

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μελέτη του προφίλ έκλυσης πτητικών οργανικών ενώσεων του εκπνεόμενου αέρα που συνδέονται με το ασκησιογόνο οξειδωτικό στρες, κατά τη λήψη συμπληρωμάτων διατροφής εμπλουτισμένων με βιοδραστικά συστατικά»

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Αθηνά Παππά

Σπουδαστής: Παναγιώτης Διονύσιος Ζεϊμπέκης

Αθήνα, 2020

Πρόλογος

Η διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια της εκπαιδευτικής διαδικασίας της σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020. Πραγματοποιήθηκε στον τομέα Χημικών Επιστημών, από το τμήμα Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας. Στόχος ήταν η παρακολούθηση των επιπτώσεων που θα είχε ένα συμπλήρωμα διατροφής με αντιοξειδωτικές ιδιότητες στο οξειδωτικό στρες, παρακολουθώντας την πορεία πιθανών βιοδεικτών αυτού, στον εκπνεόμενο αέρα. Η ανάθεση και επίβλεψη της παρούσας εργασίας έγινε από την κυρία Αθηνά Παππά, καθηγήτρια της σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Αθηνά Παππά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη την πειραματική εργασία μου, αλλά και για την συνεχή βοήθειά της, ιδιαίτερα λόγω των συνθηκών της πανδημίας του Κορονοϊού COVID-19, οι οποίες κατέστησαν τις δειγματοληψίες ιδιαίτερη πρόκληση. Επιπρόσθετα θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Δρ. Κατερίνα Μικέδη και Δρ. Σοφία Κάρμα για την συνεχή τους βοήθεια και επίβλεψη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, αλλά και για την καθοδήγησή τους για την ορθή προσέγγιση αναλυτικών προβλημάτων. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την υποστήριξή τους σε αυτή την πρόκληση.

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
Abstract.....	7
1. Θεωρητικό Μέρος.....	8
<i>1.1. Εκπνεόμενος Αέρας Ανθρώπου.....</i>	<i>8</i>
1.1.1. Το Χημικό Προφίλ του Εκπνεόμενου Αέρα	8
1.1.2. Πητικές Οργανικές Ενώσεις στον Ανθρώπινο εκπνεόμενο αέρα.....	9
<i>1.2. Ανάλυση Εκπνεόμενου Αέρα.....</i>	<i>13</i>
1.2.1. Ανάλυση Εκπνεόμενου Αέρα ως διαγνωστικό εργαλείο	13
1.2.2. Αναλυτικά προβλήματα κατά την Ανάλυση του Εκπνεόμενου Αέρα	14
1.2.3. Μέθοδοι συλλογής δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα.....	16
1.2.4. Μέθοδοι προσυγκέντρωσης δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα.....	18
1.2.5. Μέθοδοι και Τεχνικές ανάλυσης δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα	22
<i>1.3. Οξειδωτικό Στρες.....</i>	<i>27</i>
1.3.1. Το Οξειδωτικό Στρες στον Ανθρώπινο Οργανισμό	27
1.3.2. Οξειδωτικό Στρες προκαλούμενο από την σωματική άσκηση	28
1.3.3. Δείκτες του Οξειδωτικού Στρες στον Εκπνεόμενου Αέρα.....	29
1.3.4. Έλεγχος του Οξειδωτικού Στρες μέσω κατανάλωσης Αντιοξειδωτικών.....	32
<i>1.4. Σπιρουλίνα και Αντιοξειδωτική δράση.....</i>	<i>33</i>
1.4.1. Γενικά	33
1.4.2. Βιοδραστικά συστατικά Σπιρουλίνας.....	33
1.4.3. Ασκησιογόνο Οξειδωτικό Στρες και κατανάλωση συμπληρωμάτων Σπιρουλίνας	34
2. Πειραματικό Μέρος.....	35
2.1. Στόχοι και Σύνοψη της Πειραματικής Εργασίας.....	35
2.2. Προετοιμασία των Εθελοντών και Δειγματοληψία	36
2.2.1 Κριτήρια Επιλογής Εθελοντών, Προετοιμασία και Ηθικά Θέματα	36
2.2.2. Χορήγηση Συμπληρώματος Διατροφής	37
2.2.3. Πρωτόκολλο σωματικής άσκησης για την επιβολή Οξειδωτικού Στρες	38
2.3. Δειγματοληψία Εκπνεόμενου Αέρα	39
2.3.1. Διαδικασία καθαρισμού και προετοιμασίας αναλωσίμων	39
2.3.2. Πρωτόκολλο λήψης δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα και Χώρου Δειγματοληψίας.....	41
2.4. Ανάλυση Εκπνεόμενου Αέρα.....	43
2.4.1. Οργανολογία.....	43

2.4.2. Πειραματικές Συνθήκες.....	43
2.4.3. Ανάλυση Προτύπων Δειγμάτων.....	45
2.5. Αποτελέσματα Πειραματικής Εργασίας.....	45
.....	47
3. Συζήτηση Αποτελεσμάτων	67
4. Συμπεράσματα και μελλοντική εργασία	72
Συνοπμογραφίες.....	73
Παράρτημα	74
Βιβλιογραφία	76

Περίληψη

Η μελέτη των ΠΟΕ του εκπνεόμενου αέρα για κλινική χρήση εμφανίζει ιδιαίτερη προσοχή τα τελευταία χρόνια από την επιστημονική κοινότητα καθώς αποτελεί μια μη επεμβατική και ανώδυνη προσέγγιση σε αντίθεση με τις συμβατικές δειγματοληπτικές τεχνικές όπως η δειγματοληψία μυϊκού ιστού ή αίματος. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες, το οποίο είναι υπεύθυνο για την πρόκληση πολλαπλών ασθενειών στο ανθρώπινο σώμα, είναι δυνατό να παρατηρηθεί στον εκπνεόμενο αέρα.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η κατανόηση της επίπτωσης που έχει η χορήγηση συμπληρωμάτων διατροφής με αντιοξειδωτικές ιδιότητες στο οξειδωτικό στρες που έχει προκληθεί μέσω πρωτοκόλλου άσκησης, παρακολουθώντας το χημικό προφίλ των πτητικών οργανικών ενώσεων στον εκπνεόμενο αέρα εθελοντών. Ως συμπλήρωμα διατροφής επιλέχθηκε η σπιρουλίνα, η οποία αποτελεί τροφή γνωστή για τις βιοδραστικές της ιδιότητες.

Στο πέρας της πειραματικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν οι πειραματικοί κύκλοι δύο εθελοντών, ενώ η ανάλυση των δειγμάτων τους έγινε σε σύστημα TDU-GC-MS (Μονάδα θερμικής εκρόφησης σε σύζευξη με Αέριο Χρωματογράφο και ανιχνευτή Φασματογράφο Μάζας). Ταυτοποιήθηκαν ενώσεις, οι οποίες βάσει της βιβλιογραφίας αποτελούν πιθανούς βιοδείκτες διακύμανσης του οξειδωτικού στρες στον άνθρωπο. Έγινε καταγραφή της πορείας αυτών των βιοδεικτών συναρτήσει του χρόνου και για τους δύο εθελοντές και έγινε σχολιασμός επί του αποτελέσματος της σπιρουλίνας για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, αλλά και για την επιτυχία της ανάλυσης εκπνεόμενου αέρα ως εργαλείο παρακολούθησης του οξειδωτικού στρες.

Λέξεις κλειδιά: Οξειδωτικό Στρες, Εκπνεόμενος Αέρας, Σπιρουλίνα, Αντιοξειδωτικές Ενώσεις, Αέριος Χρωματογράφος, Θερμική Εκρόφηση, Φασματογράφος Μάζας, Αλκάνια

Abstract

It is widely accepted amongst the scientific community that the interpretation of exhaled breath VOCs seems to be a suitable and novel approach for the establishment of a non-invasive, painless method of evaluating the clinical profile of an individual, in contrast with the already well-established methods such as tissue and blood sampling. Recent studies have shown that oxidative stress, which is the main cause for a variety of different diseases, can be directly observed through exhaled air.

The purpose of this dissertation is to comprehend and monitor through the VOCs of the exhaled air, the impact that food supplements with antioxidants can have on the human body, with regard to the oxidative stress that is induced from exercising. The food supplement that was chosen for this purpose is spirulina, which is commonly known for its bioactive properties.

In total, two volunteers managed to complete the experimental protocol, whose breath samples were analyzed by using a TDU-GC-MS (Thermal Desorption Unit paired with a Gas Chromatograph in conjunction with a Mass Spectrometer as a detector). A variety of compounds were identified, many of which, based on past studies, can act as possible biomarkers of oxidative stress levels in the human body. The levels of these possible biomarkers were monitored in correspondence with time for both volunteers and a deduction was made about the possible effects that spirulina can have on oxidative stress, as well as the effectiveness that breath analysis has had on oxidative stress monitoring.

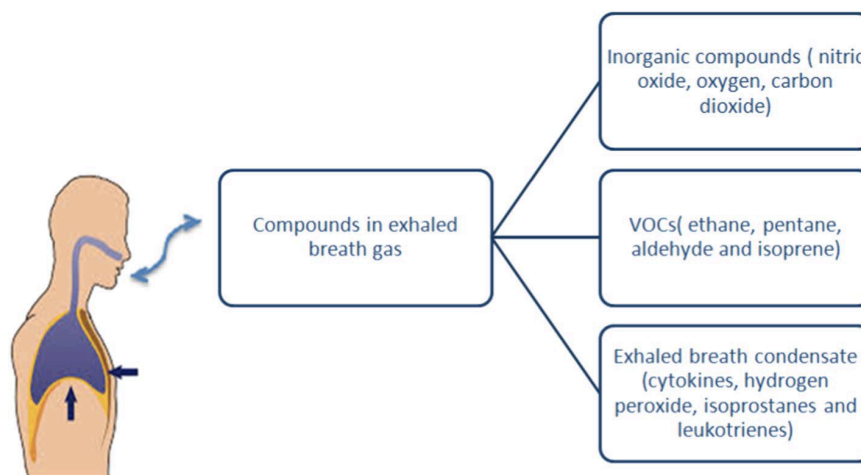
Key Words: Oxidative Stress, Exhaled Air, Spirulina, Antioxidants, Gas Chromatograph, Thermal Desorption, Mass Spectrometer, Alkanes

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1. Εκπνεόμενος Αέρας Ανθρώπου

1.1.1. Το Χημικό Προφίλ του Εκπνεόμενου Αέρα

Ο εκπνεόμενος αέρας αποτελεί ένα μίγμα διαφόρων ουσιών, η σύσταση και η συγκέντρωση του οποίου εξαρτάται από τις βιοχημικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στο ανθρώπινο σώμα, καθώς και τους εξωγενείς παράγοντες που μπορεί να επηρεάζουν. Το τυπικό χημικό προφίλ του εκπνεόμενου αέρα περιέχει κατά 5.0 % – 6.3 % υδρατμούς, 74.4 % άζωτο, 13.6 % – 16.0 % οξυγόνο, 4.0 % – 5.3 % διοξείδιο του άνθρακα, 1 % αργό, ενώ περιέχει και άλλες ουσίες σε μικροποσότητες στα επίπεδα των ppm, όπως το υδρογόνο και το μονοξείδιο του άνθρακα [1]. Επιπρόσθετα, στον εκπνεόμενο αέρα ανιχνεύονται μικροποσότητες Πτητικών Οργανικών Ενώσεων (Volatile Organic Compounds) οι οποίες βρίσκονται σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 100 ppm στον συνολικό όγκο μιας εκπνοής [1]. Αυτές οι ουσίες αποτελούν σημαντική πηγή επιστημονικού ενδιαφέροντος, καθώς μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες για τις μεταβολικές διαδικασίες που πραγματοποιούνται στον εκάστοτε ανθρώπινο οργανισμό.



Εικόνα 1: Γραφική αποτύπωση των συστατικών του Εκπνεόμενου Αέρα

1.1.2. Πτητικές Οργανικές Ενώσεις στον Ανθρώπινο εκπνεόμενο αέρα

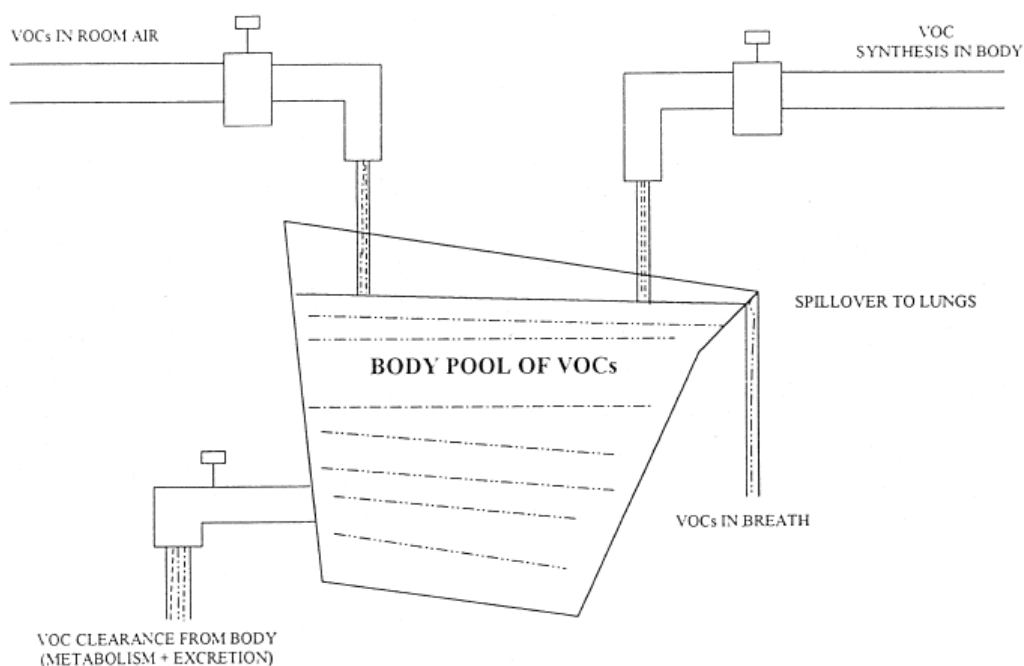
Με βάση τον ορισμό που έχει δοθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση ως Πτητικές Οργανικές Ενώσεις (ΠΟΕ) ορίζονται όσες οργανικές ενώσεις έχουν αρχικό σημείο βρασμού χαμηλότερο ή ίσο με τους 250°C μετρούμενο σε συνθήκες σταθερής πίεσης 101.3 kPa (2004/42/CE). Επιπρόσθετα, τονίζεται ότι η πτητικότητα μιας ένωσης εξαρτάται άμεσα από το βάρος αυτής, επομένως όσο μια ένωση είναι πιο ελαφριά, τόσο πιο πτητική θα είναι, γεγονός που θα υποδηλώνεται και από το σχετικά χαμηλό σημείο βρασμού της.

Στο ανθρώπινο σώμα πραγματοποιούνται συνεχώς χημικές αντιδράσεις, τόσο αναβολικής φύσεως, όσο και καταβολικής. Κατά την πραγματοποίηση των φυσιολογικών διαδικασιών του μεταβολισμού, ελευθερώνονται στο αίμα ενώσεις μεταβολίτες. Αυτές οι ενώσεις μπορούν να είναι προϊόντα οξειδωτικού στρες των κυττάρων, προϊόντα μεταβολικών δράσεων της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του οργανισμού κ.α. Στη συνέχεια, οι μεταβολίτες που προκύπτουν από τις βιοχημικές διαδικασίες που πραγματοποιούνται επί του ανθρώπινου σώματος, μεταφέρονται διαμέσου της ροής του αίματος στις κυψελίδες των πνευμόνων, όπου και λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή αερίων. Εκεί, ορισμένοι μεταβολίτες ελευθερώνονται στην εκπνοή ως ΠΟΕ οι οποίες σχετίζονται άμεσα με την ιατρική κατάσταση του ασθενή [2][3]. Την έννοια των ΠΟΕ στον εκπνεόμενο αέρα την εισήγαγε ο Linus Pauling το 1971, επιστήμονας που για το επιστημονικό του έργο έχει βραβευτεί δύο φορές με βραβείο Nobel [4].

Οι ΠΟΕ αποτελούν σημαντική πηγή πληροφοριών για το ανθρώπινο σώμα και συνεπώς χρήζει ιδιαίτερου επιστημονικού ενδιαφέροντος η αποσαφήνιση της προέλευσής τους. Είναι γνωστό ότι σε δείγματα εκπνεόμενου αέρα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 3,000 ΠΟΕ, με αρκετές από αυτές να είναι **ενδογενούς** προέλευσης, δηλαδή να παράγονται από φυσιολογικές βιοχημικές διαδικασίες του οργανισμού. Παρά τη γνώση προέλευσης αυτών, τα μεταβολικά μονοπάτια που οδηγούν στη παραγωγή τους είναι γνωστά για πολύ λίγες ενώσεις (Πίνακας 1). Οι υπόλοιπες πτητικές ενώσεις είναι **εξωγενούς** προέλευσης, έχοντας προκύψει από τον εισπνεόμενο αέρα ή από την κατανάλωση τροφίμων και ποτών. Είναι προφανές ότι οι ενώσεις εξωγενούς

προέλευσης δεν προσφέρουν πληροφορίες για το κλινικό προφίλ του ανθρώπου και λαμβάνονται υπόψιν ως επιμολυντές ή θόρυβος στις διαγνωστικές αναλύσεις [1].

Για να δοθεί μια συστημική προσέγγιση στον τρόπο με τον οποίο μελετώνται οι ΠΟΕ του εκπνεόμενου αέρα, οι Phillips et al. εισήγαγαν τον όρο **Alveolar Gradient**. Με αυτό τον όρο ορίζεται η διαφορά της συγκέντρωσης μιας πτητικής οργανικής ένωσης στο δείγμα εκπνεόμενου αέρα με τη συγκέντρωσή της στο χώρο δειγματοληψίας.



Εικόνα 2: Γραφική αναπαράσταση των ροών ΠΟΕ που εισέρχονται και εξέρχονται από το ανθρώπινο σώμα [5]

$$\text{Alveolar Gradient} = [\text{ΠΟΕ στο δείγμα}] - [\text{ΠΟΕ στο χώρο δειγματοληψίας}]$$

(Σχέση Α)

Συνεπώς, ερεύνησαν τις πτητικές οργανικές ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν σε 50 υγιείς ανθρώπους, πιθανολογώντας ως ΠΟΕ ενδογενούς προέλευσης όσες ενώσεις είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση στο δείγμα εκπνοής σε σχέση με το δείγμα αέρα του περιβάλλοντα χώρου δειγματοληψίας (Alveolar Gradient > 0). Μέσω αυτής της ερευνητικής προσπάθειας παρατήρησαν ότι από τις 3,481 πτητικές ουσίες που ταυτοποιήθηκαν επί του συνόλου των εθελοντών, οι 1,753 πληρούσαν την παραπάνω

συνθήκη, εκ των οποίων μόνο 27 ΠΟΕ μπορούσαν να βρεθούν και στους 50 [1][5]. Τα παραπάνω ευρήματα καθιστούν σαφή τη πολυπλοκότητα των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα και την αβεβαιότητα που εισάγουν οι εξωγενείς ενώσεις στην ανάλυση δεδομένων [5].

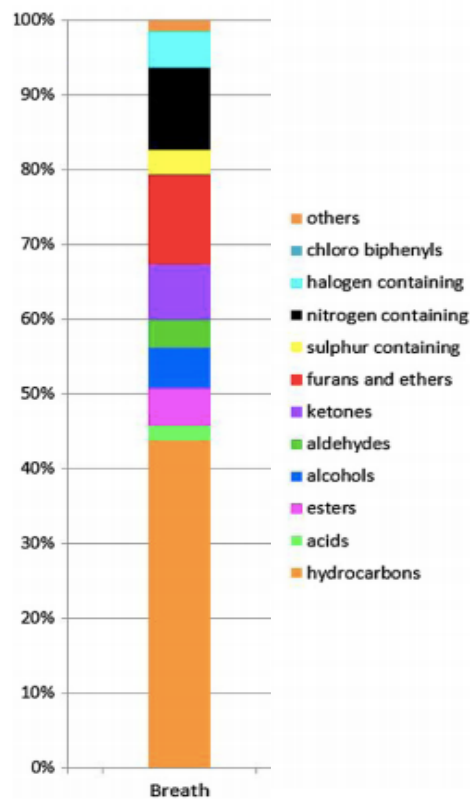
***Πίνακας 1:** Σύσχεση ΠΟΕ ενδογενούς προέλευσης με τις αντίστοιχες μεταβολικές διεργασίες [6]*

Compound	Physiological basis
acetaldehyde	ethanol metabolism
acetone	decarboxylation of acetoacetate
ammonia	protein metabolism
carbon disulfide	gut bacteria
carbon monoxide	production catalyzed by heme oxygenase
carbonyl sulfide	gut bacteria
ethane	lipid peroxidation
ethanol	gut bacteria
ethylene	lipid peroxidation
hydrocarbons	lipid peroxidation/metabolism
hydrogen	gut bacteria
isoprene	cholesterol biosynthesis
methane	gut bacteria
methanethiol	methionine metabolism
methanol	metabolism of fruit
methylamine	protein metabolism
nitric oxide	production catalyzed by nitric oxide synthase
pentane	lipid peroxidation

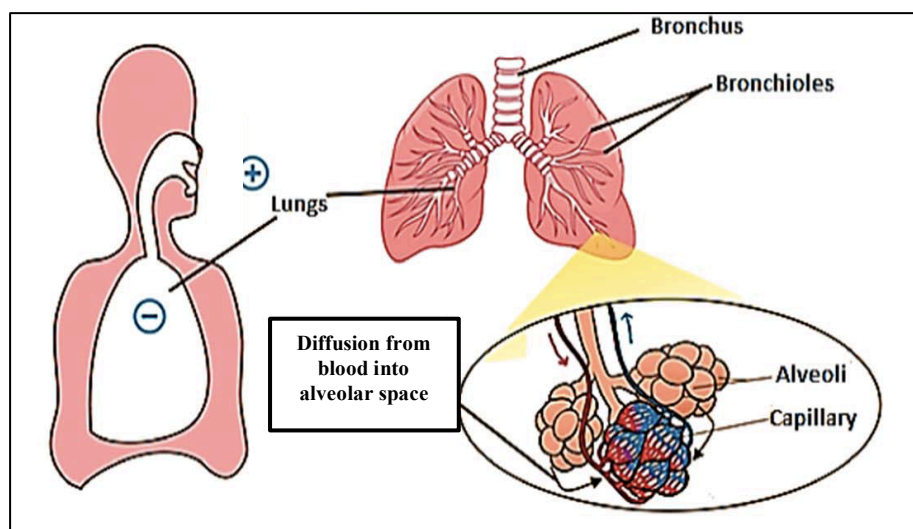
Σε έρευνα επί του εκπνεόμενου αέρα υγιών εθελοντών, ταυτοποιήθηκαν μέχρι και 1,840 πτητικές οργανικές ενώσεις, των οποίων πηγή προέλευσης είναι οι αναβολικές και καταβολικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στα κύτταρα, στους ιστούς αλλά και στη συμβιωτική μικροχλωρίδα του ανθρώπου. Από αυτή τη πληθώρα ΠΟΕ, οι κατηγορίες που εμφανίζονταν σε μεγαλύτερη αφθονία ήταν οι υδρογονάνθρακες, οι οποίοι αποτελούσαν το 44% του συνόλου των ενώσεων που είχαν ταυτοποιηθεί. Επιπροσθέτως των υδρογονανθράκων, είχαν ταυτοποιηθεί και φουράνια, αιθέρες, αζωτούχες ενώσεις, κετόνες, αλκοόλες, εστέρες, αλδεΐδες κ.α. [4].

Τονίζεται ότι μεγάλο μέρος των ΠΟΕ του εκπνεόμενου αέρα δεν μπορούν να συλλεχθούν εύκολα επειδή κατά την ανταλλαγή αερίων στις κυψελίδες, ενώσεις που είναι πτητικές στη δεδομένη θερμοκρασία και πίεση, μπορεί να μην διαχέονται στον κύριο όγκο του εκπνεόμενου αέρα λόγω των διαμοριακών δυνάμεων που

αναπτύσσονται μεταξύ διαφόρων ενώσεων του αίματος (Νόμος της διαλυτότητας του Henry).



Διάγραμμα 1: Ποσοστιαίος χωρισμός του είδους των ΠΟΕ που έχουν ανιχνευθεί στον Εκπνεόμενο Αέρα [4]



Εικόνα 3: Διαγραμματική απεικόνιση της ροής του αέρα κατά την εκπνοή, ακολουθώντας τον Νόμο του Henry

1.2. Ανάλυση Εκπνεόμενου Αέρα

1.2.1. Ανάλυση Εκπνεόμενου Αέρα ως διαγνωστικό εργαλείο

Από τα παλιά χρόνια, τόσο στην Αρχαία Ελλάδα του Ιπποκράτη (460 – 370 π.Χ), όσο και στην Αρχαία Ρώμη και σε άλλους πολιτισμούς, γιατροί χρησιμοποιούσαν την οσμή του εκπνεόμενου αέρα των ασθενών, ώστε να διαγνώσουν αν κινδύνευαν από καρκίνο των πνευμόνων και άλλες ασθένειες [1][7]. Η επιτυχημένη συσχέτιση ορισμένων ασθενειών με την οσμή του εκπνεόμενου αέρα έχει επιβεβαιωθεί και από την σύγχρονη ιατρική, δεδομένου ότι ασθενείς με τη νόσο του διαβήτη εμφανίζουν εκπνοή με γλυκιά ακετονούχα οσμή, ασθενείς με ανεπάρκεια του ήπατος εμφανίζουν εκπνοή με οσμή ψαριού, ενώ ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια εμφανίζουν εκπνοή με οσμή ούρων [1][4][8].

Στη σύγχρονη εποχή, η μέθοδος ανάλυσης και βιοχημικής συσχέτισης των ΠΟΕ του εκπνεόμενου αέρα με την διάγνωση ασθενειών ονομάζεται **Breath Analysis Disease Diagnosis** (BADD) και αποτελεί μια καινοτόμο, μη επεμβατική μέθοδο, η οποία μπορεί να αποτυπώσει το ιατρικό – κλινικό προφίλ ενός ανθρώπου, δίνοντας πληροφορίες για την πιθανή διάγνωση καρκίνου, λοιμωδών νοσημάτων ή φλεγμονωδών ασθενειών [1].

Η δεδομένη τεχνική δύναται να εκτελέσει καταλυτικό ρόλο στο μέλλον της έγκαιρης, αλλά και γρήγορης, διάγνωσης ασθενειών, ενώ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και για την παρακολούθηση του κλινικού προφίλ ενός ασθενή, δίνοντας πληροφορίες για την πορεία της υγείας του. Ήδη η χρήση ορισμένων κλινικών τεστ εκπνεόμενου αέρα έχει εδραιωθεί ως καλή πρακτική, αλλά προβλήματα όπως η έλλειψη επαναληψιμότητας βιοδεικτών ανάμεσα σε δείγματα ασθενών, έχουν εμποδίσει την ευρεία χρήση της μεθόδου λόγω των αβέβαιων αποτελεσμάτων της για ορισμένες ασθένειες [7].

1.2.2. Αναλυτικά προβλήματα κατά την Ανάλυση του Εκπνεόμενου

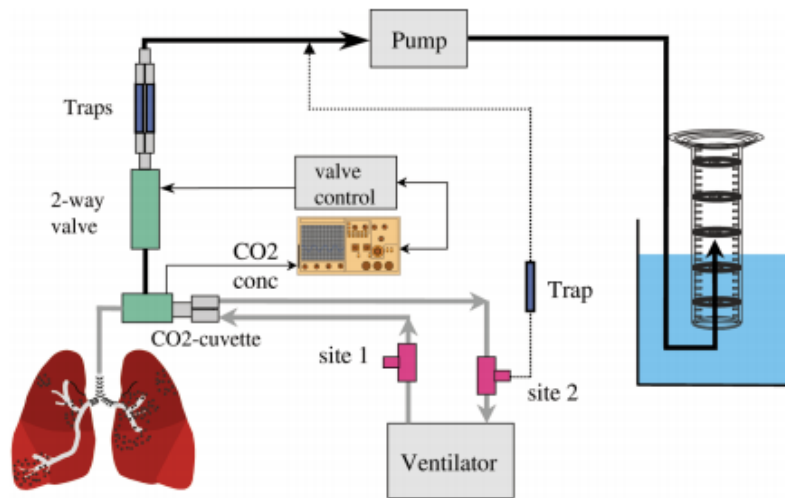
Αέρα

Ο εκπνεόμενος αέρας διαφέρει σημαντικά από άνθρωπο σε άνθρωπο, ιδιαίτερα στη κατηγορία των ΠΟΕ, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά [8]. Οι πτητικές οργανικές ενώσεις ανιχνεύονται στα επίπεδα των ppm έως και των ppt, με ιδιαίτερη θέση να δίνεται στο ισοπρένιο, την ακετόνη, το αιθάνιο και την μεθανόλη, ενώσεις που απαντώνται σε όλους στις ανθρώπους ποιοτικά [8]. Λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεων που εμφανίζουν οι ΠΟΕ στον εκπνεόμενο αέρα, η απευθείας μέτρησή τους τίθεται ιδιαίτερα δύσκολη. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος, κρίνεται απαραίτητη η χρήση τεχνικών **δειγματοληψίας και προσυγκέντρωσης**.

Ιδιαίτερο πρόβλημα τίθεται από τη φύση του εκπνεόμενου αέρα, ο οποίος αποτελεί ένα μη ομογενές μείγμα, η σύσταση του οποίου εξαρτάται από το χρόνο δειγματοληψίας της εκπνοής [7][8]. Η μέση χωρητικότητα των πνευμόνων στις ενήλικου ανθρώπου είναι 6 λίτρα, εκ των οποίων μόνο ένα μικρό μέρος χρησιμοποιείται κατά την φυσιολογική αναπνοή. Κατά μέσο όρο, με κάθε εκπνοή εξάγονται 500 mL εκπνεόμενου αέρα, εκ των οποίων τα τελευταία 350 mL συνιστούν αέρα που προέρχεται από στις κυψελίδες (*Alveolar Air*). Τα πρώτα 150 mL ονομάζονται “Νεκρός Όγκος Αέρα”, ή NOA, (*Dead Space Air*) καθώς συνιστούν τον αέρα που ήταν παγιδευμένος στην αναπνευστική οδό, τη στοματική κοιλότητα, τη τραχεία αλλά και τους βρόγχους. Ο εκπνεόμενος αέρας που προέρχεται από τις κυψελίδες περιέχει τις πτητικές οργανικές ενώσεις που μπορούν να περιγράψουν το ιατρικό προφίλ του ανθρώπου [9].

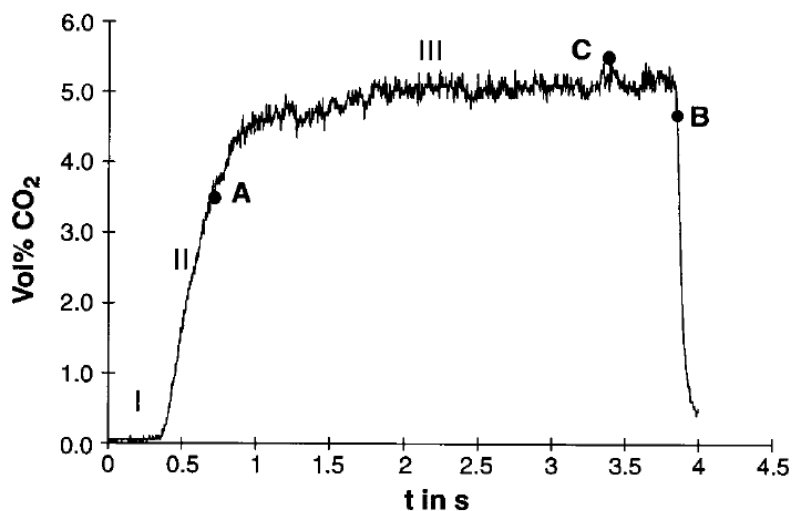
Αναλόγως των ενώσεων που χρειάζεται να προσδιοριστούν, ο NOA μπορεί να κριθεί απαραίτητος ή επιμολυντής. Σε περίπτωση φλεγμονής στις βρογχικής κοιλότητας, όπως σε έναν ασθενή με άσθμα, η μέτρηση του NO στον Νεκρό Όγκο Αέρα θα υποδείξει την ύπαρξη φλεγμονής, ενώ σε περίπτωση μέτρησης των ΠΟΕ του εκπνεόμενου αέρα, ο NOA θεωρείται επιμολυντής καθώς αραιώνει ένα μείγμα με ήδη πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στις ενώσεις που ενδιαφέρουν [8]. Στις αναλύσεις Εκπνεόμενου Αέρα μπορεί να συλλεχθεί ο NOA, ο όγκος αέρα από στις κυψελίδες ή το σύνολο στις εκπνοής. Συνήθως, ΠΟΕ ενδογενούς προέλευσης παρατηρούνται στον

όγκο αέρα από στις κυψελίδες σε συγκεντρώσεις 2 με 3 φορές μεγαλύτερες από αυτές στην συνολική εκπνοή [9].



Εικόνα 4: Σύστημα Δειγματοληψίας αέρα από στις κυψελίδες βάσει του CO₂

Επιπροσθέτως, για να γίνει λήψη ενός ομοιόμορφου και αντιπροσωπευτικού δείγματος αέρα, γίνεται υπολογισμός στις αναλογίας του CO₂ ως προς τον συνολικό όγκο της εκπνοής. Στη συνέχεια στις ο λόγος συγκρίνεται με την γενικά αποδεκτή τιμή του CO₂ στην εκπνοή όπου είναι $4.2\% \pm 0.5\%$. Ο δεδομένος λόγος έχει γίνει και η αρχή για την ανάπτυξη συστημάτων δειγματοληψίας εκπνεόμενου αέρα, βάσει του οποίου χωρίζεται ο αέρας από τις κυψελίδες με τον NOA [10].



Διάγραμμα 2: Ποσοστιαία διακύμανση του CO₂ στον εκπνεόμενο αέρα κατά τη δειγματοληψία εκπνεόμενου αέρα. Για τη βέλτιστη δειγματοληψία αέρα από στις κυψελίδες είναι σημαντικό να ληφθεί ο εκπνεόμενος αέρας στις περιοχές III

Σημειώνεται ότι βασικό εμπόδιο στην ανάλυση των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα είναι τα πολύ χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων που εμφανίζονται οι ενώσεις ερευνητικού ενδιαφέροντος. Συνεπώς για την προσπέλαση αυτού του προβλήματος γίνεται η χρήση τεχνικών προσυγκέντρωσης του αερίου δείγματος, στις οποίες θα γίνει αναφορά στη συνέχεια.

1.2.3. Μέθοδοι συλλογής δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα

Ο τρόπος και ο εξοπλισμός που επιλέγεται για τη δειγματοληψία του εκπνεόμενου αέρα εξαρτάται ισχυρά από την μέθοδο ανάλυσης που θα ακολουθήσει. Σε αναλύσεις όπου ο χρόνος δειγματοληψίας διαφέρει με το χρόνο ανάλυσης (**Off-line Analysis**) η συλλογή των δειγμάτων μπορεί να γίνει σε σακούλες πολυμερών ή σε μεταλλικά δοχεία [11].

Οι **σακούλες πολυμερών** είναι φτιαγμένες από πολυμερή όπως PVF, PFA, PTFE ή PVDC και είναι αδύνατο να γίνει διάχυση αερίου διαμέσου αυτών. Παραδείγματα αυτών των σάκων είναι οι σάκοι Tedlar, Teflon, FlexFoil και Nalophan, ενώ η Tedlar αποτελεί την πιο διαδεδομένη επιλογή. Το αέριο δείγμα φυλάσσεται εντός των ασκών και οδηγείται για προσυγκέντρωση και ανάλυση. Οι σακούλες πολυμερών έχουν συνεισφέρει πολύ θετικά στον χώρο των αναλύσεων εκπνεόμενου αέρα λόγω του σχετικά χαμηλού τους κόστους και της επαναχρησιμοποίησής τους, παρά το γεγονός ότι μπορούν να αλλοιώσουν το δείγμα κατά ένα ποσοστό της τάξεως του 10% στη περίπτωση παρατεταμένου χρόνου αποθήκευσης, οδηγώντας πιθανά σε λανθασμένα συμπεράσματα [1][11]. Για τον παραπάνω λόγο, η χρήση σωλήνων προσυγκέντρωσης για μεταφορά του δείγματος κρίνεται ως η καταλληλότερη προσέγγιση [11].

Τα **μεταλλικά δοχεία** είναι συνήθως φτιαγμένα από ανοξείδωτο χάλυβα ενώ το εσωτερικό τους έχει επεξεργασθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιηθεί η τραχύτητά τους, εξασθενώντας τους δεσμούς Van Der Waals που θα μπορούσαν να σχηματισθούν μεταξύ μικρο-κοιλοτήτων του δοχείου και πτητικών ενώσεων, αποτρέποντας πιθανές απώλειες ουσιών. Αποτελούν ασφαλή τρόπο συλλογής δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα, αλλά δεν ενδείκνυνται λόγω του υψηλού κόστους, της δυσκολίας μεταφοράς και του χώρου που καταλαμβάνουν [11][12].



***Εικόνα 5:** Σακούλα πολυμερούς για δειγματοληψία αέρα*



***Εικόνα 6:** Μεταλλικό δοχείο για δειγματοληψία αέρα*

1.2.4. Μέθοδοι προσυγκέντρωσης δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα

Για να ξεπεραστεί ο περιορισμός της ανίχνευσης σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων των ΠΟΕ μεταβολικής προέλευσης στα δείγματα του Εκπνεόμενου Αέρα, κρίνεται απαραίτητη η χρήση τεχνικών προσυγκέντρωσης. Γενικά, υπάρχουν τρεις αναλυτικές προσεγγίσεις μέσω των οποίων μπορεί να γίνει προσυγκέντρωση του Εκπνεόμενου Αέρα: η χημική, η κρυογονική και η προσροφητική [13].

Κατά τη **χημική παγίδευση**, ο εκπνεόμενος αέρας συνήθως διασπείρεται εντός επιλεγμένου υγρού αντιδρώντος μείγματος, με σκοπό την αντίδραση των ΠΟΕ επιστημονικού ενδιαφέροντος (όπως ακετόνη ή αιθανόλη) με το υγρό αντιδραστήριο, οδηγώντας στην παραγωγή γνωστού προϊόντος. Εν συνεχεία, το προϊόν της αντίδρασης διαχωρίζεται και μέσω αντιδράσεων παραγωγοποίησης προκύπτουν οι προσυγκεντρωμένες μορφές των ΠΟΕ. Μετατροπές επί της δεδομένης μεθόδου έχουν φτάσει όρια ανίχνευσης έως 14 ppb για την ακετόνη [14]. Παρά όμως τα χαμηλά όρια ανίχνευσης, η μέθοδος κρίνεται ακατάλληλη για αναλύσεις Εκπνεόμενου Αέρα σε πραγματικό χρόνο λόγω των σχετικών απωλειών ακετόνης και των φαινομένων «μνήμης» που εμφανίζουν τα αντιδραστήρια μίγματα.

Στην **κρυογονική παγίδευση**, ο εκπνεόμενος αέρας ψύχεται με αποτέλεσμα την παγίδευση των ΠΟΕ. Δυστυχώς, με την ψύξη του εκπνεόμενου αέρα, επέρχεται και η κρυστάλλωση των υδρατμών του δείγματος, επιφέροντας τεχνικά προβλήματα στον εξοπλισμό [13].

Η **προσροφητική παγίδευση** αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο προσυγκέντρωσης των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα στη σημερινή εποχή. Τα ΠΟΕ του εκπνεόμενου αέρα δεσμεύονται επιφανειακά από προσροφητικές ενώσεις και στη συνέχεια απομακρύνονται από αυτές μέσω θερμικής εκρόφησης, καθοδηγούμενες συνήθως σε Χρωματογράφο. Για τις αναλύσεις εκπνεόμενου αέρα έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά προσροφητικά υλικά όπως οργανικά πολυμερή (Tenax TA), ενεργός άνθρακας και μοριακά κόσκινα άνθρακα [15]. Επιπροσθέτως, έχει χρησιμοποιηθεί και η τεχνική της Μικρο-εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPME) στην οποία θα γίνει αναφορά στη συνέχεια. Κανένα γνωστό προσροφητικό υλικό δεν εμφανίζει μηδενικές απώλειες πτητικών ενώσεων, ενώ οι απώλειες των προσροφητικών

συστημάτων εξαρτώνται ισχυρά από τα χαρακτηριστικά των ΠΟΕ προς δέσμευση, όπως ο αριθμός ανθράκων, πλευρικές ομάδες και διακλαδώσεις στην ανθρακική αλυσίδα [15].

Είναι προφανές ότι κατά την προσροφητική παγίδευση ζητάται η δέσμευση ΠΟΕ με αρκετά διαφορετικά σημεία βρασμού και συνεπώς η επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού υλικού θα κρίνει σε μεγάλο βαθμό την επιτυχία της ανάλυσης. Θεωρείται ότι βασικά θέματα που θα πρέπει να ληφθούν υπόψιν κατά την επιλογή υλικού είναι:

- 1) η προσροφητική ικανότητα για τις υπό μελέτη ΠΟΕ
- 2) η ποσότητα που μπορεί να προσροφηθεί χωρίς να υπάρχει διαρροή των ΠΟΕ (**Break Through Volume**)
- 3) η εμφάνιση συμπεριφορών «μνήμης» του υλικού (**Memory Effect**)

Για παράδειγμα οι παγίδες οργανικών πολυμερών δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από δείγματα υψηλών συγκεντρώσεων νερού, αλλά δεν δεσμεύουν αποδοτικά υδρογονάνθρακες με πολύ χαμηλό σημείο ζέσεως (π.χ Αιθάνιο). Αντιθέτως, τα φίλτρα άνθρακα τους δεσμεύουν αποδοτικά, αλλά συνήθως εμφανίζουν συμπεριφορές «μνήμης». Συνεπώς, για να προσπελασθούν τα παραπάνω αναλυτικά εμπόδια, γίνεται χρήση τόσο πολλαπλών προσροφητικών υλικών (κόσκινο άνθρακα με λεπτή επίστρωση Tenax), όσο και αλληπάλληλων προσροφητικών τεχνικών [8][16].

Όπως αναφέρθηκε, η απορροφητική παγίδευση αποτελεί την κυρίαρχη προσέγγιση παγίδευσης των ΠΟΕ του εκπνεόμενου αέρα. Η εφαρμογή της γίνεται συνήθως μέσω **σωλήνων θερμικής εκρόφησης** (Thermal Desorption Tubes ή Sorbent Tubes) ή μέσω της μεθόδου **SPME**.

Οι **σωλήνες θερμικής εκρόφησης** εμφανίζουν διαφορετικές προσροφητικές και υδροφοβικές ικανότητες, καθώς και θερμοκρασιακά όρια λειτουργίας, τα οποία εξαρτώνται από το προσροφητικό υλικό που χρησιμοποιείται εκάστοτε. Για αναλύσεις εκπνεόμενου αέρα προτιμώνται σωλήνες θερμικής εκρόφησης με πολλαπλή

διαστρωμάτωση προσροφητικών υλικών, καθώς δύναται να δεσμεύουν μεγάλο εύρος πτητικών ενώσεων με πολύ διαφορετικά σημεία βρασμού [1][17].



Εικόνα 7: Σωλήνας θερμικής εκρόφησης για προσυγκέντρωση αέρα

Η τεχνική εμπλουτισμού της **Μικρο-εκχύλισης σε Στερεά Φάση (SPME)** είναι η πιο γνωστή μέθοδος απορροφητικής τεχνολογίας. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος βασίζεται σε μια λεπτή ίνα πυριτίου, η οποία έχει επικαλυφθεί με προσροφητικό υλικό πάχους 5-100 nm [1]. Η ίνα αυτή εισέρχεται εντός του εξοπλισμού όπου έχει γίνει η συλλογή της εκπνοής και παραμένει εκεί για δεδομένο χρονικό διάστημα. Όταν περάσει ο χρόνος προσυγκέντρωσης, η ίνα εισάγεται σε Χρωματογράφο, όπου μέσω θερμικής εκρόφησης, οι παγιδευμένες ΠΟΕ απελευθερώνονται εντός της Χρωματογραφικής στήλης [9]. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2) γίνεται μια σύντομη αναφορά των προσροφητικών υλικών που έχουν χρησιμοποιηθεί ως επικαλύψεις σε προσυγκεντρώσεις με SPME, καθώς και οι ΠΟΕ στόχοι των αναλυτών [9][18].



Εικόνα 8: Τεχνική SPME για προσυγκέντρωση δείγματος

Η τεχνική της **Παγίδευσης σε Βελόνα (Needle Trap Device, NTD)** είναι μια ανερχόμενη τεχνική που περιλαμβάνει τη συλλογή και προσυγκέντρωση του

εκπνεόμενου αέρα σε ένα και μόνο βήμα. Η συσκευή NTD περιλαμβάνει μια βελόνα πληρωμένη με ένα προσροφητικό υλικό. Αυτή η τεχνική εμφανίζει όρια ανίχνευσης παρόμοια με αυτά του SPME, αλλά σε αντίθεση με αυτό, η NTD είναι μια εξαντλητική τεχνική, εννοώντας ότι η συγκέντρωση των ΠΟΕ αναλυτικού ενδιαφέροντος μπορεί να αυξηθεί, αυξάνοντας τον όγκο του δείγματος. Προφανώς η αρχή λειτουργίας είναι παρόμοια με αυτή των TD-Tubes [19].

Πίνακας 2: ΠΟΕ στόχοι σε SPME και οι εκάστοτε προσροφητικές επικαλύψεις της ίνας [9]

Coatings	Target VOCs	LOD	Sampling collection device
CAR/PDMS	Isoprene	17 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (SPME) 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (sorption)	8 L Tedlar bag SPME inside bag, 10 min at 40°C
PDMS/DVB	Acetone	0.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	3 L Tedlar bag (max. storage 6 h) SPME inside bag, 4 min at 40°C
PDMS	Tetrachoroethylene	300 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	125 mL glass bulb (exposed 1 min)
PA	Ethanol	276 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Fiber directly to mouth (10 s)
PDMS	Acetone	116 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
CW/PDMS	Isoprene	20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
PDMS/DVB		(PDMS/DVB coating)	
PDMS	Benzene	6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Fiber directly to mouth (30 s)
CW/DVB			
PDMS/DVB			
DVB/CAR/PDMS			
CW/PEG	2-aminoacetophenone	7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	1 L glass bulb (24 h fiber)
CAR/PDMS	Acetone	5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	3 L Tedlar (20 mL vials, 10 min at 37°C)
	Acetonitrile	25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	Benzene	0.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	n-butane	12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	Dimethylsulfide	10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	Furan	6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	2-methylfuran	7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	Isoprene	0.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	Limonene	11 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
	Toluene	0.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	
CAR/PDMS	43 VOCs	1–90 $\mu\text{g m}^{-3}$	3 L Tedlar (20 mL vials, 10 min at 37°C)

1.2.5. Μέθοδοι και Τεχνικές ανάλυσης δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα

Για την ανάλυση δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι βάσει γνωστών τεχνικών Ενόργανης Ανάλυσης, καθώς επίσης και αναπτύσσονται νέα συστήματα που επιτρέπουν τη πραγματοποίηση αναλύσεων σε πραγματικό χρόνο.

Ο εκπνεόμενος αέρας μπορεί να συλλεχθεί, να εμπλουτισθεί και να αναλυθεί σε δεύτερο χρόνο (**Off-line Analysis**) ή μπορεί καθώς συλλέγεται να αναλύεται από το εκάστοτε σύστημα ανάλυσης (**Real-Time Analysis**).

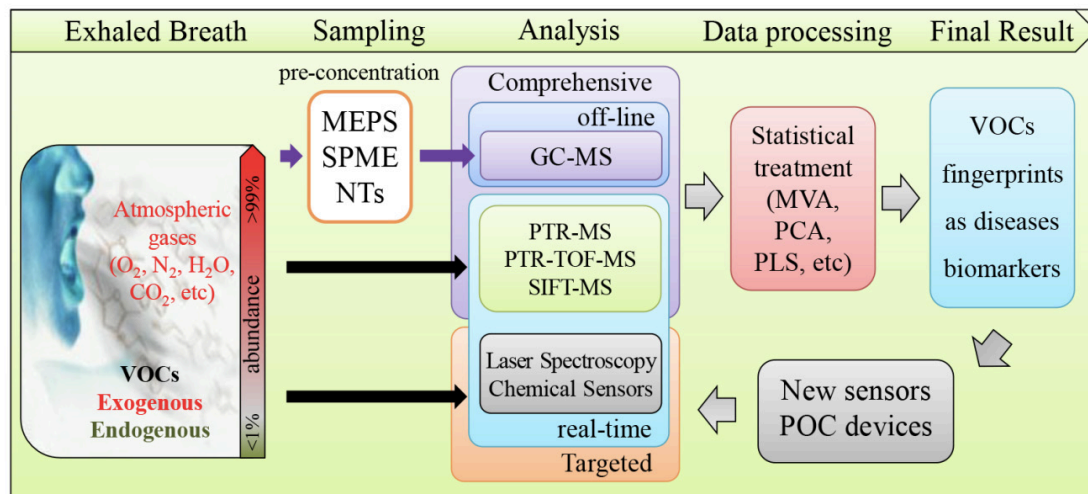
Στις **Off-line** αναλύσεις, αφού προ συγκεντρωθεί το δείγμα, συνήθως οδηγείται σε σύστημα **Αερίου Χρωματογράφου (GC)** συζευγμένο με κάποιο από τους παρακάτω ανιχνευτές:

- Φασματόμετρο Μάζας (**MS**)
- Ανιχνευτής Φλόγας Ιονισμού (**FID**)
- Φασματόμετρο Κινητικότητας Ιόντων (**IMS**)

Η **Αέρια Χρωματογραφία** αποτελεί την πλέον πιο χρησιμοποιημένη μέθοδο ανάλυσης δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα, έχοντας την τελευταία δεκαετία περίπου 2,000 δημοσιεύσεις και 1,600 Review Papers όπου αποτελεί κύρια μέθοδο ανάλυσης.

Η πιο διαδεδομένη αναλυτική τεχνική ποιοτικής ανάλυσης του Εκπνεόμενου Αέρα είναι ο **Αέριος Χρωματογράφος** σε συνέργεια με **Φασματογράφο Μάζας (GC-MS)**. Αποτελεί την πιο ευαίσθητη και επιλεκτική προσέγγιση για τη ποιοτική ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα σε ένα μείγμα που υπάρχει μεγάλο εύρος ουσιών σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι ουσίες διαχωρίζονται εντός του **Αερίου Χρωματογράφου** βάσει πολικότητας και σημείου βρασμού, και καθοδηγούνται στο **Φασματόμετρο Μάζας** όπου ιονίζονται, δημιουργώντας θραύσματα των ουσιών, τα οποία αντιστοιχούν σε χαρακτηριστικά φάσματα μάζας προς φορτίο για την κάθε ένωση. Είναι προφανές πως αντί του **Φασματογράφου Μάζας** μπορεί να γίνει χρήση του **FID** ή του **IMS**.

Για τον FID τονίζεται πως η χρήση του για δείγματα με τόσο μεγάλο εύρος σημείων βρασμού, συνεπώς και σε βάρους, θα οδηγούσε σε επίφοβα αποτελέσματα λόγω της ευαισθησίας που εμφανίζει η απόκριση ως προς τη μάζα [12][20]. Ανεξαρτήτως όμως του ανιχνευτή, η Off-line προσέγγιση με Αέριο Χρωματογράφο μπορεί να εμφανίσει αναλυτικές δυσκολίες λόγω των απαραίτητων βημάτων της συλλογής και προσυγκέντρωσης της εκπνοής. Σε αυτά τα βήματα, οι ΠΟΕ μπορούν να χαθούν, να υποστούν θερμική μετατροπή ή να προσροφηθούν σε επιφάνειες όπου οι υδρατμοί της εκπνοής συμπυκνώθηκαν. Επομένως είναι κρίσιμο για την σωστή ανάλυση των ΠΟΕ, τα δείγματα να προκατεργαστούν με προσοχή, ώστε να ελαχιστοποιηθούν τα πειραματικά σφάλματα.



Εικόνα 9: Διάγραμμα ροής της ανάλυσης δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα

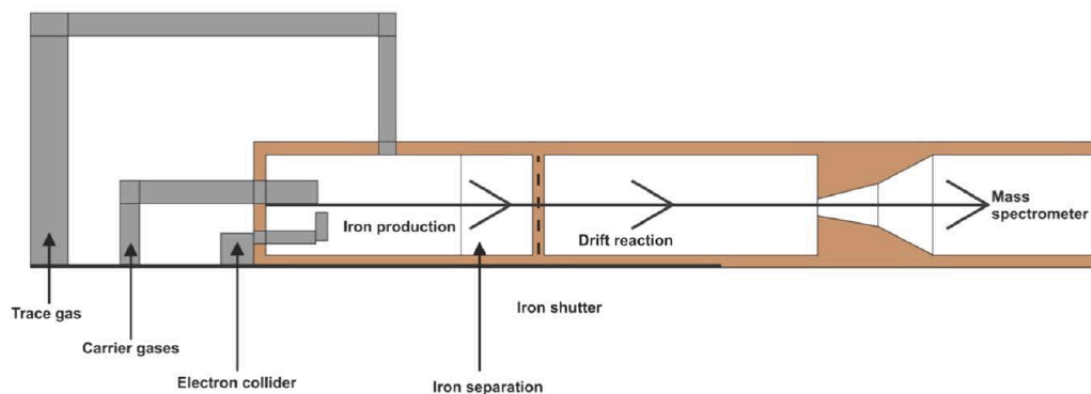
Στον αντίποδα, στις **On-line** αναλύσεις πραγματικού χρόνου, επιστρατεύονται νέες και καινοτόμες αναλυτικές τεχνικές, στόχος των οποίων είναι η άμεση παραλαβή αποτελεσμάτων, αποφεύγοντας το στάδιο της προ κατεργασίας της εκπνοής. Αρκετές από αυτές τις μεθόδους, επιφέρουν αποτελέσματα εντός 1 δευτερολέπτου [9]. Επιπρόσθετα, αρκετές από τις On-line τεχνικές επιτυγχάνουν επιλεκτικότητα και ευαισθησία παρόμοια με αυτή του MS, οδηγώντας στην ανάπτυξη συστημάτων που θα μπορούσαν να συνεισφέρουν σημαντικά στην καταγραφή των κλινικών προφίλ των ανθρώπων [1][21]. Βέβαια, παρά των προτερημάτων που φαίνεται να εμφανίζουν οι μέθοδοι πραγματικού χρόνου, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι έχουν πολύ υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης, ενώ ΠΟΕ πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων δεν μπορούν να ανιχνευθούν λόγω της απουσίας προσυγκέντρωσης. Οι πιο πολλές έρευνες

εμφανίζουν όρια ανίχνευσης στα ppb, ενώ άλλες έχουν προτείνει συστήματα που φτάνουν έως και τα ppt [22].

Κάποιες από τις βασικές On-line αναλυτικές τεχνικές που ακολουθούνται είναι οι εξής:

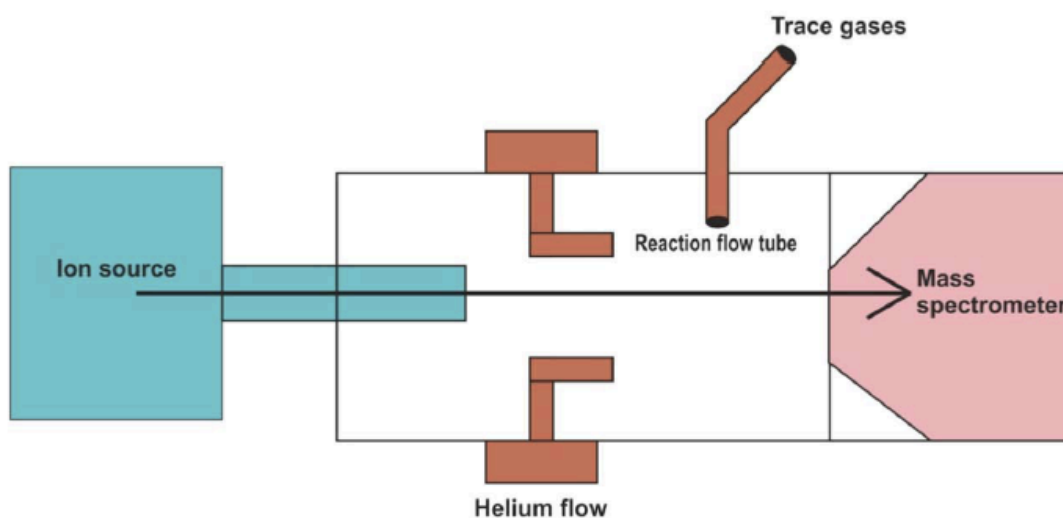
- Αντίδραση μεταφοράς Πρωτονίου και Φασματομετρία Μάζας (**PTR-MS**)
- Επιλογή Ιόντος με Ροή σε σωλήνα και Φασματομετρία Μάζας (**SIFT-MS**)
- Χρήση Χημικών Αισθητήρων (**Chemical Sensors, e-noses**)
- Οπτική Απορρόφηση (**Optical Absorption**)

Η χρήση του **PTR-MS** στις αναλύσεις εκπνεόμενου αέρα ξεκίνησε τα τελευταία χρόνια και λόγω της γρήγορης και αποτελεσματικής απόκρισής του, με όρια ανίχνευσης στο εύρος των ppt, έχει αποκτήσει αρκετή δημοτικότητα ανάμεσα στις On-line και Off-line μεθόδους [1]. Η τεχνική όμως εμφανίζει προβλήματα όταν δύναται να αναλυθούν δείγματα που περιέχουν ενώσεις ίδιου μοριακού βάρους, κάτι αρκετά πιθανό με τα δείγματα αέρα, οδηγώντας σε δυσκολίες ταυτοποίησης. Για να αποφευχθεί το παραπάνω πρόβλημα, συχνά το PTR ενώνεται σε σειρά με TOF-MS, το οποίο με τη σειρά του δίνει χρόνο στα ιόντα να ταξιδέψουν μια δεδομένη απόσταση χωρίς επιτάχυνση. Ο χρόνος που θα διανύσουν τα ιόντα αυτή την απόσταση εξαρτάται άμεσα από το πηλίκο μάζας προς φορτίο. Η χρήση του TOF-MS έναντι του απλού MS έχει οδηγήσει στη πολύ πιο αποτελεσματική ταυτοποίηση ενώσεων, αλλά η απουσία προσυγκέντρωσης συνεχίζει να αποτελεί πρόβλημα για ