιμή του δείγματος TEST για να πάρουμε την απόλυτη απορρόφηση (Net A560).
2. Η συγκέντρωση των υδρουπεροξειδίων στην σύνθεση της αντίδρασης υπολογίζεται από την απόλυτη απορρόφηση και την προφανή μοριακή εξαφάνιση συνεργών υδρουπεροξειδίων από $4.31 \times 10^3 \times 10 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ χρησιμοποιώντας την εξίσωση $[\text{LOOH}] = (\text{Net A560}/\epsilon) - \theta$

Όπου: $[\text{LOOH}]$ = Η συγκέντρωση των υδρουπεροξειδίων λιπιδίων στο δείγμα (μM).

Net A560 = Απόλυτη απορρόφηση στα 560nm

$\epsilon = 0.0431 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

θ = Παράγοντας διάλυσης = 11.2 (1.010 $\mu\text{L}/0.090\text{mL}$).

ΜΕΤΡΗΣΗ ΑΝΗΓΜΕΝΗΣ/ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗΣ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗΣ (GSH/GSSG)

Η ανηγμένη και η οξειδωμένη γλουταθειόνη μετρήθηκαν χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια (GSH/GSSG-412) τα οποία αγοράστηκαν από τη φαρμακευτική εταιρεία OXIS Research. Η ακριβής μέτρηση των επιπέδων της GSSG έχει αποδειχθεί πολύ δύσκολη εξαιτίας των χαμηλών ποσοτήτων της GSSG στους ιστούς και εξαιτίας της απουσίας κατάλληλων μεθόδων για την αποτροπή οξείδωσης της GSH σε GSSG κατά τη διάρκεια προετοιμασίας των δειγμάτων. Για να μετρήσουμε τη GSSG στους ιστούς, οι Guntherberg και Rost πρώτοι εισήγαγαν την N-αιθυλομαλεϊμίδιο για να εξαλείψουν την GSH. Αν και η NEM μπορεί να αντιδράσει με την GSH για να σχηματίσουν μια σταθερή σύνθεση και να εμποδιστεί η συμμετοχή της ανηγμένης μορφής στην χημική ανάλυση, η NEM εμποδίζει επίσης και τη GR. Γι' αυτό το λόγο ο Griffith πρώτος εισήγαγε την 2-vinylpyridine (2-VP) η οποία δεν εμποδίζει τη GR σημαντικά στο να ανάγει τη GSH. Όμως η αντίδραση της 2-VP είναι σχετικά αργή και το αντιδρόν έχει μικρή διαλυτότητα σε υδατικό μέσο.

Η χημική ανάλυση των GSH/GSSG-412 χρησιμοποιεί thiol-scavenging reagent 1 methyl - 2 - vinylpyridinium trifluoromethane – sulfonate (M2VP) σε ένα επίπεδο όπου ραγδαία ανιχνεύει τη GSH, αλλά δεν παρεμβάλλεται με την ανάλυση της GR.

Η 2-VP στα 10mM, συνήθως αποσύρεται κατά 70% από τη GSH στα 60 λεπτά, κατά το οποίο διάστημα μπορεί να επισυμβεί οξείδωση της GSH, με αποτέλεσμα να υπολογιστούν σημαντικά μεγαλύτερα ποσά GSSG από το κανονικό. Με τη χρησιμοποίηση M2VP, η ολοκληρωμένη ανίχνευση GSH επιτυγχάνεται σε λιγότερο από 1 λεπτό.

Στα 1969, ο Tietze πρώτος εισήγαγε μια ενζυματική μέθοδο για ποσοτικό καθορισμό ολικής γλουταθειόνης. Η μέθοδος χρησιμοποιεί το Ellman's reagent (5.5'-dithiobis – 2 nitrobenzoic acid ή DTNB), το οποίο αντιδρά με τη GSH για να σχηματίσει ένα προϊόν το οποίο μπορεί να ανιχνευθεί φασματοφωτομετρικά στα 412nm. Η GSH μπορεί να προσδιοριστεί από τη μετατροπή της GSSG σε GSH, η οποία μετά προσδιορίζεται με την αντίδραση με το Ellman's reagent. Εν συντομία, η μέθοδος Tietze χρησιμοποιεί την ανάπτυξη της αλλαγής χρώματος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και το ποσοστό της αντίδρασης είναι αναλογικό για τις συγκεντρώσεις GSH και GSSG.

Προετοιμασία δείγματος GSSG

1. Προσθέτουμε 10μL M2VP σε ένα σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης (Συνιστώμενα).
2. Προσεκτικά προσθέτουμε 100μL ολικού αίματος στον πάτο του σωλήνα.
3. Ανακατεύουμε προσεκτικά.
4. Παγώνουμε το δείγμα στους -70° C (Το δείγμα παραμένει σταθερό για τουλάχιστον 30 μέρες στους -70° C).
5. Ξεπαγώνουμε το δείγμα και αναδεύουμε αμέσως, επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2-10 λεπτά.
6. Προσθέτουμε 250μL κρύου 5% MPA στο σωλήνα (Αραιωμένο, διαλυμένο κατά $\frac{1}{4}$ του αρχικού δείγματος).
7. Περιδινίζουμε το δείγμα για 15-20 δευτερόλεπτα.
8. Γίνεται φυγοκέντρωση στις 1000 x g ή μεγαλύτερη ταχύτητα για 10 λεπτά.
9. Προσθέτουμε 50μL απόσταγμα MPA σε 700μL εξουδετερωτικό GSSG(Αραιωμένο κατά $\frac{1}{5}$ του όξινου αποστάγματος).

10. Τοποθετούμε το αραιωμένο απόσταγμα σε πάγο μέχρι τη χρησιμοποίηση (Η αραιώση του τελικού δείγματος είναι 1/60).

GSSG BLANK

1. Προσθέτουμε 50 μL MPA σε 700 μL εξουδετερωτικό GSSG (Αραιωμένο κατά 1/15 του όξινου αποστάγματος)
2. Τοποθετούμε το αραιωμένο MPA σε πάγο μέχρι τη χρησιμοποίηση (Η τελική αραιώση δείγματος είναι 1/60).

GSH

1. Προσεχτικά προσθέτουμε 50 μL αίματος στον πάτο ενός φυγοκεντρικού σωλ.
2. Ψύχουμε το δείγμα στους -70°C (Το δείγμα παραμένει σταθερό για τουλάχιστον 30 μέρες στους -70°C).
3. Ξεπαγώνουμε το δείγμα και το ανακατεύουμε αμέσως.
4. Προσθέτουμε 350 μL κρύο 5% MPA στο σωλήνα (Αραιωμένο κατά 1/8 του αρχικού δείγματος).
5. Περιδινίζουμε το δείγμα για 15-20 δευτερόλεπτα.
6. Κάνουμε φυγοκέντρηση στις 1000 x g ή μεγαλύτερη ταχύτητα για 10 λεπτά.
7. Προσθέτουμε 50 μL απόσταγμα μεταφωσφορικού οξέος (MPA) σε 3mL εξουδετερωτικό χημικής ανάλυσης (Αραιωμένο κατά 1/61 του όξινου αποστάγματος).
8. Τοποθετούμε το αραιωμένο απόσταγμα στον πάγο μέχρι την χρησιμοποίηση (Η αραιώση του τελικού δείγματος είναι 1/488).

