

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗΣ ΑΕΡΟΒΙΑΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ
ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΑΓΥΜΝΑΣΤΩΝ ΑΝΔΡΩΝ**

του
Αντώνη Λ. Μασσακά

Μεταπτυχιακή διατριβή που υποβάλλεται στο καθηγητικό σώμα για τη μερική ολοκλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του μεταπτυχιακού τίτλου του Τμήματος Επιστήμης Φυσικής Αγωγής και Αθλητισμού του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (Φυσική Δραστηριότητα για Ειδικούς Πληθυσμούς).

2001
Θεσσαλονίκη

Εγκεκριμένο από το Καθηγητικό σώμα:

1^{ος} Επιβλέπων: Αναπληρωτής Καθηγητής Βασίλης Μούγιος

2^{ος} Επιβλέπων: Καθηγητής Αστέριος Δεληγιάννης

3^{ος} Επιβλέπων: Αναπληρωτής Καθηγητής Αργύρης Μυλωνάς

© 2001

Αντώνη Λ. Μαισακά

ALL RIGHTS RESERVED

*...στέργε μεν τα παρόντα,
ζήτει δε τα βελτίω!!!*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΑΝΤΩΝΗΣ ΜΑΤΣΑΚΑΣ: Επίδραση της συστηματικής αερόβιας άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος αθλητών ανδρών.

(Υπό την επίβλεψη του κ. Βασίλη Μούγιου)

Η ενδοθηλίνη (ET) είναι ένα πεπτίδιο αποτελούμενο από 21 αμινοξέα και περιλαμβάνει τρεις ισομορφές, την 1, 2 και 3. Η ET-1 είναι η επικρατέστερη ισομορφή και εκκρίνεται από ενδοθηλιακά κύτταρα, ινοβλάστες, φαγοκύτταρα και κύτταρα του μυοκαρδίου. Παράλληλα η ET-1 ασκεί ισχυρή αγγειοσυσταλτική δράση και πιστεύεται ότι αποτελεί κύρια ορμόνη του καρδιαγγειακού συστήματος. Δρα με παρακρινή τρόπο και μπορεί να δραματίζει αποφασιστικό ρόλο σε παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος, όπως τη συστηματική υπέρταση, την αθηρογένεση, την καρδιακή υπερτροφία, καθώς και την καρδιακή και κυκλοφορική ανεπάρκεια. Πλήθος μελετών στον άνθρωπο και σε ζώα έχουν εξετάσει την οξεία επίδραση της φυσικής δραστηριότητας στα επίπεδα ET του πλάσματος και οι περισσότερες έχουν βρει αυξημένα επίπεδα μετά από άσκηση. Ωστόσο, δεν υπάρχουν μελέτες που να αφορούν την μακροπρόθεσμη επίδραση της άσκησης στην ET.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξετάσει την επίδραση αεροβικού τύπου άσκησης στα επίπεδα ET του πλάσματος. Δεκαοχτώ νέοι, υγιείς, μη παχύσαρκοι και μη καπνιστές εθελοντές κατανεμήθηκαν σε μία ομάδα μελέτης και μία ομάδα ελέγχου, έχοντας την ίδια μέση ηλικία και δείκτη σωματικής μάζας. Η ομάδα μελέτης υποβλήθηκε αρχικά σε αιμοληψία ύστερα από ολονύκτια νηστεία (για τον προσδιορισμό λιπιδίων) και μια δοκιμασία μέγιστης αερόβιας ισχύος σε εργοποδήλατο. Ακολούθησε περίοδος συστηματικής προπόνησης διάρκειας 12 εβδομάδων (τρεις φορές την εβδομάδα, 45 min ανά συνεδρία, με

ένταση στο 60-70 % της μέγιστης αερόβιας ισχύος) στο εργοποδήλατο ενώ η ομάδα ελέγχου δε συμμετείχε σε καμιάς μορφής συστηματική άσκηση. Στο τέλος του προπονητικού προγράμματος και οι δύο ομάδες πραγματοποίησαν μια δοκιμασία μέγιστης αερόβιας ισχύος. Τρεις μέρες αργότερα ποδηλάτησαν για 30 min στο 60 % της μέγιστης αερόβιας ισχύος τους ύστερα από ολονύκτια νηστεία και έδωσαν δείγματα αίματος, πριν και 30 min μετά το τέλος της άσκησης. Στο αίμα που συλλέξαμε προσδιόρισθηκαν τα επίπεδα ET του πλάσματος, με τη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού και τριακυλογλυκερόλες, ολική χοληστερόλη και χοληστερόλη των HDL με ενζυμικές φωτομετρικές μεθόδους. Για την ανίχνευση σημαντικών διαφορών μεταξύ των μετρήσεων για κάθε παράμετρο χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης και κατάλληλα *t* test ενώ το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε για $p < 0.05$.

Σημειώθηκε σημαντική αύξηση της μέγιστης αερόβιας ισχύος στην ομάδα μελέτης ύστερα από την εφαρμογή του προγράμματος άσκησης ($p < 0,001$). Ο όγκος του πλάσματος ελαττώθηκε στην ομάδα μελέτης ενώ αυξήθηκε στην ομάδα ελέγχου 30 min ύστερα από το τέλος της άσκησης. Η μεταβολή αυτή ήταν σημαντικά διαφορετική μεταξύ των δύο ομάδων ($p = 0,03$). Δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα ηρεμίας των λιπιδίων μεταξύ των δύο ομάδων ή μεταξύ των μετρήσεων στην ομάδα μελέτης (πριν και μετά την εφαρμογή του προγράμματος). Τα επίπεδα ET ελαττώθηκαν σημαντικά στην ομάδα μελέτης ενώ στην ομάδα ελέγχου σημειώθηκε ελαφρά αύξηση. Η αλληλεπίδραση μεταξύ χρόνου και ομάδας βρέθηκε οριακά σημαντική ($p = 0,051$).

Συμπερασματικά, τα παραπάνω δεδομένα προβάλλουν τις πρώτες ενδείξεις ελάττωσης των επιπέδων ET του πλάσματος ύστερα από ένα πρόγραμμα άσκησης 12 εβδομάδων. Η διαφορετική ανταπόκριση των δύο ομάδων γίνεται ακόμη πιο εντυπωσιακή, αν αναλογιστεί κανείς ότι η μείωση της ET στην ομάδα μελέτης συνέβη παράλληλα με αιμοσυμπύκνωση ενώ η αύξηση στην ομάδα ελέγχου συνέβη παράλληλα με αιματαραιώση. Είναι πι-

θανό η μακροπρόθεσμη άσκηση να προκαλεί ελάττωση και όχι αύξηση των επιπέδων ET, όπως αναφέρεται στις περισσότερες έρευνες που εξέτασαν τη βραχυπρόθεσμη επίδραση της άσκησης στην ET του πλάσματος.

ABSTRACT

Antonis Matsakas: Effect of long-term aerobic exercise training on plasma endothelin levels of untrained males

(Under the supervision of Dr. Vassilis Mougios)

Endothelin (ET) is a natural 21-amino acid peptide present as three isoforms, ET-1, ET-2 and ET-3. ET-1 is the predominant isoform and is secreted by endothelial cells, fibroblasts, phagocytes and cardiomyocytes. ET-1 exhibits potent vasoconstrictor activity and is thought to be mainly a cardiovascular hormone or a paracrine factor that may play a crucial role in cardiovascular diseases such as systemic hypertension, atherogenesis, cardiac hypertrophy, as well as heart and circulatory failures. A plethora of studies conducted on man and animals have investigated the acute effect of exercise on plasma ET levels and most have found augmented values of ET after exercise. However, there are no human studies on the effect of long-term exercise on ET.

The purpose of the present study was to examine the effect of aerobic exercise training on plasma ET levels. Eighteen young healthy non-obese non-smoking male volunteers were equally divided into a study group and a control group of the same mean age and body mass. The study group was initially subjected to fasting blood sampling (for lipid determinations) and a maximal aerobic power test on a cycle ergometer. Then they followed a twelve-week training program (three times per week, 45 min per session, at 60-70% of maximal aerobic power) on the cycle ergometer, while the control group remained sedentary. At the end of the training period both groups performed a maximal aerobic power test. Three days later they cycled for 30 min at 60 % of their maximal aerobic

power and gave one fasting blood sample before and one 30 min after the end of exercise. Plasma ET was determined by enzyme immunoassay and plasma triacylglycerols, total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol were determined by enzymic photometric methods. Significant differences between measurements for each parameter were detected by performing two-way analysis of variance (for ET) or appropriate *t* tests. A *p* value less than 0.05 was considered significant.

Maximal aerobic power increased significantly in the study group after the training program ($p < 0.001$). A decrease in plasma volume was observed in the study group (haemoconcentration) and a plasma volume expansion (haemodilution) in the control group post-exercise ($p = 0,03$). No significant differences were found in the resting values of plasma lipids between the two groups or between the measurements for the study group (pre- and post-training). ET decreased sharply in the study group, whereas it increased slightly in the control group after exercise. The interaction between group and time was marginally significant ($p = 0,051$).

In conclusion, our data provide the first evidence of a reducing effect of aerobic exercise training on post-exercise plasma ET levels. This finding seems to be more spectacular in conjunction with the observed plasma volume changes between the two groups.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την παρούσα εργασία ολοκληρώνω ένα δεύτερο κύκλο σπουδών, ο οποίος αποβλέπει στην απόκτηση του μεταπτυχιακού διπλώματος. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτε-
ρως τον αναπληρωτή καθηγητή βιοχημείας της άσκησης κ. Μούγιο Βασίλη για την εμπι-
στοσύνη που μου έδειξε, ώστε να αναλάβει, ύστερα από τη διπλωματική μου εργασία, την
επίβλεψη και της μεταπτυχιακής μου διατριβής, δίνοντάς μου με αυτόν τον τρόπο την ευ-
καιρία να ξεναγηθώ για ακόμη μία φορά στα μονοπάτια της επιστήμης. Η αμέριστη συ-
μπαράσταση, η υπομονή και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής και εκπό-
νησης της παρούσας εργασίας συνέβαλαν στην επιτυχή ολοκλήρωσή της. Νιώθω τη χαρά
να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για όλα όσα αποκόμισα τα τελευταία χρόνια από το
εργαστήριο υγιεινής και διατροφής αθλουμένων, γνώσεις οι οποίες αποτέλεσαν για μένα
τον ακρογωνιαίο λίθο για την επιτυχή συμμετοχή μου στο διαγωνισμό του Ιδρύματος
Κρατικών Υποτροφιών και την αποδοχή μου, κατ' εξαίρεση, από επιθυμητό ανώτατο εκ-
παιδευτικό ίδρυμα για την πραγματοποίηση σπουδών διδακτορικού κύκλου.

Επίσης ευχαριστώ τους καθηγητές κ Α. Δεληγιάννη και Α. Μυλωνά, μέλη της τριμε-
λούς επιτροπής, για τις χρήσιμες υποδείξεις και τα σχόλιά τους κατά τη συγγραφή της πα-
ρούσας μελέτης, καθώς και όλους όσους έλαβαν μέρος στη μελέτη ως εθελοντές και συνέ-
βαλαν από την πλευρά τους στη ολοκλήρωσή της.

Τέλος θα ήθελα για ακόμη μία φορά να ευχαριστήσω τους γονείς μου, οι οποίοι μου
συμπαράσταθηκαν ψυχικά και ηθικά όλο αυτό το χρονικό διάστημα και ταυτόχρονα υπο-
στήριξαν οικονομικά το μεγαλύτερο μέρος των σπουδών μου.

Θεσσαλονίκη, Μάιος 2001

A.Λ.Μ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	Σελίδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	ii
ABSTRACT	v
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	vii
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	viii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	xi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΤΟΜΕΥΣΕΩΝ	xii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
Μεταβολισμός της ET-1	4
Δράσεις της ET	6
Μηχανισμός δράσης της ET	11
Συγκεντρώσεις της ET στο πλάσμα	15
Επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ET του πλάσματος	17
Σκοπός της μελέτης	30
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	31
Συμμετέχοντες	31
Σχεδιασμός και δοκιμασίες	31
Προσδιορισμοί	34
Προσδιορισμός αιματοκρίτη	35
Προσδιορισμός αιμοσφαιρίνης	35

Προσδιορισμός ET	36
Προσδιορισμός τριακυλογλυκερολών	40
Προσδιορισμός χοληστερόλης	43
Προσδιορισμός HDL-χοληστερόλης	44
Υπολογισμός της LDL-χοληστερόλης	45
Στατιστική επεξεργασία	45
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	47
Σωματομετρικά δεδομένα και αερόβια ισχύς	47
Καρδιακή συχνότητα, ισχύς και ενεργειακή δαπάνη κατά τη διάρκεια του προπονητικού προγράμματος	48
Λιπίδια	49
Αλλαγές όγκου πλάσματος	50
Ενδοθηλίνη	51
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	57
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α	71
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β	72

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Επίπεδα ενδοθηλίνης στο πλάσμα υγιών ανθρώπων	16
Πίνακας 2. Επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος ασθενών	19-22
Πίνακας 3. Επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος υγιών ανθρώπων	23-25
Πίνακας 4. Επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος πειρα- ματόζωων	29
Πίνακας 5. Σωματομετρικά δεδομένα και αερόβια ισχύς	47
Πίνακας 6. Λιπίδια	50
Πίνακας 7. Αιμοσφαιρίνη και αιματοκρίτης	51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Η δομή της ενδοθηλίνης-1	2
Σχήμα 2. Οι τρεις ισομορφές της ενδοθηλίνης	3
Σχήμα 3. Η βιοσύνθεση της ET-1	5
Σχήμα 4. Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της ET-1	10
Σχήμα 5. Οι κυριότερες δράσεις της ενδοθηλίνης στο κυκλοφορικό σύστημα, στο μυοκάρδιο και στους νεφρούς	11
Σχήμα 6. Η αλληλεπίδραση της ET-1 με άλλους αγγειοδραστικούς παράγοντες του ενδοθηλίου	14
Σχήμα 7. Δοκιμασία μέγιστης επιβάρυνσης για άτομο βάρους 80 kg	32
Σχήμα 8. Μέση καρδιακή συχνότητα ανά πεντάλεπτο των εθελοντών της ομάδας με- λέτης κατά τη διάρκεια της πρώτης και της τελευταίας συνεδρίας	49
Σχήμα 9. Μεταβολές της ενδοθηλίνης του πλάσματος	52

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΕΥΣΕΩΝ

ΔΕΕ	Διασπαστικό ένζυμο ενδοθηλίνης
ΔΣΜ	Δείκτης σωματικής μάζας
ΕΤ	Ενδοθηλίνη
ΕΤ _A	Υποδοχείς A της ενδοθηλίνης
ΕΤ _{B1}	Υποδοχείς B1 της ενδοθηλίνης
ΕΤ _{B2}	Υποδοχείς B2 της ενδοθηλίνης
ΕΤ _C	Υποδοχείς C της ενδοθηλίνης
ΕΤ-1	Ενδοθηλίνη-1
ΕΤ-2	Ενδοθηλίνη-2
ΕΤ-3	Ενδοθηλίνη-3
ΚΟΞ-1	Κυκλοξυγονάση-1
ΜεγΕΤ	Μεγάλη ενδοθηλίνη
ΜΕΕ	Μετατρεπτικό ένζυμο ενδοθηλίνης
ΜΕΕ-1	Μετατρεπτικό ένζυμο ενδοθηλίνης -1
ΜΕΕ-2	Μετατρεπτικό ένζυμο ενδοθηλίνης -2
ΣΟΑ	Συνθάση οξειδίου του αζώτου
σφ/min	Σφυγμοί ανά λεπτό
CV	Συντελεστής διακύμανσης
ΕΙΑ	Ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός
ΡΙΑ	Ραδιοανοσοπροσδιορισμός

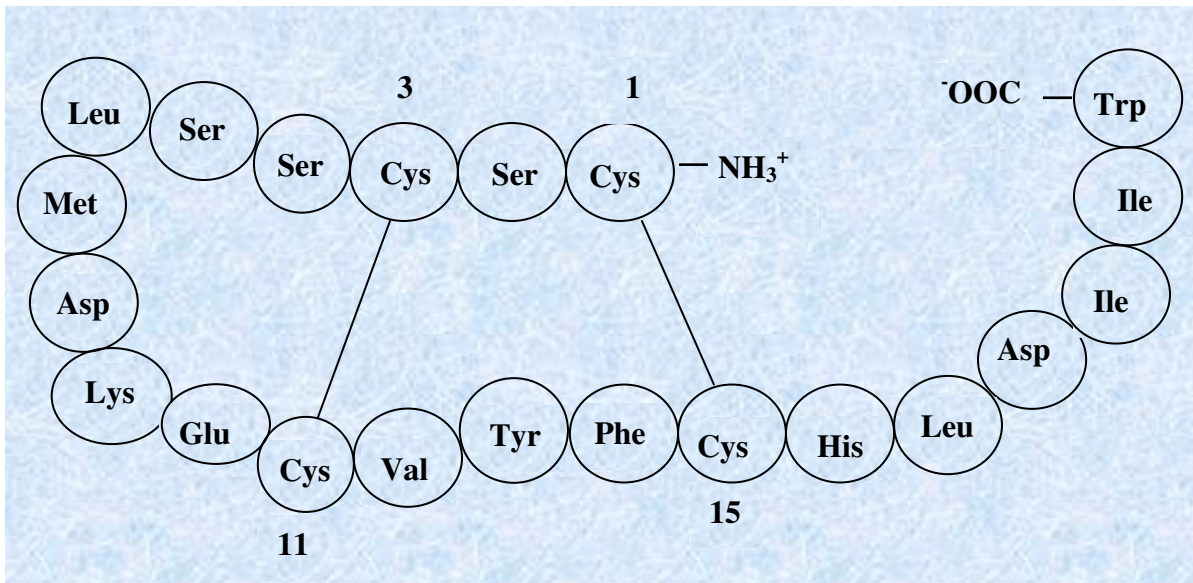
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ανακαλύψεις των τελευταίων ετών εξαίρουν τη φυσιολογική σημασία του αγγειακού ενδοθηλίου τόσο, ώστε σήμερα να θεωρείται ιστός με ποικίλες λειτουργίες, ο οποίος διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ομοιόσταση του καρδιαγγειακού συστήματος. Αποτελεί έναν ημιπερατό φραγμό μεταξύ του αγγειακού τοιχώματος και του αίματος ενώ τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκπληρώνουν σημαντικές μεταβολικές λειτουργίες, έχοντας τη δυνατότητα να απελευθερώσουν αγγειοδιασταλτικές και αγγειοσυσταλτικές ουσίες (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997).

Η αναγνώριση ουσιών του αγγειακού ενδοθηλίου με αγγειοδιασταλτικές και αγγειοσυσταλτικές ιδιότητες άνοιξε νέους ορίζοντες για βασική και κλινική έρευνα και ταυτόχρονα έστρεψε την επιστημονική σκέψη προς την κατανόηση της ρύθμισης και του ελέγχου του καρδιαγγειακού συστήματος, τόσο σε υγιείς όσο και σε νοσηρές καταστάσεις. Το 1985 περιγράφηκε η απελευθέρωση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ενός παράγοντα με έντονη αγγειοσυσταλτική δράση, ο οποίος εξαρτάται από την παρουσία εξωκυτταρικού ασβεστίου αλλά δεν επηρεάζεται από την παρεμπόδιση του α-αδρενεργικού, του χολινεργικού, του σεροτονινεργικού ή του ισταμινεργικού συστήματος. Ο παράγοντας αυτός απομονώθηκε από τα ενδοθηλιακά κύτταρα της αορτής χοίρου το 1988 από τον Yanagisawa και ονομάστηκε ενδοθηλίνη (Endothelin, ET) (Yanagisawa et al. 1988). Πρόκειται για ένα πεπτίδιο, το οποίο αποτελείται από 21 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 2492. Έχει ελεύθερο αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο και περιέχει δύο ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι ενώνουν τις κυστεΐνες των θέσεων 1-15 και 3-11, όπως φαίνεται στο σχήμα 1 (Rubanyi & Botelho 1991, Cody & Doherty 1995, Kraemer et al. 1997, Or-

tega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997, Miyauchi & Masaki 1999).

Περαιτέρω μελέτες υποστήριξαν την ύπαρξη τριών ισομορφών ενδοθηλίνης με παρόμοια δομή, της ενδοθηλίνης 1 (ET-1), της ενδοθηλίνης 2 (ET-2) και της ενδοθηλίνης 3 (ET-3), οι οποίες προέρχονται από τρία ξεχωριστά γονίδια (Schweizer et al. 1997). Η δομή των ET-2 και ET-3 διαφέρει από την ET-1 σε δύο και έξι αμινοξέα αντίστοιχα, όπως φαίνεται στο σχήμα 2.



Σχήμα 1. Η δομή της ενδοθηλίνης-1. Η πεπτιδική της αλυσίδα αποτελείται από 21 αμινοξέα και δύο δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι ενώνουν τις κυστεΐνες των θέσεων 1-15 και 3-11.

Η ET-1 ανιχνεύθηκε αρχικά στο ενδοθήλιο αλλά αργότερα βρέθηκε και σε άλλους ιστούς, όπως ο εγκέφαλος, οι νεφροί και οι πνεύμονες. Η ET-2 και ET-3 μπορούν να ανιχνευθούν σε ιστούς, όπως τα έντερα, τα επινεφρίδια και ο εγκέφαλος. Η ET-3 αφθονεί στο νευρικό ιστό και πιστεύεται ότι αποτελεί ένα νευροπεπτίδιο. Παρά το γεγονός ότι οι τρεις ισομορφές ενδοθηλίνης συναντώνται σε διάφορους ιστούς, φαίνεται ότι τα κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου παράγουν μόνο την ET-1 (Goto et al. 1992), εφόσον μόνο αυτή η

ισομορφή μπορεί να ανιχνευθεί στο αγγειακό ενδοθήλιο (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997). Επίσης, η ET-1 φαίνεται να είναι η επικρατέστερη (Geny et al. 1998, Lipa et al. 1999) και δραστικότερη (Lisy 1995) ισομορφή. Θεωρείται ως κύρια ορμόνη του καρδιαγγειακού συστήματος ή ως παρακρινής παράγοντας, ο οποίος διαδραματίζει κύριο ρόλο στα καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως η συστηματική υπέρταση, η αθηρογένεση, η καρδιακή υπερτροφία, η καρδιακή και κυκλοφορική ανεπάρκεια (Geny et al. 1998).

