



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ : ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΑΣΚΗΣΗ

ΜΙΧΑΛΗΣ ΜΑΚΡΥΛΛΟΣ



*«Συσχέτιση του πολυμορφισμού -174G/C στο γονίδιο IL-6
με την απόδοση αθλητών υπεραντοχής»*

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: Δεδούσης Γ.
Κάβουρας Σ.
Ματάλα Α.

ΠΤΥ
ΜΑΚ

ΑΘΗΝΑ 2004

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

- 1. Πρόλογος
- 1.1 Περιγραφή – Abstract
- 1.2 Γενικά

Αφιερωμένο εξαιρετικά...

- 1.4 Σκερταθλον: Ιστορική αναδρομή
- 1.5 Το Σκερταθλον σήμερα

Στη γυναίκα που μου δίδαξε πως η αγάπη έχει σάρκα και οστά...στη γυναίκα που ακόμα με ζεσταίνει με την ανάσα της...στη γυναίκα που κάθε μέρα ερωτεύομαι και περισσότερο...στην πιο όμορφη γυναίκα του κόσμου...στη γιαγιά μου...

- 2.5 Παρακίνηση μικρού γλυκογόνου και παραγωγή IL-6
- 2.6 Ενδοκυτταρικά σήματα-μηχανισμοί παραγωγής IL-6 στους σκελετικούς μύες
- 2.7 Βιολογικές δράσεις IL-6
- 2.8 IL-6 και μεταβολισμός γλυκόζης
- 2.9 IL-6 και μεταβολισμός λιπιδίων
- 2.10 Ενδοκρινικές και άλλες δράσεις IL-6
- 2.11 Ρυθμιστική επίδραση της IL-6 στα ανοσοκυτταρικά σύστημα
- 2.12 Αντι-φλεγμονώδης επίδραση της IL-6
- 2.13 IL-6 - Συμπεράσματα

ΠΡΑΚΤΙΚΟ-ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- 3.1 Δείγμα
- 3.2 Υλικά-Μέθοδοι
- 3.2.1 Πλαστικά – Γυαλιά
- 3.2.2 Μηροσώματα
- 3.2.3 Αντιδότες
- 3.2.4 Απομόνωση DNA
- 3.2.5 Αλκυοβασική Αντίδραση Πολυμεράσεως (PCR)
- 3.2.6 Έλεγχος PCR
- 3.2.7 Πήξη με ενζύμ
- 3.2.8 Στατιστική ανάλυση
- 3.2.9 Αποτέλεσμα II – Συμπεράσματα
- 3.2.10 Συμπεράσματα

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Α. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Πρόλογος
- 1.1 Περίληψη – Abstract
- 1.2 Γενικά
- 1.3 Σκοπός της μελέτης
- 1.4 Σπάρταθλον : Ιστορική αναδρομή
- 1.5 Το Σπάρταθλον σήμερα

2.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- 2.1 Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)
- 2.2 Η IL-6 ως απάντηση στην άσκηση
- 2.3 IL-6 κατά την άσκηση: ποια κύτταρα την παράγουν;
- 2.4 Υδατανθρακική φόρτιση και παραγωγή IL-6
- 2.5 Περιεκτικότητα μυϊκού γλυκογόνου και παραγωγή IL-6
- 2.6 Ενδοκυτταρικά σήματα-μηχανισμοί παραγωγής IL-6 στους σκελετικούς μύες
- 2.7 Βιολογικές δράσεις IL-6
- 2.8 IL-6 και μεταβολισμός γλυκόζης
- 2.9 IL-6 και μεταβολισμός λιπιδίων
- 2.10 Ενδοκρινικές και άλλες δράσεις IL-6
- 2.11 Ρυθμιστική επίδραση της IL-6 στο ανοσοποιητικό σύστημα
- 2.12 Αντι-φλεγμονώδης επίδραση της IL-6
- 2.13 IL-6 - Συμπεράσματα

3.ΠΡΑΚΤΙΚΟ-ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

- 3.1 Δείγμα
- 3.2 Υλικά-Μέθοδοι
- 3.2.1 Πλαστικά – Γυαλικά
- 3.2.2 Μηχανήματα
- 3.2.3 Διαλύματα
- 3.2.4 Απομόνωση DNA
- 3.2.5 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)
- 3.2.6 Έλεγχος PCR
- 3.2.7 Πένψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού
- 3.2.8 Στατιστική ανάλυση
- 3.2.9 Αποτελέσματα - Συζήτηση
- 3.2.10 Συμπεράσματα

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Γνωρίζω πολύ καλά πως θα ήταν εξαιρετικά δύσκολο εγχείρημα η εκπόνηση της συγκεκριμένης μελέτης, δίχως την αμέριστη συμπαράσταση κάποιων ανθρώπων τόσο σε ερευνητικό-εργαστηριακό επίπεδο όσο και σε επίπεδο θεωρητικής προσέγγισης. Από την πρώτη κιόλας φάση της συλλογής των δειγμάτων, μέχρι και την τελευταία φάση της στατιστικής επεξεργασίας των αποτελεσμάτων και της συγγραφής της μελέτης, είχα στο πλευρό μου ανθρώπους που είχαν τη γνώση, τη διάθεση και την υπομονή να βοηθήσουν, σε όποιο σημείο οι περιστάσεις το απαιτούσαν.

Ευχαριστώ θερμά τον υπεύθυνο καθηγητή μου, κ.Δεδούση Γεώργιο, Λέκτορα Μοριακής Βιολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής για την καθοδήγηση και τη βοήθειά του σε όλα τα στάδια της μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά τον κ.Κάβουρα Σταύρο, Λέκτορα Εργοφυσιολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, στο Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, γιατί χωρίς αυτόν ο κόσμος της επιστήμης για μένα θα ήταν γεμάτος αναπάντητες απορίες...Ήταν πάντα πρόθυμος να ψάξει, να μοιραστεί και να συμβάλλει σε όλα...

Ευχαριστώ θερμά τον κ.Γιαννακούρη Νικόλαο, Λέκτορα Φυσιολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, στο Τμήμα Επιστήμης Οικιακής Οικονομίας και Οικολογίας, για τη συμβολή του στη συλλογή των δειγμάτων και στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Δε γνωρίζω πραγματικά πόσες ευχαριστίες αρμόζουν σε δύο κυρίες του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, την κ. Λουίζου Ειρήνη και την κ. Κουμαριανού Δέσποινα Βιολόγους και M.Sc Human genetics. Δεν μπορώ πραγματικά να θυμηθώ έστω και μία μέρα που να δούλεψα, δίχως την ανεκτίμητη βοήθεια και συμβολή τους από τα πιο απλά μέχρι και τα πιο σύνθετα θέματα. Νιώθω πως αυτή η μελέτη ανήκει εξίσου και σε εκείνες όσο και σε μένα...Μαζί κοπιάσαμε, μαζί δουλέψαμε και μαζί ολοκληρώσαμε αυτήν την προσπάθεια...Κορίτσια ευχαριστώ θερμά!!

Είναι πολύ σπουδαίο να κάνεις κάτι που αγαπάς...είναι σπουδαιότερο όμως να το κάνεις μαζί με ανθρώπους που πιστεύουν σε σένα και σε στηρίζουν τόσο γι' αυτό που είσαι όσο και γι' αυτό που μπορείς να γίνεις...Στόχος μου είναι η κάθε μου επιλογή να δικαιώνει και μένα και εκείνους...Δήμητρα σε Ευχαριστώ!!

1.1 Περίληψη - Abstract

Background: Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional cytokine produced by many different cell types, including myocytes, mediating inflammatory as well as stress-induced responses. Its plasma levels increase dramatically in response to intensive exercise. A common polymorphism in the 5' flanking region of the IL-6 gene (-174G/C), associated with differences in IL-6 transcription rate, has been recently described. Subjects carrying one or two G alleles exhibit higher plasma levels of IL-6 compared with those with the CC genotype. Objective: To determine the distribution of the IL-6 -174G/C promoter polymorphism among a group of ultra-endurance runners and examine its relationship with performance. Subjects and Methods: IL-6 genotypes were determined in 148 male runners (102 of Caucasian origin, mean age 44.8 ± 8.1 yr, and 46 of Asian origin, mean age 43.5 ± 10.3 yr) who participated in the SPARTATHLON, a 246km race that takes place yearly in Greece. Genotyping was performed by PCR-RFLP analysis. Results: In the Caucasian group, the distribution of the IL-6 genotypes was: 28.4%GG, 55.9%GC, 15.7%CC (C allele frequency: 0.44). A significantly lower C allele frequency was found in the Asian group (C allele frequency: 0.03; $p < 0.0001$), where 43 out of the 46 runners were carriers of the GG genotype (93.5%) and none homozygous for the C allele. G and C allele frequencies in the two racial groups of ultra-endurance runners were not found to differ from those reported in the literature for the general population in various ethnic groups of Caucasian and Asian origin, respectively. Seventy-six of the runners (51.4% of all) managed to complete the 264km distance within the 36-hrs time limit (47 Caucasians; 29 Asians). The prevalence of the G allele was found to be significantly higher among finishers compared to non-finishers in the

group of Caucasian runners (0.65 vs. 0.49, $p=0.02$), as well as in the overall group (0.78 vs. 0.60, $p=0.001$). Conclusion: The presence of the G allele of the IL-6 -174G/C polymorphism may be related with a better performance in ultra-endurance type events. Whether this is related to higher plasma levels of exercise-induced IL-6, associated with the G allele, remains to be elucidated.

1.2 Γενικά

Ίσως να χρειαστούν πολλά ακόμα άρθρα και εκτεταμένες εργαστηριακές έρευνες έτσι ώστε να είναι σε θέση η επιστημονική κοινότητα που μελετά το συγκεκριμένο πεδίο, να καταλήξει ξεκάθαρα και αποσαφηνισμένα για το πώς και με ποιό συγκεκριμένο τρόπο η γενετική επηρεάζει την άσκηση στα διάφορα επίπεδα έκφρασής της. Μία από τις πιο βασικές και θεμελιώδεις αρχές της γενετικής επιστήμης είναι εκείνη που υπογραμμίζει πως η εκδήλωση ενός οποιουδήποτε χαρακτηριστικού-φαινοτύπου, είναι η συνισταμένη δύο καταλυτικών παραγόντων : του γενετικού υποστρώματος (γονοτύπου) και των εξωτερικών-περιβαλλοντικών επιρροών.

Με τον όρο φαινότυπο, αναφερόμαστε στην ορατή εκδήλωση-έκφραση ενός συγκεκριμένου χαρακτηριστικού. Πιο συγκεκριμένα για την περίπτωση της άσκησης, ο φαινότυπος αφορά στην επίδοση σε κάποιο συγκεκριμένο άθλημα, στην αντοχή, στην αερόβια ή στην αναερόβια ικανότητά των αθλητών καθώς και στην ευρύτερη φυσική κατάσταση τους. Με τον όρο γονότυπο , αναφερόμαστε στο γενετικό υπόβαθρο των αθλητών, δηλαδή στο σύνολο των γονιδιακών καταβολών που απαρτίζουν το γενετικό τους υλικό, κληρονομούνται ανάμεσα στις γενιές και συμβάλλουν σε μικρό ή μεγάλο ποσοστό στην εκδήλωση ενός συγκεκριμένου χαρακτηριστικού-φαινοτύπου. Οι κυριότερες εξωτερικές-περιβαλλοντικές επιρροές που σε συνδυασμό με το γενετικό υλικό επηρεάζουν την απόδοση, την επίδοση και την ευρύτερη φυσική κατάσταση των αθλητών, είναι η διάρκεια, το είδος και η ένταση της προπόνησης, η διατροφική πρόσληψη των αθλητών τόσο σε επίπεδο θερμίδων όσο και σε επίπεδο συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών καθώς και η αποχή από τις επιβλαβείς καταχρήσεις, όπως είναι το

κάπνισμα ,η αλόγιστη κατανάλωση αλκοόλ , η έλλειψη ξεκούρασης, η ελλιπής συμπλήρωση των απαραίτητων ωρών ύπνου κ.τ.λ.

Κάθε άθλημα απαιτεί ένα συγκεκριμένο είδος προπονητικού προγράμματος, καθορισμένης ή μεταβαλλόμενης έντασης και διάρκειας. Το σύνολο των προπονητικών ερεθισμάτων, ανάλογα με τη φύση και την ένταση συμβάλλει σε έναν εκτεταμένο αριθμό βιολογικών προσαρμογών στον οργανισμό του αθλητή, οι κυριότερες εκ των οποίων αναφέρονται ενδεικτικά στον ακόλουθο πίνακα.

ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΣ
1. πνευμονική λειτουργία: πνευμονική χωρητικότητα, πνευμονικός αερισμός, ανταλλαγή αερίων στις κυψελίδες των πνευμονικών τριχοειδών
2. καρδιαγγειακή λειτουργία: καρδιακή παροχή, καρδιακή συχνότητα και μέση αρτηριακή πίεση (συστολική και διαστολική)
3. ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου στους ενεργούς μύες, μέσω της αιμοσφαιρίνης
4. ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου στο εσωτερικό των μυικών κυττάρων μέσω της μυοσφαιρίνης
5. αριθμός τριχοειδών που αιματώνουν τους μύες
6. αριθμός και μέγεθος μιτοχονδρίων
7. αριθμός και δραστικότητα ενζύμων αερόβιων και αναερόβιων μεταβολικών οδών
8. ενδομυικές αποθήκες γλυκογόνου, τριγλυκεριδίων και φωσφοκρεατίνης
9. ικανότητα παραγωγής και απομάκρυνσης γαλακτικού οξέος
10. ικανότητα θερμορύθμισης και εφίδρωσης
11. ικανότητα οξείδωσης συγκεκριμένων ενεργειακών υποστρωμάτων (υδατάνθρακες – λίπη – πρωτεΐνες)

Όλες αυτές οι βιολογικές προσαρμογές των αθλητών αποτελούν την οδό μέσα από την οποία, το κυριότερο περιβαλλοντικό ερέθισμα που είναι η προπόνηση, συμβάλλει στην καλύτερη δυνατή αποτύπωση του φαινοτύπου, δηλαδή στην καλύτερη δυνατή αθλητική απόδοση.