Χημική Ανάλυση

1. Προσθέτουμε 200 μL των σταθερών (standards), κενά ή δείγματα στις κιουβέττες.
2. Προσθέτουμε 200 μL Chromogen σε κάθε κιουβέττα.
3. Προσθέτουμε 200 μL αναγωγή της γλουταθειόνης σε κάθε κιουβέττα.
4. Ανακατεύουμε και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
5. Προσθέτουμε 20 μL NADPH σε κιουβέττα.
6. Καταγράφουμε την αλλαγή απορροφητικότητας στα 412nm για 3 λεπτά.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

A 2X2 MANOVA (group X time) χρησιμοποιήθηκε για να εξετάσει τυχόν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ομάδων (έλλειψη ενζύμου και φυσιολογικά άτομα) και μεταξύ των καταστάσεων (κατάσταση μη-λήψης βιταμίνης E και κατάσταση λήψης βιταμίνης E). Διαφορές μεταξύ πριν και μετά την άσκηση εξετάστηκαν διαμέσου paired t-test. Οι τιμές παρουσιάζονται σαν μέσος όρος \pm τυπικό σφάλμα μέσου όρου ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΩΝ

Στην εργασία έλαβαν μέρος 18 συνολικά άτομα τα οποία ήταν χωρισμένα σε δύο ομάδες των εννέα ατόμων. Ο μέσος όρος ηλικίας, το ύψος, το βάρος, το ποσοστό λίπους, η μέγιστη καρδιακή συχνότητα, η καρδιακή συχνότητα της άσκησης και το ποσοστό της καρδιακής συχνότητας άσκησης των συμμετεχόντων εμφανίζονται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1: Προσωπικά στοιχεία και στοιχεία άσκησης των συμμετεχόντων

Μεταβλητή	Έλλειψη	Φυσιολογικά
Ηλικία	29.1 ± 9.1	29.0 ± 6.0
Ύψος	175 ± 8	175 ± 9
Βάρος	75.9 ± 16.4	73.8 ± 29.3
% Λίπους	17.6 ± 8.1	18.4 ± 4.9
ΜΚΣ	190.8 ± 9.0	191 ± 6.0
% ΜΚΣ	77.3 ± 4.2	78.6 ± 2.7

G6PD

Τα αποτελέσματα των δειγμάτων έδειξαν πως η ομάδα με έλλειψη ενζύμου G6PD είχε σημαντικά μικρότερα επίπεδα G6PD συγκριτικά με την ομάδα με την ομάδα των φυσιολογικών ατόμων. Πιο συγκεκριμένα, η πρώτη ομάδα είχε μία μέση τιμή επιπέδων G6PD ίση με 0.41 ± 0.5 U/g Hb ενώ η δεύτερη ομάδα είχε μία μέση τιμή που ήταν ίση με 8.8 ± 1.7 U/g Hb.

Πίνακας 2: Μέση τιμή επιπέδων ενεργότητας G6PD (U/g Hb) των συμμετεχόντων

Μεταβλητή	Έλλειψη	Φυσιολογικά
Ενεργότητα G6PD	0.41 ± 0.16 U/g	8.8 ± 0.57 U/g

ΔΕΛΟΜΕΝΑ ΑΣΚΗΣΗΣ

Τα προσωπικά στοιχεία και τα στοιχεία άσκησης δεν ήταν διαφορετικά όταν πραγματοποιήθηκε η δεύτερη προπόνηση και αυτό φαίνεται και στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Προσωπικά στοιχεία και στοιχεία άσκησης των συμμετεχόντων πριν και μετά τη λήψη βιταμίνης E

Μεταβλητή	Έλλειψη	Έλλειψη μετά τη βιταμίνη E	Φυσιολογικά	Φυσιολογικά μετά τη βιταμίνη E
Βάρος	75.9 ± 16.4	76.2 ± 15.9	73.8 ± 29.3	80.1 ± 15.2
% Λίπους	17.6 ± 8.1	18.4 ± 7.8	18.4 ± 4.9	18.7 ± 4.8
% ΜΚΣ	77.3 ± 4.2	77.3 ± 5.0	78.6 ± 2.7	78.9 ± 3.4

ΑΙΜΑΤΟΚΡΙΤΗΣ-ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ

Η διαφορά στα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη δεν ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ της ομάδας με έλλειψη ενζύμου G6PD και της ομάδας των ατόμων με φυσιολογικά επίπεδα G6PD. Επίσης η άσκηση δεν επέφερε σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη, κάτι που υποδεικνύει πως η άσκηση δεν οδήγησε σε σημαντική μεταβολή του όγκου του πλάσματος. Τέλος, η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E δεν επηρέασε τα επίπεδα της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη τόσο στην ομάδα με έλλειψη ενζύμου G6PD όσο και στην ομάδα των φυσιολογικών ατόμων.

ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ HEINZ

Η αναζήτηση εγκλειστών σωματιδίων Heinz είναι μέθοδος ποιοτικού προσδιορισμού και βασίζεται στην αναγνώριση αδέσμευτων α και β αλυσίδων σε ετερόζυγες μορφές, β ή α μεσογειακής αναιμίας αντίστοιχα και πιθανόν έλλειψης ενζύμου G6PD. Στις περιπτώσεις των ανωτέρω μεσογειακών αναιμιών τα σωματίδια Heinz είναι εμφανέστατα σε όλη της επιφάνεια των ερυθρών αιμοσφαιρίων.

Η ποιοτική ανάλυση που έγινε σε όλα τα δείγματα έδωσε αρνητικά αποτελέσματα σχετικά με την εμφάνιση σωματιδίων Heinz. Δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση σωματιδίων Heinz τόσο πριν από την άσκηση όσο και αμέσως μετά από

την άσκηση. Αυτή η παρατήρηση ισχύει τόσο για την ομάδα με έλλειψη ενζύμου G6PD όσο για την ομάδα των φυσιολογικών ατόμων.