ET-1 Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp
ET-2 Cys-Ser-Cys-Ser-Ser-**Trp-Leu**-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp
ET-3 Cys-**Thr**-Cys-**Phe-Thr-Tyr-Lys**-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-**Tyr**-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp

Σχήμα 2. Οι τρεις ισομορφές της ενδοθηλίνης. Η ET-2 και ET-3 διαφέρουν από την ET-1 σε δύο και έξι αμινοξέα αντίστοιχα, τα οποία σημειώνονται με έντονη γραφή.

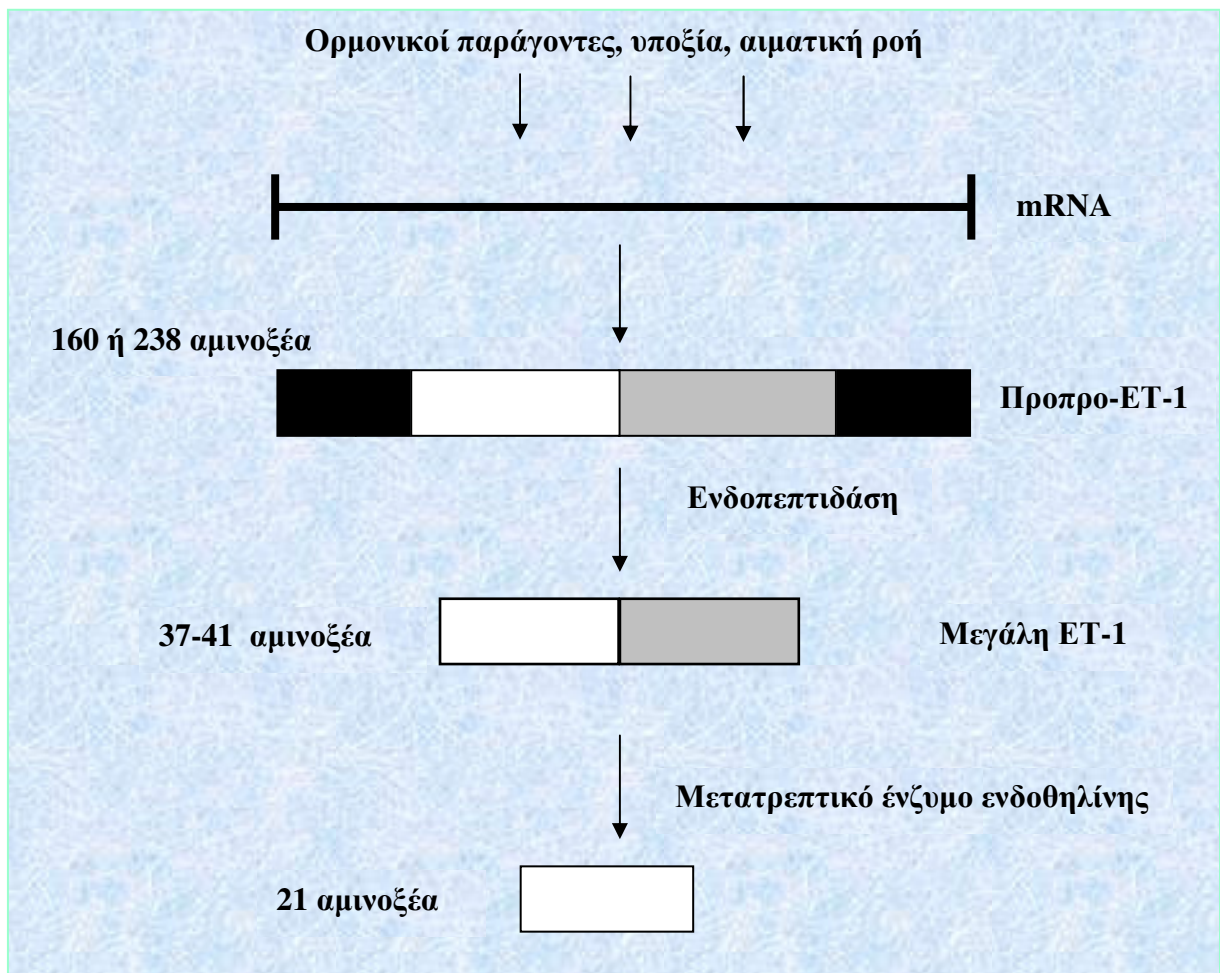
Παράλληλα η ενδοθηλίνη αποτελεί μια οικογένεια πεπτιδίων, τα οποία δρουν στις λείες μυϊκές ίνες των αιμοφόρων αγγείων και προκαλούν ισχυρή και παρατεταμένη συστολή (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997). Η ενδοθηλίνη παρουσιάζει ως προς τη δομή και τη λειτουργία μεγάλη ομοιότητα, με μια άλλη ομάδα πεπτιδίων, τις S6 σαραφοτοξίνες, νευροτοξίνες που απομονώθηκαν από το δηλητήριο του φιδιού *Atractaspis egaddensis*, το οποίο συναντάται στο Ισραήλ. Και οι δύο ομάδες πεπτιδίων ενεργοποιούν τους ίδιους υποδοχείς στον εγκέφαλο και το μυοκάρδιο (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997, Miyauchi & Masaki 1999).

ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ET-1

Η έκκριση της ET-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ρυθμίζεται σε επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης, επειδή τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν περιέχουν πυκνούς εκκριτικούς κόκκους, στους οποίους να μπορεί η ET-1 να αποθηκευτεί και αργότερα να απελευθερωθεί (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997). Το γονίδιο της έχει εντοπιστεί στο έκτο ανθρώπινο χρωμόσωμα και περιέχει πέντε εξόνια, στο δεύτερο από τα οποία περιέχεται η ακολουθία των νουκλεοτιδίων που κωδικοποιούν την τελική μορφή του πεπτιδίου των 21 αμινοξέων (Kraemer et al. 1997). Η γονιδιακή έκφραση της ET-1 επηρεάζεται από πολλούς ορμονικούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της επινεφρίνης, της θρομβίνης, της αγγειοτενσίνης, της αγγειοτενσίνης II, της ινσουλίνης, των κυτταροκινών, παραγόντων ανάπτυξης και μηχανικών ερεθισμάτων. Η εξαρτώμενη από το ασβέστιο πρωτεϊνική κινάση C εμπλέκεται σε αυτή τη διέγερση και η έκφραση της ET-1 ελαττώνεται παρουσία αναστολέων της πρωτεϊνικής κινάσης C και ενώσεων που δεσμεύουν τα κυτταροπλασματικά ιόντα ασβεστίου. Άλλοι παράγοντες, που επίσης ελαττώνουν την έκφραση της ET-1, είναι το οξείδιο του αζώτου, η προστακυκλίνη και το νατριουρητικό πεπτίδιο –ουσίες με αγγειοδιασταλτική δράση– καθώς και η ηπαρίνη (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997). Επιπλέον, ο σημαντικότερος φυσιολογικός ρυθμιστικός παράγοντας της παραγωγής και απελευθέρωσης της ET-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα φαίνεται να είναι η αιματική ροή. Αύξηση της αιματικής ροής οδηγεί σε αγγειοδιαστολή, μέσω ενεργοποίησης κατάλληλων υποδοχέων των ενδοθηλιακών κυττάρων, οι οποίοι με τη σειρά τους παράγουν και απελευθερώνουν οξείδιο του αζώτου ενώ ελαττώνουν την παραγωγή και απελευθέρωση ενδοθηλίνης (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997).

Η σύνθεση της ET πραγματοποιείται από πρόδρομες ουσίες, γνωστές ως προπροενδοθηλίνες, οι οποίες αποτελούνται από 160 και 238 αμινοξέα. Πριν καταλήξουν στην τελική μορφή του πεπτιδίου των 21 αμινοξέων σχηματίζουν, με τη δράση ενδοπεπτιδασών,

μια πρόδρομη ένωση με 37 ως 41 αμινοξέα, η οποία αναφέρεται ως προενδοθηλίνη ή μεγάλη ενδοθηλίνη και έχει και αυτή τρεις ισομορφές, την 1, 2 και 3. Η μεγάλη ενδοθηλίνη μετατρέπεται στην συνέχεια σε ενδοθηλίνη. Σε αυτό το στάδιο λαμβάνει χώρα η διάσπαση ενός δεσμού τρυπτοφάνης-βαλίνης στην ET-1 και ET-2 ή ενός δεσμού τρυπτοφάνης-ισολευκίνης στην ET-3, μέσω του ειδικού μετατρεπτικού ενζύμου της ενδοθηλίνης (σχήμα 3). Το ένζυμο αυτό είναι μια μεταλλοενδοπεπτιδάση, η δράση της οποίας αναστέλλεται από την φωσφοραμιδόνη και άλλους αναστολείς των μεταλλοπρωτεϊνών, όπως EDTA, ο-φαινανθρολίνη και διαιθυλοπυρανθρακικό οξύ (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997).



Σχήμα 3. Η βιοσύνθεση της ET-1 (Από Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997)

Το μετατρεπτικό ένζυμο της ενδοθηλίνης (MEE-1) μετατρέπει την εκκρινόμενη, από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μεγάλη ενδοθηλίνη σε ενδοθηλίνη, σε ουδέτερο pH και το μεγαλύτερο μέρος της μετατροπής αυτής λαμβάνει χώρα στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα συναντάται η δεύτερη ισομορφή του μετατρεπτικού ενζύμου της ενδοθηλίνης (MEE-2), η οποία δρα εκλεκτικά περισσότερο στη μεγάλη ενδοθηλίνη-1, σε σχέση με τη μεγάλη ενδοθηλίνη 2 ή 3 (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997, Schweizer et al. 1997).

Η ET-1 παράγεται κυρίως από ενδοθηλιακά και επιθηλιακά κύτταρα αλλά και από φαγοκύτταρα, ινοβλάστες και άλλους τύπους κυττάρων (Goto et al. 1992, Dawes et al. 1996, Yoshida et al. 1998). Στον μυοκαρδιακό ιστό η ET-1 συντίθεται και εκκρίνεται από καρδιακά κύτταρα και ινοβλάστες (Piacentini et al. 2000). Η ET-1 εφόσον εκκριθεί από τα ενδοθηλιακά κύτταρα δε δρα ως ορμόνη του κυκλοφορικού συστήματος και στην πραγματικότητα η συγκέντρωσή της στο πλάσμα δεν είναι ικανή να προκαλέσει αγγειοσύσπαση. Πιστεύεται ότι το 80 % της συντιθέμενης ποσότητας εκκρίνεται στο βασεοπλευρικό τμήμα. Αυτό ανταποκρίνεται στο γεγονός ότι η ET-1 δρα με παρακρινή τρόπο, ως τοπική ορμόνη, στα επιφανειακά κύτταρα των αγγειακών λείων μυϊκών ινών. Επιπρόσθετα η ET-1 έχει μικρό χρόνο ημιζωής στο αίμα λόγω της ταχύτατης σύνδεσής της με τους ιστούς και λόγω της ύπαρξης ενός διασπαστικού ενζύμου, το οποίο τη μεταβολίζει πολύ γρήγορα (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997).

ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ET

Η ET-1 επιδεικνύει ευρύ φάσμα δράσεων όπως αγγειοσύσπαση, αγγειοδιαστολή, βρογχόσπασμο και μίτωση (Piacentini et al. 2000). Αναφέρεται ότι δρα με παρακρινή και αυτοκρινή τρόπο και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τοπική ρύθμιση του αγγειακού τόνου των λείων μυϊκών ινών, στην ανάπτυξη των κυττάρων (Orgenorth 1995) και στην

ανακατασκευή του αγγειακού και μυοκαρδιακού τοιχώματος σε ορισμένες παθήσεις του καρδιαγγειακού συστήματος (Battistini et al. 1993, Lisy 1995, Schmeck & Koch 1997). Υποστηρίζεται ότι η ET-1 ρυθμίζει την ανάπτυξη των κυττάρων επηρεάζοντας τη σύνθεση του DNA, την έκφραση πρωτοογκογονιδίων, τον πολλαπλασιασμό και την υπερτροφία των κυττάρων (Hafizi et al. 1999, Rossi et al. 1999, Chiao et al. 2000, Piacentini et al. 2000). Επίσης, αυξημένη παραγωγή της ET-1 έχει συσχετιστεί με την παρουσία του εξειδικευμένου αντιγόνου του προστάτη και ταυτόχρονα η ET-1 αυξάνει τη σύνθεση DNA καρκινικών κυττάρων του προστάτη (Chiao et al. 2000). Παράλληλα δρα συνεργικά με άλλους αυξητικούς παράγοντες και την ινσουλίνη (Wolpert et al. 1993) καταλήγοντας σε μετασχηματισμό ή πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Ορισμένοι από τους παραπάνω παράγοντες προκαλούν με τη σειρά τους σύνθεση ή/και έκκριση ενδοθηλίνης. Η ινσουλίνη συγκεκριμένα αυξάνει την έκκριση και τη δράση της ET-1 σε καταστάσεις μη ινσουλινεξαρτώμενου διαβήτη και υπέρτασης (Höpfner et al. 1998) ενώ η αιμοσφαιρίνη έχει βρεθεί ότι αυξάνει την απελευθέρωση της ET-1 στα εγκεφαλικά ενδοθηλιακά κύτταρα, μέσω της απομάκρυνσης του οξειδίου του αζώτου (Lin et al. 2001).

Η ET-1 εμπλέκεται στους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς αρκετών παθήσεων, όπως η υπέρταση, η καρδιακή ανεπάρκεια, η τοπική ισχαιμία (συμπεριλαμβανομένου και του εμφράγματος του μυοκαρδίου), η οξεία νεφρική ανεπάρκεια και ο αγγειόσπασμος (συμπεριλαμβανομένης και της υπαραχνοειδούς αιμορραγίας). Στην παθογένεση της υπέρτασης, για παράδειγμα, η ET-1 μπορεί να εμπλέκεται ασκώντας αγγειακή, νευρική, νεφρική και ενδοκρινική δράση (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997). Προκαλεί αγγειακή υπερτροφία και ισχυρή αγγειοσύσπαση και συμμετέχει στην αύξηση της αρτηριακής πίεσης, στην παθογένεση ή και στη διατήρηση της υπέρτασης, τόσο σε πειραματόζωα όσο και στον άνθρωπο (Schiffrin 1995). Αυξάνει την κεντρική και περιφερική συμπαθητική δραστηριότητα, προκαλεί παραγωγή ρενίνης, αγγειοτενσίνης II, αλδοστερόνης και

επιπεφρίνης. Ωστόσο, είναι αρκετά δύσκολο να διατυπωθεί ο ρόλος των επιπέδων ET-1 του πλάσματος στην ανάπτυξη της υπέρτασης, επειδή η πλειονότητα της ET-1 που συντίθεται στο ενδοθήλιο απελευθερώνεται προς τις υποκείμενες λείες μυϊκές ίνες. Επομένως τοπικά αυξημένη παραγωγή ET-1 δε σημαίνει απαραίτητα και αυξημένη συγκέντρωσή της στο πλάσμα. Παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα ET-1 αυξάνονται ελάχιστα μόνο σε καταστάσεις υπέρτασης, η μακροχρόνια αύξηση της ET του πλάσματος σε παθολογικά πλαίσια προκαλεί υπέρταση και σημαντική ελάττωση στην αποβολή νατρίου με την ούρηση (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997). Πρόσθετες επιδράσεις της στη νεφρική λειτουργία περιλαμβάνουν την πρόκληση αγγειοσύσπασης των νεφρικών αιμοφόρων αγγείων, ελάττωση της νεφρικής αιματικής ροής και του ρυθμού σπειραματικής διήθησης καθώς και αναστολή της έκκρισης ρενίνης (Kraemer et al. 1997). Αυξημένη σύνθεση ET στο εσωτερικό των αιμοφόρων αγγείων χωρίς μεταβολές των επιπέδων της στο πλάσμα αναφέρεται σε διάφορα πειραματικά πρότυπα με υψηλή αρτηριακή πίεση ενώ μακροπρόθεσμη χορήγηση αποκλειστών των υποδοχέων ενδοθηλίνης μετριάζει την υπέρταση. Επίσης, η εμφάνιση προοδευτικής υπέρτασης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σχετίζεται με γενική ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων στη μητρική κυκλοφορία και οφείλεται στην υπερπαραγωγή ET-1, την ελαττωμένη παραγωγή οξειδίου του αζώτου και προστακυκλίνης καθώς και στην απόκτηση προθρομβωτικών ιδιοτήτων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα πειραματικά δεδομένα που υποστηρίζουν τη συμμετοχή της ET στο μηχανισμό πρόκλησης αγγειακής και καρδιακής υπερτροφίας σε συνδυασμό με υπέρταση αυξάνονται συνεχώς (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997).

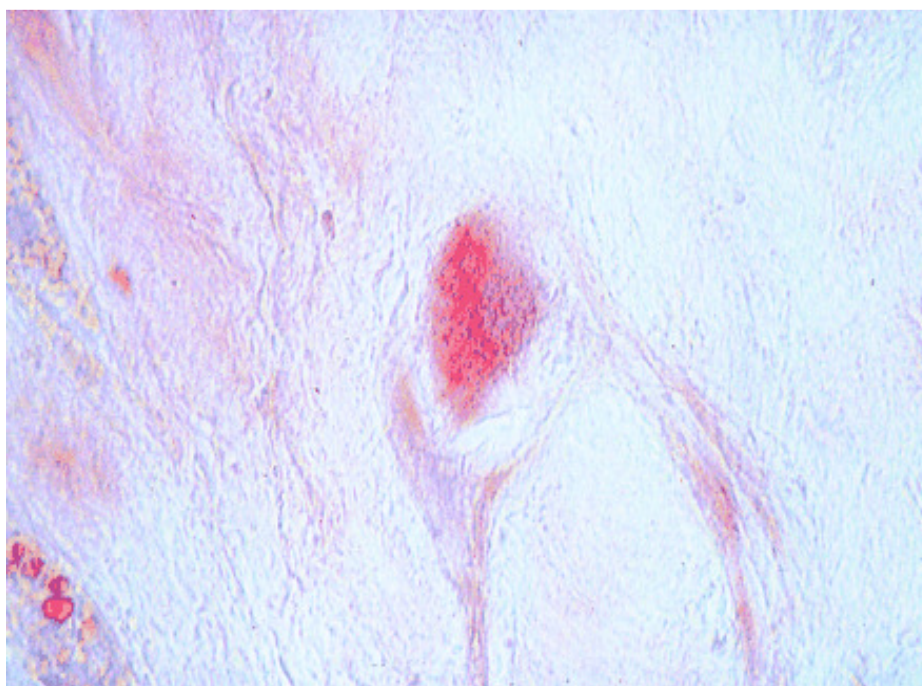
Η έκκριση της ET αυξάνεται επίσης στην αθηροσκλήρωση, στην απόφραξη αγγείων μετά από αγγειοπλαστική επέμβαση, στην υπέρταση, σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, στη στηθάγχη (Cesari et al. 1996), σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις του πνεύμονα, όπως η πνευμονική υπέρταση (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997), σε ασθενείς με

κίρρωση του ήπατος (Salo et al. 1995) και στην καρκινογένεση (Battistini et al. 1993, Kurbel et al. 1999). Τα επίπεδα μεγάλης ενδοθηλίνης-1 του πλάσματος αποτελούν το σημαντικότερο προγνωστικό παράγοντα για την εξέλιξη ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια. Η ισχαιμία προκαλεί σύνθεση ET ενώ σε περιπτώσεις οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου και ασταθούς στηθάγχης όσο υψηλότερα είναι τα επίπεδα ET του πλάσματος τόσο χειρότερη η πρόγνωση. Τα επίπεδα ET του πλάσματος την τρίτη μέρα ύστερα από έμφραγμα του μυοκαρδίου σχετίζονται με τη θνησιμότητα των ασθενών και ύστερα από εννέα εβδομάδες ενδονοσοκομειακής περίθαλψης αποτελούν σημαντικό προγνωστικό δείκτη περαιτέρω καρδιαγγειακών επιπλοκών (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997). Αύξηση της ET-1 σημειώνεται επίσης ύστερα από μεταμόσχευση καρδιάς, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στην ελαττωμένη απομάκρυνσή της από τους πνεύμονες και τους νεφρούς ή/και σε αυξημένη παραγωγή της (Allevard et al. 1991, Geny et al. 1998). Υποστηρίζεται ότι τα επίπεδα ET του πλάσματος ασθενών με στηθάγχη και κυρίως εκείνων που υπέστησαν έμφραγμα του μυοκαρδίου ή παρουσιάζουν απόφραξη του αριστερού κλάδου της στεφανιαίας αρτηρίας είναι πολύ υψηλότερα από τα αντίστοιχα υγιών ανθρώπων (Kaski et al. 1998). Σε διάφορα πειραματικά πρότυπα με εμφραγματικούς ασθενείς, στους οποίους χορηγήθηκαν ουσίες που αναστέλλουν τη δράση της ET βρέθηκε ελάττωση της καταστροφής του μυοκαρδίου (Hasdai et al. 1994). Παράλληλα έχει βρεθεί ότι σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, που πάσχουν από χρόνια στηθάγχη η χορήγηση ανταγωνιστών ασβεστίου προκάλεσε ελάττωση της ισχαιμίας και των επιπέδων ET-1 του πλάσματος (Letizia et al. 1996).

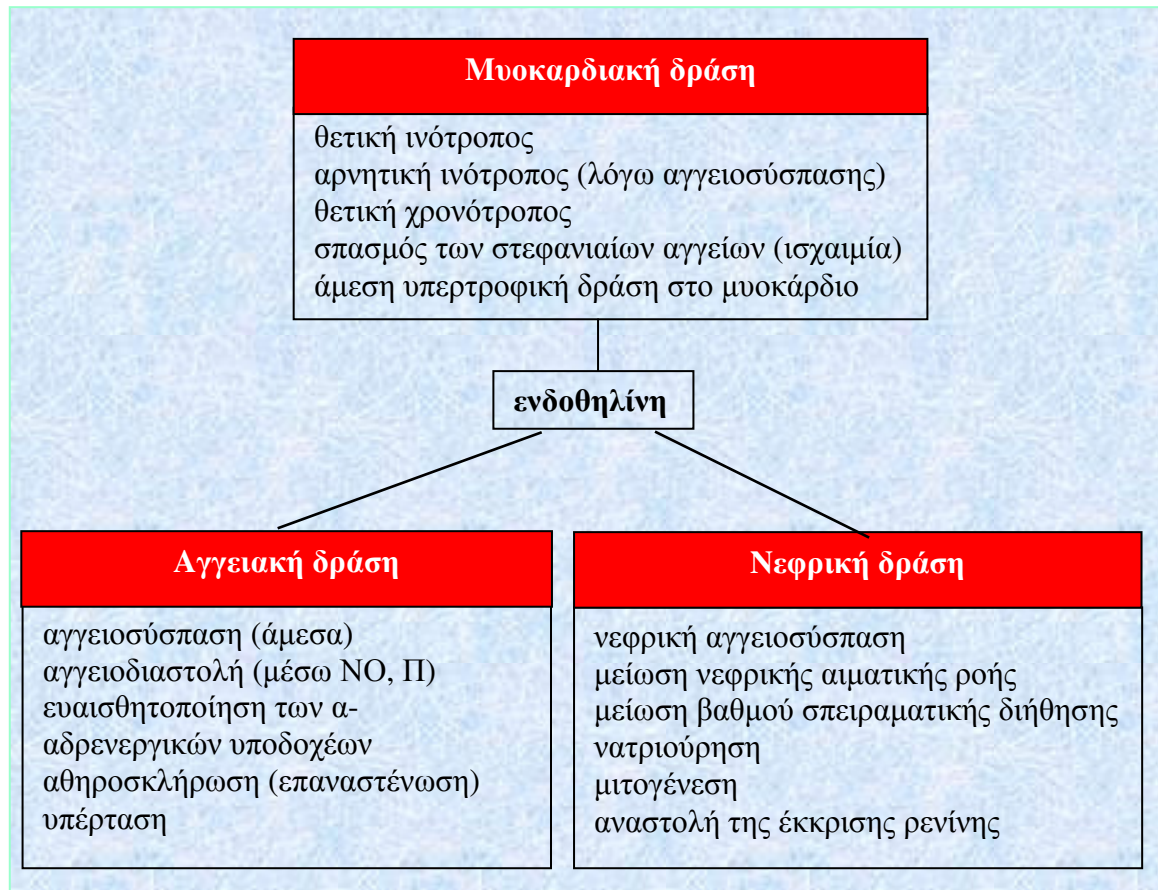
Πέρα από την αγγειοσυσπαστική και αγγειοδιασταλτική της δράση, η ET-1 προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του αγγειακού ενδοθηλίου, των λείων μυϊκών ινών των αγγείων και των ινοβλαστών, γεγονός που οδηγεί σε δομικές αλλαγές του αγγειακού τοιχώματος. Προκαλεί υπερτροφία των μυοκαρδιακών κυττάρων (Maeda et al. 1998^γ) και επιδεικνύει θετική ινότροπο και χρονότροπο δράση στο μυοκάρδιο καθώς και αντινατρι-

ουρητική δράση (Kraemer et al. 1997, Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997, Miyauchi & Masaki 1999).

Επίσης, έχει βρεθεί ότι η ET-1 απελευθερώνεται τοπικά από τις αθηρωματικές πλάκες των στεφανιαίων αγγείων με την εφαρμογή μηχανικών ερεθισμάτων. Εισερχόμενη, στη συνέχεια στην κυκλοφορία, μπορεί να προκαλέσει αιμοδυναμικές μεταβολές λόγω της αγγειοσυσπαστικής της δράσης και ταυτόχρονα να επηρεάσει την ανατομική αναμόρφωση των στεφανιαίων αγγείων και να επιταχύνει το μηχανισμό αθηρογένεσης, λόγω της μιτωτικής της δράσης. Στο σχήμα 4 φαίνεται η ET-1 εντοπισμένη με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας στο εσωτερικό ενός ινοβλάστη και στο σχήμα 5 συνοψίζονται οι κυριότερες δράσεις της ET.



Σχήμα 4. Ενδοκυτταρικός εντοπισμός της ET-1 με τεχνικές ανοσοϊστοχημείας (ως κόκκινες κηλίδες) μέσα σε έναν ινοβλάστη. Από Hasdai et al. 1997.



Σχήμα 5. Οι κυριότερες δράσεις της ενδοθηλίνης στο κυκλοφορικό σύστημα, στο μυοκάρδιο και στους νεφρούς. NO: οξείδιο του αζώτου, Π: προστακυκλίνη (Από Kraemer et al. 1997, ανατυπώνεται με την άδεια του συγγραφέα).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ET

Η ET-1 οφείλει τη μιτογόνο δράση της στη φωσφορυλίωση της τυροσίνης και την ενεργοποίηση δύο άλλων πρωτεϊνικών κινασών των λείων μυϊκών ινών των αγγείων. Επιπρόσθετα επιδεικνύει προσυναπτική νευρορρυθμιστική δράση, μέσω των υποδοχέων ET_B, μιας ειδικής κατηγορίας υποδοχέων, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο τη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου στους περιφερικούς νευρώνες τόσο του αδρενεργικού όσο και του χολινεργικού συστήματος (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997).

Υποδοχείς ET συναντώνται σε πολυάριθμα κύτταρα, όπως σε λείες μυϊκές ίνες, ινοβλάστες και στο αγγειακό ενδοθήλιο. Η δομή του αμινοτελικού άκρου της ET καθορίζει τη συνάφειά της με τον υποδοχέα ενώ το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει τη θέση σύνδεσης του πεπτιδίου με τον υποδοχέα του. Η αντικατάσταση των ζευγών κυστεΐνης με στερεοχημικά όμοια αμινοξέα ελαττώνει την αγγειοσυσταλτική δράση της ET αλλά δεν επηρεάζει το βαθμό σύνδεσής της με τους υποδοχείς της σε διάφορους ιστούς, όπως η παρεγκεφαλίδα. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη περισσότερων του ενός τύπων υποδοχέων της ενδοθηλίνης (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997). Οι τύποι αυτοί έχουν χαρακτηριστεί A, B₁, B₂ και C (Opgenorth 1995, Schmeck & Koch 1997).

Το 1990 απομονώθηκαν οι υποδοχείς A και B (ET_A και ET_B). Η συνάφεια της ET-1 προς τον υποδοχέα ET_A είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της ET-2 και πολύ μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της ET-3. Στον άνθρωπο η συνάφεια της ET-1 προς τον ίδιο υποδοχέα είναι 1000 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της ET-3. Αντιθέτως ο υποδοχέας ET_B δεν παρουσιάζει εκλεκτικότητα μεταξύ των τριών ισομορφών ενδοθηλίνης. Η διαφορετική συνάφεια της ET-1 και ET-3 με τους δύο τύπους υποδοχέων βοηθά στην ταξινόμησή τους και στο χαρακτηρισμό των φυσιολογικών τους αντιδράσεων. Ενεργοποίηση των υποδοχέων ET_A, οι οποίοι συναντώνται στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων, προκαλεί αγγειοσύσπαση ενώ ενεργοποίηση των υποδοχέων ET_B, οι οποίοι συναντώνται στο ενδοθήλιο, προκαλεί αγγειοδιαστολή (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997). Άλλες μελέτες, ωστόσο, υποστηρίζουν την ύπαρξη υποδοχέων ET_B στις λείες μυϊκές ίνες της σφαγίτιδας φλέβας (Summer et al. 1992) και της κύριας φλέβας του ποδιού (Moreland et al. 1992) κουνελιών και ότι η διέγερσή τους δεν προκαλεί αγγειοδιαστολή αλλά αγγειοσυστολή. Με βάση την παραπάνω ένδειξη προτάθηκε η ύπαρξη δύο τύπων υποδοχέων ET_B, η οποία και επιβεβαιώθηκε το 1993. Έτσι υποδοχείς ET_{B1} ονομάστηκαν αυτοί που βρίσκονται στο ενδοθήλιο και συμβάλλουν στην απελευθέρωση αγγειοδιασταλτικών παραγό-

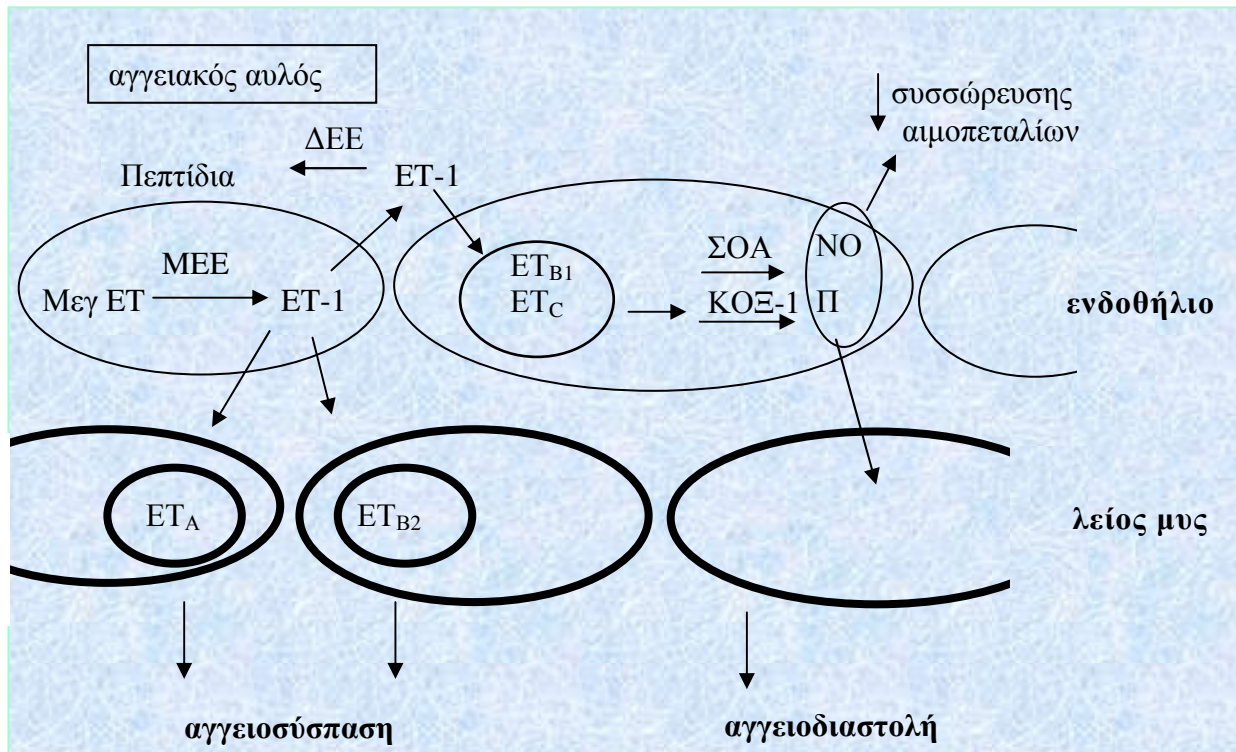
ντων, όπως οξειδίου του αζώτου και προστακυκλίνης ενώ ET_{B2} ονομάστηκαν εκείνοι οι υποδοχείς που συναντώνται στις λείες μυϊκές ίνες των αγγείων και η διέγερση των οποίων προκαλεί αγγειοσύσπαση και αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997).

Πιστεύεται επίσης ότι οι υποδοχείς του ενδοθηλίου είναι πιο ευαίσθητοι στην ET-1 σε σύγκριση με τους υποδοχείς των λείων μυϊκών ινών. Είναι γενικώς αποδεκτό ότι η ET-1 αποτελεί αγγειοδιασταλτικό παράγοντα σε φυσιολογικές καταστάσεις, δρώντας επάνω στους υποδοχείς ET_{B1} του ενδοθηλίου. Σε παθολογικές καταστάσεις τα επίπεδά της στο πλάσμα αυξάνονται και, συνδεδεμένη στους υποδοχείς του αγγειακού τοιχώματος, ασκεί αγγειοσυσπαστική δράση (σχήμα 6). Τέλος, ένας τρίτος τύπος υποδοχέα, ο ET_C, έχει ανιχνευθεί στο βάτραχο *Xenopus laevis*, που επιδεικνύει μεγαλύτερη συνάφεια προς την ET-3 σε σύγκριση με την ET-1 και η ενεργοποίησή του προκαλεί απελευθέρωση οξειδίου του αζώτου. Ο υποδοχέας αυτός δεν έχει βρεθεί στα κύτταρα των θηλαστικών (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997).

Αναστολή της δράσης της ενδοθηλίνης επιτυγχάνεται με ουσίες, οι οποίες δρουν ανταγωνιστικά σε αυτήν ως προς τη σύνδεση με τους υποδοχείς της (Moreland 1994, Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997). Οι αποκλειστές των υποδοχέων ενδοθηλίνης αποδεικνύονται χρήσιμοι στη θεραπεία της υπέρτασης, στην επούλωση ελκών και στην καταπολέμηση της τοξικότητας που προκαλεί η κυκλοσπορίνη (Miller et al. 1993, Schiffrin 1999).

Σε πειραματόζωα τα οποία υπέστησαν έμφραγμα του μυοκαρδίου, η χορήγηση αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της ενδοθηλίνης, μονοκλωνικών αντισωμάτων κατά της ET-1 και αποκλειστών των υποδοχέων ET_A και ET_B οδήγησε σε μείωση του αριθμού των εμφραγματικών επεισοδίων (Watanabe et al. 1991, Grover et al. 1992, Grover et al. 1993) και παράλληλα είχε ευεργετική επίδραση στην ανατομική αναδιαμόρφωση των

κοιλιών (Fraccarollo et al. 1997, Oie et al. 1998). Η χρήση αποκλειστών με σκοπό την αναστολή της παραγωγής ή της δράσης της ET-1 δίνει ελπιδοφόρα μηνύματα κυρίως για παθολογικές καταστάσεις, στις οποίες έχει βρεθεί ότι η ενδοθηλίνη διαδραματίζει κάποιο ρόλο (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997).



Σχήμα 6. Η αλληλεπίδραση της ET-1 με άλλους αγγειοδραστικούς παράγοντες του ενδοθηλίου. Η μεγάλη ενδοθηλίνη (Μεγ ET) μετατρέπεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα, με τη δράση του μετατρεπτικού ενζύμου της ενδοθηλίνης (MEE), σε ET-1. Η ET-1 εκκρίνεται στο βασειοπλευρικό τμήμα και συνδέεται με τους υποδοχείς ET_A και ET_{B2} των λείων μυϊκών ινών του αγγείου, προκαλώντας αγγειοσύσπαση. Παράλληλα απελευθερώνεται και στον αγγειακό αυλό, όπου το διασπαστικό ένζυμο της ενδοθηλίνης (ΔΕΕ) τη μεταβολίζει ραγδαία. Η ET-1 που κυκλοφορεί στο πλάσμα συνδέεται με τους υποδοχείς ET_C και ET_{B1}, διεγείροντας την παραγωγή συνθάσης του οξειδίου του αζώτου (ΣΟΑ) και κυκλοοξυγονάσης 1 (ΚΟΞ-1). Το οξείδιο του αζώτου (NO) και η προστακυκλίνη (Π) που παράγονται με τη δράση αυτών των δύο ενζύμων αναστέλλουν τη συγκόλληση αιμοπεταλίων και, δρώντας στον υποκείμενο λείο μυ, προκαλούν αγγειοδιαστολή.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ET ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

Σύμφωνα με τους Ortega Mateo και Aleixandre de Artinano (1997) η συγκέντρωση ET-1 στο πλάσμα είναι περίπου 1 pmol/L αλλά πλήθος μελετών υποδεικνύει αρκετά μεγαλύτερο φάσμα τιμών για υγιείς ανθρώπους σε κατάσταση ηρεμίας, το οποίο κυμαίνεται από 0,2 ως 10 pmol/L (0,6 ως 25 pg/mL, πίνακας 1). Ορισμένες μελέτες χρησιμοποιούν ως μονάδα μέτρησης το pg/ml ενώ άλλες το pmol/L. Στον πίνακα όλες οι τιμές της ενδοθηλίνης εκφράζονται σε pmol/L. Η μετατροπή των pg/ml σε pmol/L έγινε σύμφωνα με τον τύπο $\text{pg/ml} / \text{MB ET} \times 1000 = \text{pmol/L}$, όπου MB το μοριακό βάρος της ενδοθηλίνης.

Συγκεντρώσεις ενδοθηλίνης μεταξύ 5 και 40 pmol/L είναι αγγειοδραστικές, γεγονός το οποίο έχει μεγάλη σημασία για τις παθοφυσιολογικές ιδιότητες της ουσίας (McMurray et al. 1992). Επιπλέον η συγκέντρωσή της στο χώρο μεταξύ του αγγειακού ενδοθηλίου και των λείων μυϊκών ινών δε διαφέρει σημαντικά από την αντίστοιχη του πλάσματος. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η ενδοθηλίνη που απελευθερώνεται δε συσσωρεύεται σε αυτό το τμήμα. Πιθανότατα συνδέεται με υποδοχείς των λείων μυϊκών ινών των αγγείων ή με το ενδοθήλιο σε βραχύ χρονικό διάστημα. Υποστηρίζεται ότι η συγκέντρωση ενδοθηλίνης που ανιχνεύθηκε στον αγγειακό ιστό είναι 100 φορές περίπου μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του πλάσματος, αλλά το μεγαλύτερο μέρος της είναι συνδεδεμένο με υποδοχείς και μόνο μια ελάχιστη ποσότητα παραμένει στην ελεύθερη μορφή της (Ortega Mateo & Aleixandre de Artinano 1997).

Πίνακας 1. Επίπεδα ενδοθηλίνης στο πλάσμα υγιών ανθρώπων

Πηγή	Δείγμα	Ηλικία (έτη)	Ενδοθηλίνη (pmol/L)*	Μέθοδος, ισομορφή
Edwards et al. 1991	67	35 ± 2	1,0 ± 0,1	RIA, ET
Lerman et al. 1992	24	38 ± 2	2,7 ± 0,1	RIA**, ET-1
McMurray et al. 1992	16	42 ± 3	6,4 ± 0,3	RIA, ET-1,-2
Haas et al. 1993	12	19 - 52	0,8 ± 0,1	RIA, ET-1
Dorent et al. 1994	20	53 ± 5	1,4 ± 0,2	RIA, ET
Richter et al. 1994	20 A***	28 ± 2	0,8 ± 0,1	RIA, ET-1
Dengler et al. 1995α	21 A, 9 Γ	40 ± 2,2	0,6 ± 0,1	RIA, ET
Dengler et al. 1995β	18 A, 12 Γ	38 ± 2,2	0,6 ± 0,1	RIA, ET
de Groote et al. 1995	13 A, 2 Γ	35 ± 10,3	0,8 ± 0,1	RIA, ET-1
Kaski et al. 1995	4 A, 17 Γ	53 ± 1,5	1,2 ± 0,1	RIA, ET
Schmoeckel et al. 1995	7 A	53 ± 5	4,7 ± 0,4	RIA, ET-1
Sehested et al. 1995	9 A, 1 Γ	32,1	10,8 ± 1,6	RIA, ET-1,-2
Sudhir et al. 1995	8		10,4 ± 0,9	RIA, ET-1,-3
Maeda et al. 1996	5 A	22	0,5 ± 0,0	EIA, ET-1
Ferri et al. 1997β	14 A	53,2 ± 1,6	0,2 ± 0,0	RIA, ET-1
Maeda et al. 1997α	5 A	18 - 20	0,5 ± 0,0	EIA, ET-1
Mangiery et al. 1997	12 A	37 (24-42)	0,3 ± 0,0	RIA, ET-1
Genth-Zotz et al. 1998	13 A, 4 Γ	60 ± 9	1,3 ± 0,1	RIA, ET-1, ΜεγET
Mangiery et al. 1998	10 A	27,3 ± 0,5	0,2 ± 0,0	RIA, ET-1
Piquard et al. 1998	10	41,6 ± 3,4	2,3 ± 0,2	RIA, ET-1
Savourey et al. 1998	9 A	33,1 ± 6,9	8,5 ± 1,2	RIA, ET-1

*Οι τιμές εκφράζονται ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα

**RIA = ραδιοανοσοπροσδιορισμός, EIA = ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός,

***A = άντρες, Γ = γυναίκες

Τα οιστρογόνα επηρεάζουν την αγγειακή λειτουργία αυξάνοντας την παραγωγή οξειδίου του αζώτου και ελαττώνοντας τα επίπεδα (Luscher et al. 1996, Spence 1996) και την παραγωγή ET-1 (Morey et al. 1998). Το κάπνισμα, επίσης, έχει άμεση επίδραση στο αγγειακό σύστημα, αυξάνοντας τα επίπεδα ET-1 (Haak et al. 1994, Goerre et al. 1995, Eastwood 1997) και προκαλώντας αγγειοσύσπαση (Kiowski et al. 1994). Άλλες μελέτες δείχνουν ότι τα επίπεδα ET-1 σε παχύσαρκους (δείκτης σωματικής μάζας > 30 kg/m²) και υπερτασικούς είναι αυξημένα (Licata 1993, Ferri et al. 1997a).

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΤΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Μελέτες των τελευταίων χρόνων εξέτασαν την επίδραση της φυσικής δραστηριότητας στην ενδοθηλίνη του πλάσματος σε ασθενείς και υγιείς ανθρώπους αλλά και σε πειραματόζωα. Τα επίπεδα ET-1 του πλάσματος ασθενών με στεφανιαία νόσο βρέθηκε ότι αυξάνονται σημαντικά κατά τη διάρκεια δυναμικού τύπου άσκησης (Letizia et al. 1995, Predel et al. 1995) αλλά και κατά τη διάρκεια ισομετρικής άσκησης των άνω άκρων. Μπορεί, επίσης, να αυξάνονται παροδικά κατά τη διάρκεια καθημερινής φυσικής δραστηριότητας σε ασθενείς με χρόνια συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, γεγονός το οποίο συμβάλλει στη σταδιακή επιδείνωση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας (Mangieri et al. 1997). Αύξηση των επιπέδων ενδοθηλίνης του πλάσματος βρέθηκε και σε ασθενείς, οι οποίοι είχαν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου και ασκήθηκαν σε περιβάλλον με θερμοκρασία αέρα -22 °C. Η αύξηση αυτή συσχετίστηκε με την πρόκληση ισχαιμικής αντίδρασης στο μυοκάρδιο. Αντιθέτως άσκηση των ίδιων ασθενών σε περιβάλλον με θερμοκρασία 22 °C δεν επηρέασε τα επίπεδα ET του πλάσματος (Petersen et al. 1994). Αύξηση της ET-1 του πλάσματος διαπιστώθηκε και σε ασκηθέντες πνευμονοπαθείς (Yamakami et al. 1997). Αντίθετα, η εκτέλεση υπομέγιστης δοκιμασίας κόπωσης σε ασθενείς με επισωρευτική καρδιοπάθεια δεν κατόρθωσε να μεταβάλει τα επίπεδα ET-1, γεγονός το οποίο πι-

θανά να συνδυάζεται με τη μειωμένη αντοχή των ασθενών αυτών στην άσκηση (Ishikawa et al. 1995, Ishikawa et al. 1998). Ο πίνακας 2 παρουσιάζει μελέτες, στις οποίες εξετάστηκε η επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος ασθενών με καρδιαγγειακά νοσήματα, παθήσεις του πνεύμονα ή του ήπατος ή μεταβολικά νοσήματα. Από τον πίνακα φαίνεται ότι στις μισές περίπου μελέτες η φυσική δραστηριότητα προκάλεσε αύξηση των επιπέδων ενδοθηλίνης του πλάσματος ενώ στις άλλες μισές η άσκηση δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδά της. Μόνο σε μία μελέτη σε ασθενείς με μόνιμη στηθάγχη, οι οποίοι διέκοψαν τη λήψη φαρμακευτικών ουσιών και εκτέλεσαν υπομέγιστη άσκηση στο δαπεδοεργόμετρο, αναφέρεται σημαντική ελάττωση της ET-1 κατά τη μέγιστη επιβάρυνση (Dodds et al. 1995). Επίσης στις περισσότερες από τις μελέτες, όπου χρησιμοποιήθηκε υγιής ομάδα ελέγχου, βρέθηκε ότι οι ασθενείς είχαν αυξημένα επίπεδα ηρεμίας ενδοθηλίνης σε σύγκριση με τους υγιείς, ανεξάρτητα από την επίδραση της άσκησης. Από την άλλη μεριά η ET-1 φαίνεται να συμβάλλει στη μειωμένη ικανότητα ανοχής της άσκησης σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, πιθανότατα επειδή δεν επιτρέπει τη διαστολή των περιφερικών αγγείων κατά τη διάρκεια της άσκησης (Krum et al. 1995).

Ο πίνακας 3 παρουσιάζει τις κυριότερες μελέτες που εξέτασαν την επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος υγιών εθελοντών. Στις περισσότερες από αυτές φαίνεται να αυξάνονται τα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος. Αναφέρεται ότι εξαντλητική ποδηλάτηση, η οποία προκάλεσε οξεία κυψελιδική υποξία, συνοδεύτηκε από αύξηση των επιπέδων ET του πλάσματος (Kullmer et al. 1995). Ποδηλάτηση διάρκειας 30 min σε μέτρια ένταση ή μέγιστης έντασης με μικρή διάρκεια προκάλεσε αύξηση της συγκέντρωσης ET μετά την άσκηση (Rocker et al. 1996). Από την άλλη πλευρά, εξαντλητική ποδηλάτηση από υγιείς εθελοντές, η οποία προκάλεσε οξεία ιστική υποξία, δεν επηρέασε την έκκριση ET-1, την έκκριση μεγάλης ενδοθηλίνης ή τη

Πίνακας 2. Επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος ασθενών.

Πηγή	Δείγμα - είδος άσκησης	Μεταβολές της ενδοθηλίνης του πλάσματος
Ciocchis et al. 1995	20 ασθενείς με στεφανιαία νόσο - δυναμικού τύπου άσκηση	Σημαντική αύξηση
Cohen Solal et al. 1995	Ασθενείς ύστερα από μεταμόσχευση μυοκαρδίου – δυναμικού τύπου άσκηση (ποδηλάτηση)	Φυσιολογικά επίπεδα σε κατάσταση ηρεμίας, αλλά υπερβολική παραγωγή κατά την άσκηση
Predel et al. 1995	10 ασθενείς με στεφανιαία νόσο – δυναμικού τύπου άσκηση (ποδηλάτηση)	Σημαντική αύξηση
Salo et al. 1995	Ασθενείς με κίρρωση του ήπατος σε σύγκριση με υγιή άτομα – δυναμικού τύπου άσκηση (ποδηλάτηση)	3-5 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις στους ασθενείς σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές
Chen et al. 1996	46 ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια	Αύξηση μετά την άσκηση στους ασθενείς σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές
Fontana et al. 1997	Ασθενείς με συμπτώματα στηθάγχης κατά την κόπωση	Αύξηση. Συσχέτιση ασκησιογενούς ισχαιμίας με αυξημένη παραγωγή ενδοθηλίνης

Πίνακας 2 (συνέχεια). Επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος ασθενών.

Πηγή	Δείγμα - είδος άσκησης	Μεταβολές της ενδοθηλίνης του πλάσματος
Mangieri et al. 1997	Ασθενείς με σοβαρή χρόνια συμφορητική καρδιοπάθεια - ισομετρική άσκηση	Παροδική αύξηση κατά τη διάρκεια καθημερινής άσκησης, γεγονός το οποίο οδηγεί σε χειροτέρευση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας
Yamakami et al. 1997	Ασθενείς με εμφύσημα και βλάβη στο ενδιάμεσο τμήμα του πνεύμονα - σταδιακά αυξανόμενη ένταση μέχρι το μέγιστο	Σημαντική αύξηση τόσο στους ασθενείς με εμφύσημα όσο και σε αυτούς με πνευμονική νόσο
Michelakakis et al. 1998	Ασθενείς με σύνδρομο X σε σύγκριση με υγιείς	Απουσία σημαντικών διαφορών σε ηρεμία μεταξύ των δύο ομάδων. Σημαντικά υψηλότερες τιμές ύστερα από άσκηση στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Ελάττωση στην ομάδα ελέγχου σε σύγκριση με τις τιμές ηρεμίας
McMurray et al. 1992	Ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια και υγιής ομάδα ελέγχου	Αυξημένα επίπεδα στους ασθενείς, αλλά απουσία σημαντικών μεταβολών κατά την άσκηση και στις δύο ομάδες

Πίνακας 2 (συνέχεια). Επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος ασθενών.

Πηγή	Δείγμα - είδος άσκησης	Μεταβολές της ενδοθηλίνης του πλάσματος
Ishikawa et al. 1995	7 ασθενείς με συγγενή καρδιακή ανεπάρκεια (μέσης ηλικίας 13 ετών) - κατάλληλα προσαρμοσμένη δοκιμασία κόπωσης	Καμία μεταβολή των επιπέδων ενδοθηλίνης του πλάσματος
de Groote et al. 1995	Ασθενείς με διατακτικού τύπου ιδιοπαθή μυοκαρδιοπάθεια – ηρεμία και μέγιστη άσκηση	Απουσία μεταβολών, αλλά υψηλότερες τιμές στους ασθενείς σε σύγκριση με υγιείς
Sehested et al. 1995	10 ασθενείς, οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση μυοκαρδίου και ισάριθμη υγιής ομάδα ελέγχου	Υψηλότερα επίπεδα ηρεμίας στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Απουσία σημαντικών μεταβολών μεταξύ των δύο ομάδων κατά την άσκηση
Mattyus et al. 1996	Εξετάστηκε η επίδραση της άσκησης στην απέκκριση ενδοθηλίνης με τα ούρα σε παιδιά που έπασχαν από διαβήτη και σε υγιή ομάδα ελέγχου	Η άσκηση σε ασθενείς με διαβήτη δεν επηρέασε την απέκκριση ενδοθηλίνης
Ishikawa et al. 1998	Ασθενείς με καρδιοπάθεια – προσαρμοσμένη δοκιμασία κόπωση	Καμία αύξηση

Πίνακας 2 (συνέχεια). Επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος ασθενών.

Πηγή	Δείγμα - είδος άσκησης	Μεταβολές της ενδοθηλίνης του πλάσματος
Ferri et al. 1997β	Ασθενείς με στεφανιαία νόσο σε σύγκριση με υγιή ομάδα ελέγχου	Υψηλότερα επίπεδα ηρεμίας στους ασθενείς σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Απουσία σημαντικών μεταβολών κατά την άσκηση και στις δύο ομάδες
Dodds et al. 1995	12 ασθενείς με σταθερή στηθάγχη κατά την εισπνοή παγωμένου ή θερμοκρασίας δωματίου αέρα	Σημαντική ελάττωση των επιπέδων ενδοθηλίνης του πλάσματος ασθενών κατά τη διάρκεια μέγιστης άσκησης σε σύγκριση με τις τιμές ηρεμίας και στις δύο περιπτώσεις

Πίνακας 3. Επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος υγιών ανθρώπων

Πηγή	Δείγμα - είδος άσκησης	Μεταβολές της ενδοθηλίνης του πλάσματος
Appenzeller et al. 1992	Διάφορες μορφές άσκησης σε χαμηλό και μέτριο υψόμετρο και ύστερα από θερμικό στρες	Αύξηση ανεξάρτητα από τον τύπο της άσκησης, τη διάρκεια και το βαθμό υποξίας
Kullmer et al. 1995	15 υγιείς εθελοντές σε ηρεμία και ύστερα από εξαντλητική άσκηση σε δύο διαφορετικές ημέρες	Αύξηση σε συνδυασμό με οξεία κυψελιδική υποξία
Maeda et al. 1997α	Άσκηση αντοχής	Σημανική αύξηση τόσο της ET-1 όσο και της ET-3 μετά την άσκηση. Μέγιστη συγκέντρωση της ET-1 30 min μετά την άσκηση, ενώ της ET-3 αμέσως μετά την άσκηση
Maeda et al. 1994	Αθλητές - τριαντάλεπτη άσκηση δύο διαφορετικών εντάσεων (στο 90 και 130 % του ατομικού αναπνευστικού κατωφλιού)	Αύξηση και κορύφωση 30 min μετά την άσκηση και στις δύο εντάσεις. Θεαματικότερη αύξηση στην υψηλότερη ένταση

Πίνακας 3 (συνέχεια). Επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος υγιών ανθρώπων

Πηγή	Δείγμα - είδος άσκησης	Μεταβολές της ενδοθηλίνης του πλάσματος
Maeda et al. 1996	Άσκηση σε 30 °C με πρόκληση αφυδάτωσης	Αύξηση, στην οποία συμβάλλει η προκαλούμενη από την άσκηση αφυδάτωση
Maeda et al. 1997β	Αθλητές - επίδραση άσκησης αντοχής στην παραγωγή και κυκλοφορία της ET-1 στους ασκηθέντες και μη ασκηθέντες μύες	Σημαντική αύξηση της ET-1 στο μη ασκούμενο μέλος μετά την άσκηση με απουσία σημαντικής μεταβολής στο ασκούμενο μέλος
Richter et al. 1994	10 υγιείς εθελοντές - άσκηση στο 65 % της μέγιστης αερόβιας ικανότητας μέχρι εξαντλήσεως	Αρχική ελάττωση της ET-1 και επάνοδος στη συνέχεια στα επίπεδα ηρεμίας
Rocker et al. 1996	15 υγιείς εθελοντές – επίδραση 30λεπτης άσκησης μέτριας έντασης στο εργοποδήλατο ύστερα από βραχεία μέγιστη αναερόβια δοκιμασία	Αύξηση αμέσως μετά την άσκηση

Πίνακας 3 (συνέχεια). Επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος υγιών ανθρώπων

Πηγή	Δείγμα - είδος άσκησης	Μεταβολές της ενδοθηλίνης του πλάσματος
Neri Sernerì et al. 1997	Υγιείς αθλητές - επίδραση δίωρης άσκησης στα επίπεδα ET-1 του πλάσματος και των ούρων και εξέταση του ρόλου της στην προκαλούμενη από την άσκηση αιμοσυμπύκνωση, με χορήγηση ή όχι ισοτονικών ποτών	Σημαντική αύξηση των επιπέδων ET-1 του πλάσματος και των νεφρών και κατά 13 % ελάττωση του όγκου του πλάσματος
Gullestad et al. 1997	12 υγιείς εθελοντές - μέγιστες δοκιμασίες στο εργοποδήλατο	Καμία μεταβολή
Cosenzi et al. 1996	15 υγιείς εθελοντές υπό τη χορήγηση αναστολέα των αδρενοϋποδοχέων α1 και β - άσκηση στο 60 % της μέγιστης ικανότητας ύστερα από μέγιστη δοκιμασία	Καμία μεταβολή πριν και μετά τη διεξαγωγή παρατεταμένης αερόβιας άσκησης
Lenz et al. 1998	Υγιείς εθελοντές - επίδραση ασκησιογενούς υποξίας στα επίπεδα ET-1.	Απουσία επίδρασης της ασκησιογενούς υποξίας στην απελευθέρωση της ET-1.

μετατροπή της δεύτερης στην πρώτη (Lenz et al. 1998). Δύο ακόμη μελέτες υποστηρίζουν τη μη αύξηση της ενδοθηλίνης κατά την άσκηση τόσο σε υγιείς όσο και ασθενείς (McMurray et al. 1992, Ferri et al. 1997β). Φαίνεται ότι η ενδοθηλίνη δε μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια άσκησης 6-14 min με σταδιακά αυξανόμενη επιβάρυνση ως τη μέγιστη σε υγιείς εθελοντές (Letizia et al. 1995, Predel et al. 1995, Gullestad et al. 1997).

Αντίθετα, η ενδοθηλίνη αυξάνεται σε υγιείς εθελοντές κατά τη διάρκεια δίωρης φυσικής δραστηριότητας στο 50 % της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (Ahlborg et al. 1995). Κατά τη διάρκεια ποδηλάτησης στο 65 % της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου για 60 min η ενδοθηλίνη ελαττώθηκε αρχικά και κατόπιν αυξήθηκε στα επίπεδα ηρεμίας (Richter et al. 1994). Αύξηση της ενδοθηλίνης σημειώθηκε σε αθλητές ύστερα από ποδηλάτηση 30 min στο 90 και 130 % του ατομικού τους αναπνευστικού «κατωφλιού». Η αύξηση ήταν μεγαλύτερη στην υψηλότερη ένταση (Maeda et al. 1994, Maeda et al. 1997α, Maeda et al. 1997β). Η αύξηση της ενδοθηλίνης κορυφώθηκε 30 min μετά το τέλος της άσκησης και στις δύο εντάσεις. Η προκαλούμενη από την άσκηση αφυδάτωση μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα ET-1 (Maeda et al. 1996) και η λήψη ισοτονικών ποτών κατά τη διάρκεια δίωρου χαλαρού τρεξίματος περιόρισε την ελάττωση του όγκου του πλάσματος και την αύξηση των επιπέδων ET-1, γεγονός το οποίο υποδεικνύει το ρόλο της ET-1 στην προκαλούμενη από παρατεταμένη άσκηση αιμοσυμπύκνωση (Neri Serneri et al. 1997). Αυξημένα επίπεδα ET-1 έχουν βρεθεί επίσης στους μη ασκούμενους μυς κατά την άσκηση (Tanabe et al. 2000). Είτε άμεσα είτε έμμεσα (αυξάνοντας την αγγειοσυσπαστική δράση της νορεπινεφρίνης) προκαλεί αγγειοσύσπαση και συνεπώς ελαττώνει την αιματική ροή προς τους μη ασκούμενους μυς, γεγονός το οποίο δείχνει ότι η ET-1 μπορεί να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην ανακατανομή τη αιματικής ροής μεταξύ ασκούμενων και μη μυών κατά τη διεξαγωγή φυσικής δραστηριότητας. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη αρτηριοφλεβική διαφορά της ET-1 που παρατηρήθηκε στο μη ασκούμενο μέλος μπορεί να σχετίζεται με την πρό-

κλιση αγγειοσύσπασης στο μέλος αυτό, περιορισμό της αιματικής ροής και αύξηση της αιμάτωσης των ασκηθέντων μυών (Maeda et al. 1997β). Επίσης έχει βρεθεί ότι η άσκηση του χεριού σε υγιείς εθελοντές, των οποίων οι γονείς ήταν υπερτασικοί, συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα ET-1 στο πλάσμα κατά την άσκηση και αυξημένη απελευθέρωσή της κατά την αποκατάσταση, σε σύγκριση με υγιείς εθελοντές, των οποίων οι γονείς δεν είχαν ιστορικό οικογενούς υπέρτασης (Mangieri et al. 1998).

Σε πειραματόζωα (αρουραίους) που εκτέλεσαν υπομέγιστη ή μέχρι εξαντλήσεως άσκηση, τα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος ελαττώθηκαν (Allevard et al. 1991). Αύξηση της ET-1 διαπιστώθηκε στο μυοκάρδιο αρουραίων που ασκήθηκαν στο δαπεδοεργόμετρο για 45 min, υποδηλώνοντας έτσι το ρόλο που διαδραματίζει η ουσία στη ρύθμιση της καρδιακής λειτουργίας κατά τη διάρκεια της άσκησης (Maeda et al 1998α). Επίσης, έχει εξεταστεί η επίδραση της άσκησης στην έκφραση της προπροET-1 στους νεφρούς επιμυων, οι οποίοι ασκήθηκαν για 45 λεπτά με ταχύτητα 25 m/min. Βρέθηκε ότι τα επίπεδα ET-1 του πλάσματος και η πρωτεϊνική έκφραση της προπροET-1 στους νεφρούς της ομάδας που ασκήθηκε ήταν υψηλότερα σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η μελέτη αυτή παρείχε τις πρώτες ενδείξεις ότι η αυξημένη παραγωγή ET-1 στους νεφρούς, στην ομάδα που ασκήθηκε, προκαλεί αγγειοσύσπαση και ελάττωση της αιματικής ροής προς τους νεφρούς, είτε άμεσα μέσω της αγγειοσυσπαστικής δράσης της είτε έμμεσα αυξάνοντας την αγγειοσυσπαστική δράση της νορεπινεφρίνης (Maeda et al. 1998β). Ο πίνακας 4 παρουσιάζει μελέτες, οι οποίες εξέτασαν την επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος ή άλλων οργάνων.

Όλες οι παραπάνω μελέτες εξέτασαν την επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης σε οξεία φάση, δηλαδή μετά από την εκτέλεση μιας μόνο δοκιμασίας. Από την αναζήτηση της βιβλιογραφίας βρέθηκε μόνο μία μελέτη που εξέτασε τη μακροπρόθεσμη επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης και αυτή σε πειραματόζωα. Σύμφωνα με

αυτήν (Yin & Zhang 1998), τα επίπεδα ET ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε αρουραίους, οι οποίοι ασκήθηκαν κολυμπώντας 1,5 ώρα την ημέρα, 5 ημέρες την εβδομάδα για 4 εβδομάδες, σε σύγκριση με αγύμναστους αρουραίους (μάλλον πρόκειται για τιμές ηρεμίας, αλλά το κείμενο είναι στην Κινεζική γλώσσα και δε διευκρινίζεται στην αγγλική περίληψη αν είναι ηρεμίας ή άσκησης). Επομένως, δεν είναι γνωστή η μακροπρόθεσμη επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του ανθρώπου, αποτελώντας έναν ελκυστικό στόχο για μελέτη.

Πίνακας 4. Επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος πειραματοζώων.

Πηγή	Δείγμα - είδος άσκησης	Μεταβολές της ενδοθηλίνης του πλάσματος
Allevard et al. 1991	Επίμυες - ύστερα από άσκηση μερικής και πλήρους εξάντλησης.	Ελάττωση, γεγονός το οποίο ίσως σχετίζεται με την ραγδαία αποβολή της από διάφορους ιστούς και κυρίως από τους πνεύμονες.
Yin et al. 1998	Επίμυες - συστηματική άσκηση.	Σημαντική ελάττωση ύστερα από τέσσερις εβδομάδες άσκησης, σε σχέση με ζώα που δεν ασκήθηκαν.
Maeda et al. 1998α	Επίμυες - επίδραση 45λεπτης άσκησης στην παραγωγή ενδοθηλίνης στο μυοκάρδιο.	Σημαντικά υψηλότερα επίπεδα ενδοθηλίνης του μυοκαρδίου των επίμων που ασκήθηκαν ήταν σε σχέση με ζώα που δεν ασκήθηκαν. Συνεπώς τα επίπεδα ενδοθηλίνης του μυοκαρδίου αυξάνονται κατά την άσκηση, επηρεάζοντας την καρδιακή λειτουργία.
Maeda et al. 1998β	Επίμυες - 45λεπτη άσκηση με ταχύτητα 25 m/min στην έκφραση της προπροET-1 στους νεφρούς.	Υψηλότερα επίπεδα ET-1 του πλάσματος και υψηλότερη πρωτεϊνική έκφραση της προπροET-1 στους νεφρούς στην ομάδα που ασκήθηκε σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εξέταση της επίδρασης ενός προγράμματος άσκησης στα επίπεδα ET του πλάσματος υγιών ανθρώπων, τόσο σε κατάσταση ηρεμίας όσο και μετά από οξεία άσκηση. Τα αποτελέσματα της έρευνας προστέθηκαν στις λίγες υπάρχουσες μελέτες σχετικά με την οξεία επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος υγιών ανθρώπων και, το κυριότερο, παρείχαν τις πρώτες πληροφορίες για τη μακροπρόθεσμη επίδραση της άσκησης στα παραπάνω επίπεδα.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΝΤΕΣ

Στη μελέτη έλαβαν μέρος 18 εθελοντές που ανταποκρίθηκαν σε μια δημόσια πρόσκληση και δεν ήταν εν ενεργεία αθλητές ή δεν ασκούσαν συστηματικά τουλάχιστον έξι μήνες πριν από την έναρξη της μελέτης. Οι εθελοντές ήταν άρρενες, μη καπνιστές και μη παχύσαρκοι (δείκτης σωματικής μάζας, ΔΣΜ < 30 kg/m²) ή υπέρτασικοί. Επιπλέον δεν έπασχαν από κάποια χρόνια ή οξεία πάθηση και δε λάμβαναν φάρμακα κατά τη διάρκεια της μελέτης. Ενημερώθηκαν προφορικά και γραπτά για το σχεδιασμό της μελέτης και, εφόσον έδωσαν τη συγκατάθεσή τους, συμμετείχαν στη μελέτη. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του Κώδικα Δεοντολογίας Ερευνών του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

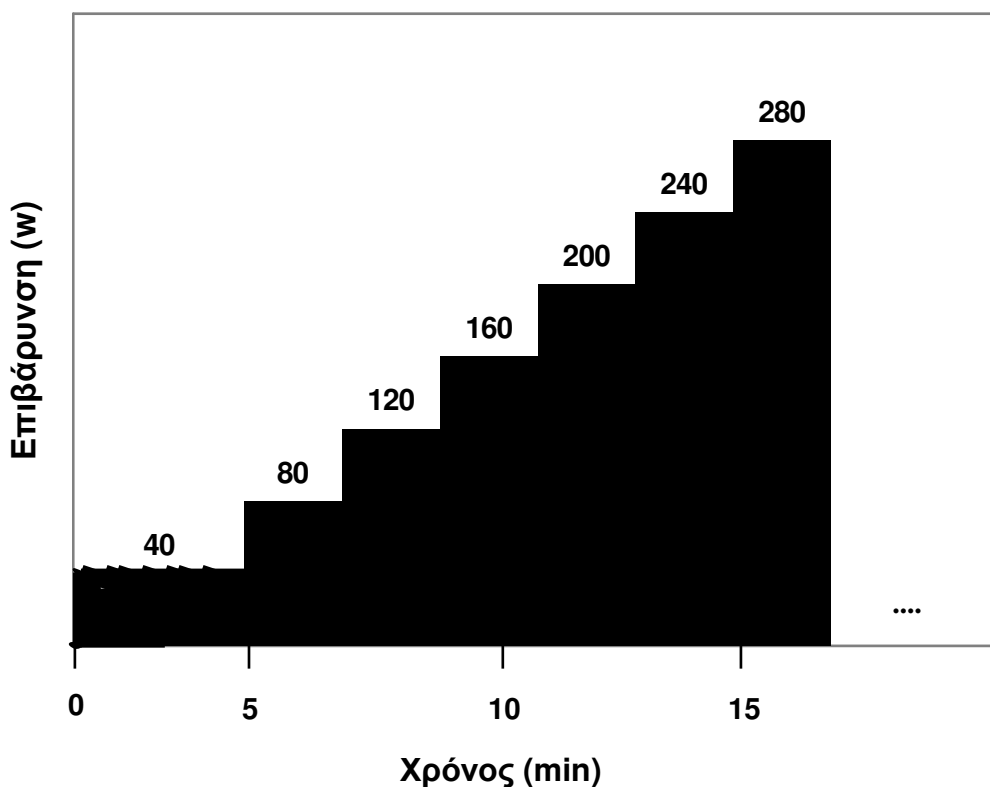
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ

Μετρήθηκε το ύψος και το βάρος των 18 εθελοντών και κατόπιν χωρίστηκαν σε δύο ισάριθμες ομάδες με ίδιο μέσο δείκτη σωματικής μάζας και ίδια μέση ηλικία. Η μία ομάδα εισήχθη σε πρόγραμμα συστηματικής γύμνασης και θα αναφέρεται ως ομάδα μελέτης, ενώ η άλλη δε συμμετείχε σε καμία μορφή συστηματικής γύμνασης και θα αναφέρεται ως ομάδα ελέγχου.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε στην ομάδα μελέτης μια δοκιμασία σταδιακά αυξανόμενης έντασης σε εργοποδήλατο (τύπου KX 1, της εταιρείας Kettler, Ense-Parsit, Γερμανία) για τον προσδιορισμό της μέγιστης αερόβιας ισχύος, αφού προηγήθηκε δοκιμή εξοικείωσης. Τόσο στη δοκιμή εξοικείωσης όσο και στη μέγιστη δοκιμασία οι εθελοντές ποδηλά-

τησαν αρχικά για 5 min σε μια επιβάρυνση, εκφρασμένη σε W, που αντιστοιχούσε στο ήμισυ του σωματικού τους βάρους (σε kg) και στην συνέχεια αυξανόταν ανά 2 min κατά 40 W μέχρι εξαντλήσεως των εθελοντών. Έτσι, αν κάποιος είχε βάρος 80 kg, η μεταβολή της επιβάρυνσης κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας ήταν όπως φαίνεται στο σχήμα 7. Η ισχύς ποδηλάτησης ήταν ανεξάρτητη της ταχύτητας ποδηλάτησης.

Ως μέγιστη αερόβια ισχύς θεωρήθηκε η ανώτατη επιβάρυνση, στην οποία ποδηλάτησαν οι εθελοντές. Αν κάποιος εθελοντής εγκατέλειπε πριν την ολοκλήρωση ενός σταδίου, κατοχύρωνε μέρος της ισχύος αυτού του σταδίου ανάλογο του χρόνου. Η δοκιμή εξοικείωσης απείχε από τη μέγιστη δοκιμασία τουλάχιστον τρεις ημέρες. Στη συνέχεια ακολούθησε περίοδος συστηματικής άσκησης, στην αρχή της οποίας έγινε αιμοληψία, όπως περιγράφεται παρακάτω, για τον προσδιορισμό λιπιδίων.



Σχήμα 7. Δοκιμασία μέγιστης επιβάρυνσης για άτομο βάρους 80 kg

Η διάρκεια κάθε συνεδρίας ήταν 45 min, τα οποία αποτελούνταν από πεντάλεπτη προθέρμανση στα 40 W και 40 min στο 60-70 % της ατομικής μέγιστης ισχύος. Η συνεδρία επαναλαμβανόταν τρεις φορές την εβδομάδα και η διάρκεια του προγράμματος ήταν 12 εβδομάδες. Η ένταση αναπροσαρμοζόταν προς τα πάνω κατά τη διάρκεια της μελέτης, με κριτήριο την καρδιακή συχνότητα ή τη διανυόμενη απόσταση.

Στη διάρκεια κάθε συνεδρίας άσκησης παρακολουθείτο η καρδιακή συχνότητα με αισθητήρα ενσωματωμένο στο εργοποδήλατο και καταγραφόταν κάθε 5 min. Η αξιοπιστία του αισθητήρα ελέγχθηκε σε μια δοκιμασία με τη χρήση τηλεμετρικής συσκευής καταγραφής της καρδιακής συχνότητας (Polar Electro, Kempele, Φιλανδία) και βρέθηκε να διαφέρει κατά 1-2 σφυγμούς ανά λεπτό (σφ/min). Για τον υπολογισμό της ενεργειακής δαπάνης σε κάθε συνεδρία πολλαπλασιαζόταν η ισχύς επί το χρόνο (σε s) και διαιρείτο το γινόμενο (J) με 1000 για να μετατραπεί σε kJ. Ακολουθούσε διαίρεση με 0,25, θεωρώντας το ως το συντελεστή μηχανικής απόδοσης της κίνησης, και με 4,184 για να μετατραπούν τα kJ σε kcal.

Οι εθελοντές της ομάδας μελέτης ξεκινούσαν κάθε συνεδρία καλά ενυδατωμένοι και κατά τη διάρκεια της άσκησης είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε νερό. Στην αρχή του προγράμματος ζητήθηκε από τους εθελοντές να μην αλλάξουν τις διατροφικές τους συνήθειες και να αποφύγουν άλλου είδους έντονη φυσική δραστηριότητα κατά τη διάρκεια του προγράμματος. Στο τέλος της μελέτης μετρήθηκαν πάλι το ύψος και το βάρος των εθελοντών.

Δύο ως τρεις ημέρες μετά το τέλος του προγράμματος οι εθελοντές υποβλήθηκαν σε δοκιμασία μέγιστης ισχύος όμοια με την αρχική και τρεις ημέρες μετά ποδηλάτησαν στο 60 % της νέας μέγιστης ισχύος για 30 min. Οι αιμοληψίες έγιναν από φλέβα του χεριού, σε καθιστή θέση, για τον προσδιορισμό ενδοθηλίνης και λιπιδίων, πριν και 30 min μετά το τέλος της άσκησης. Στην ίδια δοκιμασία υποβλήθηκε και η ομάδα ελέγχου, αφού προηγήθηκε δοκιμασία εξοικείωσης και μέγιστη δοκιμασία στο εργοποδήλατο με ελάχιστο χρο-

νικό διάστημα μεταξύ των δύο δοκιμασιών τρεις μέρες. Για την τελική δοκιμασία οι εθελοντές προσήλθαν στο εργαστήριο πρωινή ώρα και ύστερα από ολονύκτια νηστεία.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ

Για κάθε αιμοληψία χρησιμοποιήθηκαν 2 σωληνάρια των 5 ml με κενό, τα οποία περιείχαν EDTA και είχαν τοποθετηθεί στην κατάψυξη μέσα σε δοχείο με τριμμένο πάγο, όπως και οι βελόνες αιμοληψίας. 0,5 mL του φλεβικού αίματος τοποθετήθηκαν σε φιαλίδιο erpendorf και προσδιορίστηκε αιματοκρίτης με μικροφυγοκέντρωση και αιμοσφαιρίνη με φωτομετρική μέθοδο, για γενικότερο έλεγχο της υγείας τους και για τη διαπίστωση τυχόν αφυδάτωσης. Το υπόλοιπο αίμα φυγοκεντρήθηκε αμέσως στα $2000 \times g$ για 10 min σε θερμοκρασία $4 \text{ }^\circ\text{C}$ σε φυγόκεντρο Sorvall RC 28S της εταιρείας Dupont, (Wilmington, Delaware, ΗΠΑ). Η κεφαλή της φυγοκέντρου ήταν τύπου F-28/13. Για τη μετατροπή της επιθυμητής σχετικής δύναμης φυγοκέντρωσης g σε στροφές ανά λεπτό (σαλ) χρησιμοποιήθηκε ο τύπος $N = 1,12 r v^2$, όπου $N =$ η σχετική δύναμη φυγοκέντρωσης (g), $r =$ η ακτίνα περιστροφής σε mm (101,3 για την κεφαλή F-28/13) και $v =$ η ταχύτητα περιστροφής σε χιλιάδες σαλ. Με τον τρόπο αυτό υπολογίστηκε ότι $v = 4219$ σαλ.

Μετά τη φυγοκέντρωση το πλάσμα διαχωρίστηκε από τα έμμορφα συστατικά και αποθηκεύτηκε στους $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Στα δείγματα ηρεμίας και άσκησης και των δύο ομάδων, από την τελική δοκιμασία, προσδιορίστηκε η ενδοθελίνη με τη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν προσδιορισμοί τριακυλογλυκερολών, ολικής χοληστερόλης και χοληστερόλης των HDL με ενζυμικές φωτομετρικές μεθόδους. Η εκτίμηση της χοληστερόλης των LDL έγινε με τον τύπο των Friedewald et al. (1972), ενώ ο υπολογισμός της μεταβολής του όγκου του πλάσματος έγινε σύμφωνα με τον τύπο

$$\frac{\text{Όγκος πλάσματος μετά}}{\text{Όγκος πλάσματος πριν}} = \frac{\text{Αιμοσφαιρίνη πριν}}{\text{Αιμοσφαιρίνη μετά}} \times \frac{(100 - \text{Αιματοκρίτης μετά})}{(100 - \text{Αιματοκρίτης πριν})}$$

(Dill και Costill 1974).

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΙΜΑΤΟΚΡΙΤΗ

1. Αιμοληψία σε δοκιμαστικό σωλήνα με EDTA.
2. Γέμισμα ενός τριχοειδούς σωλήνα 5 mm από το χείλος, βουτώντας την άκρη του μέσα στο αίμα με κλίση.
3. Καθαρισμός του σωλήνα εξωτερικά, σφράγιση του ενός άκρου με το δείκτη του χεριού και πίεση του άλλου άκρου μέσα σε πλαστελίνη.
4. Φυγοκέντρηση των τριχοειδών σωλήνων σε ειδικό επιτραπέζιο φυγοκεντρητή K-20 της εταιρείας Hellenic Labware (Αθήνα) για 5 min.
5. Μέτρηση του ύψους της στήλης των ερυθρών αιμοσφαιρίων και του συνολικού ύψους της στήλης του αίματος. Ο αιματοκρίτης προέκυψε από το πηλίκο του πρώτου προς το δεύτερο ύψος επί 96, λαμβάνοντας υπόψη ότι 4 % του πλάσματος παγιδεύεται ανάμεσα στα ερυθρά αιμοσφαίρια, (Dill & Costill 1974).

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ

Η αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της αιμοσφαιρίνης στηρίζεται στην οξείδωση της αιμοσφαιρίνης από το σιδηρικυανιούχο κάλιο σε μεθαιμοσφαιρίνη, η οποία αντιδρά με κυανιούχο κάλιο και μετατρέπεται σε κυανομεθαιμοσφαιρίνη. Η απορρόφηση της κυανομεθαιμοσφαιρίνης είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αιμοσφαιρίνης.

Πειραματικό μέρος

Χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο αντιδραστηρίων της εταιρείας Spinreact (Santa Coloma, Ισπανία), με αριθμό καταλόγου 1001230. Το κουτί περιείχε τέσσερα φιαλίδια με 5 mL αντιδραστηρίου το καθένα.

Το πρωτόκολλο εργασίας ήταν:

1. Ανασύσταση του περιεχομένου ενός φιαλιδίου αντιδραστηρίου με 245 mL απιοντισμένο νερό. Το διάλυμα παραμένει σταθερό για δύο μήνες από την ημέρα παρασκευής σε θερμοκρασία 2-8 °C.
2. Ετοιμασία τριών δοκιμαστικών σωλήνων για κάθε δείγμα.
3. Τοποθέτηση σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα 20 μ L αίματος και 5 mL αντιδραστηρίου.
4. Καλή ανάμειξη του περιεχομένου όλων των δοκιμαστικών σωλήνων σε κυκλομείκτη και επώαση για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο τύπου U1100 της εταιρείας Hitachi (Τόκιο, Ιαπωνία), σε μήκος κύματος τα 540 nm και FACTOR 36,77 (g/dL). Στη συνέχεια, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων και υπολογίστηκε η μέση τιμή των τριών προσδιορισμών κάθε δείγματος.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗΣ

Η αρχή της μεθόδου

Η ενδοθηλίνη προσδιορίστηκε με τη μέθοδο του ενζυμικού ανοσοπροσδιορισμού (*enzyme immunoassay*, *EIA*). Η μέθοδος αποτελεί συνδυασμό ενζυμολογίας και ανοσολογίας (δηλαδή αλληλεπίδρασης αντισωμάτων και αντιγόνων) και στηρίζεται στη μεγάλη εκλεκτικότητα της σύνδεσης αντιγόνου-αντισώματος. Για την εφαρμογή της μεθόδου υπάρχουν έτοιμα πλαστικά βοηθία (δηλαδή μικρές κυψελίδες). Κάθε βοηθίο είναι επιστρωμένο με μια σταθερή, περιορισμένη ποσότητα ενός μονοκλωνικού αντισώματος που

αναγνωρίζει και δεσμεύει την ενδοθηλίνη που υπάρχει στο πλάσμα. Στα βοθρία προστίθεται το δείγμα μας και μια σταθερή ποσότητα ενός συζεύγματος ακετυλοχολινεστεράσης, το οποίο συνδέεται σε διαφορετικό σημείο της ενδοθηλίνης, σχηματίζοντας την εξής διάταξη: μονοκλωνικό αντίσωμα – ενδοθηλίνη – σύζευγμα ακετυλοχολινεστεράσης. Η ενζυμική δραστηριότητα του συζεύγματος μπορεί να μετρηθεί με φασματοφωτομετρική μέθοδο μέσω ενός ωχροκίτρινου προϊόντος, η απορρόφηση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του συζεύγματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης ενδοθηλίνης στο δείγμα.

Πειραματικό μέρος

Χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια της εταιρείας Cayman, με αρ. κατ. 583151. Το κουτί περιείχε ένα πλακίδιο με 96 βοθρία επικαλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα ενδοθηλίνης (#1), ένα φιαλίδιο συζεύγματος (#2), ένα φιαλίδιο προτύπου ενδοθηλίνης (#3), δύο φιαλίδια EIA Buffer Concentrate (#4), ένα φιαλίδιο με διάλυμα έκπλυσης (#5), ένα φιαλίδιο Tween 20 (#5a), ένα κάλυμμα πλακιδίου (#7), τρία φιαλίδια Ellmann's Reagent (#8) και ένα φιαλίδιο με λυοφιλωμένο ανθρώπινο πλάσμα χωρίς ενδοθηλίνη (#12). Το πρωτόκολλο εργασίας ήταν:

A. Μερικός καθαρισμός της ενδοθηλίνης

1. Ενεργοποίηση μιας στήλης C-18 αντίστροφης φάσης των 500 mg της εταιρείας Tech Elut (Cheshire, Hν. Βασίλειο) με το πέρασμα αρχικά 2 ml μεθανόλης και στη συνέχεια 2 ml νερού (όπου νερό, νοείται νερό υψηλής καθαρότητας για ένεση). Για αυτήν και τις υπόλοιπες πλύσεις διατηρήθηκε ο ρυθμός ροής κάτω από 5 ml/min. Η στήλη μπορούσε να αποθηκευτεί με νερό.

2. Σε ένα ψηλό γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα αραιώση 2 ml πλάσματος με 8 ml 4 % οξικό οξύ.
3. Το δείγμα περάστηκε αργά (με ταχύτητα περίπου 2 ml/min) μέσα από τη στήλη. Στη στήλη συγκρατείται η ενδοθηλίνη, ενώ οι άλλες ουσίες του πλάσματος περνούσαν.
4. Πλύση της στήλης με 5 ml υδατικού διαλύματος 0,1 % τριφθοροξικού οξέος.
5. Έκλουσμα της ενδοθηλίνης περνώντας 2 ml μεθανόλης:νερού:τριφθοροξικού οξέος 90:10:0,1 (v/v/v) μέσα από την στήλη με αργό και ελεγχόμενο τρόπο και συλλογή του εκλούσματος σε πλαστικό δοκιμαστικό σωλήνα μιας χρήσης. Η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων επηρεάζεται από την προσοχή σε αυτό το σημείο.
6. Εξάτμιση του μεγαλύτερου μέρους της μεθανόλης και του νερού κάτω από ρεύμα αζώτου διατηρώντας το σωλήνα σε υδατόλουτρο 37 °C. Άφησα περίπου 250 μ L. Πωματισμός του σωλήνα και διατήρησή του σε 4 °C μέχρι να χρησιμοποιηθεί παραπέρα.
7. Χρησιμοποίηση της στήλης για τον καθαρισμό άλλων 2 ml πλάσματος από το ίδιο δείγμα και άλλου ενός δείγματος εις διπλούν επαναλαμβάνοντας τα βήματα 1-6 και φροντίζοντας ο τελικός όγκος να είναι ίδιος για όλα τα δείγματα.

B. Παρασκευή διαλυμάτων για την καμπύλη αναφοράς

1. Ανασύσταση του περιεχομένου του φιαλιδίου #4 (EIA Buffer Concentrate) με 90 ml νερού. Πρόσθεση 0,1 ml Tween 20 (φιαλίδιο # 5a) και ανάμειξη καλά. Το διάλυμα που προέκυψε θα αναφέρεται ως *EIA Buffer*. Διατηρείται στους 4 °C.
2. Διάλυση του προτύπου ενδοθηλίνης (φιαλίδιο # 3) με 1 ml EIA buffer. Η συγκέντρωση αυτού του διαλύματος ήταν 5 ng/ml (5000 pg/ml). Ανάμειξα 50 μ l από το παραπάνω με 950 μ l EIA Buffer για την παρασκευή του διαλύματος *C1* (250 pg/ml). Διατηρούνται για 2 εβδομάδες στους 4 °C.

3. Ανασύσταση του Sample Matrix Blank - Human Plasma (SMB, φιαλίδιο #12), το οποίο είναι λυοφιλιωμένο ανθρώπινο πλάσμα χωρίς ενδοθηλίνη, με 5 ml νερού και αποθήκευσή του στους 4 °C. Είναι σταθερό για δύο εβδομάδες. Εναλλακτικά, χρησιμοποίηση ανθρώπινου πλάσματος μετά από παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ημέρες τουλάχιστον, ώστε να αποικοδομηθεί η ενδοθηλίνη του.
4. Τοποθέτηση σε τρεις ψηλούς δοκιμαστικούς σωλήνες με αρίθμηση 0, 1 και 2 8 ml 4 % οξικού οξέος και 2 ml SMB (ή πλάσματος χωρίς ενδοθηλίνη).
5. Σε κάθε ένα από τους σωλήνες 1 και 2 πρόσθεση επιπλέον 20 και 40 μl, αντίστοιχα, από το C1 ενδοθηλίνης. Άρα οι σωλήνες περιέχουν 5 και 10 pg ενδοθηλίνης, αντίστοιχα.
6. Πέρασμα του περιεχομένου των τριών σωλήνων με σειρά 0, 1, 2 από μια στήλη C-18 για καθαρισμό και εξάτμιση των εκλουσμάτων, όπως περιγράφεται στα βήματα A.3-6, φροντίζοντας ο τελικός όγκος να είναι ίδιος με εκείνον των δειγμάτων.
7. Παρασκευή άλλων τριών προτύπων 0, 1 και 2 εργαζόμενος όπως παραπάνω.

Γ. Ενζυμικός ανοσοπροσδιορισμός

1. Ανασύσταση του περιεχομένου του φιαλιδίου #2 (Conjugate, σύζευγμα) με 10 ml EIA buffer. Αποθήκευσή του στους 4 °C και χρησιμοποίησή του μέσα σε διάστημα δύο εβδομάδων.
2. Τοποθέτηση στο πλαστικό πλαίσιο των λωρίδων με βοθρία όσων λωρίδων χρειάζονται κάθε φορά (για την καμπύλη αναφοράς με 3 σημεία και για 6 δείγματα, όλα εις διπλούν, χρειάζονται 2 λωρίδες των 8 βοθρίων και 2 βοθρία από μια τρίτη).
3. Τοποθέτηση σε κάθε βοθρίο 100 μl από τα διαλύματα 0, 1 ή 2 (για την καμπύλη αναφοράς) ή από τα δείγματα εις διπλούν.
4. Πρόσθεση σε κάθε βοθρίο 100 μl συζεύγματος.

5. Κάλυψη των βοθρίων με πλαστική μεμβράνη και επώαση για μια νύχτα στους 4 °C.
6. Ανασύσταση το επόμενο πρωί του μισού περιεχομένου ενός φιαλιδίου #8 (Ellmann's Reagent) με 10 ml νερού. Δεν μπορούσε να χρησιμοποιηθεί άλλη μέρα.
7. Ανασύσταση του περιεχομένου του φιαλιδίου #5 (Wash Buffer Concentrate, διάλυμα έκπλυσης) με 2 l νερό. Πρόσθεση 1 ml Tween 20 και καλή ανάμειξη.
8. Καλή πλύση των βοθρίων με διάλυμα έκπλυσης 5 φορές και στέγνωμα κτυπώντας τα ανεστραμμένα σε απορροφητικό χαρτί.
9. Πρόσθεση 200 μl αντιδραστηρίου Ellmann σε κάθε βοθρίο.
10. Κάλυψη πάλι των βοθρίων με πλαστική μεμβράνη και τοποθέτησή τους σε μέρος σκοτεινό. Ανακινούνται κάθε 5 min.
11. Χρησιμοποίηση του φωτομέτρου Anthos 2001 της εταιρείας Anthos (Salzburg, Αυστρία), το οποίο απαιτεί προγραμματισμό της μεθόδου για τον προσδιορισμό της ενδοθηλίνης. Μετά από 35 min επώασης τοποθέτηση του πλακιδίου στην υποδοχή του φωτομέτρου και μέτρηση της απορρόφησης στα 405 nm με μήκος κύματος αναφοράς 620 nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της ενδοθηλίνης, έγινε σύγκριση της μεταβολής της απορρόφησης των δειγμάτων με εκείνη των προτύπων στο ίδιο χρονικό διάστημα.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΑΚΥΛΟΓΛΥΚΕΡΟΛΩΝ

Η αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός των τριακυλογλυκερολών είναι ενζυμικός φωτομετρικός. Ειδικότερα, στηρίζεται στην ενζυμική υδρόλυσή τους και στην ακόλουθη μέτρηση της γλυκερόλης που απελευθερώνεται. Η μέθοδος περιλαμβάνει από τέσσερις αντιδράσεις:

Στην πρώτη αντίδραση οι τριακυλογλυκερόλες υδρολύονται προς γλυκερόλη και 3 λιπαρά οξέα. Η αντίδραση καταλύεται από μια λιπάση.

Τριακυλογλυκερόλη + 3 H₂O → γλυκερόλη + 3 λιπαρά οξέα

Στη δεύτερη αντίδραση, η παραγόμενη γλυκερόλη φωσφορυλιώνεται από το ATP σε 3-φωσφορική γλυκερόλη, αντίδραση που καταλύεται από την κινάση της γλυκερόλης.

Γλυκερόλη + ATP → 3-φωσφορική γλυκερόλη + ADP

Στην τρίτη αντίδραση, η 3-φωσφορική γλυκερόλη αντιδρώντας με O₂ παράγει φωσφορική διυδροξυακετόνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂). Η αντίδραση καταλύεται από την οξειδάση της φωσφορικής γλυκερόλης.

3-φωσφορική γλυκερόλη + O₂ → φωσφορική διυδροξυακετόνη + H₂O₂

Στην τέταρτη και τελευταία αντίδραση, το H₂O₂ αντιδρά με δύο οργανικές ενώσεις (4-αμινοαντιπυρίνη και 4-χλωροφαινόλη) με τη βοήθεια της υπεροξειδάσης. Οι ενώσεις αυτές, αντιδρώντας με το H₂O₂, ενώνονται σχηματίζοντας μια έγχρωμη ουσία, της οποίας η συγκέντρωση υπολογίζεται μετρώντας την απορρόφησή της στα 500 nm.

2 H₂O₂ + 4-αμινοαντιπυρίνη + 4-χλωροφαινόλη → κινονιμίνη + 4 H₂O

Τα γραμμομόρια της έγχρωμης ουσίας που παράγεται είναι ανάλογα των γραμμομορίων των τριακυλογλυκερολών του δείγματος.

Πειραματικό μέρος

Χρησιμοποίηση ενός συνόλου αντιδραστηρίων της εταιρείας BEST (Αθήνα), το Triglycerides Liquid reagent, με αρ. κατ. 70.B5.011171.

Το κουτί περιείχε:

1. Τέσσερα φιαλίδια με 100 mL (το καθένα) αντιδραστηρίου
2. Ένα φιαλίδιο με 3 mL προτύπου διαλύματος τριακυλογλυκερολών συγκέντρωσης 200 mg/dL

Το πρωτόκολλο εργασίας ήταν:

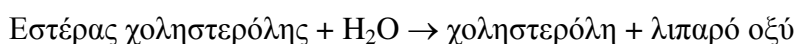
1. Ετοιμασία ενός δοκιμαστικού σωλήνα για το πρότυπο, δύο για κάθε δείγμα, ένα για τον ορό ελέγχου (Precinorm U της εταιρείας Roche, Mannheim, Γερμανία).
2. Τοποθέτηση 14 μL προτύπου, ορού ή ορού ελέγχου σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
3. Πρόσθεση 1,4 mL αντιδραστηρίου σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
4. Καλή ανάδευση του περιεχομένου όλων των δοκιμαστικών σωλήνων στον κυκλομεικτη και επώαση για 20 min στους 25 °C.
5. Χρησιμοποίηση γυάλινων κυψελίδων και πληκτρολόγηση ως μήκος κύματος στο φασματοφωτόμετρο των 500 nm. Μέτρηση της απορρόφησης του προτύπου ως προς το αντιδραστήριο, μετάβαση σε MODE CONC και πληκτρολόγηση STANDARD 200 (mg/dL). Στη συνέχεια, μέτρηση των συγκεντρώσεων των δειγμάτων και υπολογισμός της μέσης τιμής των δύο προσδιορισμών κάθε δείγματος.
6. Από τις παραπάνω τιμές αφαιρέθηκαν 10 mg/dL, ως διόρθωση για την ελεύθερη γλυκερόλη που υπάρχει στο δείγμα.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

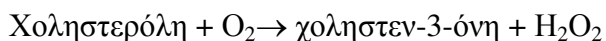
Η αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός της χοληστερόλης είναι ενζυμικός φασματοφωτομετρικός. Η μέθοδος περιλαμβάνει τρεις αντιδράσεις:

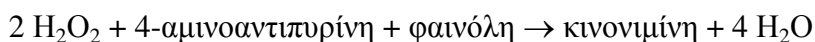
Στην πρώτη αντίδραση, οι εστέρες της χοληστερόλης υδρολύονται με τη βοήθεια της εστεράσης της χοληστερόλης.



Στη δεύτερη αντίδραση, η χοληστερόλη αντιδρά με O_2 . Η αντίδραση καταλύεται από την οξειδάση της χοληστερόλης, σχηματίζοντας χοληστενόνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).



Στην τρίτη και τελευταία αντίδραση, το H_2O_2 αντιδρά με δύο οργανικές ενώσεις (4-αμινοαντιπυρίνη και φαινόλη), με τη βοήθεια της υπεροξειδάσης. Οι ενώσεις αυτές, αντιδρώντας με το H_2O_2 , ενώνονται σχηματίζοντας μια έγχρωμη ουσία, της οποίας τη συγκέντρωση υπολογίζεται, μετρώντας την απορρόφησή της στα 500 nm.



Τα γραμμομόρια της έγχρωμης ουσίας που παράγεται είναι ανάλογα των γραμμομορίων της χοληστερόλης του δείγματος.

Πειραματικό μέρος

Χρησιμοποίηση ενός συνόλου αντιδραστηρίων της εταιρείας BEST, με αρ. κατ. 70.B5.011141.

Το κουτί περιείχε:

1. Έξι φιαλίδια με 100 mL (το καθένα) αντιδραστηρίου
2. Ένα φιαλίδιο με 3 mL προτύπου διαλύματος χοληστερόλης συγκέντρωσης 200 mg/dL

Το πρωτόκολλο εργασίας ήταν:

1. Ετοιμασία ενός δοκιμαστικού σωλήνα για το πρότυπο, δύο για κάθε δείγμα και ενός για τον ορό ελέγχου.
2. Τοποθέτηση 14 μL προτύπου, ορού ή ορού ελέγχου σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
3. Πρόσθεση 1,4 mL αντιδραστηρίου σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
4. Καλή ανάδεση του περιεχομένου όλων των δοκιμαστικών σωλήνων στον κυκλομείκτη και επώαση για 20 min στους 20-25 °C.
5. Χρησιμοποίηση γυάλινων κυψελίδων και πληκτρολόγηση ως μήκος κύματος στο φασματοφωτόμετρο τα 500 nm. Μέτρηση την απορρόφηση του προτύπου ως προς το αντιδραστήριο, μετάβαση σε MODE CONC και πληκτρολόγηση STANDARD 200

(mg/dL). Στη συνέχεια, μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων και υπολογίστηκε η μέση τιμή των δύο προσδιορισμών κάθε δείγματος.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΤΩΝ HDL

Η αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος διαιρείται σε δύο μέρη. Στο πρώτο, πραγματοποιείται καταβύθιση των χυλομικρών, VLDL και LDL με την προσθήκη φωσφοβολφραμικού οξέος και ιόντων μαγνησίου στο δείγμα. Μετά από φυγοκέντρηση, μόνο οι HDL παραμένουν στο υπερκείμενο. Στο δεύτερο μέρος, γίνεται ο προσδιορισμός της χοληστερόλης των HDL όμοια με την ολική χοληστερόλη.

Πειραματικό μέρος

Για την καταβύθιση των χυλομικρών, VLDL και LDL χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο HDL Cholesterol-Pesrcipitant, αρ. κατ. 543 004, της Boehringer Mannheim.

Το πρωτόκολλο εργασίας ήταν:

A. Καταβύθιση:

1. Ανάμειξη 400 μl από το αντιδραστήριο με 160 μl δείγματος ή προτύπου χοληστερόλης σε ένα φιαλίδιο eppendorf.
2. Καλή ανάδεψη του περιεχομένου των φιαλιδίων στον κυκλομείκτη.
3. Μετά από 10 min, φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 10 min στις 4000 στροφές ανά min ($1500 \times g$) σε επιτραπέζιο φυγοκεντρητή K-40 της εταιρείας Hellenic Labware (Αθήνα).

B. Προσδιορισμός:

1. Ετοιμασία ενός δοκιμαστικού σωλήνα για το τυφλό, ενός για το πρότυπο και δύο για κάθε δείγμα.
2. Τοποθέτηση 130 μl απιοντισμένου νερού στο σωλήνα για το τυφλό.

3. Τοποθέτηση 130 μl από το υπερκείμενο του προτύπου στο σωλήνα για το πρότυπο.
4. Τοποθέτηση 130 μl από το υπερκείμενο του αντίστοιχου δείγματος σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα για δείγμα.
5. Πρόσθεση 1,3 ml από το αντιδραστήριο για χοληστερόλη σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
6. Καλή ανάδεψη του περιεχομένου όλων των δοκιμαστικών σωλήνων στον κυκλομείκτη.
7. Επώαση για 10 min στους 20-25 °C.
8. Προσδιόρισμός της χοληστερόλης των HDL όπως στο βήμα 5 της ολικής χοληστερόλης.

ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ ΤΩΝ LDL

Λόγω του εξειδικευμένου εξοπλισμού που απαιτεί ο προσδιορισμός της χοληστερόλης των LDL, η παράμετρος αυτή υπολογίστηκε κατά προσέγγιση σύμφωνα με τον τύπο των Friedewald, Levy και Fredickson (Friedewald et al. 1972):

χοληστερόλη των LDL = ολική χοληστερόλη - χοληστερόλη HDL - τριακυλογλυκερόλες/5
με μονάδα μέτρησης το mg/dL.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται για όλα τα δεδομένα ως μέση τιμή ± τυπικό σφάλμα, το οποίο προκύπτει από τη διαίρεση της τυπικής απόκλισης προς την τετραγωνική ρίζα του δείγματος. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των προσδιορισμών προσδιορίστηκε ο συντελεστής διακύμανσης (CV). Για την αιμοσφαιρίνη, την ενδοθηλίνη, τις τριακυλογλυκερόλες, τη χοληστερόλη και τη χοληστερόλη των HDL ο CV υπολογίστηκε για το σύνολο των δειγμάτων από τον τύπο:

$$CV = \text{τυπική απόκλιση} / \text{μέση τιμή} \times 100$$

Ως τυπική απόκλιση νοείται η τετραγωνική ρίζα του πηλίκου του αθροίσματος των τετραγώνων των διαφορών ανάμεσα στις διπλές μετρήσεις προς τον αριθμό των μεμονωμένων προσδιορισμών. Ως μέση τιμή νοείται η μέση τιμή όλων των τιμών των βιοχημικών παραμέτρων που μετρήθηκαν. Για την αιμοσφαιρίνη, η οποία προσδιορίστηκε εις τριπλούν, χρησιμοποιήθηκε ο ίδιος τύπος με τον κλασικό ορισμό της τυπικής απόκλισης.

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων της ενδοθηλίνης έγινε με ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (ομάδα × χρόνος) με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στο δεύτερο παράγοντα. Για την εξέταση της σημαντικότητας των μεταβολών στα λιπίδια του αίματος, την αιμοσφαιρίνη, τον αιματοκρίτη, τον όγκο του πλάσματος, τη μέγιστη αερόβια ισχύ και την ισχύ της δοκιμασίας των 30 min, μέσα σε κάθε ομάδα ως προς το χρόνο και των διαφορών μεταξύ των ομάδων σε κάθε χρονική στιγμή πραγματοποιήθηκαν κατάλληλες δοκιμασίες t του Student. Παράλληλα για την εξέταση σημαντικών μεταβολών στην καρδιακή συχνότητα της ομάδας μελέτης κατά τη διάρκεια του προγράμματος πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης δύο παραγόντων (συνεδρία × χρόνος) με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις και στους δύο παράγοντες. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο $\alpha = 0,05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΩΜΑΤΟΜΕΤΡΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΚΑΙ ΑΕΡΟΒΙΑ ΙΣΧΥΣ

Οι δύο ομάδες είχαν όμοια ηλικία, σωματική μάζα και ΔΣΜ, ως αποτέλεσμα του πειραματικού σχεδιασμού (πίνακας 5). Η μέγιστη αερόβια ισχύς αυξήθηκε σημαντικά στην ομάδα μελέτης ύστερα από την εφαρμογή του προπονητικού προγράμματος ($p < 0,001$) και παράλληλα βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0,001$) ενώ η διαφορά μεταξύ της αρχικής τιμής της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου δεν ήταν σημαντική.

Πίνακας 5. Σωματομετρικά δεδομένα και αερόβια ισχύς

	Ομάδα μελέτης		Ομάδα ελέγχου
	Αρχή	Τέλος	
Ηλικία (έτη)	28,8 ± 2,1	29,0 ± 2,1	25,2 ± 1,7
Σωματική μάζα (kg)	80,0 ± 3,2	79,5 ± 3,2	74,3 ± 1,6
Ύψος (m)	1,79 ± 0,1	1,79 ± 0,1	1,79 ± 0,1
ΔΣΜ (kg/m ²)	25,1 ± 1,1	24,9 ± 1,0	23,4 ± 0,9
Μέγιστη αερόβια ισχύς (W)	232 ± 14	276 ± 14*	206 ± 10
Ισχύς της δοκιμασίας των 30 min (W)		163 ± 7*	128 ± 6

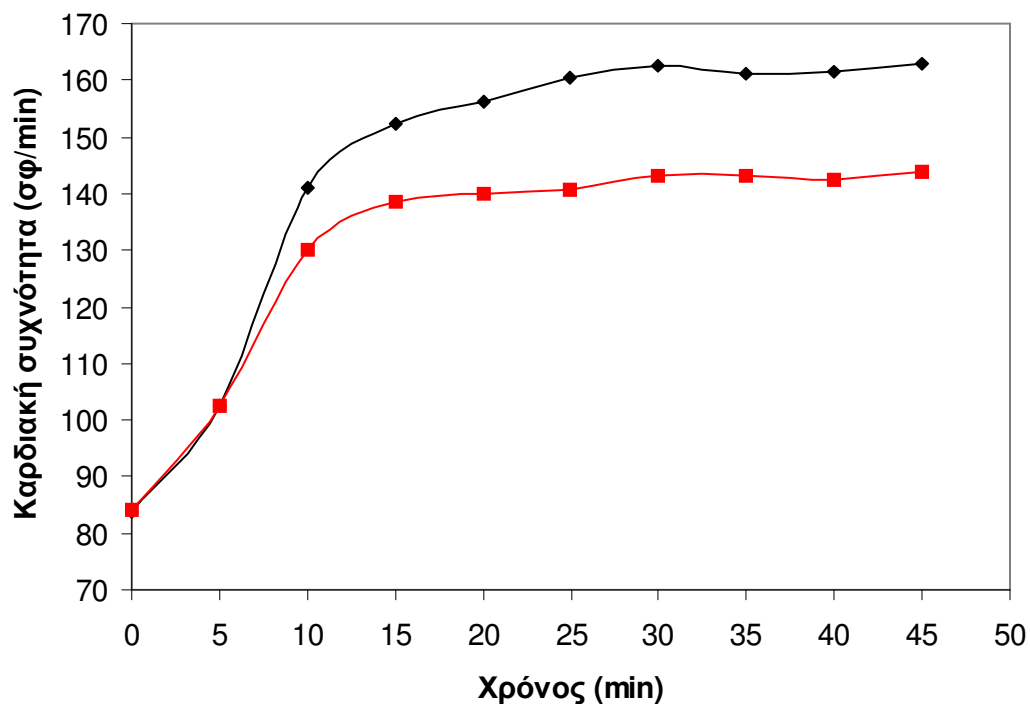
* $p < 0,001$, σημαντικά διαφορετική από την αρχική μέτρηση (όπου έγινε) και από την ομάδα ελέγχου

Επίσης η ισχύς της δοκιμασίας των 30 min (στο 60 % της μέγιστης αερόβιας ισχύος) βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($p < 0,001$). Τα ατομικά δεδομένα των εθελοντών, με βάση τα οποία καταρτίστηκε ο πίν. 5, παρουσιάζονται στο παράρτημα Α.

ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ, ΙΣΧΥΣ ΚΑΙ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΗ ΔΑΠΑΝΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑ- ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΠΟΝΗΤΙΚΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

Η καρδιακή συχνότητα των εθελοντών της ομάδας μελέτης κατά τη διάρκεια της άσκησης ελαττώθηκε σταδιακά με την πρόοδο του προπονητικού προγράμματος. Η καρδιακή συχνότητα κατά τη διάρκεια της τελευταίας συνεδρίας ήταν σημαντικά χαμηλότερη από την αντίστοιχη της πρώτης συνεδρίας ($p = 0,004$, σχήμα 8). Το ίδιο ισχύει και για τις μέσες τιμές καρδιακής συχνότητας κατά τη διάρκεια των δύο αυτών συνεδριών (131 ± 2 έναντι 144 ± 3 σφ/min, $p = 0,004$). Αντίθετα η ισχύς, στην οποία ασκούσαν οι εθελοντές σε κάθε συνεδρία, αυξανόταν σταδιακά καθώς φαινόταν ότι οι εθελοντές ήταν σε θέση να ασκηθούν σε υψηλότερες επιβαρύνσεις. Η ισχύς κατά την τελευταία συνεδρία (148 ± 9 W) ήταν σημαντικά υψηλότερη από την ισχύ κατά την πρώτη συνεδρία (139 ± 8 W, $p = 0,005$).

Η ενεργειακή δαπάνη ανά συνεδρία κυμάνθηκε μεταξύ 330 ± 19 kcal (κατά τις δύο πρώτες συνεδρίες) και 352 ± 21 kcal (κατά τις έξι τελευταίες συνεδρίες) και ήταν κατά μέσο όρο 340 kcal.



Σχήμα 8. Μέση καρδιακή συχνότητα ανά πεντάλεπτο των εθελοντών της ομάδας μελέτης κατά τη διάρκεια της πρώτης (◆) και της τελευταίας συνεδρίας (■).

ΛΙΠΙΔΙΑ

Δε βρέθηκε καμιά σημαντική διαφορά στα λιπίδια του πλάσματος τόσο μεταξύ των δύο ομάδων όσο και στην ομάδα μελέτης πριν και μετά το παρεμβατικό πρόγραμμα των 12 εβδομάδων (πίνακας 6). Το CV του προσδιορισμού των τριακυλογλυκερολών ήταν 2,6 %, της ολικής χοληστερόλης 2,7 % και της χοληστερόλης των HDL 2,4 %.

Πίνακας 6. Συγκεντρώσεις ηρεμίας των λιπιδίων στο πλάσμα των μελών της ομάδας μελέτης (στην αρχή και στο τέλος του προπονητικού προγράμματος) και της ομάδας ελέγχου

	Ομάδα μελέτης		Ομάδα ελέγχου
	Αρχή	Τέλος	
Τριακυλογλυκερόλες (mg/dL)	95 ± 7	98 ± 10	121 ± 19
Ολική χοληστερόλη (mg/dL)	203 ± 17	197 ± 13	188 ± 11
Χοληστερόλη των HDL (mg/dL)	49 ± 3	51 ± 1	52 ± 2
Χοληστερόλη των LDL (mg/dL)	135 ± 15	126 ± 12	105 ± 14

ΑΛΛΑΓΕΣ ΟΓΚΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

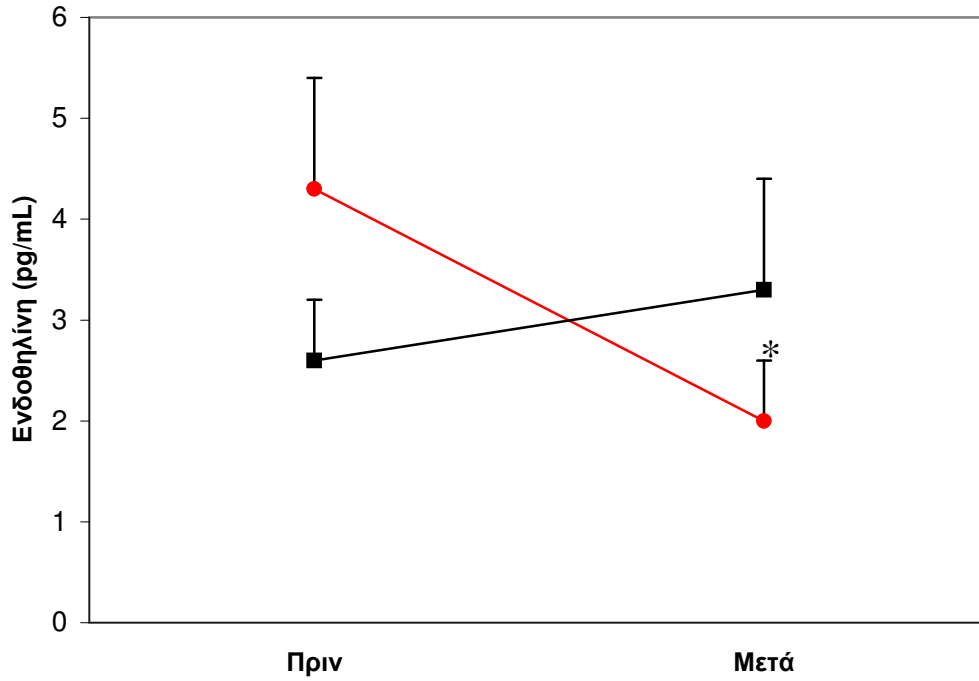
Καμιά σημαντική διαφορά δε βρέθηκε στις τιμές της αιμοσφαιρίνης και του αιματοκρίτη πριν και 30 min μετά το τέλος της «τριαντάλεπτης» δοκιμασίας στο 60 % της μέγιστης αερόβιας ισχύος σε καμία από τις δύο ομάδες (πίνακας 7). Το CV του προσδιορισμού της αιμοσφαιρίνης ήταν 5,5 %. Ωστόσο στην ομάδα μελέτης η μεταβολή του όγκου του πλάσματος (όγκος πλάσματος μετά/όγκος πλάσματος πριν) ήταν 0,986, δείχνοντας ελαφρά αιμοσυμπύκνωση, ενώ στην ομάδα ελέγχου η μεταβολή του όγκου του πλάσματος ήταν 1,050, δείχνοντας ελαφρά αιματαραίωση. Η μεταβολή του όγκου του πλάσματος ήταν σημαντικά διαφορετική στις δύο ομάδες ($p = 0,03$).

Πίνακας 7. Αιμοσφαιρίνη και αιματοκρίτης πριν και 30 min μετά το τέλος της «τριαντάλεπτης» δοκιμασίας

	Ομάδα μελέτης		Ομάδα ελέγχου	
	Πριν	Μετά	Πριν	Μετά
Αιμοσφαιρίνη (mg/dL)	16,5 ± 0,3	16,4 ± 0,2	18,3 ± 0,4	17,7 ± 0,4
Αιματοκρίτης (%)	43,3 ± 0,9	44,4 ± 0,8	45,5 ± 0,5	44,7 ± 0,5

ΕΝΔΟΘΗΛΙΝΗ

Σημαντική ελάττωση ($p = 0,024$) των επιπέδων ενδοθηλίνης βρέθηκε στην ομάδα μελέτης 30 min μετά το τέλος της «τριαντάλεπτης» δοκιμασίας ($2,0 \pm 0,6$ pg/mL) σε σύγκριση με τα επίπεδά της σε κατάσταση ηρεμίας, ($4,3 \pm 1,1$ pg/mL). Αντιθέτως, στην ομάδα ελέγχου τα επίπεδα ενδοθηλίνης παρουσίασαν μια αυξητική τάση μετά την άσκηση ($3,3 \pm 1,1$ pg/mL) σε σχέση με τα επίπεδα ηρεμίας ($2,6 \pm 0,6$ pg/mL), χωρίς αυτή η διαφορά να είναι σημαντική (σχήμα 9). Παράλληλα καμία σημαντική διαφορά δε βρέθηκε μεταξύ της ομάδας μελέτης και της ομάδας ελέγχου στις τιμές ενδοθηλίνης είτε πριν, είτε τριάντα λεπτά μετά το τέλος της άσκησης. Το CV για το σύνολο των προσδιορισμών της ενδοθηλίνης ήταν 4,6 %. Ανάλυση διακύμανσης στα δεδομένα της ενδοθηλίνης έδειξε απουσία σημαντικών διαφορών ως προς την κύρια επίδραση της ομάδας και ως προς την κύρια επίδραση του χρόνου. Επίσης η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων (ομάδα × χρόνος) βρέθηκε να είναι οριακά σημαντική ($p = 0,051$). Τα επιμέρους δεδομένα των βιοχημικών παραμέτρων, με βάση τα οποία καταρτίστηκαν οι πίνακες 6 και 7, καθώς και το σχ. 8, παρουσιάζονται στο παράρτημα Β.



Σχήμα 9. Μεταβολές της ενδοθηλίνης του πλάσματος 30 min μετά το τέλος της τριαντάλεπτης δοκιμασίας. Ο αστερίσκος δείχνει σημαντική διαφορά από την αρχική μέτρηση.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα εργασία εξέτασε για πρώτη φορά την επίδραση ενός προγράμματος συστηματικής άσκησης στα επίπεδα ET του πλάσματος υγιών ανθρώπων. Επιλέχθηκαν άρρενες εθελοντές, ώστε να αποφευχθεί η επίδραση των οιστρογόνων στην αγγειακή λειτουργία και στα επίπεδα ενδοθηλίνης (Luscher et al. 1996, Spence 1996, Morey et al. 1998). Επίσης δεν ήταν καπνιστές, διότι, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, το κάπνισμα έχει άμεση επίδραση στο αγγειακό σύστημα, αυξάνοντας τα επίπεδα ενδοθηλίνης και προκαλώντας αγγειοσύσπαση (Haak et al. 1994, Eastwood 1997, Goerre et al. 1995, Kiowski et al. 1994). Επιπλέον δε ήταν παχύσαρκοι (δείκτης σωματικής μάζας < 30 kg/m²) ή υπέρταστοι, διότι τα επίπεδα ενδοθηλίνης σε αυτές τις πληθυσμιακές κατηγορίες είναι αυξημένα (Licata 1993, Ferri et al. 1997a). Δεν έπασχαν από κάποια χρόνια ή οξεία πάθηση και δε λάμβαναν φάρμακα κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Υποστηρίζεται ότι για την πρόκληση καρδιαγγειακών προσαρμογών απαιτείται ένα χρονικό διάστημα τουλάχιστον τριών μηνών συστηματικής άσκησης, με διάρκεια ανά εβδομάδα δύο ως τρεις ώρες, σε καρδιακή συχνότητα 140-160 σφ/min ή 50-75 % της μέγιστης επιτευχθείσας καρδιακής συχνότητας (Engelhardt & Neumann 1994) και με ενεργειακή δαπάνη μεγαλύτερη των 300 kcal ανά συνεδρία ή 1000 kcal την εβδομάδα (Huonker et al. 1998). Οι απαιτήσεις αυτές καλύφθηκαν κατά το μεγαλύτερο μέρος στην παρούσα μελέτη, η οποία διήρκεσε 12 εβδομάδες, με τρεις συνεδρίες των 40 min ανά εβδομάδα, σε μέση καρδιακή συχνότητα που κυμάνθηκε μεταξύ 144 σφ/min (κατά την πρώτη συνεδρία) και 131 σφ/min (κατά την τελευταία συνεδρία) και με μέση ενεργειακή δαπάνη 340 kcal ανά συνεδρία ή 1020 kcal την εβδομάδα.

Η σταδιακή ελάττωση της καρδιακής συχνότητας στην ομάδα μελέτης μπορεί να οφείλεται σε περιφερειακές προσαρμογές του μυοσκελετικού συστήματος, οι οποίες είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανοχής και της δεκτικότητας προς την επιβάρυνση της άσκησης, μειώνοντας ταυτόχρονα την επιβάρυνση του καρδιακού έργου. Επιπλέον, με κριτήριο την υποκειμενική αίσθηση των εθελοντών, η επιβάρυνση αναπροσαρμόστηκε θετικά κατά τη διάρκεια του προγράμματος των 12 εβδομάδων.

Η απουσία σημαντικών μεταβολών μετά την εφαρμογή του προπονητικού προγράμματος στα λιπίδια του πλάσματος της ομάδας μελέτης μπορεί να οφείλεται στα χαρακτηριστικά του προγράμματος που εφαρμόστηκε. Είναι πιθανό η συνολική διάρκεια των 12 εβδομάδων του παρεμβατικού προγράμματος να μη στάθηκε ικανή να προκαλέσει σημαντικές μεταβολές στο λιπιδαιμικό προφίλ των συμμετεχόντων. Πέρα από αυτό, ενδέχεται οι διατροφικοί χειρισμοί των εθελοντών να συγκάλυψαν πιθανή μεταβολή των λιπιδίων του αίματος. Η διατροφή δεν ελέγχθηκε, αν και ζητήθηκε από τους εθελοντές να διατηρήσουν τις διατροφικές τους συνήθειες κατά τη διάρκεια της μελέτης. Πάντως, δύο μελέτες δε βρήκαν καμιά σημαντική μεταβολή στις τριακυλογλυκερόλες, την ολική χοληστερόλη και τη χοληστερόλη των LDL ύστερα από συστηματική άσκηση διάρκειας μεγαλύτερης των εννέα μηνών (Motoyama et al. 1995, Hata et al. 1998).

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκαν αντίθετες και σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των δύο ομάδων μεταβολές του όγκου του πλάσματος 30 min μετά το τέλος της 30λεπτης δοκιμασίας. Σύμφωνα με τον Fellmann (1992) «Οι μεταβολές που επέρχονται στον όγκο του πλάσματος κατά τη διάρκεια φυσικής δραστηριότητας περιλαμβάνουν αιματараίωση ή αιμοσυμπύκνωση ανάλογα με τύπο της άσκησης, την ένταση και τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Επίσης, το επίπεδο φυσικής επάρκειας των αθλουμένων παίζει ρόλο στις μεταβολές του όγκου του πλάσματος. Φαίνεται λιγότερο πιθανό να προκληθεί περαιτέρω αύξηση του όγκου του πλάσματος σε άτομα με καλή φυσική επάρκεια, στα

οποία η συστηματική φυσική δραστηριότητα έχει ήδη προκαλέσει αιματαραΐωση. Παράλληλα, η μεταβολή του όγκου του πλάσματος κατά την άσκηση είναι αντιστρόφως ανάλογη με την μεταβολή του πλάσματος μετά το τέλος της άσκησης. Έτσι όσο μεγαλύτερη είναι η ελάττωση του όγκου του πλάσματος κατά την άσκηση, τόσο μεγαλύτερη είναι η παρατηρούμενη αιματαραΐωση μετά το τέλος της άσκησης». Ενδέχεται, λοιπόν, η συστηματική άσκηση των 12 εβδομάδων να προκάλεσε αιματαραΐωση στην ομάδα μελέτης με αποτέλεσμα μικρότερες διαταραχές του όγκου του πλάσματος στη διάρκεια της άσκησης και της αποκατάστασης.

Η σημαντική ελάττωση της ενδοθηλίνης μετά την άσκηση στην ομάδα μελέτης είναι πολύ ενθαρρυντική, σε σύγκριση μάλιστα με την τάση για το αντίθετο που παρατηρήθηκε στην ομάδα ελέγχου. Χαμηλά επίπεδα ενδοθηλίνης είναι επιθυμητά, εφόσον η ουσία αποτελεί κύρια ορμόνη του κυκλοφορικού συστήματος (Geny et al. 1998) και υψηλές συγκεντρώσεις της στο πλάσμα σχετίζονται με την πρόκληση καρδιαγγειακών παθήσεων (Battistini et al. 1993, Lisy 1995, Schmeck & Koch 1997). Η διαφορετική αυτή ανταπόκριση των δύο ομάδων γίνεται ακόμη πιο εντυπωσιακή, αν αναλογιστεί κανείς ότι η μείωση της ενδοθηλίνης στην ομάδα μελέτης συνέβη παράλληλα με αιμοσυμπύκνωση ενώ η αύξηση στην ομάδα ελέγχου συνέβη παράλληλα με αιματαραΐωση. Υπενθυμίζεται ότι η προκαλούμενη από την άσκηση αφυδάτωση μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα ET-1 (Maeda et al. 1996).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι η συστηματική άσκηση μπορεί να ανατρέψει την οξεία επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του ανθρώπινου πλάσματος. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η μακροπρόθεσμη άσκηση ενδέχεται να προκαλεί ελάττωση και όχι αύξηση των επιπέδων ενδοθηλίνης, όπως αναφέρεται στις περισσότερες έρευνες που εξέτασαν τη βραχυπρόθεσμη επίδραση της σωματικής δραστηριότητας στην ενδοθηλίνη του πλάσματος (Appenzeller & Wood 1992, Maeda et al. 1994,

Kullmer et al. 1995, Maeda et al. 1996, Rocker et al. 1996, Maeda et al. 1997α, Neri Serneri et al. 1997) αλλά και τα δικά μας αποτελέσματα.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη εξέτασε τη μακροπρόθεσμη επίδραση της άσκησης στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος υγιών ανθρώπων και έδειξε ότι αυτά μειώνονται στους γυμνασμένους εκεί όπου αυξάνονται στους αγύμναστους. Το εύρημα αυτό προσθέτει άλλη μια προστατευτική και ευεργετική δράση της φυσικής δραστηριότητας στην ανθρώπινη υγεία. Η διεξαγωγή ανάλογων μελετών στο μέλλον με περισσότερους συμμετέχοντες, σε διαφορετικές κατηγορίες του πληθυσμού και με την εφαρμογή διαφόρων μορφών φυσικής δραστηριότητας κρίνεται αναγκαία προκειμένου να ερευνηθεί περαιτέρω η βραχυπρόθεσμη και, κυρίως, η μακροπρόθεσμη επίδραση της φυσικής δραστηριότητας στα επίπεδα ενδοθηλίνης του πλάσματος. Για τη βαθύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς της ET ύστερα από άσκηση συνιστάται η διεξαγωγή μελετών με διαδοχικές αιμοληψίες, ώστε να αποσαφηνιστεί η κινητική της ουσίας.

BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ

- Ahlborg, G., Weitzberg, E., & Lundberg, J. (1995). Metabolic and vascular effects of circulating endothelin-1 during moderately heavy prolonged exercise. *Journal of Applied Physiology*, 78, 2294-2300
- Allevard, A.M., Gauquelin, G., & Gharib, C. (1991). Endothelin and atrial natriuretic peptide after exercise performed until exhaustion in the rat. *Life Sciences*, 49, 1803-1808
- Appenzeller, O., & Wood, S.C. (1992). Peptides and exercise at high and low altitudes. *International Journal of Sports Medicine*, 13, 135-140
- Battistini, B., Chailier, P., D'Orleans Juste, P., Briere, N., & Sirois, P. (1993). Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides*, 14, 385-399
- Cesari, M., Pavan, E., Sacchetto, A., & Rossi, G.P. (1996). Endothelin-1: a scientist's curiosity, or a real player in ischemic heart disease? *American Heart Journal*, 132, 1236-1243
- Chiao, J.W., Moonga, B.S., Yang, Y.M., Kancharla, R., Mittelman, A., Wu Wong, J.R., & Ahmed, T. (2000). Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone resorption. *British Journal of Cancer*, 83, 360-365
- Cody, W.L., & Doherty, A.M. (1995). The development of potent peptide agonists and antagonists for the endothelin receptors. *Biopolymers*, 37, 89-104
- Cohen Solal, A., Pansard, Y., & Gourgon, R. (1995). Exercise capacity after heart transplantation. *Presse Medicale*, 9, 1806-1808
- Cosenzi, A., Sacerdote, A., Bocin, E., Molino, R., Plazzotta, N., Seculin, P., & Bellini, G. (1996). Neither physical exercise nor alpha 1- and beta-adrenergic blockade affect plasma endothelin concentrations. *American Journal of Hypertension*, 9, 819-822
- Dawes, K.E., Cambrey, A.D., Campa, J.S., Bishop, J.E., McAnulty, R.J., Peacock, A.J., & Laurent, G.J. (1996). Changes in collagen metabolism in response to endothelin-1:

- evidence for fibroblast heterogeneity. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 28, 229-238
- de Groote, P., Millaire, A., Racadot, A., Decoux, E., & Ducloux, G. (1995). Plasma levels of endothelin-1 at rest and after exercise in patients with moderate congestive heart failure. *International Journal of Cardiology*, 51, 267-272
- Dengler, T.J., Tiefenbacher, C.P., Braun, K., Sack, F.U., Zimmermann, R.K., & Kuebler, W. (1995a). Impaired renal function but not high cyclosporine levels determines increased endothelin plasma levels after heart transplantation. *Transplantation Proceedings*, 27, 1956-1957
- Dengler, T.J., Zimmermann, R., Tiefenbacher, C.P., Braun, K., Sack, F.U., & Kuebler, W. (1995b). Endothelin both plasma levels in acute graft rejection after heart transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 14, 1057-1064
- Dill, D.B., & Costill, D.L. (1974). Calculation of percentage changes in volumes of blood plasma, and red blood cells in dehydration. *Journal of Applied Physiology*, 37, 247-248
- Dodds, P.A., Bellamy, C.M., Muirhead, R.A., & Perry, R.A. (1995). Vasoconstrictor peptides and cold intolerance in patients with stable angina pectoris. *British Heart Journal*, 73, 25-31
- Dorent, R., Cacoub, P., Carayon, A., Nataf, P., Golmard, L.J., Vaissier, E., Godeau, P., & Carbol, C. (1994). Endothelin levels after orthotopic heart transplantation. *Transplantation Proceedings*, 26, 250
- Edwards, B.S., Hunt, S.A., Fowler, M.B., Valantine, H.A., Anderson, L.M., & Lerman, A. (1991). Effect of cyclosporine on plasma endothelin levels in humans after cardiac transplantation. *The American Journal of Cardiology*, 67, 782-784
- Eastwood, G.L. (1997). Is smoking still important in the pathogenesis of peptic ulcer disease? *Journal of Clinical Gastroenterology*, 25, S1-7

- Engelhardt, M., & Neumann, G. (1994). *Sportmedizin. Grundlagen für alle Sportarten*, BLV Sportwissen, München, pg 40-44
- Fellmann, N. (1992). Hormonal and plasma volume alterations following endurance exercise. *Sports Medicine*, 13, 37-49
- Ferri, C., Bellini, C., Desideri, G., Baldoncini, R., Properzi, G., Santucci, A., & De Mattia, G. (1997 α). Circulating endothelin-1 levels in obese patients with the metabolic syndrome. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 105, 38-40
- Ferri, C., De Marzio, P., Desideri, G., Baldoncini, R., Bellini, C., Morelli, S., & Santucci, A. (1997 β). Plasma endothelin-1 levels during transient acute myocardial ischaemia in men: effects of coronary revascularization. *European Journal of Clinical Investigation*, 27, 526-32
- Fontana, F., Tarsi, G., Boschi, S., de Iasio, R., Monetti, N., & Bugiardini, R. (1997). Relationship between plasma endothelin-1 levels and myocardial ischemia induced by exercise testing. *The American Journal of Cardiology*, 79, 957-959
- Fraccarollo, D., Hu, K., Galuppo, P., Gaudron, P., & Ertl, G. (1997). Chronic endothelin receptor blockade attenuates progressive ventricular dilation and improves cardiac function in rats with myocardial infarction. Possible involvement of myocardial endothelin system in ventricular remodeling. *Circulation Research*, 96, 3963-3973
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., & Fredrickson, D.S. (1972). Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 18, 499-502
- Genth-Zotz, S., Zotz, R.J., Cobaugh, M., van Veldhuisen, D.J., Netzer, T., Meyer, J., & Darius, H. (1998). Changes of neurohumoral parameters and endothelin-1 in response to exercise in patients with mild to moderate congestive heart failure. *International Journal of Cardiology*, 66, 137-42

- Geny, B., Piquard, F., Lonsdorfer, J., & Haberey, P. (1998). Endothelin and heart transplantation. *Cardiovascular Research*, 39, 556-562
- Goerre, S., Staehli, C., Shaw, S., & Luscher, T.F. (1995). Effect of cigarette smoking and nicotine on plasma endothelin-1 levels. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 26, S236-238
- Goto, K., Sakurai, T., & Kasuya, Y. (1992). Molecular pharmacology of endothelin in the cardiovascular system. *Nippon Yakurigaku Zasshi. Folia pharmacologica Japonica Kyoto*, 100, 205-218 [Abstract]
- Grover, G.J., Dzwonczyk, S., & Parham, C.S. (1993). The endothelin-1 receptor antagonist BQ-123 reduces infarct size in canine model of coronary occlusion and reperfusion. *Cardiovascular Research*, 27, 1613-1618
- Grover, G.J., Sleph, P.G., & Fox, M. (1992). Role of endothelin-1 and big endothelin-1 in modulating coronary artery vascular tone, contractile function and severity of ischaemia in rat hearts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 263, 1074-1082
- Gullestad, L., Myers, J., Bjornerheim, R., Berg, K.J., Djoseland, O., Hall, C., Lund, K., Kjekshus, J., & Simonsen, S. (1997). Gas exchange and neurohumoral response to exercise: influence of the exercise protocol. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 29, 496-502
- Haak, T., Jungmann, E., Raab, C., & Usadel, K.H. (1994). Elevated endothelin-1 levels after cigarette smoking. *Metabolism*, 43, 267-269
- Hafizi, S., Allen, S.P., Goodwin, A.T., Chester, A.H., & Yacoub, M.H. (1999). Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ET(A) receptor and is co-mitogenic with growth factors. *Atherosclerosis*, 146, 351-359
- Haas, G., Wooding-Scott, M., Binkley, P.F., Myerowitz, D.P., Kelley, R., & Cody, J.R.

- (1993). Effects of successful cardiac transplantation on plasma endothelin. *The American Journal of Cardiology*, 71, 237-240
- Hasdai, D., Holmes, R.D., Garratt, N.K., Edwards, D.W., & Lerman, A. (1997). Mechanical pressure and stretch release endothelin-1 from human atherosclerotic coronary arteries in vivo. *Circulation*, 95, 357-362
- Hasdai, D., Kornowski, R., & Battler, A. (1994). Endothelin and myocardial ischemia. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 8, 589-599
- Hata, K., Hata, T., Miyazaki, K., Kunishi, H., & Masuda, J. (1998). Effect of regular aerobic exercise on cerebrovascular tone in young women. *Journal of Ultrasound in Medicine*, 17, 133-136
- Hopfner, R.L., Hasnadka, R.V., Wilson, T.W., McNeill, J.R., & Gopalakrishnan, V. (1998). Insulin increases endothelin-1-evoked intracellular free calcium responses by increased ET(A) receptor expression in rat aortic smooth muscle cells. *Diabetes*, 47, 937-944
- Huonker, M., Halle, M., Frey, I., Schmidt-Trucksäss, A., Sorichter, S., Keul, J., & Berg, A. (1998). Stellenwert von körperlicher Mehraktivität in der ambulanten kardiovaskulären Prävention. *Zeitschrift für Kardiologie*, 87, 881-890
- Ishikawa, S., Miyauchi, T., Ueno, M., Sagawa, K., Sakai, S., Ushinohama, H., Kado, H., Sunagawa, H., Goto, K., Sugishita, Y., & Honda, S. (1998). Abnormal neurohumoral responses to exercise in patients with heart disease: inhibition of an increase in endothelin-1 production during exercise. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 31, 406-411
- Ishikawa, S., Miyauchi, T., Sakai, S., Sunagawa, H., Honda, S., Maeda, S., Matsuda, M., Yamaguchi, I., Goto, K., & Sugishita, Y. (1995). Plasma endothelin-1 levels after exercise in patients with congenital heart disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 26, 491-493

- Kaski, J.C., Cox, I.D., Crook, J.R., Salomone, O.A., Fredericks, S., Hann, C., & Holt, D. (1998). Differential plasma endothelin levels in subgroups of patients with angina and angiographically normal coronary arteries. Coronary Artery Disease Research Group. *American Heart Journal*, 136, 412-7
- Kaski, J.C., Elliott, P.M., Salomone, O., Dickinson, K., Gordon, D., Hann, C., & Holt, D.W. (1995). Concentration of circulating plasma endothelin in patients with angina and normal coronary angiograms. *British Heart Journal*, 74, 620-4
- Kiowski, W., Linder, L., Stoschitzky, K., Pfisterer, M., Burckhardt, D., Burkart, F., & Buhler, F.R. (1994). Diminished vascular response to inhibition of endothelium-derived nitric oxide and enhanced vasoconstriction to exogenously administered endothelin-1 in clinically healthy smokers. *Circulation*, 90, 27-34
- Kraemer, B.K., Ittner, K.P., Beyer, M.E., Hoffmeister, H.M., & Riegger, G.A. (1997). Circulatory and myocardial effects of endothelin. *Journal of Molecular Medicine*, 75, 886-890
- Krum, H., Goldsmith, R., Wilshire Clement, M., Miller, M., & Packer, M. (1995). Role of endothelin in the exercise intolerance of chronic heart failure. *The American Journal of Cardiology*, 75, 1282-1283
- Kullmer, T., Jungmann, E., Haak, T., & Usadel, K.H. (1995). Modification of the responses of endothelin-1 to exhaustive physical exercise under simulated high-altitude conditions with acute hypoxia. *Metabolism*, 44, 8-9
- Kurbel, S., Kurbel, B., Kovačić, D., Sulava, D., Krajina, Z., Dmitrović, B. & Šokčević, M. (1999). Endothelin-secreting tumors and the idea of the pseudoectopic hormone secretion in tumors. *Medical Hypotheses*, 52, 329-333
- Lenz, T., Nadansky, M., Gossmann, J., Oremek, G., & Geiger, H. (1998). Exhaustive exer-

- cise-induced tissue hypoxia does not change endothelin and big endothelin plasma levels in normal volunteers. *American Journal of Hypertension*, 11, 1028-1031
- Lerman, A., Kubo, S.H., Tschumperlin, L.K., & Burnett, J.C. (1992). Plasma endothelin concentrations in humans with end-stage heart failure and after transplantation. *Journal of the American College of Cardiology*, 20, 849-853
- Letizia, C., Barilla, F., Cerci, S., de Ciocchis, A., Coassin, S., Mastroianni, M.A., D'Ambrosio, C., Campa, P.P., & Scavo, D. (1996). Plasma endothelin-1 concentrations in patients with coronary artery disease during stress test before and after nisoldipine administration. *Acta Cardiologica*, 51, 165-72
- Letizia, C., Barilla, F., Cerci, S., D'Ambrosio, C., Coassin, S., de Ciocchis, A., Mastroianni, M.A., Campa, P.P., & Scavo, D. (1995). Dynamic exercise induces elevation of plasma levels of endothelin-1 in patients with coronary artery disease. *Angiology*, 46, 819-826
- Licata, G., Scaglione, R., Avellone, G., Parrinello, G., Merlino, G., & Corrao, S. (1993). Obesity, hypertension and atherosclerosis. *International Angiology*, 12, 326-330
- Lin, G., Macdonald, L.R., Marton, S.L., Kowalczyk, A., Solensky, J.N., & Weir, K.B. (2001). Hemoglobin increases endothelin-1 in endothelial cells by decreasing nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280, 824-830
- Lipa, E.J., Neligan, C.P., Perreault, M.T., Baribeau, J., Levine, H.R., Knowlton, J.R., & Pang, Y.C. (1999). Vasoconstrictor effect of endothelin-1 in human skin: role of ET_A and ET_B receptors. *American Journal of Physiology*, 276 (*Heart and Circulatory Physiology*, 45), H359-H367
- Lisy, O. (1995). Endothelin: a cardiovascular regulatory peptide. Outline of its pathophysiologic activity. *Ceskoslovenska Fysiologie*, 44, 152-157, [Abstract]

- Luscher, T.F., Barton, M., Wight, E., Espinosa, E., & Yang, Z. (1996). Action of natural estrogens on the vessel wall: molecular mechanisms and clinical implications. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 126, 1748-1755
- Maeda, S., Miyauchi, T., Sakai, S., Kobayashi, T., Goto, K., Sugishita, Y., & Matsuda, M. (1998 α). Endothelin-1 in the heart during exercise. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 31, S392-394
- Maeda, S., Miyauchi, T., Kobayashi, T., Goto, K., & Matsuda, M. (1998 β). Exercise causes tissue-specific enhancement of endothelin-1 mRNA expression in internal organs. *Journal of Applied Physiology*, 85, 425-431
- Maeda, S., Miyauchi, T., Sakai, S., Kobayashi, T., Iemitsu, M., Goto, K., Sugishita, Y., & Matsuda, M. (1998 γ). Prolonged exercise causes an increase in endothelin-1 production in the heart in rats. *American Journal of Physiology*, 275 (*Heart and Circulatory Physiology*, 44), H2105-H2112
- Maeda, S., Miyauchi, T., Goto, K., & Matsuda, M. (1997 α). Differences in the change in the time course of plasma endothelin-1 and endothelin-3 levels after exercise in humans. The response to exercise of endothelin-3 is more rapid than that of endothelin-1. *Life Sciences*, 61, 419-425
- Maeda, S., Miyauchi, T., Sakane, M., Saito, M., Maki, S., Goto, K., & Matsuda, M. (1997 β). Does endothelin-1 participate in the exercise-induced changes of blood flow distribution of muscles in humans? *Journal of Applied Physiology*, 82, 1107-1111
- Maeda, S., Miyauchi, T., Waku, T., Koda, Y., Kono, I., Goto, K., & Matsuda, M. (1996). Plasma endothelin-1 level in athletes after exercise in a hot environment: exercise-induced dehydration contributes to increases in plasma endothelin-1. *Life Sciences*, 58, 1259-1268

- Maeda, S., Miyauchi, T., Goto, K., & Matsuda, M. (1994). Alteration of plasma endothelin-1 by exercise at intensities lower and higher than ventilatory threshold. *Journal of Applied Physiology*, 77, 1399-1402
- Mangieri, E., Tanzilli, G., Barilla, F., Ciavolella, M., Puddu, P.E., De Angelis, C., Dell'Italia, L.J., & Campa, P.P. (1998). Handgrip increases endothelin-1 secretion in normotensive young male offspring of hypertensive parents. *Journal of the American College of Cardiology*, 31, 1362-1366
- Mangieri, E., Tanzilli, G., Barilla, F., Ciavolella, M., Serafini, G., Nardi, M., Mangiaracina, F., Scibilia, G., Dell'Italia, L.J., & Campa, P.P. (1997). Isometric handgrip exercise increases endothelin-1 plasma levels in patients with chronic congestive heart failure. *The American Journal of Cardiology*, 79, 1261-1263
- Mattyus, I., Zimmerhackl, L.B., Schwarz, A., Brandis, M., Miltenyi, M., & Tulassay, T. (1996). Elevated urinary excretion of endothelin in insulin-dependent diabetes mellitus: no influence of physical exercise. *Acta Paediatrica*, 85, 1058-1061
- McMurray, J.J., Ray, S.G., Abdullah, I., Dargie, H.J., & Morton, J.J. (1992). Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation*, 85, 1374-1379
- Michelakakis, N.A., Petropoulou, E.N., Lazaros, G.A., Perpinia, A.S., Vrachatis, A.D., Apostolou, T.S., & Zacharoulis, A.A. (1998). Comparison of endothelin-1 levels at rest and during exercise between patients with cardiac syndrome-X and healthy people. *Acta Cardiologica*, 53, 3-6
- Miller, R.C., Pelton, J.T., & Huggins, J.P. (1993). Endothelins: from receptors to medicine. *Trends in Pharmacological Sciences*, 14, 54-60
- Miyauchi, T., & Masaki, T. (1999). Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annual Review of Physiology*, 61, 391-415

- Moreland, S. (1994). Endothelin receptor antagonists: a brief review. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 72, 1469-1471
- Moreland, S., McMullen, D.M., Delaney, C.R., Lee, V.G., & Hunt, J.T. (1992). Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ET_B-like receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184, 100-106
- Morey, K.A., Razandi, M., Pedram, A., Hu, R., Prins, A.B., & Levin, R.E. (1998). Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. *Biochemical Journal*, 330, 1097-1105
- Motoyama, M., Sunami, Y., Kinoshita, F., Irie, T., Sasaki, J., Arakawa, K., Kiyonaga, A., Tanaka, H., & Shindo, M. (1995). The effects of long-term low intensity aerobic training and detraining on serum lipid and lipoprotein concentrations in elderly men and women. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 70, 126-131
- Neri Serneri, G.G., Cecioni, I., Migliorini, A., Vanni, S., Galanti, G., & Modesti, P.A. (1997). Both plasma and renal endothelin-1 participate in the acute cardiovascular response to exercise. *European Journal of Clinical Investigation*, 27, 761-766
- Oie, E., Bjonerheim, R., Groggaard, H.K., Kongshaug, H., Smiseth, O.A., & Attramadal, H. (1998). ET-receptor antagonism, myocardial gene expression, and ventricular remodeling during CHF in rats. *American Journal of Physiology*, 275, H868-H877
- Opgenorth, T.J. (1995). Endothelin receptor antagonism. *Advances in Pharmacology*, 33, 1-65
- Ortega Mateo, A., & Aleixandre de Artinano, A. (1997). Highlights on endothelins: A review. *Pharmacological Research*, 36, 339-351
- Petersen, C.L., Hansen, A., Frandsen, E., Strange, S., Jonassen, O., Nielsen, J.R., Dige-Petersen, H., & Hesse, B. (1994). Endothelin release and enhanced regional myocar-

- dial ischemia induced by cold-air inhalation in patients with stable angina. *American Heart Journal*, 128, 511-516
- Piacentini, L., Gray, M., Honbo, Y.N., & Chentoufi, J. (2000). Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32, 565-576
- Piquard, F., Geny, B., Ellero, B., Canguilhem, B., Mettauer, B., Epailly, E., Chakfe, N., Charpentier, A., Wolf, P., Kretz, J.G., Eisenmann, B., Koehl, C., & Haberey, P. (1998). Role of the immunosuppressive therapy in the neuroendocrine activation after heart, renal and liver transplantation. *Transplantation Proceedings*, 30, 2124-2126
- Predel, H.G., Knigge, H., Prinz, U., Kramer, H.J., Stalleicken, D., & Rost, R.E. (1995). Exercise increases endothelin-1 plasma concentrations in patients with coronary artery disease: modulatory role of LDL cholesterol and of pentaerithryltetranitrate. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 26, S497-501
- Richter, E.A., Emmeluth, C., Bie, P., Helge, J., & Kiens, B. (1994). Biphasic response of plasma endothelin-1 concentration to exhausting submaximal exercise in man. *Clinical Physiology*, 14, 379-384
- Rossi, G.P., Sacchetto, A., Cesari, M., & Pessina, A.C. (1999). Interactions between endothelin-1 and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Cardiovascular Research*, 43, 300-307
- Rocker, L., Mockel, M., Westpfahl, K.P., & Gunga, H.C. (1996). Influence of maximal ergometric exercise on endothelin concentrations in relation to molecular markers of the hemostatic system. *Thrombosis and Haemostasis*, 75, 612-616
- Rubanyi, G.M., & Botelho, L.H. (1991). Endothelins. *The FASEB Journal*, 5, 2713-2720
- Salo, J., Francitorra, A., Follo, A., Navasa, M., Gines, A., Jimenez, W., Gines, P., Arroyo, V., Rivera, F., & Rodes, J. (1995). Increased plasma endothelin in cirrhosis. Relation-

- ship with systemic endotoxemia and response to changes in effective blood volume. *Journal of Hepatology*, 22, 389-398
- Savourey, G., Garcia, N., Caravel, J.P., Charib, C., Pouzeratte, N., Martin, S., & Bittel, J. (1998). Pre-adaptation, adaptation and de-adaptation to high altitude in humans: hormonal and biochemical changes at sea level. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 77, 37-43
- Schiffrin, L.E. (1999). Role of Endothelin-1 in Hypertension. *Hypertension*, 34, 876-881
- Schiffrin, E.L. (1995). Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension*, 25, 1135-1143
- Schmeck, J., & Koch, T. (1997). The significance of endothelin for physiologic and patho-physiologic processes of the lung. *Anaesthesiologische und Intensivmedizinische Notfallmedizin und Schmerztherapie*, 32, 397-398 and 401-408
- Schmoeckel, M., Arendt, R.M., Rolinski, B., Rieckmann, P., Riemer, M., Ueberfuhr, P., & Reichart, B. (1995). Enhanced endothelin-1 urine excretion in patients with graft arteriosclerosis after heart transplantation. *Transplantation Proceedings*, 27, 2097-2099
- Schweizer, A., Valdenaire, O., Nelboeck, P., Deuschle, U., Dumas Milne Edwards, J., Stumpf, G.J., & Loeffler, B. (1997). Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *Biochemical Journal*, 328, 871-877
- Sehested, J., Reinicke, G., Ishino, K., Hetzer, R., Schifter, S., Schmitzer, E., & Regitz, V. (1995). Blunted humoral responses to mental stress and physical exercise in cardiac transplant recipients. *European Heart Journal*, 16, 852-858
- Spence, J.D. (1996). Cerebral consequences of hypertension: where do they lead? *Journal of Hypertension (Supplement)*, 14, S139-145

- Sudhir, K., DeMarco, T., Kumar, S., Maganti, K., Amidon, T.M., de Groot, C., Klinski, C., Lau, D., Keith, F., Taylor, R.N., & Chatterjee, K. (1995). Transcoronary and pulmonary vascular dynamics of endothelin-1 in heart transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 14, 230-235
- Summer, M.I., Cannon, T.R., Mundin, J.W., White, D.G., & Watts, I.S. (1992). Endothelin ET_A and ET_B receptors mediate vascular smooth muscle contraction. *British Journal of Pharmacology*, 107, 858-860
- Tanabe, K., Yamamoto, A., Suzuki, N., Yokoyama, Y., Osada, N., Nakayama, M., Akashi, Y., Seki, A., Samejima, H., Oya, M., Murabayashi, T., Omiya, K., Itoh, H., Miyake, F., & Murayama, M. (2000). Physiological role of endothelin-1 in nonworking muscles during exercise in healthy subjects. *Japanese Circulation Journal*, 64, 27-31
- Watanabe, T., Suzuki, N., Shimamoto, N., Fujino, M., & Imada, A. (1991). Contribution of endogenous endothelin to the extension of myocardial infarct size in rats. *Circulation Research*, 69, 370-377
- Wolpert, H.A., Steen, S.N., Istfan, N.W., & Simonson, D.C. (1993). Insulin modulates circulating endothelin-1 levels in humans. *Metabolism*, 42, 1027-1030
- Yamakami, T., Taguchi, O., Gabazza, E.C., Yoshida, M., Kobayashi, T., Kobayashi, H., Yasui, H., Iбата, H., & Adachi, Y. (1997). Arterial endothelin-1 level in pulmonary emphysema and interstitial lung disease. Relation with pulmonary hypertension during exercise. *The European Respiratory Journal*, 10, 2055-2060
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., & Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332, 411-415
- Yin, S., & Zhang, B. (1998). Effect of exercise on endothelin and nitric oxide synthesis of the thoracic aorta in rats. *Chinese Journal of Sports Medicine*, 17, 8-9, [Abstract]

Yoshida, H., Imafuku, Y., Ohhara, M., Miyata, M., Kasukawa, R., Ohsumi, K., & Horiuchi, J. (1998). Endothelin-1 production by human synoviocytes. *Annals of Clinical Biochemistry*, 35, 290-294

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Ατομικά στοιχεία εθελοντών

Κωδικό γράμμα εθελοντή	Πειραματική Ομάδα	Ηλικία (έτη)	Μάζα (kg)		Ύψος (m)		Δ.Σ.Μ (Kg/m ²)		Μέγιστη ισχύς (W)		Ισχύς 30λεπτης δοκιμασίας	
			1η*	2η**	1η	2η	1η	2η	1η	2η	1η	2η
			μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση
A	μελέτης	40	86	87	1,75	1,75	28.1	28,4	200	240	120	150
B	μελέτης	25	89	88,5	1,77	1,77	28.4	28,2	280	320	160	180
C	μελέτης	32	90	87,3	1,75	1,74	29.4	28,5	250	280	160	180
D	μελέτης	25	62	61,7	1,78	1,78	19.6	19,5	170	200	100	120
E	μελέτης	23	75	76,5	1,85	1,85	21.9	22,4	280	340	160	180
F	μελέτης	23	77,8	77	1,80	1,81	24.0	23,8	240	280	140	160
G	μελέτης	23	87	86	1,85	1,84	25.4	25,1	260	280	150	180
I	μελέτης	34	70	67,8	1,70	1,70	24.2	23,5	235	260	150	170
N	μελέτης	34	84	83,3	1,84	1,84	24.5	24,6	200	280	130	150
a	ελέγχου	26	80		1,73		26,7		200		140	
b	ελέγχου	25	70,5		1,80		21,8		220		140	
d	ελέγχου	38	80,5		1,78		25,4		220		135	
e	ελέγχου	23	71		1,88		20,1		160		100	
f	ελέγχου	24	75		1,69		26,3		200		110	
g	ελέγχου	24	75		1,72		25,4		160		110	
h	ελέγχου	23	76,5		1,83		22,8		220		140	
m	ελέγχου	21	75		1,86		21,7		230		140	
n	ελέγχου	23	65,6		1,80		20,2		240		140	

* Στην έναρξη της μελέτης

** Μετά το πέρας 12 εβδομάδων

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β
Βιοχημικές παράμετροι

Κωδικό γράμμα	Πειραμα- τική Ομάδα	Χοληστερόλη (mg/dL)		HDL-χοληστερόλη (mg/dL)		LDL-χοληστερόλη (mg/dL)		Τριγλυκερίδια (mg/dL)		Αιμοσφαιρίνη (mg/dL)		Αιματοκρίτης		Ενδοθελίνη (pg/mL)	
		1η*	2η**	1η*	2η**	1η*	2η**	1η*	2η**	1η¶	2ης	1η¶	2ης	1η¶	2ης
εθελοντή		μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση	μέτρηση
A	μελέτης	330	289	57,1	53,6	245	215	140	104	15,9	15,9	42,5	43,2	1,1	0,0
B	μελέτης	160	153	45,4	48,5	95	90	98	73	17,6	16,5	39,3	44,1	4,4	0,0
C	μελέτης	184	185	46,0	55,1	117	119	103	55	Καταστροφική δείγματος				11,8	5,3
D	μελέτης	206	205	44,9	51,6	147	131	72	113	16,9	16,8	43,3	42,5	2,2	0,0
E	μελέτης	195	157	36,7	45,8	138	98	100	65	15,5	16,1	42,3	44,1	2,5	3,3
F	μελέτης	169	210	40,6	45,1	112	139	78	131	17,8	17,1	45,6	44,7	0,6	1,8
G	μελέτης	195	188	60,4	55,2	118	111	83	111	15,1	15,5	48,8	50,4	7,3	2,6
I	μελέτης	216	184	49,8	56,2	146	111	103	82	16,1	16,2	41,9	43,0	3,4	2,3
N	μελέτης	173	201	59,3	48,9	99	123	74	148	16,9	16,9	42,3	43,2	5,0	2,5
α	ελέγχου	173		48,6		112		61		17,6	17,2	45,6	43,9	3,3	10,0
b	ελέγχου	156		54,3		85		85		17,3	15,6	46,4	43,9	5,8	0,0
d	ελέγχου	265		62,2		181		106		17,2	17,0	46,5	44,7	0,0	6,9
e	ελέγχου	179		53,6		33		186		20,8	18,5	45,6	47,2	2,5	0,0
f	ελέγχου	161		56,5		91		70		17,6	18,7	45,6	43,9	1,9	2,7
g	ελέγχου	217		43,9		153		102		17,6	17,6	45,9	46,7	4,2	5,0
h	ελέγχου	178		45,9		96		183		20,0	18,9	48,0	46,4	0,0	2,0
m	ελέγχου	189		54,5		118		84		17,7	17,3	42,5	42,7	1,1	1,2
n	ελέγχου	170		50,3		78		210		18,5	18,0	43,9	43,2	0,6	1,1

* Στην έναρξη της μελέτης

** Μετά το πέρας 12 εβδομάδων

¶ Πριν την έναρξη της 30λεπτης δοκιμασίας

s 30 min μετά το τέλος της 30λεπτης δοκιμασίας