Επιπλέον σε όλα τα παραπάνω μπορούμε να προσθέσουμε και τη συνεισφορά των γονιδιακών καταβολών ενός «γενετικά προικισμένου» αθλητή, όπου η έκφραση του γενετικού του υλικού οδηγεί στο σχηματισμό πρωτεϊνών που μέσα από διάφορες βιοχημικές και μεταβολικές οδούς διευκολύνουν, προάγουν και υποστηρίζουν τις παραπάνω βιολογικές προσαρμογές. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται έτσι το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα, σχετικά με τις αθλητικές επιδόσεις και αποδόσεις.

Βέβαια εδώ γεννάται ένα πολύ σημαντικό ερώτημα που σχετίζεται με το αν και κατά πόσο η σχέση επηρεασμού γονιδιακών υποστρωμάτων και άσκησης είναι αμφίδρομη. Πιο συγκεκριμένα, δεδομένου ότι δεχόμαστε πως με τον τρόπο που εξηγήσαμε η άσκηση ευνοείται από τη γονιδιακή έκφραση, μήπως θα έπρεπε να δούμε αν και με ποιο τρόπο η ίδια η άσκηση επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων; Πιθανότατα κάποιες ορμόνες που εκκρίνονται όταν ο οργανισμός βρίσκεται υπό «stress», δηλαδή όταν εκτελεί άσκηση είτε περνούν αυτούσιες τους πυρηνικούς υποδοχείς είτε δεσμευόμενες σε υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης κινητοποιούν ένα δεύτερο «σήμα», το οποίο με τη σειρά του περνάει τους πυρηνικούς υποδοχείς και επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση.

Αν θέλαμε να γίνουμε ακόμα πιο συγκεκριμένοι, θα μπορούσαμε να αναφέρουμε μια σειρά από έρευνες και μελέτες στο πεδίο της γενετικής επιστήμης, οι οποίες έχουν καταλήξει στη σάρωση του γενετικού υλικού σχετικά με τον εντοπισμό συγκεκριμένων χρωμοσωμάτων και γονιδιακών περιοχών που ελέγχουν τη μέγιστη αερόβια ικανότητα καθώς και την ανταπόκρισή της σε ένα προπονητικό

πρόγραμμα. Η μέγιστη αερόβια ικανότητα είναι προφανές πως αποτελεί έναν από τους πλέον σημαντικούς φαινοτυπικούς δείκτες, που σχετίζονται τόσο με την αντοχή όσο και με την απόδοση, ιδιαίτερα σε αθλήματα μεγάλων αποστάσεων, όπως είναι ο μαραθώνιος, αλλά και σε άλλα τα οποία δεν ολοκληρώνονται σε λίγα δευτερόλεπτα, με αποτέλεσμα να χρησιμοποιούν αερόβιες οδούς για την παραγωγή ενέργειας. Έτσι λοιπόν, έχει βρεθεί πως στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα 4, 8, 11, 14 υπάρχουν συγκεκριμένες γονιδιακές περιοχές που ελέγχουν τη μέγιστη τιμή της μέγιστης αερόβιας ικανότητας σε κατάσταση ηρεμίας, χωρίς την παρεμβολή δηλαδή προπονητικού ερεθίσματος. Αντίστοιχα στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα 1, 2, 4, 6, 11 υπάρχουν γονιδιακές περιοχές που ελέγχουν το βαθμό αύξησης της μέγιστης αερόβιας ικανότητας, ως απόκριση σε κάποιο συγκεκριμένο προπονητικό ερέθισμα. Πιο απλά, δύο μαραθωνοδρόμοι ή δύο αθλητές μεγάλων αποστάσεων που έχουν ακολουθήσει το ίδιο προπονητικό πρόγραμμα, δε σημειώνουν την ίδια επίδοση, λόγω διαφορετικού γονιδιακού υποστρώματος και κατά συνέπεια διαφορετικής απόκρισης στο προπονητικό ερέθισμα.

Σε ό,τι αφορά στην έως τώρα βιβλιογραφική προσέγγιση της μελέτης της αλληλεπίδρασης της γενετικής με την απόδοση της άσκησης, επικεντρώνοντας το ενδιαφέρον μας αυστηρά και μόνο στην ύπαρξη ή όχι του πολυμορφισμού -174G/C στον υποκινητή του γονιδίου της IL-6, θα διαπιστώσουμε πως τέτοια ερευνητική προσέγγιση δεν έχει πραγματοποιηθεί έως τώρα. Σαφώς και έχουν εκπονηθεί μοριακές μελέτες που επικεντρώνονται σε διάφορους πολυμορφισμούς στο γονίδιο της IL-6, όπως και στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό για τον οποίο γίνεται λόγος στην παρούσα πρόταση, όμως καμία από αυτές δε συσχετίζει την ύπαρξη του συγκεκριμένου πολυμορφισμού (-174G/C – IL-6) με την απόδοση στην άσκηση. Οι περισσότερες εξ' αυτών

επικεντρώνονται στη μελέτη του συγκεκριμένου πολυμορφισμού ή αμιγώς του μορίου της IL-6 σε σχέση με τα επίπεδα των ανδρογόνων στο αίμα, με τη συγκέντρωση IL-6 στο αίμα, καθώς και με μεταβολικές και φλεγμονώδεις οργανικές απαντήσεις σε κλινικές καταστάσεις, όχι όμως με την άσκηση αυστηρά και με την απόδοση σε αυτήν.

1.3 Σκοπός μελέτης

Έχοντας επίγνωση της σημαντικής συμβολής του γενετικού υποστρώματος στην εκδήλωση ενός συγκεκριμένου φαινοτύπου και στηριζόμενοι στην πρόοδο της επιστήμης της Μοριακής Βιολογίας , προσπαθήσαμε να δούμε αν και κατά πόσο το γενετικό υπόβαθρο των αθλητών, μπορεί να επηρεάσει την απόδοσή τους, δηλαδή πώς και με ποιον τρόπο η γενετική επηρεάζει την άσκηση στα διάφορα επίπεδα έκφρασής της. Αν και κατά πόσο συγκεκριμένες γονιδιακές περιοχές, που κωδικοποιούν την έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνικών μορίων, που με τη σειρά τους συμμετέχουν σε μια σειρά βιοχημικών πορειών, μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση των αθλητών είτε διευκολύνοντας, προάγοντας και υποστηρίζοντας τις βιολογικές τους προσαρμογές είτε εμποδίζοντας, καταστέλλοντας και δυσχεραίνοντας την προσπάθεια παραγωγής έργου.

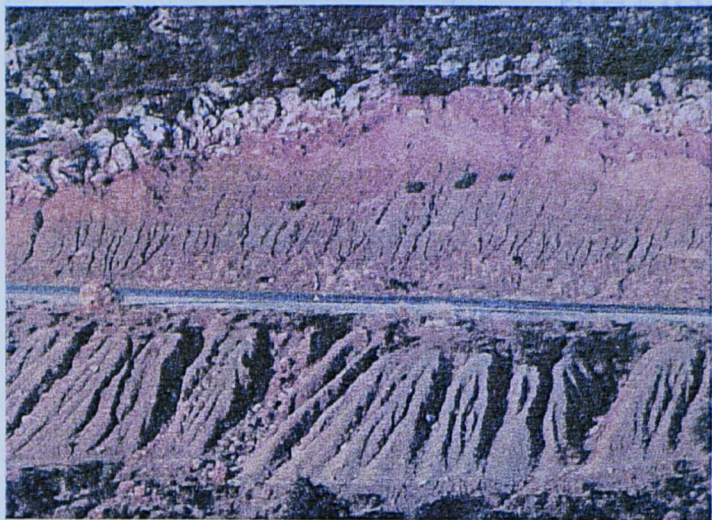
Δεδομένου πως μελετώνται αθλητές που αγωνίζονται στο Σπάρταθλο, δηλαδή μαραθωνοδρόμοι που καταβάλουν εντατική και παρατεταμένη προσπάθεια, θεωρείται λογικό και αναμενόμενο αυτοί οι αθλητές να παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα οξειδωτικού stress και ραβδομυόλυσης. Το οξειδωτικό stress συνεπάγεται τη δημιουργία ελεύθερων ριζών ως παραπροϊόντων του μεταβολισμού των

υποστρωμάτων με σκοπό την παραγωγή ενέργειας για την επιτέλεση της συγκεκριμένης προσπάθειας. Η ραβδομύλωση είναι αποτέλεσμα του αναπόφευκτου και εκτεταμένου μυικού τραυματισμού λόγω της υπερεντατικής προσπάθειας. Αποτέλεσμα του οξειδωτικού stress και της ραβδομύλωσης είναι η ανάπτυξη φλεγμονής στον οργανισμό των αθλητών, η οποία πιθανόν να επηρεάζει με κάποιο τρόπο την απόδοσή τους.

Ένας από τους σημαντικότερους δείκτες φλεγμονής στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η IL-6. Δεδομένου ότι ήταν πρακτικά ανέφικτο να μετρηθούν τα επίπεδα των συγκεκριμένων κυτοκινών στο αίμα των αθλητών, έγινε προσπάθεια εντοπισμού των γονοτυπικών ταυτοτήτων τους, μελετώντας το συγκεκριμένο γονίδιο που ευθύνεται για την έκφραση της IL-6, υπό την επίδραση του οξειδωτικού και του τραυματικού stress, στα οποία υπόκεινται οι συγκεκριμένοι αθλητές. Πιο συγκεκριμένα ερευνήθηκε η πιθανή συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού 174G/C στο γονίδιο της IL-6 και της απόδοσης των αθλητών στο συγκεκριμένο αγώνισμα. Δηλαδή εάν οι γενετικές καταβολές σχετικά με την αυξημένη ή μειωμένη γονιδιακή έκφραση της IL-6, μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση. Βιβλιογραφικά αναφέρεται πως άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο γονίδιο G, ομόζυγα GG ή ετερόζυγα GC, φέρουν αυξημένα επίπεδα IL-6 στο αίμα, συγκριτικά με άτομα CC.

1.4 Σπάρταθλον : Ιστορική αναδρομή

Όταν την άνοιξη του 490 π.Χ ο στόλος των Περσών ξεκίνησε με σκοπό την υποδούλωση της Αθήνας, ο κίνδυνος που διέτρεχε ο Ελληνισμός ήταν πολύ μεγάλος. Οι Αθηναίοι, υπό την ηγεσία του Μιλτιάδη, συγκεντρώνουν για λόγους στρατηγικής τις ολιγάριθμες δυνάμεις τους στο Μαραθώνα. Έχουν όμως επιτακτική ανάγκη για βοήθεια και για το λόγο αυτό στέλνουν στη Σπάρτη τον ημεροδρόμο τους Φειδιππίδη για να ζητήσει βοήθεια. Ο Ηρόδοτος αναφέρεται στο κατόρθωμα του Αθηναίου ημεροδρόμου, ο οποίος ξεκινώντας από την Αθήνα ακολούθησε την Αρχαία Ιερά Οδό μέχρι την Ελευσίνα, στη συνέχεια τη Σκυρώνεια Οδό, μια στρατιωτική οδό στις πλαγιές των Γερανίων Όρων και έφθασε στα Ίσθμια, τα Εξαμήλια και την Αρχαία Κόρινθο. Από κει, πέρασε την Αρχαία Νεμέα και αποφεύγοντας την επικράτεια του Άργους που δεν είχε συμμαχία με την Αθήνα, προχώρησε προς τον ορεινό όγκο μεταξύ Αργολίδας και Αρκαδίας. Έπειτα αναρρίχθηκε στο Παρθένιο Όρος, όπου συνάντησε το θεό Πάνα. Κατεβαίνοντας το βουνό, κατευθύνθηκε στην Τεγέα και στη συνέχεια νοτιότερα στη Σπάρτη. Σύμφωνα με τη μαρτυρία του Ηρόδοτου, ο Φειδιππίδης έφτασε στη Σπάρτη την επομένη της αναχώρησής του από την Αθήνα, διατρέχοντας συνολικά 246 χιλιόμετρα.



Εικόνα 1: Σημείο της διαδρομής του Σπάρταθλου

Δυόμισι χιλιάδες χρόνια αργότερα ένας Βρετανός πτέρarquος της RAF, ο John Foden, μελετητής της Αρχαίας Ελληνικής Ιστορίας και δρομέας μεγάλων αποστάσεων, διερωτάται αν το κατόρθωμα του Φειδιππίδη είναι εφικτό. Το φθινόπωρο του 1982, ο John Foden φτάνει στην Αθήνα με τέσσερις συναδέλφους του, επίσης δρομείς, και καταστρώνουν την πλησιέστερη προς τις μαρτυρίες του Ηρόδοτου διαδρομή, και στις 8 Οκτωβρίου ρίχνονται στην περιπέτεια για να διαπιστώσουν αν το όραμά τους, μπορεί να γίνει πράξη. Στις 9 Οκτωβρίου ο John Foden φτάνει μπροστά στο άγαλμα του Λεωνίδα, μετά από 36 ώρες, ενώ ο συνάδελφος του John Scholten, έχει φτάσει μισή ώρα νωρίτερα και τέλος ο John Macarth τερματίζει σε χρόνο λιγότερο από 40 ώρες. Η επιτυχία της προσπάθειας των Βρετανών δρομέων γίνεται ευρύτερα και χάρη στη βοήθεια Ελλήνων και ξένων υποστηρικτών της, παίρνει τον επόμενο χρόνο μορφή οργανωμένου αγώνα. Ο αγώνας ονομάζεται *Σπάρταθλον*. Το πρώτο διεθνές Σπάρταθλον διεξάγεται με απόλυτη επιτυχία το φθινόπωρο του 1983, με συμμετοχή 45 δρομέων από έντεκα χώρες και από την Ελλάδα. Στις 6 Ιουνίου του 1984 ιδρύεται ο Διεθνής Σύνδεσμος Σπάρταθλον, ένας μη κερδοσκοπικός, πολιτιστικός και αθλητικός

σύλλογος με κύριο σκοπό τη διοργάνωση του ετήσιου αγώνα υπεραποστάσεως και με γενικότερο στόχο την ενθάρρυνση της οργάνωσης αγώνων υπεραποστάσεων στην Ελλάδα.

1.5 Το Σπάρταθλον σήμερα

Μετά την πρώτη επιτυχή οργάνωση του Σπάρταθλου το 1983, ο αγώνας διοργανώνεται σε ετήσια βάση, στα τέλη κάθε Σεπτεμβρίου, γιατί τότε τοποθετεί χρονικά ο Ηρόδοτος την αποστολή του Φειδιππίδη στη Σπάρτη. Η μοναδικότητα του αγωνίσματος και η τραχύτητα της διαδρομής διεγείρουν τη φαντασία σε πλήθος δρομέων υπεραποστάσεων σε όλο τον κόσμο από την Αυστραλία και την Ιαπωνία, μέχρι τον Καναδά και τις ΗΠΑ, συμπεριλαμβανομένων φυσικά και των χωρών της Ευρώπης, αναδεικνύοντας το Σπάρταθλο σε κορυφαίο αθλητικό αλλά και πολιτιστικό γεγονός σε ολόκληρο τον κόσμο.

Θα πρέπει να αναφερθεί πως η διαδρομή που χάραξε ο John Foden και οι συνεργάτες του βασισμένοι στις μαρτυρίες του Ηρόδοτου και σε γνωστά ιστορικά γεγονότα της εποχής εκείνης, είναι ίσως η πλησιέστερη προς εκείνη που είχε ακολουθήσει ο Φειδιππίδης, και το Σπάρταθλο η εγκυρότερη αναπαράσταση της διαδρομής αυτής.

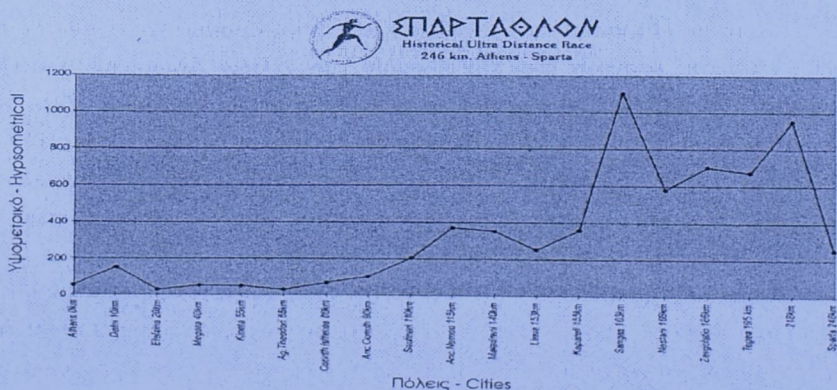


Εικόνα 2: Η διαδρομή του Σπάρταθλου

Ο αγώνας ξεκινάει από τα Προπύλαια της Ακρόπολης στην Αθήνα, στις 7:00 το πρωί της τελευταίας Παρασκευής κάθε Σεπτέμβρη. Οι δρομείς ακολουθούν την οδό Αποστόλου Παύλου, περνούν από την πλατεία των Αγίων Ασωμάτων και φθάνουν στο ύψος της Ιεράς Οδού, την οποία ακολουθούν μέχρι το Δαφνί. Στη συνέχεια διασχίζουν την Εθνική Οδό Αθηνών-Κορίνθου προς την Ελευσίνα, από όπου μέσα από την κεντρική οδό της πόλης και στη συνέχεια ακολουθώντας την παλαιά οδό Αθηνών-Κορίνθου φθάνουν στη γέφυρα του Ισθμού της Κορίνθου. Περίπου δυόμισι χιλιόμετρα μετά τη γέφυρα στρίβουν αριστερά, περνούν τα Εξαμίλια, διασταυρώνονται με την Εθνική Οδό Κορίνθου-Τριπόλεως και κατευθύνονται προς την Αρχαία Κόρινθο. Συνεχίζουν σε δρόμους αγροτικούς με κακή βατότητα μέσα στον κορινθιακό κάμπο και αφού διέρθουν από τον Άσσο, το Ζευγολατιό, την Αρχαία Νεμέα, το Μαλαντρένι, τη Στέρνα και τα Λύρκεια αντικρίζουν το Παρθένιο Όρος (1200 μέτρα υψόμετρο). Αφού περάσουν το καπαρέλι, φτάνουν στη βάση του βουνού και προχωρούν προς την κορυφή, πάνω σε μια πλαγιά γεμάτη βράχια και θάμνους, η οποία δε φωταγωγείται, κατά τη διάρκεια

της νύχτας. Το σημείο αυτό της διαδρομής γίνεται με τη βοήθεια ενός φακού, ειδικής σηματοδότησης και φυσικά κάποιας ανθρώπινης παρουσίας. Όταν οι δρομείς περάσουν την κορυφή προχωρούν προς το χωριό Σάγκας, το πρώτο χωριό της Αρκαδίας και στη συνέχεια προς τη Νεστάνη, το Ζευγολατιό, την ιστορική Τεγέα και τα χωριά Καμάρι και Μανθουραία. Από εκεί τους περιμένει ανάβαση 30 χιλιομέτρων στον Πάρνωννα (900 μέτρα υψόμετρο), σε δρόμο ασφαλτοστρωμένο με πολλές στροφές και τοπίο τελείως ερημικό. Στα 20 χιλιόμετρα πριν τη Σπάρτη, αρχίζει ο κατήφορος μέσα από την κοιλάδα του Ευρώτα, από όπου οι δρομείς μπορούν πλέον να αντικρίσουν το όνειρο, είτε φωτισμένο αν είναι ακόμα νύχτα, είτε λουσμένο στο φως της μέρας, για αυτούς που ακολουθούν. Αφού περάσουν από το χωριό Βουτιάνοι, τον Κλαδά και τη γέφυρα του Ευρώτα εισέρχονται μέσα στην ιστορική πρωτεύουσα της Λακωνίας. Είναι σαφές πως μια τέτοια διαδρομή είναι ίσως η δυσκολότερη στον κόσμο, αφού χαρακτηρίζεται από μεγάλες υψομετρικές διακυμάνσεις, αλλά και δρόμους δύσβατους με πέτρες και λάσπες ή μονοπάτια ανάμεσα σε βράχια και θάμνους, ενώ οι θερμοκρασιακές διαφορές κυμαίνονται από 32-38 βαθμούς Κελσίου κατά τη διάρκεια της ημέρας, με πτώση τη νύχτα στις ορεινές περιοχές και δυνατούς ανέμους.

Σχήμα 1.1: Υψομετρικές διαφοροποιήσεις της διαδρομής του Σπάρταθλον



Θα πρέπει να σημειωθεί πως ένα αγώνισμα αυτών των διαστάσεων απαιτεί μια προετοιμασία η οποία δεν απέχει καθόλου από εκείνη ενός στρατιωτικού εγχειρήματος, απαιτώντας πολυάριθμο έμπυχο υλικό, οχήματα, εφόδια, αλλά και άγρυπνη παρακολούθηση των αθλητών για την πλήρη ασφάλειά τους και για την αντιμετώπιση οποιουδήποτε περιστατικού. Συνολικά στήνονται 75 σταθμοί ανεφοδιασμού κατά μήκος της διαδρομής, οι οποίοι απέχουν μεταξύ τους μικρές σχετικά αποστάσεις (1.5-5.6 χιλιόμετρα) και σε αυτούς παρέχονται νερό, υγρά αλλά και στερεά τρόφιμα. Επιπλέον, υπάρχουν προκαθορισμένοι σταθμοί στους οποίους οι δρομείς μπορούν να δεχτούν ιατρική βοήθεια. Επιπρόσθετα, οι κανονισμοί του αγώνα εξασφαλίζουν τη συμμετοχή δρομέων άριστης φυσικής κατάστασης, έτσι όπως αποδεικνύεται και από τους χρόνους τερματισμού των πρώτων καθ' όλη την ιστορία του αγώνα (Πίνακας 1.2). Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί πως ο αγώνας υπόκειται σε χρονικούς περιορισμούς, καθώς οι δρομείς είναι υποχρεωμένοι να έχουν διέρθει από τους σταθμούς εφοδιασμούμέσα σε συγκεκριμένα χρονικά πλαίσια, ενώ θα πρέπει να ολοκληρώσουν το σύνολο της διαδρομής μέσα σε 36 ώρες.

Πίνακας 1.2: Οι πρώτοι που τερμάτισαν τον αγώνα καθ' όλη τη διάρκεια της ιστορίας του και οι αντίστοιχοι χρόνοι τερματισμού².

Έτος	Χρόνος	Όνομα	Προέλευση
1983	21:53	Γιάννης Κούρος	Ελλάδα
1984	20:25	Γιάννης Κούρος	Ελλάδα
1985	23:18	Patrick Macke	Αγγλία
1986	21:57	Γιάννης Κούρος	Ελλάδα
1987	24:41	Rune Larsson	Σουηδία
1988	24:42	Rune Larsson	Σουηδία
1989	24:32	Patrick Macke	Αγγλία
1990	20:29	Γιάννης Κούρος	Ελλάδα
1991	24:15	Janos Bogar	Ουγγαρία
1992	24:08	Rusco Kantief	Βουλγαρία
1993	26:57	Rune Larsson	Σουηδία
1994	26:15	James Zarei	Αγγλία
1995	25:59	James Zarei	Αγγλία
1996	26:21	Ronald Vuilleminot	Γαλλία
1997	23:37	Κώστας Ρέππος	Ελλάδα
1998	25:11	Κώστας Ρέππος	Ελλάδα
1999	25:38	Jens Lukac M	Γερμανία

Αυτό είναι το Σπάρταθλον, ένας μυθικός αγώνας υπε-αντοχής, ένα βίωμα, μια εμπειρία προσωπική στηριγμένη στα πλαίσια του *ευ αγωνίζεσθαι*, μια πρόκληση που φέρνει τον άνθρωπο στα όρια των σωματικών δυνατοτήτων του, αλλά και του ψυχικού του σθένους. Πρόκειται για μια υπεράνθρωπη προσπάθεια που έχει ως ανταμοιβή ένα στεφάνι ελιάς και λίγο νερό από τα χέρια μιας νεαρής Σπαρτιάτισσας για όσους κατορθώσουν να φθάσουν μπροστά στο άγαλμα του Λεωνίδα. Πρόκειται για μια ιδέα βασισμένη στις αξίες και τα ιδανικά του Ολυμπιακού Πνεύματος, αποστρεφόμενη κάθε σύγχρονη τάση για εμπορευματοποίηση του αθλητικού ιδεώδους.



Εικόνα 3: Σημείο της διαδρομής του Σπάρταθλου

2.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Ιντερλευκίνη-6 (IL-6)

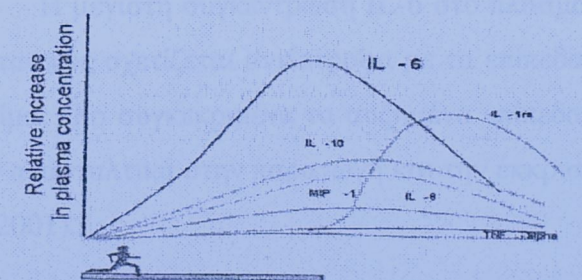
Η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) αποτελεί μια πλειοτροπική κυττοκίνη 22-28kD, που συντίθεται ως πρόδρομος πρωτεΐνη αποτελούμενη από 212 αμινοξέα, σε πολλά διαφορετικά κύτταρα. Οι κύριες πηγές παραγωγής IL-6 *in vivo* είναι τα διεγερμένα μονοκύτταρα-μακροφάγα, οι ινοβλάστες και τα σπλαχνικά ενδοθηλιακά κύτταρα (Akira et al, 1993), υποδηλώνοντας το ρόλο της στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Άλλα κύτταρα γνωστά για τη σύνθεση και την παραγωγή IL-6, είναι οι κερατινοκύτταρα, οι οστεοβλάστες, τα Τ-λεμφοκύτταρα, τα Β-λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα επιθηλιακά κύτταρα, τα λεία μυϊκά κύτταρα και τα σκελετικά μυϊκά κύτταρα (Nagaragu et al, 1998). Οι πιο γνωστοί ενεργοποιητές για την παραγωγή της IL-6, είναι ο TNF-α και η IL-1.

Μέχρι πρόσφατα η IL-6 θεωρούνταν κατά βάση ως μία κυτοκίνη με ανοσορυθμιστικές μόνο επιδράσεις και τα ανοσοποιητικά κύτταρα κατά συνέπεια ως η κυριότερη πηγή παραγωγής IL-6. Όμως τελευταίες έρευνες δείχνουν μια δραματική αύξηση στα επίπεδα συγκέντρωσης της IL-6 του πλάσματος ως και 100 φορές, σαν απόκριση στο ερέθισμα της άσκησης (Febbraio and Pedersen 2002). Η άσκηση επιπλέον φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα συγκέντρωσης στο αίμα και άλλων αντιφλεγμονώδων κυτοκινών, καθώς και κάποιων αναστολέων τους, όπως είναι ο ανταγωνιστής του υποδοχέα της IL-1(-ra), ο υποδοχέας του TNF-α (TNF-α-R) και η αντιφλεγμονώδης κυτοκίνη IL-10 (Ostrowski et al, 1999). Επιπρόσθετα τα επίπεδα της IL-8 και των μακροφαγικών αντιφλεγμονώδων πρωτεϊνών MIP-1a και MIP-1b αυξάνονται σε σημαντικό επίπεδο μετά από έντονη άσκηση (Ostrowski et al, 2001). Οι

περισσότερες έρευνες έχουν αναφέρει πως η άσκηση δεν αυξάνει τα επίπεδα του TNF-α στο πλάσμα, παρότι μερικές μελέτες έδειξαν πως η επίπονη και παρατεταμένη άσκηση, όπως ο μαραθώνιος, προκαλεί μια μικρή αύξηση στη συγκέντρωση του TNF-α στο πλάσμα (Starkie et al 2001; Suzuki et al, 2000 ; Toft et al, 2000). Συμπερασματικά λοιπόν, η άσκηση προάγει μια ισχυρή αντιφλεγμονώδη απάντηση κυτοκινών, με πιο αξιοσημείωτη την παρουσία της IL-6 στο πλάσμα, αποτελώντας πρόδρομη ουσία για την παρουσία και των άλλων κυτοκινών στην κυκλοφορία.

2.2 Η IL-6 ως απάντηση στην άσκηση

Το εύρημα των αυξημένων επιπέδων IL-6 στην κυκλοφορία του αίματος μετά από άσκηση αποτελεί μια διαρκή, αξιοσημείωτη και επαναλαμβανόμενη διαπίστωση, η οποία επιβεβαιώνεται από μία σειρά ερευνών (Castell et al 1997; Drenth et al, 1995; Hellsten et al, 1997; Nielsen et al, 1996; Northoff et al, 1994).



Σχήμα 1.3: Σχετική αύξηση της συγκέντρωσης διαφόρων κυτοκινών στο πλάσμα κατά τη διάρκεια αγώνα δρόμου (Febbraio and Pedersen, 2002)

Τα στοιχεία από τον μαραθώνιο της Κομπεγχάγης (1996,1997,1998) όπου συμμετείχαν 56 αθλητές, έδειξαν πως υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση ανάμεσα στην ένταση της άσκησης και στη αύξηση της συγκέντρωσης της IL-6 στο πλάσμα

(Ostrowski et al, 2001). Παρότι μια πρόσφατη έρευνα έδειξε πως η εμφάνιση της IL-6 στο αίμα σχετίζεται με τη μυική καταστροφή κατά τη διάρκεια της άσκησης (Bruunsgaard et al, 1997), πιο πρόσφατες ακόμη μελέτες δείχνουν πως η μυική συστολή και όχι μυική καταστροφή, είναι ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας αύξησης των επιπέδων της IL-6 στην κυκλοφορία (Croisier et al, 1999; Ostrowski et al, 1999; Toft et al, 2002). Εκτός από την ένταση, τη διάρκεια και το είδος της άσκησης, η αύξηση των επιπέδων IL-6 στο αίμα λόγω άσκησης πιθανότατα να σχετίζεται και με την απάντηση του συμπαθητικο-αδρενεργικού συστήματος (Nehlsen-Canarella et al, 1997; Rhind et al, 2001). Μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ζώα έδειξε πως η αύξηση στην έκκριση της αδρεναλίνης υπό συνθήκες stress, όπως είναι η άσκηση, ευθύνεται για την αντίστοιχη αύξηση της IL-6 (DeRijk et al, 1994). Υπάρχουν όμως και έρευνες που υποστηρίζουν πως η αδρεναλίνη παίζει πολύ μικρό ρόλο στην αύξηση των επιπέδων της IL-6 κατά την άσκηση (Steensberg et al, 2001).

Η μέγιστη συγκέντρωση IL-6 στο πλάσμα κατά την άσκηση φαίνεται πως σχετίζεται αντίστροφα με τα επίπεδα γαλακτικού οξέος στο αίμα. Πιο συγκεκριμένα τα αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος δρουν ανασταλτικά στην παραγωγή και την έκκριση IL-6 (Steensberg et al, 2001).

2.3 IL-6 κατά την άσκηση : Ποια κύτταρα την παράγουν;

Στηριζόμενοι στην κοινή πεποίθηση πως η αύξηση των επιπέδων της IL-6 στο αίμα κατά την άσκηση είναι αποτέλεσμα ανοσοποιητικής απάντησης, υποθέτουμε πως τα κύτταρα του αμυντικού συστήματος είναι τα υπεύθυνα κύτταρα για την αύξηση αυτή (Nehlsen-Canarella et al, 1997). Μια σειρά ερευνών όμως (Moldoveanu et al, 2000; Ullum et al, 1994) έδειξε πως το m-RNA της IL-6 στα μονοκύτταρα, τα μονοπύρηνια δηλαδή κύτταρα του αίματος που ευθύνονται για την αύξηση των επιπέδων της IL-6 στο αίμα κατά τη σήψη (Pedersen and Hoffman-Goetz 2000), δεν αυξάνεται ως αποτέλεσμα της άσκησης. Προσδιορισμοί της ενδοκυτταρικής παραγωγής κυτοκινών απέδειξαν πως ο αριθμός και το ποσοστό (μέσες τιμές) των μονοκυττάρων είτε δεν αλλάζουν κατά τη διάρκεια ποδηλασίας (Starkie et al, 2000) είτε μειώνονται κατά τη διάρκεια παρατεταμένου αγώνα δρόμου (Starkie 2001). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως το ήπαρ κατά τη διάρκεια της άσκησης δεν ευθύνεται τόσο για την παραγωγή και την απελευθέρωση IL-6 όσο για την εκκαθάρισή της. Δηλαδή ούτε τα ηπατικά κύτταρα αποτελούν τα βασικά κύτταρα παραγωγής IL-6 κατά την άσκηση (Febbraio et al, 2002).

Επομένως το ερώτημα που παραμένει είναι ποια ακριβώς κύτταρα του οργανισμού ευθύνονται για την παραγωγή IL-6 κατά την άσκηση, δεδομένου ότι ούτε τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, ούτε τα ηπατικά κύτταρα μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνα. Η απάντηση στο ερώτημα αυτό βρίσκεται στα μυικά κύτταρα, τα οποία αποτελούν τη βασική πηγή παραγωγής και απελευθέρωσης IL-6 στο πλάσμα κατά την άσκηση. Η αυξημένη παραγωγή και απελευθέρωση IL-6 από τα μυικά κύτταρα είναι απόρροια μηχανισμών που άπτονται της μυικής συσταλτικότητας και όχι της μυικής ζημιάς ή της συμπαθητικό-αδρενεργικής διέγερσης (Starkie et al, 2001; Steensberg et al, 2001).

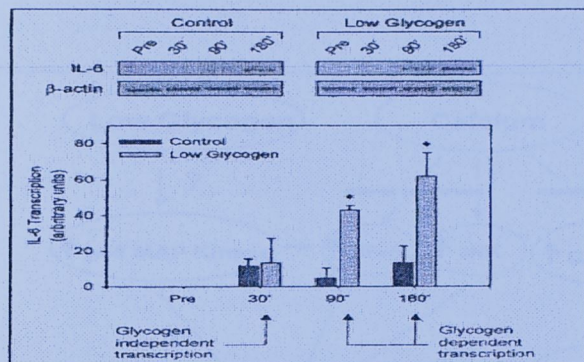
Παρόλο που στα μυικά κύτταρα διεγείρεται η μεταγραφική δραστηριότητα του m-RNA της IL-6, λόγω εκτεταμένης μυικής συστολής, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η παραγωγή και η απελευθέρωσή της από τον εργαζόμενο μυ, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο ποια ακριβώς είδη μυικών κυττάρων χρεώνονται ως επί το πλείστον την όλη διαδικασία. Φαίνεται πως είναι ιδιαίτερα πιθανό τα υπεύθυνα μυικά κύτταρα να είναι οι μυοβλάστες (Bartoccioni et al, 1994), χωρίς αυτό να αποκλείει τους ινοβλάστες (De Rossi et al, 2000) και τα λεία μυικά κύτταρα (Klouché et al, 1999).

Συμπερασματικά λοιπόν θεωρείται πως το μεγαλύτερο ποσοστό της παραγόμενης IL-6 κατά τη διάρκεια της άσκησης προέρχεται από τα μυικά κύτταρα και οφείλεται σε μηχανισμούς που διεγείρουν τη μεταγραφική δραστηριότητα του m-RNA της IL-6.

2.4 Υδατανθρακική φόρτιση και παραγωγή IL-6

Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει πως η υδατανθρακική πέψη και απορρόφηση μειώνει την αύξηση των επιπέδων IL-6 στο πλάσμα κατά τη διάρκεια τρεξίματος ή και ποδηλασίας (Nehlsen-Canarella et al, 1997; Nieman et al, 1998). Πιο συγκεκριμένα η υδατανθρακική φόρτιση κατά τη διάρκεια της άσκησης δε φαίνεται να επηρεάζει την αύξηση των επιπέδων του m-RNA της IL-6 στα μυικά κύτταρα, αλλά πιθανότατα με κάποιο μηχανισμό εμποδίζει την απελευθέρωσή της στο πλάσμα.

2.5 Περιεκτικότητα μυϊκού γλυκογόνου και παραγωγή IL-6

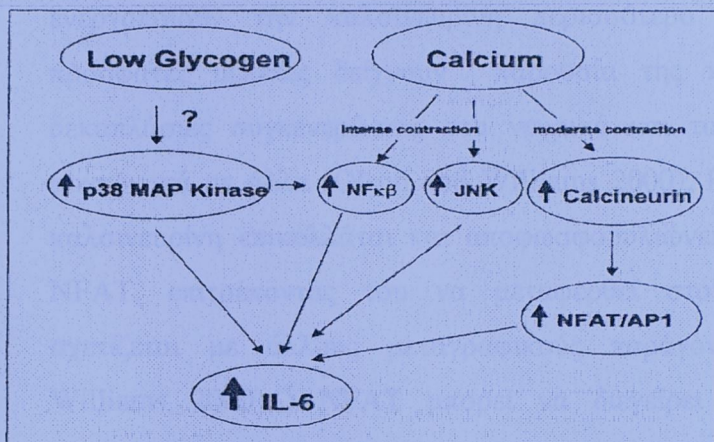


Σχήμα 1.4: Διφασική μεταγραφή της IL-6 σε απομονωμένους πυρήνες μυϊκών κυττάρων, πριν και μετά την άσκηση (Keller et al, 2001)

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε αυξημένη απάντηση IL-6 στο πλάσμα των αθλητών, όταν τα αποθέματα του γλυκογόνου ελιχαν μειωθεί αισθητά (Gleeson and Bishop 2000). Το γεγονός αυτό οδηγεί αυτόματα στην υπόθεση πως η μεταγραφή του γονιδίου της IL-6 και κατά συνέπεια η πρωτεϊνική μετάφραση και απελευθέρωση εξαρτώνται από τα χαμηλά αποθέματα μυϊκού γλυκογόνου.

Συμπεραίνουμε λοιπόν πως η περιεκτικότητα ενδομυϊκού γλυκογόνου αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την παραγωγή IL-6 κατά μήκος των μυϊκών κυττάρων. Η παρατεταμένη άσκηση ενεργοποιεί τη μεταγραφική δραστηριότητα του γονιδίου της IL-6 στο σκελετικό μυ των αθλητών, διαδικασία που αυξάνεται δραματικά σε καταστάσεις μείωσης των αποθεμάτων του μυϊκού γλυκογόνου.

2.6 Ενδοκυτταρικά σήματα-μηχανισμοί παραγωγής IL-6 στο σκελετικό μυ κατά την άσκηση

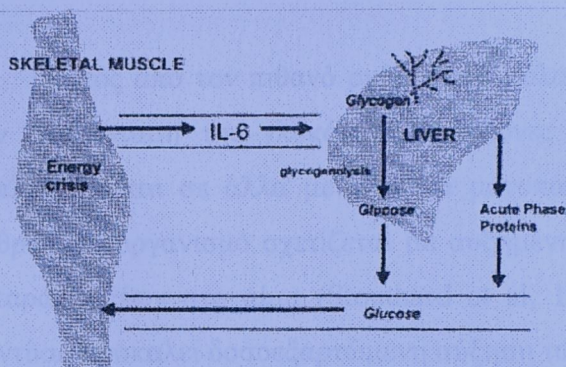


Σχήμα 1.5 : Ενδοκυτταρικά σήματα-μηχανισμοί υπεύθυνα για τη μεταγραφική παραγωγή IL-6 στα μυϊκά κύτταρα (Febbraio M. And Pedersen B. K, 2002)

Ο ρυθμός μεταγραφής του γονιδίου της IL-6 στα πρώτα 30 min της άσκησης αυξάνεται κατά 10-20 φορές, συγκρινόμενος με τις τιμές ηρεμίας. Αυτή η απότομη και θεαματική αύξηση, πιθανότατα να σχετίζεται με τα επίπεδα του κυτταροπλασματικού ασβεστίου Ca, αφού η μηχανική επιφόρτιση του μυός αποτελεί σήμα διέγερσης για την απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (Olson and Williams 2000). Είναι ευρέως γνωστό πως το Ca ελέγχει ένα ποικίλο εύρος κυτταρικών λειτουργιών, ανάμεσα στις οποίες βρίσκεται και η γονιδιακή έκφραση (Berridge et al, 1993). Κατά τη διάρκεια παρατεταμένης μυϊκής συσταλτικότητας αυξάνεται το m-RNA της IL-6 στο σκελετικό μυ (Keller et al, 2001; Ostrowski et al, 1998; Starkie et al, 2001). Η μεταγραφή του m-RNA της IL-6 πραγματοποιείται διαμέσου ενός βιοχημικού μονοπατιού, εξαρτώμενου από ένα πυρηνικό παράγοντα Ca των ενεργοποιημένων T-κυττάρων (NFAT). Ο NFAT αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα

που ενεργοποιείται σε διάφορα κύτταρα, άρα και στα μυικά, μέσω της ενεργοποίησης της καλσινευρίνης (Crabtree et al, 1999; Rao et al, 1997). Παρότι αρχικά υπήρχε η πεποίθηση πως τα ιόντα Ca ενεργοποιούν την καλσινευρίνη περισσότερο στα Τ-κύτταρα, πρόσφατες μελέτες δείχνουν παρουσία της καλσινευρίνης σε δεκαπλάσιες συγκεντρώσεις στα νευρικά και τα μυικά κύτταρα, συγκριτικά με άλλα (Olson and Williams 2000). Η ενεργοποιημένη καλσινευρίνη επικολλάται και αποφωσφορυλιώνει τον παράγοντα NFAT, επιτρέποντας του να μεταφερθεί στον πυρήνα, όπου σχετίζεται με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες (Olson and Williams 2000). Ο NFAT μπορεί να διεγείρει τη μεταγραφική παραγωγή των κυτοκινών είτε από μόνος του, είτε σε συνδυασμό με το μεταγραφικό παράγοντα ενεργοποιημένης πρωτεΐνης-1 (AP-1) ((Crabtree et al, 1999; Rao et al, 1997). Αυτός είναι και ο πιθανότερος μηχανισμός διέγερσης και αύξησης της μεταγραφικής παραγωγής της IL-6 στα μυικά κύτταρα, κατά τη διαδικασία της μυικής συστολής.

2.8 IL-6 και μεταβολισμός γλυκόζης



Σχήμα 1.7 : Ο ρόλος της IL-6 στη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης (Gleeson M, 2000)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η αύξηση των επιπέδων του mRNA της IL-6 (Steensberg et al, 2001), της μεταγραφικής δραστηριότητας (Keller et al, 2001), αλλά αλλά και της πρωτεϊνικής απελευθέρωσης από τα μυικά κύτταρα, παρατηρείται ακόμη πιο έντονα σε καταστάσεις μείωσης της διαθεσιμότητας του μυικού γλυκογόνου. Η αυξημένη πρωτεϊνική έκφραση και απελευθέρωση της IL-6 σχετίζεται με αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης από το μυ κατά τη διάρκεια της άσκησης. Δηλαδή η IL-6 την πρόσληψη της γλυκόζης από το μυ, μέσω ινσουλινοεξαρτώμενων και μη-ινσουλινοεξαρτώμενων οδών. Επιπλέον η IL-6 φαίνεται να αυξάνει την ηπατική γλυκογονόλυση και τη γλυκονεογένεση κατά τη διάρκεια της άσκησης, επιβεβαιώνοντας έτσι την πεποίθηση σχετικά νε τη συμβολή της στην ομοιόσταση του μεταβολισμού της γλυκόζης. Τέλος η IL-6 αυξάνει την εντερική απορρόφηση της γλυκόζης, αυξάνοντας έτσι και τη συγκέντρωσή της στο αίμα (Hardin et al, 2000).

2.9 IL-6 και μεταβολισμός λιπιδίων

Η IL-6 αποτελεί σημαντικό σήμα ανάμεσα στα κύρια κέντρα του μεταβολισμού και του ανοσοποιητικού συστήματος.

Εκτός από τον πιθανό ρυθμιστικό ρόλο της στο μεταβολισμό και την ομοιοστάση της γλυκόζης, οι έρευνες πιστοποιούν πως η IL-6 εμπλέκεται και σε άλλα μεταβολικά μονοπάτια. Έγχυση rh-IL-6 στον ανθρώπινο οργανισμό σχετίζεται με αυξημένη συγκέντρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων στο αίμα (Stouthard et al, 1996). Η έγχυση IL-6 στα ποντίκια προκαλεί δόσοεξαρτώμενη αύξηση των επιπέδων συγκέντρωσης των TGL και των FFA του ορού (Nonogaki et al, 1995). Η υπερτριγλυκεριδαιμία οφείλεται περισσότερο στην αυξημένη ηπατική έκκριση και λιγότερο στο μειωμένο ποσοστό εκκαθάρισης των TGL. Επομένως ένας επιπλέον μεταβολικός ρόλος της IL-6 είναι η αυξημένη λιπόλυση και η ηπατική εστεροποίηση των FFA. Συμπερασματικά λοιπόν η IL-6 αποτελεί έναν **ισχυρό λιπολυτικό παράγοντα**, που διεγείρει την ορμονοευαίσθητη λιπάση (HSL). Κατά τη διάρκεια της άσκησης, η αύξηση της συγκέντρωσης των FFA στο αρτηριακό αίμα οφείλεται σε ιδιαίτερα μεγάλο ποσοστό στη δράση της λιπολυτικής κυτοκίνης IL-6, που απελευθερώνεται από τους μύες κατά τη διάρκεια της μυϊκής συστολής.

Συμπερασματικά λοιπόν η IL-6 αποτελεί έναν ισχυρό λιπολυτικό παράγοντα. Κατά τη διάρκεια της άσκησης, η αύξηση της συγκέντρωσης των FFA στο αρτηριακό αίμα οφείλεται σε ιδιαίτερα μεγάλο ποσοστό στη δράση της λιπολυτικής κυτοκίνης IL-6, που απελευθερώνεται από τους μύες κατά τη διάρκεια της μυϊκής συστολής.

2.10 Ενδοκρινικές και άλλες δράσεις IL-6

Η IL-6 αποτελεί ενεργειακό σήμα ανάμεσα στα μυϊκά κύτταρα, καθώς και ανάμεσα στους μύες και σε άλλα όργανα και ιστούς κατά τη διάρκεια της άσκησης, με σκοπό τη διατήρηση της παροχής ενέργειας (Yudkin et al, 2000). Η IL-6 αποτελεί ενεργειακό σήμα που συμμετέχει στη ρύθμιση της ενεργειακής δαπάνης, μέσω δύο προτεινόμενων μηχανισμών: Ο πρώτος μηχανισμός αφορά στην κεντρική υποθαλαμική ρύθμιση μέσω κορτικοτροπίνης, που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεταβολικού ρυθμού ηρεμίας (Resting Metabolic Rate) και της ενεργειακής δαπάνης. Ο δεύτερος μηχανισμός αφορά στην αδρενεργική κινητοποίηση, την αύξηση της καρδιακής συχνότητας, την αύξηση των επιπέδων νορεπινεφρίνης, την κινητοποίηση του αδρενεργικού συστήματος και την αύξηση της ενεργειακής δαπάνης (Fernandez et al, 2000). Άλλες σημαντικές ενδοκρινικές δράσεις της IL-6 αφορούν στη θερμογέννεση, στη διέγερση της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης (GH) και της βαζοπρεσίνης, στην αυξημένη έκκριση μεταλοκορτικοειδών, κορτιζόλης και δέυδροεπιανδροστερόνης (Fernandez et al, 2000), καθώς και στην κινητοποίηση της σύνθεσης ανδρογόνων. Σε μια πρόσφατη μελέτη διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην ύπαρξη του πολυμορφισμού -174G/C στον υποκινητή του γονιδίου της IL-6 και στα αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων πλάσματος (Villuendas et al, 2002).

2.11 Ρυθμιστική επίδραση της IL-6 στο ανοσοποιητικό σύστημα

Η συγκέντρωση λεμφοκυττάρων στο αίμα αυξάνεται αρχικά κατά τη διάρκεια της άσκησης, όμως στη συνέχεια πέφτει σε τιμές κατώτερες από τις τιμές ηρεμίας, ιδιαίτερα σε αγωνίσματα αυξημένης έντασης και παρατεταμένης διάρκειας, όπως είναι ο μαραθώνιος (McCarthy and Dale 1988). Η βραχυπρόθεσμη επίδραση της άσκησης στα λεμφοκύτταρα ρυθμίζεται από τις κατεχολαμίνες και ιδιαίτερα από την αδρεναλίνη (Steensberg et al, 2001), ενώ η μακροπρόθεσμη επίδραση της άσκησης στη μείωση των λεμφοκυττάρων, ρυθμίζεται από την ταυτόχρονη δράση αδρεναλίνης και κορτιζόλης. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περίπτωση της παρατεταμένης άσκησης. Η αύξηση στην κορτιζόλη ρυθμίζεται από την IL-6 (Steensberg et al, 2001). Τελευταίες έρευνες υποστηρίζουν ότι η υδατανθρακική φόρτιση κατά τη διάρκεια της άσκησης αναστέλλει την επίδραση της άσκησης στον αριθμό και τη λειτουργικότητα των λεμφοκυττάρων, μέσω της δράσης της IL-6 (Nehlsen-Canarella et al, 1997).

2.12 Αντιφλεγμονώδης επίδραση της IL-6

Η IL-6 θεωρείται ευρέως ως ο συνδετικός κρίκος μεταξύ της φλεγμονής, της παχυσαρκίας, του stress και της στεφανιαίας νόσου (Yudkin et al, 2000). Παρόλα αυτά, δεδομένου ότι οι μύες κατά την άσκηση παράγουν και απελευθερώνουν IL-6 σε πολύ μεγάλες ποσότητες και γνωρίζοντας ταυτόχρονα τις ευεργετικές επιδράσεις της άσκησης στην υγεία (Pedersen et al, 2001), είναι πάρα πολύ δύσκολο να δεχθούμε πως η IL-6 αποτελεί έναν επιβαρυντικό παράγοντα για την υγεία. Είναι πολύ πιθανό περισσότερο ο TNF-a έναντι της IL-6 να ευθύνεται για τις μεταβολικές επιπλοκές του οργανισμού. Αυξημένα επίπεδα TNF-a και

IL-6 έχουν παρατηρηθεί σε ηλικιωμένα άτομα (Bruunsgaard et al, 1999), σε παχύσαρκα άτομα (Bastard et al, 2000) και σε μη-ινσουλινοεξαρτώμενους διαβητικούς (Katsouki et al, 1998). Παρότι υπάρχουν εκτετεμένες έρευνες που αποδεικνύουν ότι ο λιπώδης ιστός παράγει και απελευθερώνει ταυτόχρονα TNF-a και IL-6 (Fried et al, 1998), υπάρχουν κι άλλες οι οποίες αποδεικνύουν ότι η έκφραση του TNF-a από το λιπώδη ιστό και όχι η έκφραση της IL-6 παίζει πολύ σπουδαίο ρόλο στο μηχανισμό της ινσουλινοαντοχής (Qi and Pekala, 2000). Υπάρχουν πολλοί μηχανισμοί μέσω των οποίων ο TNF-a θα μπορούσε να προκαλέσει ινσουλινοαντοχή. Η μακροπρόθεσμη έκθεση ανθρώπινων κυττάρων λιπώδους ιστού στον TNF-a, μπορεί να προκαλέσει αξιοσημείωτη μείωση των GLUT-4 (Hauner et al, 1995), παρότι οι πιο πρόσφατες μελέτες προτείνουν πως η μείωση της έκφρασης του m-RNA των GLUT-4 από τον TNF-a ίσως να μην είναι ο υπεύθυνος παράγοντας για την ινσουλινοαντίσταση (Hotamisligil et al, 1999). Παρόλα αυτά ο TNF-a μειώνει το σήμα του υποδοχέα της ινουλίνης (Hotamisligil et al, 1994), αναστέλλει τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL) και κινητοποιεί τη λιπόλυση στα λιποκύτταρα (Patton et al, 1986). Η αυξημένη συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο πλάσμα (FFA) ίσως να συμβάλλει στην ανάπτυξη της ινσουλινοαντίστασης (Boden, 1997). Μελέτες σε μυϊκά κύτταρα ποντικών αποδεικνύουν ότι ο TNF-a αναστέλλει την πρόσληψη γλυκόζης μέσω του ινσουλινοεξαρτώμενου μηχανισμού (Begun and Ragolia, 1996). Σε υπέρβαρα ποντίκια τα οποία πάσχουν από μειωμένη κινητοποίηση της πρόσληψης γλυκόζης μέσω ινουλίνης, θεραπεία χορήγησης αντισωμάτων TNF-a προκαλεί αύξηση στην πρόσληψη γλυκόζης (Borst and Bagby, 2002), αποδεικνύοντας ότι ο TNF-a παίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στον μηχανισμό της ινσουλινοαντίστασης στα ποντίκια. Από μελέτες που έχουν γίνει σε ανθρώπινα μυϊκά κύτταρα, τα

οποία εληφθησαν από υγιείς αλλά και διαβητικούς τύπου II, αποδείχθηκε ότι ο TNF-a αναστέλλει την πρόσληψη γλυκόζης στους υγιείς, ενώ στους διαβητικούς η επίδραση αυτή είναι λιγότερο ξεκάθαρη (Saghizaden et al, 1996). Ο TNF-a επίσης αναστέλλει το ρυθμό πρόσληψης γλυκόζης από τα μυϊκά κύτταρα (Halse et al, 2001).

Ο TNF-a κινητοποιεί την παραγωγή της IL-6. Όμως πειραματικές έρευνες σε ζώα δείχνουν πως η IL-6 ίσως να αναστέλλει την παραγωγή του TNF-a (Matthys et al, 1995; Mizuhara et al, 1994). Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η φυσική δραστηριότητα και η έγχυση IL-6 σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις αναστέλλουν την παραγωγή TNF-a. Το γεγονός ότι η άσκηση προκαλεί μια παρατεταμένη αύξηση στην παραγωγή IL-6 και ότι η IL-6 αναστέλλει την παραγωγή του TNF-a δείχνει πως ίσως η IL-6 να εμπλέκεται στη μείωση της επίδρασης της άσκησης στην παραγωγή TNF-a μέσω ενδοτοξινών. Γι' αυτό η παραγόμενη IL-6 λόγω άσκησης, ίσως να μεσολαβεί στη ρύθμιση της αυξημένης ινσουλινοευαισθησίας σε ανθρώπους λόγω προπόνησης (Dela et al, 1995).

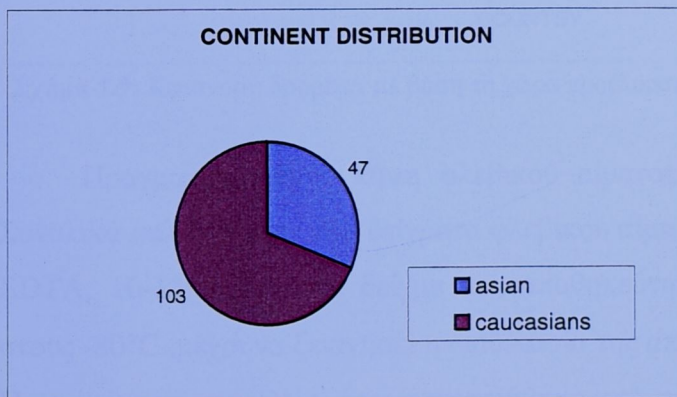
2.13 IL-6 - Συμπεράσματα

- ✓ Η άσκηση προάγει την τοπική παραγωγή IL-6 από τους μύες
- ✓ Η παραγωγή αυτή αυξάνεται περισσότερο όταν τα αποθέματα μυϊκού γλυκογόνου είναι χαμηλά
- ✓ Οι μύες παράγουν IL-6 για να συμβάλλουν στη διατήρηση της μεταβολικής ομοιόστασης κατά τη διάρκεια μυϊκής άσκησης παρατεταμένης διάρκειας
- ✓ Η IL-6 που απελευθερώνεται από τα μυϊκά κύτταρα, πιθανότατα αναστέλλει την παραγωγή TNF-a και κατά συνέπεια την ινσουλινοαντίσταση που προκαλείται μέσω του TNF-a, προφυλάσσοντας τις ευεργετικές επιδράσεις της άσκησης στην υγεία
- ✓ Το βιολογικό προφίλ της IL-6 αυξάνει την πιθανότητα, η παρατεταμένη χρήση αυτής ή των παραγώγων της, να έχει θεραπευτική δράση στην ινσουλινοαντίσταση

3. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Δείγμα

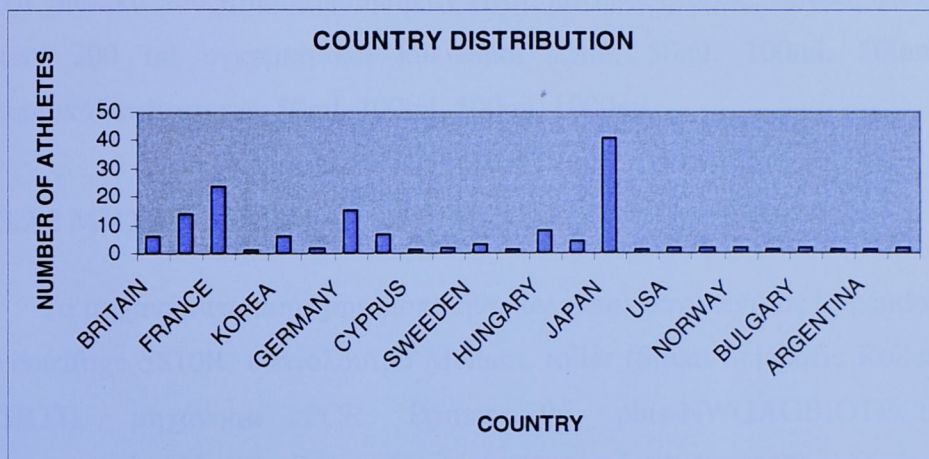
Η μελέτη αυτή βασίστηκε σε 148 υγιείς άνδρες, οι οποίοι συμμετείχαν στο Σπάρταθλο τη χρονιά 2003. Ο μέσος όρος ηλικίας των αθλητών ήταν 44.4 ετών, με εύρος από 22 έως 75 έτη. Ο μέσος όρος του δείκτη μάζας σώματος ήταν 23.2kg/m², με εύρος από 17.81 έως 30.2kg/m². Από τους 148 δρομείς που συμμετείχαν στη μαραθώνια διαδρομή, 102 ήταν Καυκάσιοι (68.9%) και 46 Ασιάτες (31.1%). Ο μέσος όρος ηλικίας των Καυκασίων ήταν 44.8 έτη με εύρος από 28 έως 75 έτη, ενώ ο μέσος όρος ηλικίας των Ασιατών ήταν 43.5 έτη, με εύρος από 22 έως 63 έτη.



Σχήμα 1.8 : Κατανομή δρομέων με βάση την καταγωγή τους

	Αριθμός δρομέων	Μέση ηλικία (έτη)	Εύρος ηλικίας (έτη)
Σύνολο	148	44.4	22 → 75
Καυκάσιοι	102	44.8	28 → 75
Ασιάτες	46	43.5	22 → 63

Πίνακας 1: Μέση ηλικία και ηλικιακό εύρος Καυκασίων και Ασιατών Σπαρταθλητών



Σχήμα 1.9: Κατανομή δρομέων με βάση τη χώρα προέλευσης

Πραγματοποιήθηκε λήψη φλεβικού αίματος από τους αθλητές. Συνολικά συλλέχθηκαν 148 δείγματα φλεβικού αίματος σε σωληνάκια με EDTA, 10-15ml το κάθε δείγμα και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -80°C ,μέχρι να ξεκινήσει η διαδικασία της απομόνωσης του DNA. Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε από τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος των αθλητών.

3.2 ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ:

3.2.1 ΠΛΑΣΤΙΚΑ-ΓΥΑΛΙΚΑ

Τα πλαστικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι: πλαστικά σωληνάκια Falcon των 15ml, πλαστικές πιπέτες μιας χρήσης των 5 ml, ακροφύσια (Greiner) των 2 µl, 100µl, 1000µl, σωληνάκια Eppendorf των 1,5 ml, 0,5 ml και 0,2 ml.

Τα γυαλικά που χρησιμοποιήθηκαν είναι: ποτήρια ζέσεως, κωνική φιάλη των 200 ml ογκομετρικοί κύλινδροι 25ml, 50ml, 100ml, 500ml, μπουκάλια Boro των 50ml, 100ml, 500ml, 1000ml.

3.2.2 ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΑ

Τα μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: φυγόκεντρος Eppendorf centrifuge 5810R, υδατόλουτρο Memert, roller (Stuart Scientific Rollers SRTI), μηχανήμα PCR Primus 96 plus-NWGAGBIOTECH, αναδευτήρας Nuova-stir plate, vortex IKA minishaker MSI, pHμετρο microprocessor pHmeter, WTW pH 537, ζυγαριά ακριβείας Gibertini, συσκευή ηλεκτροφόρησης, αυτόματες πιπέτες Gilson 2µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl, τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης, θάλαμος UV.

3.2.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Tris Borate Acid (TBE 5x)
 - 54 gr Tris Base
 - 27,5 gr Boric Acid
 - 20 ml EDTA 0,5 M
 - Προσθήκη 800 ml απεσταγμένο νερό
 - Ανάδευση

- Έλεγχος και ρύθμιση του pH στο 8,3
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=1 \text{ lt.}$

- Tris Borate Acid (TBE 1x)

- 200 ml 5x
- Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=1 \text{ lt}$
- Ανάδευση

- Αιθανόλη 100%

- Αιθανόλη 70%

70 ml αιθανόλη 100% και 30 ml απεσταγμένο νερό

- Βρωμιούχο αιθίδιο (10 mg/ml)

- 10 mg EtBr
- 1 ml αποστειρωμένο νερό
- Ανάδευση σε Vortex
- Φύλαξη σε ψυγείο

3.2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση του DNA έγινε από τα λευκά αιμοσφαίρια του αίματος των αθλητών που συμμετείχαν στο Σπάρταθλο σύμφωνα με τη μεθοδολογία των Miller et al (1). Η όλη διαδικασία απομόνωσης έχει διάρκεια 2 ημέρες:

1^η ημέρα

Λευκά κύτταρα που αντιστοιχούν σε 10 ml ολικού αίματος μεταφέρθηκαν σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα Falcon των 50 ml. Στα κύτταρα προστέθηκε μέχρι τα 40 ml ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των ερυθρών αιμοσφαιρίων (EL Buffer, El: 150 mM NH_4Cl , 10mM KHCO_3 ,

1 mM EDTA, pH 7,4). Το αιώρημα των κυττάρων παρέμεινε στον πάγο για 20min με τακτική ανάδευση για τη λύση των ερυθροκυττάρων. Στη συνέχεια το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε στις 2000 rpm X 10min και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για 1-2 φορές έως ότου το ίζημα πυρήνων να ήταν κατά το δυνατόν απηλλαγμένο από προσμίξεις ερυθρών αιμοσφαιρίων. Το ίζημα των πυρήνων αιωρήθηκε ακολούθως σε 3 ml διαλύματος λύσης των πυρήνων (Nucleus lysis Buffer NL : 10 mM Tris/ HCl, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8,4). Στο εναιώρημα προστέθηκε 50 μ l πρωτεϊνάση K (20 mg/dl) και 150 μ l 20% SDS και τα δείγματα επώαστηκαν ολονύκτια σε υδατόλουτρο στους 56°C.

2^η ημέρα

Τα δείγματα απομακρύνθηκαν από το υδατόλουτρο και μεταφέρθηκαν σε πλαστικό σωλήνα Falcon των 15ml. Σε κάθε δείγμα, προστέθηκε στη συνέχεια 1 ml NaCl 6 M και τα δείγματα αναδεύτηκαν βίαια για 15-20 sec. Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 3000 rpm, επαναιωρήθηκαν με βίαιη ανάδευση για 15-20 sec και ξαναφυγοκεντρήθηκαν όπως και προηγουμένως προκειμένου να κατακρημνιστούν οι πρωτεΐνες. Το καθαρό διαυγές υπερκείμενο κάθε δείγματος που περιέχει το DNA μεταφέρθηκε με γυάλινη Pasteur σε καθαρό σωλήνα Falcon των 50 ml. Στη συνέχεια προστέθηκε 2,5 φορές ο όγκος του διαλύματος απόλυτη αιθανόλη. Το DNA που γίνεται ευδιάκριτο μετά τη προσθήκη της αιθανόλης δεσμεύτηκε με πιπέτα Pasteur. Το DNA ξεπλύθηκε αρκετές φορές με εμβάπτυση του σε διάλυμα 70% αιθανόλης και αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως αιωρήθηκε σε μικρό όγκο (300 - 500 μ l) διαλύματος TE (Tris/ HCl 10 mM, 0,1 mM EDTA, pH 7,4). Τα δείγματα του καθαρού DNA φυλάχθηκαν στους 4°C αφού προηγουμένως έγινε προσδιορισμός της συγκέντρωσής τους με φωτομέτρηση.

3.2.5 ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Μετά την απομόνωση ακολούθησε εφαρμογή της μεθόδου PCR (Saiki et al, 1988), η οποία αποσκοπεί στην εκλεκτική αντιγραφή κατά εκατομμύρια φορές ειδικών τμημάτων DNA. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση περιοχών που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα. Πρόκειται για μια αντίδραση πολυμερισμού, η οποία μιμείται *in vitro* τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του πυρήνα (DNA πολυμεράσες) αντιγράφουν το DNA του κυττάρου. Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει η νουκλεοτιδική ακολουθία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δυο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μιας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της άλλης αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές, primers) για *in vitro* σύνθεση DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Παρουσία περίσσειας των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό είναι η Taq πολυμεράση, η οποία απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες. Η πολυμεράση αυτή εμφανίζει τη μεγαλύτερη ενεργότητα πολυμερισμού στους 72 °C, ενώ

παραμένει ενεργή σε θερμοκρασία μέχρι 95°C. Η τεχνική της PCR περιλαμβάνει τη κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων:

1. Αποδιάταξη (template denaturation). Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνες αλυσίδες σε υψηλή θερμοκρασία (94-96°C).
2. Σύνδεση εκκινητών (primer annealing). Οι δυο εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες που βρίσκονται στις δυο αλυσίδες του DNA. Η σύνδεση αυτή πραγματοποιείται σε θερμοκρασία που εξαρτάται αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών.
3. Επιμήκυνση (primer extension). Στο στάδιο αυτό γίνεται σύνθεση DNA με επιμήκυνση των εκκινητών κατά την 5'-3'κατεύθυνση, χρησιμοποιώντας τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στο διάλυμα και έχοντας ως καλούπι τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από την Taq DNA πολυμεράση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C.
4. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες αποδιατάσσονται ξανά και οι μονόκλωνες αλυσίδες επανανυβριδίζονται με τους εκκινητές και ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 25-35 φορές.

Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA του οποίου τα άκρα ορίζονται από τα 5'άκρα των εκκινητών και έχει μήκος ίσο με την απόσταση των εκκινητών. Για παράδειγμα 30 κύκλοι PCR δίνουν πολλαπλασιασμό της τάξης του εκατομμυρίου. Το προϊόν της PCR χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τη μελέτη του τμήματος που πολλαπλασιάστηκε (62).

Τα αντιδραστήρια για τη PCR διατηρούνται σε θερμοκρασία -20°C και είναι τα ακόλουθα:

- 1,25 μl PCR buffer

- 0,5 μl MgCl_2
- 0,2 μl Taq DNA πολυμεράση
- 0,1 μl dNTP's
- 0,3 μl primer L (left primer-αριστερός εκκινητής)
- 0,3 μl primer R (right primer-δεξιός εκκινητής)
- 8,85 μl H_2O

Τα 4 νουκλεοτίδια (100 mM) αναμίχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε eppendorf.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι:

5'-TGA CTT CAG CTT TAC TCT TGT-3' και

5'-CTG ATT GGA AAC ATT AAG-3'.

Οι εκκινητές αρχικά ήταν σε ξηρή μορφή και διαλυτοποιήθηκαν με προσθήκη αποστειρωμένου νερού σε συγκέντρωση 100 pmoles/ μl (stock solution). Από το διάλυμα που σχηματίστηκε παρασκευάστηκε νέο διάλυμα με αραίωση 1:8 (working solution, 25 μl stock + 175 μl αποστειρωμένο νερό) το οποίο είναι και το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε αρχικά στη PCR. Η διαδικασία της PCR γίνεται σε eppendorf των 0,2 ml στα οποία προστίθενται 11,5 μl από το μίγμα των παραπάνω και 1 μl δείγματος DNA. Συγκεκριμένα η διαδικασία γίνεται ως εξής:

1. Αρχικά παρασκευάζεται μίγμα που αποτελείται από τα παραπάνω αντιδραστήρια στις αντίστοιχες ποσότητες, τα οποία καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας διατηρούνται σε πάγο. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει PCR, συν ένα επιπλέον, σε περίπτωση απώλειας. Το μίγμα αναδεύεται σε Vortex και διατηρείται σε πάγο.

2. Σε κάθε eppendorf τοποθετούνται 11,5 μ l από το μίγμα που παρασκευάστηκε.
3. Τοποθετούνται 1 μ l από κάθε δείγμα DNA στα eppendorfs και γίνεται φυγοκέντρωση.
4. Σε κάθε eppendorf προστίθεται μια σταγόνα mineral oil, για να αποφευχθεί εξάτμιση του μίγματος κατά τη διαδικασία της PCR που πραγματοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες.
5. Τοποθετούνται τα eppendorfs στο μηχάνημα της PCR και πραγματοποιούνται τα ακόλουθα στάδια:

Βήμα 1^ο: 94°C για 10 min

Βήμα 2^ο: 94°C για 1 min

Βήμα 3^ο: 55°C για 1 min : τα βήματα 2,3,4 x 35 φορές

Βήμα 4^ο: 72°C για 1 min

Βήμα 5^ο: 72°C για 10 min

Βήμα 6^ο: Αποθήκευση στους 8°C

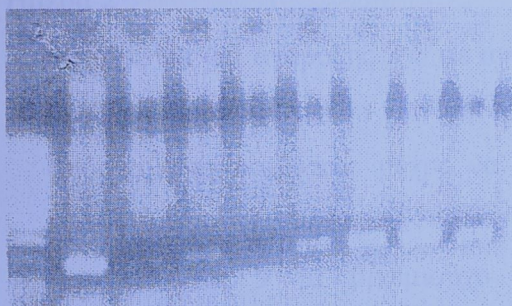
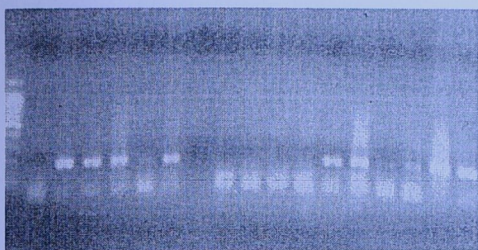
3.2.6 ΕΛΕΓΧΟΣ PCR

Ο έλεγχος της επιτυχίας γίνεται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πήκτωμα αгарόζης 2%. Το πήκτωμα αυτό περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) 10mg/ml, το οποίο έχει την ιδιότητα να φωσφορίζει στο υπεριώδες φως. Η ηλεκτροφορητική ικανότητα του DNA κατά μήκος των πηκτωμάτων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό μέγεθος του DNA και τη συγκέντρωση της αгарόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA ηλεκτροφορούνται, και αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης αгарόζης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος

μεγεθών DNA. Με συγκέντρωση 2% γίνεται διαχωρισμός γραμμικών τμημάτων DNA μήκους 3-3,1 Kb.

Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης έχει ως εξής:

1. Παρασκευάζεται πήκτωμα αγαρόζης με ανάμιξη σε κωνική φιάλη 50 ml διαλύματος TBE αραιωμένου και 1 gr αγαρόζης. Η κωνική μεταφέρεται σε φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη και να προκύψει διαυγές διάλυμα.
2. Αφού κρυώσει το διάλυμα προστίθενται 3 μ l βρωμιούχο αιθίδιο 10 mg/ml.
3. Το διάλυμα χύνεται στο εκμαγείο της ηλεκτροφόρησης, αφού πρώτα έχουν τοποθετηθεί σε αυτό χτένες, ώστε να δημιουργηθούν «πηγαδάκια» καθώς πήζει το gel της αγαρόζης. Στη συσκευή της ηλεκτροφόρησης και πάνω από το gel προστίθενται 250 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE αραιωμένου.
4. Μέχρι να πήξει το gel (20 min) προετοιμάζονται τα δείγματα για την ηλεκτροφόρηση: Σε eppendorf τοποθετούνται 2 μ l από το προϊόν της PCR και 2 μ l χρωστικής.
5. Αφού πήξει το gel μεταφέρονται σε κάθε πηγάδι αυτού ένα από τα παραπάνω δείγματα που αναμίχθηκαν με τη χρωστική. Σε ένα από τα πηγάδια του gel τοποθετείται ένας μάρτυρας (DNA ladder 100 bp).
6. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 150 Volts για 20 min περίπου.
7. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το gel παρατηρείται στο υπεριώδες. Η ύπαρξη ζωνών συγκεκριμένου μήκους υποδηλώνει ότι η διαδικασία της PCR έγινε με επιτυχία. Το μήκος κάθε ζώνης υπολογίζεται με σύγκριση της με το μάρτυρα, ο οποίος αποτελείται από κομμάτια DNA συγκεκριμένου μήκους (DNA ladder).



Σχήμα 1.10: Προϊόντα PCR

3.2.7 ΠΕΨΗ ΜΕ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

Η πέψη γίνεται στο προϊόν της PCR με σκοπό την ανίχνευση πολυμορφισμών. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού, τα οποία αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες του δίκλωνου DNA μήκους 4-8 νουκλεοτιδίων και τέμνουν το μόριο στα σημεία αυτά. Τα ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε είναι το LweI το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'GA↑CT 3' (28).

Η διαδικασία της πέψης είναι η εξής:

Ημέρα 1^η:

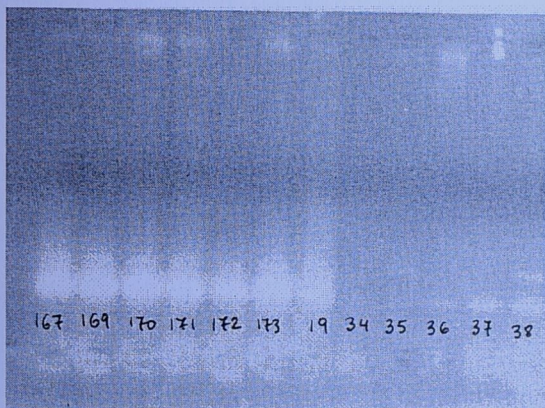
1. Φτιάχνεται μίγμα που περιέχει 2μl ρυθμιστικό διάλυμα (buffer), 7,6μl H₂O και 0,4μl AluI (10U/μl) πολλαπλασιασμένα με τον αριθμό των δειγμάτων συν ένα για να καλυφθούν τυχόν απώλειες. Γίνεται ανάδευση σε vortex.

2. Σε eppendorf 0,5 ml τοποθετούνται 10 μl προϊόντος της PCR και 10μl από το μίγμα που προετοιμάστηκε. Γίνεται φυγοκέντρηση για καλύτερη ανάδευση.
3. Επώαση στους 37°C για 12 ώρες.

Ημέρα 2^η:

1. Φτιάχνεται gel αγαρόζης 3% με ανάμιξη 4,5 gr αγαρόζης και 150 ml TBE αραιωμένου σε κωνική φιάλη. Το μίγμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί η αγαρόζη και να προκύψει διαυγές διάλυμα.
2. Προστίθενται 9 μl βρωμιούχο αιθίδιο και ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω (§ 2.6 έλεγχος PCR).
3. Σε eppendorf αναμιγνύονται 20 μl από το προϊόν πέψης και 5 μl χρωστικής και γίνεται φυγοκέντρηση για καλύτερη ανάμιξη.
4. «Φορτώνονται» τα δείγματα στα πηγαδάκια του gel και ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 150 Volts για μια ώρα περίπου.
5. Το gel παρατηρείται στο υπεριώδες.





Σχήμα 1.11: Προϊόντα πέψης

3.2.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα δεδομένα της συγκεκριμένης μελέτης (data base) αναλύθηκαν μέσω του στατιστικού λογισμικού προγράμματος SPSS. Έγιναν συσχετίσεις ανεξαρτησίας μεταξύ του γονότυπου (και των μεμονωμένων αλληλομόρφων) , με τον τερματισμό ή μη του αγώνα. Επιπλέον για να απαλειφθεί η πιθανή επίδραση της ηλικίας και της εθνικότητας στη σχέση γονοτύπου – τερματισμού, διεξήχθη ο έλεγχος ανεξαρτησίας Mantel-Haenszel (adjusted for ethnicity and age). Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας φαίνονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες.

3.2.9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατανομή γονοτύπων (Πίνακας 2)

	Σύνολο	Καυκάσιοι	Ασιάτες
Γονότυποι	-	-	-
GG	72 (48.6%)	29 (28.4%)	43 (93.5%)*
GC	60 (40.5%)	57 (55.9%)	3 (6.5%)
CC	16 (10.8%)	16 (15.7%)	0 (0%)
Αλληλόμορφα	-	-	-
G	204 (68.9%)	115 (56.4%)	89 (96.7%)**
C	92 (31.1%)	89 (43.6%)	3 (3.3%)

* Significantly important ($X^2 = 53.8$, $df = 2$, $p < 0.000$)

** Significantly important in Caucasians ($X^2 = 48.2$, $df = 1$, $p < 0.000$)

Το 28.4% των Καυκασίων Σπαρταθλητών είναι ομόζυγοι (GG) ως προς το αλληλόμορφο G, το 55.9% είναι ετερόζυγοι (GC) και το 15.7% ομόζυγοι (CC) ως προς το C αλληλόμορφο. Αντίστοιχα οι Ασιάτες Σπαρταθλητές, στη συντριπτική πλειοψηφία τους (93.5%) είναι ομόζυγοι GG, ετερόζυγοι GC σε ποσοστό μόλις 6.5%, ενώ δεν υπάρχει ούτε ένας Ασιάτης δρομέας ομόζυγος ως προς το C αλληλόμορφο. Η συχνότητα εμφάνισης του C αλληλομόρφου στο σύνολο των Καυκάσιων Σπαρταθλητών είναι 0.44, ενώ η αντίστοιχη συχνότητα εμφάνισης του C αλληλομόρφου στους Ασιάτες δρομείς είναι στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη (0.03; $p < 0.0001$). Οι συχνότητες εμφάνισης του G και του C αλληλομόρφου στις δύο ομάδες αθλητών υπεραντοχής δε διαφέρουν από τις συχνότητες εμφάνισης των ίδιων αλληλομόρφων, σύμφωνα πάντα με

τη βιβλιογραφία, για το γενικό πληθυσμό σε ποικίλες εθνικές ομάδες Καυκάσιας ή Ασιατικής καταγωγής αντίστοιχα.

Συσχέτιση ποσοστού τερματισάντων και μη δρομέων, με τη φυλετική τους προέλευση (Πίνακας 3)

	Σύνολο	Καυκάσιοι	Ασιάτες
Τερματίσαντες	76 (51.4%)	47 (46.1%)	29 (63%)
Μη-τερματίσαντες	72 (48.6%)	55 (53.9%)	17 (37%)

Από τους 148 δρομείς που συμμετείχαν στο Σπάρταθλο, οι 76 (51.4%) κατάφεραν να ολοκληρώσουν επιτυχημένα τον αγώνα, διανύοντας μian απόσταση 246 km μέσα σε 36 ώρες (47 Καυκάσιοι; 29 Ασιάτες). Είναι αξιοσημείωτο πως το ποσοστό των τερματισάντων Καυκασίων (46.1%) δε διαφέρει σημαντικά από το αντίστοιχο ποσοστό των μη τερματισάντων Καυκασίων (53.9%), σε αντίθεση με το ποσοστό των Ασιατών δρομέων που τερμάτισαν (63%) , συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό των μη τερματισάντων Ασιατών δρομέων (37%).

Συσχέτιση κατανομής γονοτύπων με τερματίσαντες και μη δρομείς (Πίνακας 4)

Γονότυποι	GG	GC	CC *
Τερματίσαντες	47 (61.8)	24 (31.6%)	5 (6.6%)
Μη-τερματίσαντες	25 (34.7%)	36 (50%)	11 (15.3%)

* Significantly important ($X^2 = 11.3$, $df = 2$, $p=0.004$)

Το ποσοστό των δρομέων που τερμάτισαν και ήταν ομόζυγοι ως προς το C αλληλόμορφο (CC) είναι εξαιρετικά χαμηλό σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό των τερματισάντων GG και GC δρομέων.

Συσχέτιση κατανομής αλληλομόρφων με τερματίσαντες και μη δρομείς
(Πίνακας 5)

	G	C **
Τερματίσαντες	77.6%	22.4%
Μη - τερματίσαντες	59.7%	40.3%

** Significantly important ($X^2 = 11.07$, $df = 1$, $p=0.001$)

Η παρουσία του G αλληλομόρφου είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερη συνολικά στους τερματίσαντες δρομείς, συγκριτικά με τους μη τερματίσαντες (0.78 vs. 0.60, $p = 0.001$).

Συσχέτιση κατανομής γονοτύπων με τερματίσαντες και μη Καυκάσιους δρομείς (Πίνακας 6)

Γονότυπος	GG	GC	CC *
Τερματίσαντες	19 (40.4%)	23 (48.9%)	5 (10.6%)
Μη-τερματίσαντες	10 (18.2%)	34 (61.8%)	11 (20%)

* Significantly important ($X^2 = 6.6$, $df = 2$, $p = 0.037$)

Το ποσοστό των Καυκάσιων δρομέων που τερμάτισαν και ήταν ομόζυγοι ως προς το C αλληλόμορφο (CC) είναι εξαιρετικά χαμηλό σε σχέση με τους τερματίσαντες GG και GC Καυκάσιους δρομείς.

Συσχέτιση κατανομής αλληλομόρφων με τερματίσαντες και μη Καυκάσιους δρομείς (Πίνακας 7)

	G	C **
Τερματίσαντες	64.9%	35.1%
Μη-τερματίσαντες	49.1%	50.9%

** Significantly important ($X^2 = 5.15$, $df = 1$, $p = 0.025$)

Η παρουσία του G αλληλομόρφου είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερη στους τερματίσαντες Καυκάσιους δρομείς συγκριτικά με τους μη τερματίσαντες Καυκάσιους δρομείς (0.65 vs. 0.49, $p = 0.02$).

Συσχέτιση κατανομής γονοτύπων με τερματίσαντες και μη Ασιάτες δρομείς (Πίνακας 8)

Γονότυπος	GG	GC	CC
Τερματίσαντες	28 (96.6%)	1 (3.4%)	- (0%)
Μη-τερματίσαντες	15 (88.2%)	2 (11.8%)	- (0%)

Δεν υπήρξε Ασιάτης δρομέας ομόζυγος ως προς το C αλληλόμορφο ούτε ανάμεσα στους τερματίσαντες ούτε ανάμεσα στους μη τερματίσαντες.

Συσχέτιση κατανομής αλληλομόρφων με τερματίσαντες και μη Ασιάτες δρομείς (Πίνακας 9)

Αλληλόμορφα	G	C
Τερματίσαντες	98.3%	1.7%
Μη-τερματίσαντες	94.1%	5.9%

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται πως οι φορείς του G αλληλομόρφου στους Ασιάτες δρομείς δεν παρουσιάζουν διαφορά στα ποσοστά μεταξύ αυτών που τερμάτισαν και αυτών που δεν τερμάτισαν. Πιθανότατα η απουσία του C αλληλομόρφου στο γενικότερο πληθυσμό των Ασιατών, αναστέλλει την ενδεχόμενη εργογόνο δράση του G αλληλομόρφου. Ίσως να πρόκειται για αποτέλεσμα βιολογικής προσαρμογής, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η περίπτωση στο συγκεκριμένο πληθυσμό η έκφραση κάποιων άλλων γονιδίων να παίζει σημαντικότερο ρόλο.

Προσαρμογή ως προς την ηλικία (Πίνακας 10)

Statistics	Chi-Squared	df	Asymp.Sig.(2-sided)
Conditional Cochran's	7.072	1	0.008
Independence Mantel-Haenszel	5.113	1	<u>0.024</u>
Homogeneity Breslow	19.514	19	0.424
Day-Tarone's	19.413	19	0.431

Για να εξαληφθεί η πιθανή επίδραση της ηλικίας στη σχέση γονοτύπου-τερματισμού, διεξήχθη ο έλεγχος ανεξαρτησίας Mantel-Haenszel. Μέσω του ελέγχου αυτού διαπιστώθηκε πως σε δρομείς της ίδιας ηλικίας, ο τερματισμός ή ο μη τερματισμός στο Σπάρταθλο εξαρτάται από το γονότυπο.

Προσαρμογή ως προς την εθνικότητα (Πίνακας 11)

Statistics	Chi-Squared	df	Asymp.Sig.(2-Sided)
Conditional Cochran's	6.029	1	0.014
Independence Mantel-Haenszel	5.343	1	<u>0.021</u>
Homogeneity			
Breslow	0.241	1	0.623
Day-Tarone's	0.241	1	0.623

Για να εξαληφθεί η πιθανή επίδραση της εθνικότητας στη σχέση γονοτύπου-τερματισμού, διεξήχθη ο έλεγχος ανεξαρτησίας Mantel-Haenszel. Μέσω του ελέγχου αυτού διαπιστώθηκε πως σε δρομείς της ίδιας εθνικότητας, ο τερματισμός ή ο μη τερματισμός στο Σπάρταθλο εξαρτάται από το γονότυπο.

3.2.10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρουσία του G αλληλομόρφου στη θέση -174 του υποκινητή του γονιδίου της IL-6 φαίνεται να σχετίζεται με **υψηλότερη** και καλύτερη **απόδοση σε αθλήματα αντοχής**, δηλαδή αθλήματα υπομέγιστης έντασης και εξαιρετικά παρατεταμένης διάρκειας. Συνεχίζει όμως να παραμένει θέμα προς διερεύνηση το αν αυτή η διαπίστωση οφείλεται στα υψηλά επίπεδα IL-6 πλάσματος λόγω άσκησης, τα οποία με τη σειρά τους σχετίζονται και με την παρουσία του G αλληλομόρφου. Επιπλέον είναι ανάγκη να διερευνηθεί και να αποσαφηνιστεί μέσω ποιων ακριβώς μεταβολικών μονοπατιών η IL-6 μπορεί να δράσει ως εργογόνο βοήθημα, βελτιώνοντας την απόδοση και την επίδοση των αθλητών υπεραντοχής.

Είναι πιθανό η *παρουσία του G αλληλομόρφου* γονιδίου σε **συνδυασμό με την άσκηση** να προάγει σε ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό τα επίπεδα της IL-6 του πλάσματος. Τα **υψηλά επίπεδα της IL-6** του πλάσματος μέσα από συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια διεγείρουν την ορμονοευαίσθητη λιπάση (HSL), προάγοντας τη **λιπόλυση** και την απελευθέρωση λιπαρών οξέων (FFA) στο πλάσμα. Τα **λιπαρά οξέα** στη συνέχεια προσλαμβάνονται από τους ενεργούς μύες και καταβολίζονται στις αερόβιες οξειδωτικές πορείες αποτελώντας το πλέον κατάλληλο και **ιδανικό υπόστρωμα** σε τέτοιου είδους αθλήματα υπομέγιστης έντασης και **παρατεταμένης διάρκειας**, όπως είναι το Σπάρταθλο, όπου τα μυικά και ηπατικά αποθέματα γλυκογόνου έχουν εξαντληθεί.

Σαφέστατα και δεν υποτιμάται η σημαντικότητα συνεισφορά της IL-6 στο μεταβολισμό και την ομοιόσταση της γλυκόζης, άρα και το πιθανό εργογόνο αποτέλεσμά της αυξημένης γλυκογονόλυσης, της υψηλής πρόσληψης γλυκόζης από το μυικά κύτταρα και κατά συνέπεια του υψηλού βαθμού οξείδωσής της με σκοπό την παραγωγή ενέργειας

και την εκτέλεση έργου. Όμως η εργογόνος δράση της IL-6 μέσω του μεταβολισμού της γλυκόζης, σε αθλήματα όπως το Σπάρταθλο, διαρκεί όσο διαρκούν και τα αποθέματα γλυκογόνου. Μετά από δύο ώρες περίπου συνεχούς τρεξίματος, τα αποθέματα μυϊκού και ηπατικού γλυκογόνου σχεδόν εξαντλούνται, αδυνατώντας να καλύψουν τις ενεργειακές απαιτήσεις της επίπονης προσπάθειας των Σπαρταθλητών. Γι' αυτόν ακριβώς το λόγο οι δρομείς τέτοιων αποστάσεων από ένα σημείο και μετά στηρίζονται σε εξαιρετικά μεγάλο ποσοστό στην παροχή ενέργειας από την οξείδωση των λιπαρών οξέων, για τις επόμενες ώρες τρεξίματος που ακολουθούν.

Σε κάθε περίπτωση η παρούσα ερευνητική μελέτη στηριζόμενη στα μέχρι τώρα σαφή και ξεκάθαρα βιβλιογραφικά και ερευνητικά δεδομένα προσπάθησε να διερευνήσει και τελικά πιστοποίησε τη συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης του πολυμορφισμού **-174G/C στον υποκινητή του γονιδίου της IL-6 και της απόδοσης των Σπάρταθλητών**. Ίσως να αποτελέσει μια πολύ καλή αφορμή για την περαιτέρω διερεύνηση των ακριβών μηχανισμών που συμβάλουν σε αυτό το γεγονός, μέσω άλλων ερευνών που θα ακολουθήσουν, υιοθετώντας ή απορρίπτοντας προτεινόμενα, πιθανά μεταβολικά και βιοχημικά μοντέλα.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Barbieri M, Ferrucci L, Ragno E, Corsi A, Bandinelli S, Bonafe M, Olivieri F, Giovagnetti S, Franceschi C, Guralnik JM and Paolisso G (2003). Chronic inflammation and the effect of IGF-1 on muscle strength and power in older persons, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Mar; 284(3): E481-487

Bartoccini E, Michaelis D and Hohlfeld R (1994). Constitutive and cytokine-induced production of interleukin-6 by human myoblasts. *Immunol Lett* 42: 135-138

Bastard JP, Jardel C and Hainque B (2000). Elevated levels of interleukin-6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3338-3342

Begum N and Ragolia L (1996). Effect of tumor necrosis factor-alpha on insulin action in cultured rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 137:2441-2446

Berridge MJ (1993). Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* 361: 315-325

Borst SE and Bugby GJ (2002). Neutralization of tumor necrosis factor reverses age-induced impairment of insulin responsiveness in skeletal muscle of Sprague-Dawley rats. *Metabolism* 51: 1061-1064

Bouchard C, Dionne T. F, Simoneau J-A and Boulay R.M (1992). Genetics of Aerobic and Anaerobic Performances. *ESSR* 20: 27-58

Bouchard C, Rankinen T., Chagnon C. Y, Rice T, Perusse L, Gagnon J, Borecki I, An P, Leon S. A, Skinner S. J, Province M and Rao C.D (2000). Genomic scan for maximal oxygen uptake and its response to training in the Heritage Family Study. *J. Appl. Physiol*, 88: 551-559

Bruunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B and Pedersen AN (1999). A high plasma concentration of TNF-alpha is associated dementia in centenarians. *J Gerontol* 54A: 357-364

Burzotta F, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Gliuca F, Luciani N, Zamparelli R, Schiavello R, Donati MB, Maseri A and Possati G (2001). Relation of the -174G/C polymorphism of interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. *Am J Cardiol.* Nov 15;88(10): 1125-8

Castell LM, Poortmans JR and Newsholme EA (1997). Some aspects of the acute phase response after a marathon race and the effects of glutamine supplementation. *Eur J Appl Physiol* 75:47-53

Chen TC and Hsieh SS, (2001). Effects of a 7-day eccentric training period on muscle damage and inflammation, *Med Sci Sports Exerc.* Oct; 33(10): 1732-8

Crabtree GR, (1999). Genetic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin and NF-AT. *Cell* 96:611-614

Croisier JL, Camus G and Dedy C (1999). Effects of training on exercise-induced muscle damage and interleukin-6 production. *Muscle Nerve* 22: 208-212

De Rossi M, Baggi F and Mantegazza R (2000). Cytokines and chemokines are both expressed by human myoblasts: possible relevance for the immune pathogenesis of muscle inflammation. *Int Immunol* 12: 1329-1335

Dela F, Larsen JJ, Mikines KJ and Ploug T (1995). Insulin-stimulated muscle glucose clearance in patients with NIDDM. Effects of one-legged physical training. *Diabetes* 44: 1010-1020

DeRijk RH, Boelen A and Tilders FG (1994). Induction of plasma interleukin-6 by circulating adrenaline in the rat . *Psychoneuroendocrinology* 19: 155-163

Drenth JP, Uum SH van and Meer JW van der (1995). Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-Alpha and IL-1 beta production. *J Appl Physiol* 79: 1497-1503

Endler G, Marsik C, Joukhadar C, Marculescu R, Mayr F, Mannhal C, Wagner OF and Jilma B (2004). The interleukin-6 G(-174)C promoter polymorphism does not determine plasma interleukin-6 concentration in experimental endotoxemia in humans. *Clin Chem Jan*; 50(1): 195-200

Febbraio M and Pedersen K. B (2002). Muscle - derived interleukin-6 : mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.* 16, 1335-1347

Febbraio MA and Pedersen BK (2002). Muscle derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J* 16: 1335-1347

Fernandez-Real JM and Ricart W (1999). Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness. *Diabetologia* 42: 1367-1374

Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Gutierrez C, Casamitjana R, Puget M, Richart C and Ricart W (2000). Interleukin-6 polymorphism and insulin sensitivity. *Diabetes* 49: 517-520

Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C and Ricart W (2000). Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1334-1339

Ferrucci L, Penninx BW, Volpato S, Harris TB, Bandeen-Roche K, Balfour J, Leveille SG, Fried LP, Md JM, (2002). Change in muscle strength explains accelerated decline of physical function in older women with high interleukin-6 serum levels. *J Am Geriatric Soc. Dec*; 50(12):1947-54

Fried SK, Bunkin DA and Greenberg AS (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 847-850

Gleeson M and Bishop NC (2000). Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: modification of immune responses to exercise by carbohydrate, glutamine and anti-oxidant supplements. *Immunol Cell Biol* 78: 554-561

Halse R, Pearson SR and Taylor R (2001). Effects of tumor necrosis factor-alpha on insulin action in cultured human muscle cells. *Diabetes* 50: 1102-1109

Hardin J, Kroeker K, Chung B and Gall DG (2000). Effect of proinflammatory interleukins on jejunal nutrient transport. *Gut* 47: 184-191

Hauner H, Russ M and Eckel J (1995). Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia* 38:764-771

Hellsten Y, Frandsen U and Richter EA (1997). Xanthine oxidase in human skeletal muscle following eccentric exercise : a role of inflammation. *J Physiol* 498: 239-248

Hotamisligil GS, Budavari A and Murray D (1994). Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 94: 1543-1549

Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, Pasternack A and Hurme M (2001). Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL-6 gene in primary Sjogren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. *Rheumatology (Oxford)*. Jun;40(6):656-61

Katsuki A, Sumida Y, Murashima S, Murata K, Takarada Y and Yano Y (1998). Serum levels of tumor necrosis factor-alpha are increased in obese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 83:859-862

Keller C, Hellsten Y and Pedersen BK (2002). Human muscle cells express IL-6 via a Ca²⁺ - dependent pathway. *J Physiol (Lond)*(In Press)

Keller C, Steensberg A, Saltin B and Neufer PD (2001). Transcriptional activation of the IL-6 gene in contracting skeletal muscle: influence of muscle content. *FASEB J* 15: 2748-2750

Matthys P, Mitera T, Heremans H, Van Damme J and Billiau A (1995). Anti-gamma interferon and anti-interleukin-6 antibodies affect staphylococcal enterotoxin B-induced weight loss, hypoglycemia and cytokine release in d-galactosamine-sensitized and unsensitized mice. *Infect Immune* 63: 1158-1164

McCarthy DA and Dale (1998). The leucocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med* 6: 333-363

Mizuhara H, O' Neil E, Seki N, Ogawa T and Senoh H, (1994). T-cell activation – associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin-6. *J Exp Med* 179: 1529-1537

Nehlsen-Canarella SL, Fagoaga OR and Nieman DC (1997). Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 hours of running. *J Appl Physiol* 82: 1662-1667

Nielsen HB, Secher N and Pedersen BK (1996). Lymphocytes and NK cell activity during repeated bouts of maximal exercise. *Am J Physiol* 271:R222-R227

Nieman DC, Nehlsen-Canarella SL and Henson DA (1998a). Effects of mode and carbohydrate on the granulocyte and monocyte response to intensive prolonged exercise. *J Appl Physiol* 84: 1252-1259

Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, Moser AH and Staprans I (1995). Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology* 136:2143-2149

Northoff H, Weinstock C and Berg A (1994). The cytokine response to strenuous exercise. *Int J Sports Med* 15: S167-S171

Olson EN and Williams RS (2000). Remodeling muscles with calcineurin. *Bioessays* 510-519

Ostrowski K, Hermann C, Bangash A, Nielsen JN and Pedersen BK (1998a). A trauma- like elevation in plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J Physiol (Lond)* 508: 889-894

Pedersen B. K and Hoffman-Goetz I (2000). Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. *Physiol Rev* 80, 1055-1081

Pedersen B. K, Steensberg A and Schjerling P (2001). Muscle derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol (London)* 536, 329-337

Pedersen B. K, Steensberg A, Keller P, Keller C, Fischer C, Hiscock N, Hall G, Plomgaard P, Febbraio M (2003). Muscle-derived interleukin-6: lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Arch – Eur J Physiol* 446: 9-16

Phillips T, Childs AC, Dreon DM, Phinney S and Leeuwenburgh C (2003). A dietary supplement attenuates IL-6 and CPR after eccentric exercise in untrained males. *Med Sci Sports Exerc* Dec; 35(12): 2032-7

Qi C and Pekala PH (2000). Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in adipocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 223:128-135

Rao A, Luo C and Hogan PG (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15: 707-747

Saghizadeh M, Ong JM, Garvey WT and Kern PA (1996). The expression of TNF alpha by human muscle: relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 97: 1111-1116

Starkie RL (2001). Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running. *Am J Physiol* 280: C769-774

Starkie RL, Arkinstall MJ, Koukoulas I and Febbraio MA (2001). Carbohydrate ingestion attenuates the increase in plasma interleukin-6, but not skeletal muscle interleukin-6 m-RNA during exercise in humans. *J Physiol (Lond)* 533: 585-591

Steensberg A (2003). The role of IL-6 in exercise – induced immune changes and metabolism. *Exerc Immunol Rev.* 9:40-7

Stouthard JM, Oude Elferink RP and Sauerwein HR (1996). Interleukin-6 enhances glucose transport in 3T3-L1 adipocytes . *Biochem Biophys Res Commun* 220:241-245

Toft AD, Jensen LB and Febbraio M (2002). Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. *Am J Physiol* 283: C289-C295

Villuendas G, Millan J. S, Sancho J and. Escobar-Morreale H. F (2002). The –597G/A and –174G/C Polymorphisms in the Promoter of the IL-6 Gene Are Associated with Hyperandrogenism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(3): 1134-1141

Yudkin GS, Kumari M and Humphries SA (2000). Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148: 209-214

Σχεδίαση του πορτοφ-
φιδίου - 174 G / C στο...

ΠΤΥ ΜΑΚ

Μαυρίδης Μ.

12964

10063

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



* 1 2 9 6 4 *