Σειρά από φωτογραφίες ερυθρών αιμοσφαιρίων στα άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Εικόνα 1



Εικόνα 2



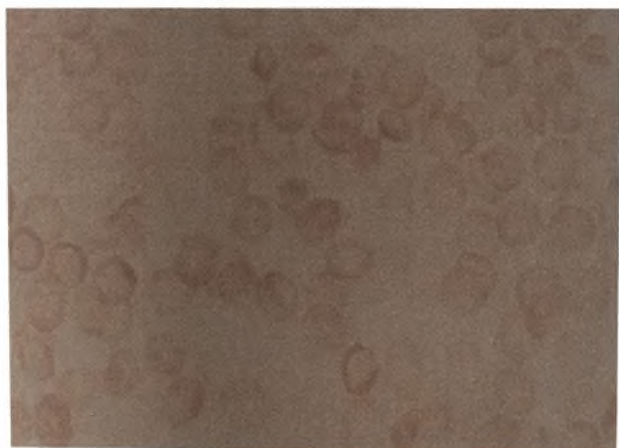
Εικόνα 3



Εικόνα 4



Εικόνα 5



Εικ.1 = σωματίδια Heinz.

Εικ.2 = έλλειψη ενζύμου πριν την άσκηση χωρίς συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E.

Εικ.3 = έλλειψη ενζύμου μετά την άσκηση χωρίς συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E.

Εικ.4 = έλλειψη ενζύμου πριν την άσκηση και μετά τη συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E.

Εικ.5 = έλλειψη ενζύμου μετά την άσκηση και μετά τη συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E.

Πίνακας 4: Τιμές αιμοσφαιρίνης (g/dl) πριν και μετά την άσκηση

	Πριν	Μετά
G6PD Vit E-	14.4 (1.2)	14.5 (1.5)
G6PD Vit E+	14.6 (1.1)	14.7 (1.4)
Φυσ/κα Vit E-	15.2 (1.1)	15.4 (1.2)
Φυσ/κα Vit E+	15.4 (1.1)	15.5 (1.5)

G6PD Vit E-: Άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD πριν τη συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E, G6PD Vit E+: Άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD μετά τη συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E, Φυσ/κα Vit E-: Φυσιολογικά άτομα πριν τη συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E, Φυσ/κα Vit E+: Φυσιολογικά άτομα μετά τη συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E.

Πίνακας 5: Τιμές αιματοκρίτη (%) πριν και μετά την άσκηση

	Πριν	Μετά
G6PD Vit E-	43.8 (3.9)	44.1 (3.6)
G6PD Vit E+	43.5 (3.0)	43.6 (3.6)
Φυσ/κα Vit E-	46.2 (2.8)	45.9 (4.2)
Φυσ/κα Vit E+	46.5 (3.5)	46.5 (4.1)

ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΑ ΛΙΠΙΔΙΩΝ (LPO)

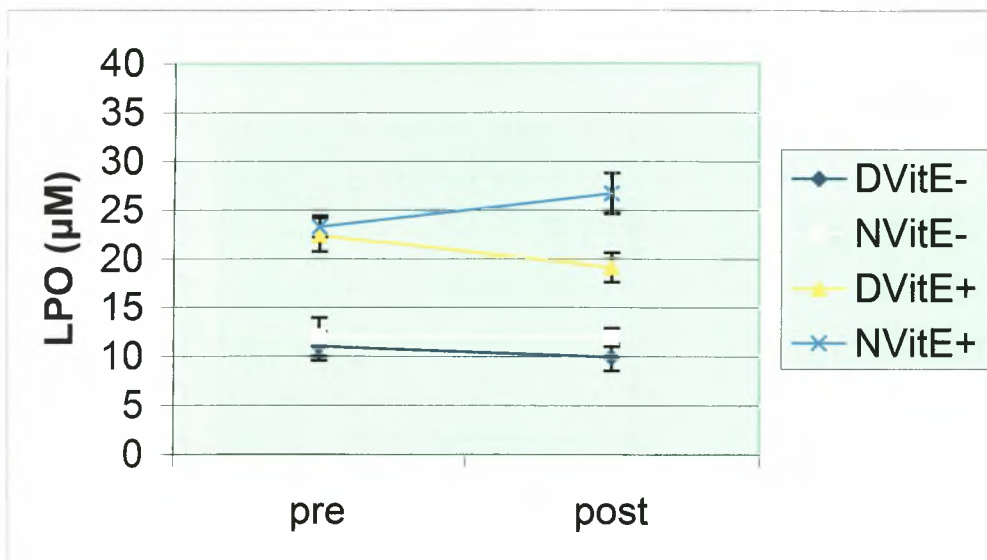
Η διαφορά στα επίπεδα των υπεροξειδίων των λιπιδίων δεν ήταν στατιστικά σημαντική μεταξύ της ομάδας με έλλειψη ενζύμου G6PD και της ομάδας των ατόμων με φυσιολογικά επίπεδα G6PD. Επίσης η άσκηση δεν επέφερε σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα των υπεροξειδίων των λιπιδίων. Τέλος, η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα υπεροξειδίων των λιπιδίων τα οποία ήταν στατιστικά σημαντικά τόσο στην ομάδα με έλλειψη ενζύμου G6PD όσο και στην ομάδα των φυσιολογικών ατόμων.

Πίνακας 6: Τιμές υπεροξειδίων των λιπιδίων (μM) πριν και μετά την άσκηση και μετά από συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E

	Πριν	Μετά
G6PD Vit E-	11.0 (1.3)	9.9 (1.2)
G6PD Vit E+	22.5 (1.7)	19.1 (1.3)*
Φυσ/κα Vit E-	12.1 (1.9)	12.0 (0.9)
Φυσ/κα Vit E+	23.3 (1.7)	26.7 (1.5)#

*: Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα G6PD Vit E-

#: Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα G6PD Vit E+



ΑΝΗΓΜΕΝΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSH)

Η διαφορά στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης πριν από την άσκηση μεταξύ της ομάδας με έλλειψη ενζύμου G6PD και της ομάδας των ατόμων με φυσιολογικά επίπεδα G6PD ήταν στατιστικά σημαντική. Επίσης η άσκηση δεν επέφερε σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης τόσο στην ομάδα με έλλειψη του ενζύμου όσο και στην ομάδα με φυσιολογικά επίπεδα G6PD. Τέλος, η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα ανηγμένης γλουταθειόνης, τα οποία ήταν στατιστικά σημαντικά τόσο στην ομάδα με έλλειψη ενζύμου G6PD όσο και στην ομάδα των φυσιολογικών ατόμων.

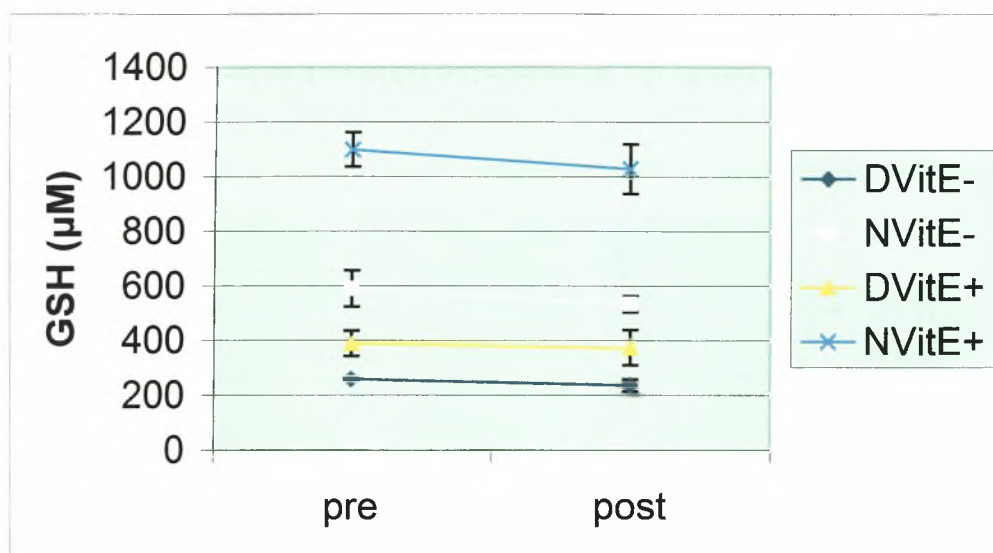
Πίνακας 7: Τιμές ανηγμένης γλουταθειόνης (μM) πριν και μετά την άσκηση και μετά από συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E

	Πριν	Μετά
G6PD Vit E-	259.7 (9.3)	236.2 (21.7)
G6PD Vit E+	388.4 (66.7)	373.8 (29.6)*
Φυσ/κα Vit E-	589.4 (47.0)	533.4 (63.8)*#
Φυσ/κα Vit E+	1098.5 (62.5)	1028.0 (91)*#&

*: Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα G6PD Vit E-

#: Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα G6PD Vit E+

&: Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα Φυσ/κα Vit E-



ΟΞΕΙΔΩΜΕΝΗ ΓΛΟΥΤΑΘΕΙΟΝΗ (GSSG)

Η διαφορά στα επίπεδα της οξειδωμένης γλουταθειόνης πριν από την άσκηση μεταξύ της ομάδας με έλλειψη ενζύμου G6PD και της ομάδας των ατόμων με φυσιολογικά επίπεδα G6PD δεν ήταν στατιστικά σημαντική πριν τη συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E. Η διαφορά στα επίπεδα της οξειδωμένης γλουταθειόνης πριν από την άσκηση μεταξύ της ομάδας με έλλειψη ενζύμου G6PD και της ομάδας των ατόμων με φυσιολογικά επίπεδα G6PD έγινε στατιστικά σημαντική μετά τη συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E. Η άσκηση δεν επέφερε σημαντικές μεταβολές

στα επίπεδα της οξειδωμένης γλουταθειόνης τόσο στην ομάδα με έλλειψη του ενζύμου όσο και στην ομάδα με φυσιολογικά επίπεδα G6PD.

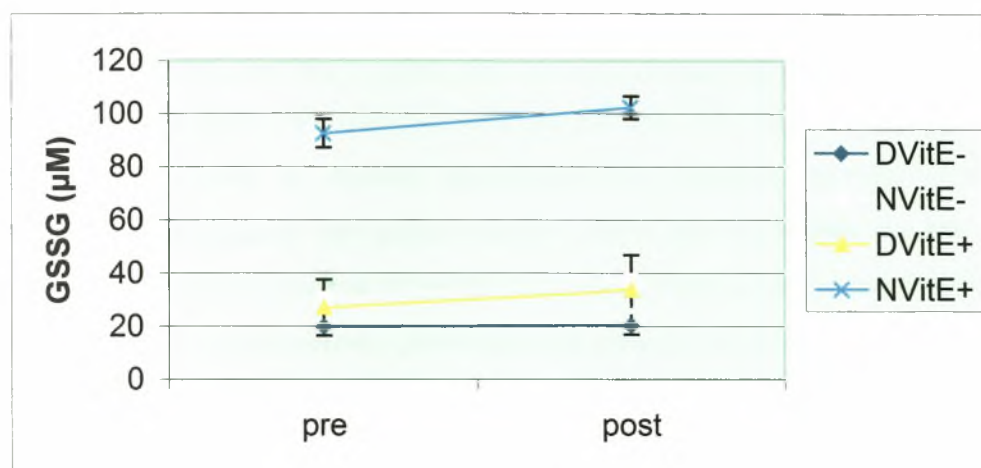
Πίνακας 8: Τιμές οξειδωμένης γλουταθειόνης (μM) πριν και μετά την άσκηση και μετά από συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E

	Πριν	Μετά
G6PD Vit E-	19.9 (3.4)	20.4 (3.4)
G6PD Vit E+	27.1 (1.2)	33.6 (2.1)
Φυσ/κα Vit E-	30.3 (7.2)	37.2 (9.6)
Φυσ/κα Vit E+	92.4 (5.3)	102.3 (4.3)*#&

*: Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα G6PD Vit E-

#: Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα G6PD Vit E+

&: Στατιστικά σημαντική διαφορά συγκριτικά με την ομάδα Φυσ/κα Vit E-



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να εξετάσει την επίδραση της μέτριας έντασης αερόβιας άσκηση και της συμπληρωματικής λήψης βιταμίνης E στην ανάπτυξη οξειδωτικού στρες σε άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD. Όπως φαίνεται και από τον μέσο όρο των τιμών του ενζύμου τα άτομα τα οποία είχαν έλλειψη παρουσίασαν μία μέση τιμή ενζύμου που ήταν ίση με 0.41 ± 0.16 U/g Hb ενώ η ομάδα των φυσιολογικών ατόμων είχε μία μέση τιμή που ήταν ίση με 8.8 ± 0.57 U/g Hb. Από αυτές τις τιμές μπορεί να συμπεράνει κανείς πως οι δύο ομάδες είχαν σημαντικά διαφορετικά επίπεδα ενζύμου και επομένως ο διαχωρισμός των δύο ομάδων ήταν πετυχημένος (Πίνακας 2, σελ. 38).

Τα άτομα τα οποία συμμετείχαν στη συγκεκριμένη εργασία ανήκαν στα άτομα τα οποία βρίσκονται στην ομάδα των ατόμων που έχουν μέτρια φυσική κατάσταση. Αυτό συμπεραίνεται από το υπομέγιστο τεστ το οποίο πραγματοποιήθηκε και το οποίο προσδιόρισε την αερόβια ικανότητα των ατόμων στα 44 ml/kg/min (ACSM Guidelines 2000). Επίσης, ο μέσος όρος της καρδιακής συχνότητας κατά τη διάρκεια της άσκησης ήταν 147 σφυγμοί ανά λεπτό και 77% της Μέγιστης Καρδιακής Συχνότητας. Αυτή η ένταση προσδιορίζεται σύμφωνα με την Αμερικανική Αθλητιατρική Εταιρεία σαν μέτρια και είναι αυτή που συνιστάται για την ανάπτυξη της αερόβιας ικανότητας για το γενικό πληθυσμό. Έτσι μπορεί να υποστηρίξει κανείς πως οι βασικές προϋποθέσεις για συμμετοχή ατόμων με έλλειψη ενζύμου G6PD και άσκηση μέτριας έντασης επιτεύχθηκαν.

Υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία που υποδεικνύουν πως η αερόβια άσκηση για αρκετό χρονικό διάστημα μπορεί να επιφέρει μεταβολές στα επίπεδα του όγκου του πλάσματος (Μούγιος Β.Κ. 2002) και αυτές οι μεταβολές μπορεί να επηρεάσουν τις τιμές ουσιών που μετρούνται στο αίμα σε εργασίες που εξετάζουν να βρουν ποια είναι η οξεία επίδραση της άσκησης (Gur et al. 1999). Όταν συμβαίνει κάτι τέτοιο θα πρέπει να χρησιμοποιούνται συγκεκριμένες εξισώσεις που περιλαμβάνουν τις τιμές του αιματοκρίτη και της αιμοσφαιρίνης έτσι ώστε να προσαρμόζονται οι τιμές που βρέθηκαν μετά την άσκηση. Στη συγκεκριμένη εργασία δεν χρειάζεται να πραγματοποιηθεί κάτι τέτοιο επειδή τόσο οι τιμές του αιματοκρίτη όσο και της αιμοσφαιρίνης δεν ήταν σημαντικά διαφορετικές μετά το τέλος της άσκησης.

Τα επίπεδα των υπεροξειδίων των λιπιδίων δεν ήταν σημαντικά διαφορετικά μεταξύ της ομάδας με έλλειψη ενζύμου G6PD και φυσιολογικών επιπέδων πριν από την άσκηση και πριν τη συμπληρωματική λήψη. Επίσης, η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε για την ανεύρεση σωματιδίων Heinz δεν ήταν θετική ούτε στην ομάδα με την έλλειψη ενζύμου ούτε στα φυσιολογικά άτομα και έτσι συμπεραίνεται πως δεν υπήρχε σημαντική αιμόλυση πριν από την άσκηση και τη συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E σε καμία ερευνητική ομάδα. Τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών υποδεικνύουν πως άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD μπορεί να εμφανίζουν μεγαλύτερη καταστροφή ερυθρών αιμοσφαιρίων εξαιτίας αυξημένου οξειδωτικού στρες (Liu et al. 1994). Αυτό δεν υποστηρίζεται από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας δείχνουν πως η μέτρια έντασης άσκηση δεν αυξάνει το οξειδωτικό στρες, όπως αυτό εκτιμάται από έμμεσες μετρήσεις, τόσο σε άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD όσο και σε φυσιολογικά άτομα. Προηγούμενες αναφορές στη βιβλιογραφία αναφέρουν πως η άσκηση αυξάνει τα επίπεδα δεικτών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Alessio H.A. 1993; Alessio et al. 1988; Goldfarb et al. 1993). Ωστόσο, εάν παρατηρήσει κανείς προσεκτικότερα τις συγκεκριμένες έρευνες αλλά και τη βιβλιογραφία θα διαπιστώσει πως για να αυξηθούν τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες απαιτείται να είναι αυξημένη η ένταση της άσκησης. Οι Chung et al. (1998), αλλά και άλλοι ερευνητές έχουν βρει πως όταν η ένταση της άσκησης είναι χαμηλή ή μέτρια τότε η ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες μπορεί να μην είναι σημαντικά αυξημένη. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με τις προηγούμενες εργασίες και υποδεικνύουν πως η πραγματοποίηση μέτριας έντασης άσκηση δεν επιτείνει το οξειδωτικό στρες τόσο σε άτομα με έλλειψη ενζύμου όσο και σε φυσιολογικά άτομα. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό εάν αναλογιστεί κανείς πως η άσκηση αποτελεί σημαντικό αντιαθηρογόνο παράγοντα αφού μειώνει τα επίπεδα της LDL, της VLDL, της oxLDL, ενώ αυξάνει τα επίπεδα της HDL. Έτσι μπορεί να μειωθεί ο κίνδυνος αθηρογένεσης αφού δεν δημιουργείται προ-οξειδωτικό περιβάλλον από την καταστροφή της αιμοσφαιρίνης και την απελευθέρωση του σιδήρου και άλλων υποστρωμάτων για την πραγματοποίηση της αντίδρασης Fenton και in-vivo οξείδωσης.

Η άλλη σημαντική παρατήρηση της συγκεκριμένης εργασίας δείχνει πως η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E μπορεί να επιφέρει προοξειδωτικά αποτελέσματα. Πολλές έρευνες μέχρι τώρα έχουν δείξει πως η βιταμίνη E λειτουργεί

σαν αντιοξειδωτικός μηχανισμός τόσο στην ηρεμία όσο και κατά τη διάρκεια της άσκησης. Οι περισσότερες έρευνες που έχουν αναφέρει θετικές επιδράσεις για την βιταμίνη E προέρχονται από επιδημιολογικές μελέτες που έχουν δείξει πως η βιταμίνη E μειώνει τον κίνδυνο για την εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων και αυτό σχετίζεται με τη μείωση που επέρχεται στην οξείδωση της LDL, ενός παράγοντα που αποτελεί ισχυρό προδιαθεσικό παράγοντα για ασθένειες του καρδιαγγειακού συστήματος. Η ίδια αντίληψη επικρατεί και για τα άτομα που πάσχουν από έλλειψη ενζύμου G6PD, αφού υπάρχουν έρευνες που έχουν δείξει πως η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E μειώνει το ποσοστό αιμόλυσης σε αυτή την ομάδα ατόμων (Eldamhough et al. 1988). Ωστόσο, υπάρχουν και άλλες έρευνες οι οποίες αναφέρουν πως η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E δεν επιφέρει σημαντικές μεταβολές στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό ενός ατόμου (Ikemoto et al. 2002; Newman et al. 1979) ή σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να λειτουργήσει αρνητικά και να επιφέρει αύξηση σε μεταβλητές που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες (Brown et al. 2001). Οι έρευνες που αναφέρουν προοξειδωτικές ικανότητες της βιταμίνης E σχετίζονται άμεσα με τη βιταμίνη C. Πιο συγκεκριμένα, αυτές οι έρευνες αναφέρουν πως όταν τα επίπεδα της βιταμίνης C αλλά και άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών είναι χαμηλά, τότε η βιταμίνη E μπορεί να λειτουργήσει προοξειδωτικά (Brown et al. 1997; Kontush et al. 1996). Στη συγκεκριμένη εργασία δεν εξετάστηκαν τα επίπεδα της βιταμίνης C αλλά ούτε και άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών έτσι ώστε να μπορέσουν να εξαχθούν ικανά συμπεράσματα για τα επίπεδα των άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών στον οργανισμό των ατόμων που συμμετείχαν στην εργασία. Υπάρχει η περίπτωση οι άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες να ήταν σε τέτοια επίπεδα που να δημιουργήσαν τις προϋποθέσεις έτσι ώστε η βιταμίνη E να λειτουργήσει σαν προοξειδωτικός παρά σαν αντιοξειδωτικός παράγοντας. Οποσδήποτε, αυτό είναι κάτι που χρήζει ιδιαίτερης παρατήρησης και περαιτέρω έρευνες χρειάζονται έτσι ώστε να εξαχθούν πιο ασφαλή συμπεράσματα.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της έρευνας δείχνουν πως η άσκηση μέτριας έντασης, διάρκειας 45 λεπτών δεν δημιουργεί τις προϋποθέσεις για αυξημένο οξειδωτικό στρες σε άτομα με έλλειψη ενζύμου G6PD. Επομένως, τα προκαταρκτικά αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν πως αυτά τα άτομα μπορούν να κάνουν άσκηση μέτριας έντασης και διάρκειας με ασφαλή τρόπο. Επίσης, η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E φαίνεται πως επιτείνει το οξειδωτικό στρες και θα πρέπει να λαμβάνεται με ιδιαίτερη προσοχή τόσο από υγιή αλλά και από άτομα με έλλειψη

ενζύμου G6PD επειδή μπορεί να δημιουργηθούν δυσμενείς επιπτώσεις για τον οργανισμό του ατόμου. Απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για να διευκρινιστεί εάν η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης E, ίσως με διαφορετική δόση και λαμβάνοντας υπ' όψιν τα επίπεδα άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών, μπορεί να λειτουργήσει ευεργετικά για τον οργανισμό ενός ατόμου.

ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΕΡΕΥΝΕΣ

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας δίνουν το ερέθισμα για την πραγματοποίηση μίας σειράς ερευνών που σχετίζεται με το θέμα της εργασίας. Πιο συγκεκριμένα θα μπορούσε να μελετηθεί ποια είναι η επίδραση:

1. της άσκησης με βάρη στο μυϊκό σύστημα των ατόμων με έλλειψη ενζύμου G6PD. Ο μυϊκός ιστός έχει 15% ενεργότητα του ενζύμου και επειδή ο μυϊκός ιστός δέχεται διαφορετικού είδους ερεθίσματα όταν ασκείται με βάρη, ίσως και απόκριση του αντιοξειδωτικού συστήματος του μυός να είναι διαφορετική.
2. της άσκησης διαφορετικής έντασης στο αντιοξειδωτικό σύστημα των ατόμων με έλλειψη ενζύμου G6PD.
3. της επίδρασης διαφορετικής δόσης βιταμίνης E ή και διαφορετικών αντιοξειδωτικών ουσιών (λιποδιαλυτών και υδατοδιαλυτών) στο αντιοξειδωτικό σύστημα τόσο υγιών ατόμων αλλά και ατόμων με έλλειψη ενζύμου G6PD.
4. στο TAS (Total Antioxidant Status) της έλλειψης του ενζύμου, άσκησης, λήψης vit. E κλπ.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alessio HM, Goldfarb AH, Cutler RG. MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am J Physiol.* 1988 Dec;255(6 Pt 1):C874-7.
2. Alessio HM. Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* 1993 Feb;25(2):218-24.
3. American College of Sports Medicine (2000). *ACSM's Guidelines for Exercise testing and Prescription*, 6th Edition, Franklin BA(eds), Lippincott Williams & Wilkins (Philadelphia).
4. Antioxidant Nutrients <http://www.cce.cornell.edu>.
5. Beutler E., Glucose -6-phosphate dehydrogenase deficiency, *New England Journal of Medicine*, 1991, 324(3):169-174.
6. Bresolin N, Bet L, Moggio M, Meola G, Fortunato F, Comi G, Adobbati L, Geremia L, Pittalis S, Scarlato G. Muscle glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Neurol.* 1989 May;236(4):193-8.
7. Bresolin N, Bet L, Moggio M, Muscle glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Journal of Neurology*, 1989, 236(4):193-8.
8. Brown KM, Morrice PC, Duthie GG. Erythrocyte vitamin E and plasma ascorbate concentrations in relation to erythrocyte peroxidation in smokers and nonsmokers: dose response to vitamin E supplementation. *Am J Clin Nutr.* 1997 Feb;65(2):496-502.
9. Bruunsgard H, Pedersen BK. Special features for the Olympics: effects of exercise on the immune system: effects of exercise on the immune system in the elderly population. *Immunol Cell Biol* 2000 Oct; 78 (5): 523 -31
10. Chan AC, Chow CK, Chiu D. Interaction of antioxidants and their implication in genetic anemia. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999 Dec;222(3):274-82.
11. Chung SC, Goldfarb AH, Jamurtas AZ, Hegde SS, Lee J. Effect of exercise during the follicular and luteal phases on indices of oxidative stress in healthy women. *Med Sci Sports Exerc.* 1999 Mar;31(3):409-13.
12. Colonna, P., Aspirin and Glucose -6-phosphate dehydrogenase deficiency. *British Medical Journal.* 1981, 283 (63000): 1189.

13. Dekkers. Ic. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise – induced muscle damage. *Sports Medicine* 1996 21: 213-238
14. Diplock A., Antioxidant nutrients. In Gurr M. (ed) *Lifestyles: Nutrition and physical activity*. Brussels: ILSI Europe, 1998, p.p. 20 – 26
15. Eldamhougy S, Elhelw Z, Yamamah G, Hussein L, Fayyad I, Fawzy D. The vitamin E status among glucose-6 phosphate dehydrogenase deficient patients and effectiveness of oral vitamin E. *Int J Vitam Nutr Res*. 1988;58(2):184-8.
16. Evans W. Vitamin E, Vitamin C and exercise. *Am J Clin Nutr*. 2000 Aug; 72 (2 Suppl.): 6475-525
17. Gelehrter D. Thomas End. Collins S. Francis (Αρχές Ιατρικής Γενετικής, ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ. ΑΘΗΝΑ 1996).
18. Goldfarb AH, McIntosh MK, Boyer BT, Fatouros J. Vitamin E effects on indexes of lipid peroxidation in muscle from DHEA-treated and exercised rats. *J Appl Physiol*. 1994 Apr;76(4):1630-5.
19. Goldfarb AH. Antioxidants: Role of supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*. 1993 Feb;25(2):232-6.
20. Halliwell B. & Gutteridge JMC. (1985) *Free radicals in biology and medicine*. 2nd edition. Clarendon Press, Oxford, UK.
21. HARPER'S. Βιοχημεία. Αθήνα: Επιστημονικές εκδόσεις «ΓΡ. ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΣ», 1984
22. Health on the net foundation. *Free radicals*. 2001.
23. <http://www.ibms.sinica.edu.tw/Ehtml/pie/ttang.html>
24. Human Genetics (G6PD)
25. I.C.A.S. Biomedicals for the Life, Ευβοίας 34, 11362 Αθήνα
26. Ihara H, Shino Y, Morita Y, Kamaguchi E, Hashizum N, Yoshida M. Is skeletal muscle damaged by the oxidative stress following an aerobic exercise? *L clin. Lab Anal* 2001; 15 (5): 239-43
27. Ikemoto M, Okamura Y, Kano M, Hirasaka K, Tanaka R, Yamamoto T, Sasa T, Ogawa T, Sairyō K, Kishi K, Nikawa T. A relative high dose of vitamin E does not attenuate unweighting-induced oxidative stress and ubiquitination in rat skeletal muscle. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci*. 2002 Sep;21(5):257-63.
28. Jain SK. Glutathione and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency can increase protein glycosylation. *Free Radic Biol Med*. 1998 Jan 1;24(1):197-201.

29. Johnson RM, Ravindranath Y, El-Alfy M, Goyette Jr. G. Oxidant damage to erythrocyte membrane in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: correlation with in vivo reduced glutathione concentration and membrane protein oxidation. *Blood* 1994, 83(4):1117-1123.
30. Karlsson L. Antioxidants and exercise. Edition 1997.
31. Kontush A, Finckh B, Karten B, Kohlschutter A, Beisiegel U. Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J Lipid Res.* 1996 Jul;37(7):1436-48.
32. Kostka T. Aging, physical activity and free radicals. *Pol. Mercurius Lek* 1999 Oct; 7 (40): 202-4
33. LINDER M. Nutritional Biochemistry and Metabolism. New York: Elsevier. 1991.
34. Liu TZ, Lin TF, Hung IJ, Wei JS, Chiu DT. Enhanced susceptibility of erythrocytes deficient in glucose-6-phosphate dehydrogenase to alloxan/glutathione-induced decrease in red cell deformability. *Life Sci.* 1994;55(3):PL55-60.
35. Mc Ardle, Katch V, Katch F. Physiology of exercise. Second edition 2000.
36. Mehta, A. B., Glucose -6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Postgraduate Medical Journal.* 1994, 70(830): 871-877.
37. Murray RK. Red & white blood cells. *In Harper's Biochemistry* (Murray RK, Granner DK, Mayers PA, Rodwell VW, eds). Norwalk, CT: Appleton & Lange. 1993, pp 688-703.
38. Newman JG, Newman TB, Bowie LJ, Mendelsohn J. An examination of the role of vitamin E in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Clin Biochem.* 1979 Oct;12(5):149-51.
39. Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H, Northoff H, Ferhenbach E, Free radicals and radicals and oxidative Stress in exercise – immunological aspects.
40. Ninfali P, Bresolin N. Muscle glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency and oxidant stress during physical exercise. *Cell Biochem Funct.* 13(4):297-8, 1995.
41. Polidori MC, Mecoci P, Cherabini A, Senin N. Physical activity and oxidative stress during aging. *Int. Sports Med* 2000 Apr; 21 (3): 154-7

42. Poulsen HE, Welmann A, Loft S. Methods to detect DNA damage by free radicals: relation to exercise. *Proc Nutr Soc* 1999 Nov; 58 (4): 1007 –14
43. Powers SK, Lennon SL, Analysis of cellular responses to free radicals: Focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 1999 Nov; 58 (4): 1025-33
44. Racet L, Holecek V, Sedlacek D, Panzer P. Free radicals and infectious diseases. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 2002 Apr; 50 (2): 87 – 91
45. Radak Z. Free Radicals in exercise and aging, *Human Kinetics*, 2000.
46. Saiki S, Sato T, Kohzyki M, Kamimoto M, Yoshida T. Changes in serum hypoxanthine levels by exercise in obese subjects. *Metabolism* 2001 Jun; 50 (6): 627-30
47. SCHROEDER S.L, TIERNEY S. Mc PHEE, M. PAPADAKIS AND M. KRUPP. Διαγνωστική και θεραπευτική, Αθήνα. Επιστημονικές Εκδόσεις "Γρ. Παρισσιανός", 1993.
48. Senozan N. M. & C. A. Thielman, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency – an inherited element that affects 100 million people. *Journal of Chemical Education*, 1991, 68(1):7-10.
49. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991 Sep 30;91(3C):31S-38S.
50. Siri SE. Body composition from fluid spaces and density: analysis of methods. In: Brozek J, Henschel A, eds. *Techniques for measuring body composition*. Washington, DC: *National Academy of Sciences, National Research Council*, 1961:223–34.
51. Stryer Lubert – Βιοχημεία (I), Έτος 1997, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης (Τόμοι Α και Β)
52. Surmen-Gur E, Ozturk E, Gur H, Punduk Z, Tuncel P. Effect of vitamin E supplementation on post-exercise plasma lipid peroxidation and blood antioxidant status in smokers: with special reference to haemoconcentration effect. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1999 May;79(6):472-8.
53. Vitamin E in human nutrition: <http://www.roche.com>
54. Wysiyg://38/<http://www.goodties.com/waso2gr/libere.html> (Αντιοξειδωτικά και Ελεύθερες ρίζες)

55. Yahya HI, Alallawi NAS, Acute hemolytic episodes and fava bean consumption in G6PD deficient Iraqis, Indian Journal of Medical Research section B- Biochemical Research Other Than Infectious Diseases, 1993, 98:290-292.
56. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species Physiol Rev. 1994 Jan;74(1):139-62.
57. Ζερφυρίδης Κ. Γρηγόρης – Διατροφή του Ανθρώπου, Θεσσαλονίκη 1998. Εκδόσεις Γιαχούδη – Γιαπούλη/
58. Μούγιος Β., Εργαγόνα βοηθήματα στον αθλητισμό, Επιμορφωτικό σεμινάριο με θέμα διατροφή και άθληση, Δεκέμβριος 1999.
59. Οικονόμου Ευτυχία – ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΗ τροφογνωσία και ειδικές δίαιτες – ΑΘΗΝΑ 1992. Εκδόσεις ΠΕΛΕΚΑΝΟΣ.
60. Πανελλήνια Ένωση Ελευθέρων Ριζών και οξειδωτικού Στρες. Πρακτικά 1^{ου} Συνεδρίου. Ιωάννινα 1998.
61. ΠΑΠΑΔΗΜΗΤΡΙΟΥ, Μ. Εσωτερική Παθολογία, Univercity studio Press, 1998.
62. ΤΡΑΚΑΤΕΛΛΗΣ Α., Βιοχημεία Τόμος Β μέρος 1^ο, Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Κυριακίδη 1992.
63. Φερτάκης Αριστομένης, Βιβλίο Αιματολογίας, Έτος 1992, Εκδόσεις Πασχαλίδης, Σελ. 17 έως 21, 76, 81
64. Φερτάκης Αριστομένης, Βιβλίο Παθολογικής Φυσιολογίας, 1998, Εκδόσεις Πασχαλίδης, Σελ. 396 – 400.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Συναίνεση Δοκιμαζόμενου για συμμετοχή σε ερευνητική εργασία

Όνοματεπώνυμο: _____

Τίτλος Εργασίας: Η επίδραση της άσκησης και της συμπληρωματικής λήψης βιταμίνης Ε στα επίπεδα ελευθέρων ριζών σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G-6-PD)

Αναγνωρίζω ότι ο σκοπός αυτής της εργασίας είναι να εξεταστεί η επίδραση που έχει η άσκηση και η συμπληρωματική λήψη βιταμίνης Ε στα επίπεδα ελευθέρων ριζών σε άτομα με έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G-6-PD). Ενώ τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας μπορεί να μην επηρεάσουν άμεσα εμένα, μπορεί να βοηθήσουν στην δημιουργία πρωτογενούς γνώσεως.

Κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας θα χρειαστεί να παρουσιαστώ στο Κέντρο Έρευνας και Αξιολόγησης της Φυσικής Απόδοσης του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας συνολικά τρεις φορές. Την πρώτη φορά θα πραγματοποιηθεί μία αξιολόγηση των επιπέδων του ενζύμου G-6-PD. Στη συνέχεια θα χρειαστεί να παρουσιαστώ στο εργαστήριο για την πραγματοποίηση μίας προπόνησης της οποίας η ένταση θα αντιστοιχεί στο 70-75% της Μέγιστης Καρδιακής Συχνότητας για 45 λεπτά. Πριν και μετά από την πραγματοποίηση της προπόνησης θα πραγματοποιηθεί αιμοληψία (10 mL αίματος) από μία φλέβα στην περιοχή του αγκώνα. Αναγνωρίζω ότι η είσοδος και η απομάκρυνση της βελόνας μπορεί να είναι λίγο επώδυνη αλλά ο πόνος θα απομακρυνθεί πολύ σύντομα. Η πιθανή δημιουργία ενός μικρού μώλωπα θα αποφευχθεί με την άμεση πίεση που θα ασκηθεί στην περιοχή αμέσως μετά την απομάκρυνση της βελόνας. Η πιθανότητα της δημιουργίας φλεγμονής θα μειωθεί στο έπακρο με τη χρησιμοποίηση αποστειρωμένων βελονών. Επίσης, κατανοώ πως μετά το πέρας της προπόνησης και για ένα διάστημα τεσσάρων εβδομάδων θα λαμβάνω ημερησίως 800 IU βιταμίνης Ε και πως δε θα λαμβάνω συμπληρωματικά άλλες αντιοξειδωτικές ουσίες. Κατανοώ πως μετά το πέρας της συμπληρωματικής λήψης της βιταμίνης Ε (4 εβδομάδες) θα επανέλθω στο Κέντρο και θα ακολουθηθούν οι ίδιες διαδικασίες που ακολουθήθηκαν κατά την δεύτερη μου επίσκεψη.

Επιβεβαιώνω πως η συμμετοχή μου στην εργασία είναι απόλυτα εθελοντική και δεν ασκήθηκε καμία πίεση για τη συνεργασία μου σε αυτή. Επίσης γνωρίζω ότι μπορώ να αποχωρήσω οποιαδήποτε στιγμή το επιθυμώ από την εργασία.

Επιπρόσθετα, κατανοώ πως οι πληροφορίες που θα συλλεχθούν από τη συγκεκριμένη εργασία θα είναι απόλυτα εμπιστευτικές και πως η περίληψη των αποτελεσμάτων της εργασίας δύναται να μου δοθεί εάν το ζητήσω.

Επιβεβαιώνω πως η μεθοδολογία της εργασίας έγινε γνωστή σε μένα, οι ερωτήσεις που είχα γύρω από τη μεθοδολογία που θα ακολουθηθεί απαντήθηκαν ικανοποιητικά και επιθυμώ να συμμετάσχω εθελοντικά στην εργασία.

Υπογραφή συμμετέχοντα

Τηλέφωνο

Μάρτυρας Υπογραφής

Ημερομηνία

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

ΦΥΛΛΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Όνοματεπώνυμο	
ID	
Ημερομηνία	
Ημερ. Γέννησης	
Βάρος	
Ύψος	
% λίπους	
ΜΚΣ	
70-75% ΜΚΣ	

Λεπτό	5	10	15	20	25	30	35	40	45
ΚΣ									
VO2									
Ve									
RQ									

1 | **PRE**

1 = πριν τη λήψη συμπληρώματος 2 = μετά τη λήψη συμπληρώματος

1 = αριθμός συμμετέχοντα

PRE = πριν την άσκηση των 45 λεπτών

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πάρα πολύ τον κ. Αθανάσιο Τζιαμούρτα για τις πολύτιμες συμβουλές καθ' όλη τη διάρκεια της συλλογής και ανάλυσης των δειγμάτων και κατά τη διάρκεια της συγγραφής αυτής της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Π. Μολυβδά και την κ. Σ. Μπονάνου για τις παρατηρήσεις που έκαναν στη συγγραφή της εργασίας και για τις πολύτιμες συμβουλές τους τα τέσσερα χρόνια της πανεπιστημιακής μου καριέρας.

Ακόμα θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμηση μου στους Άγγελο Καλαμάρα, υπεύθυνο κέντρου πρόληψης μεσογειακής αναιμίας Γ.Ν. Καρδίτσας και τους παρασκευαστές Νικόλαο Λάμπρου και Πέτρα Κροσυμπλά για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν για τις αναλύσεις σωματιδίων Heinz. Ακόμα εκφράζω πολλές ευχαριστίες στους φοιτητές του Τ.Ε.Φ.Α.Α. Ειρήνη Μάνθου, Τρύφωνα Τόφα, Χριστίνα Υφαντή, Βασίλη Πασχάλη για το χρόνο και τη συνεισφορά τους στη συλλογή δεδομένων. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα τα οποία οικειοθελώς συμμετείχαν στην εργασία έτσι ώστε να μπορέσουν να συλλεχθούν σημαντικά στοιχεία για μία ομάδα πληθυσμού στην οποία δεν έχει πραγματοποιηθεί ακόμα αρκετή έρευνα.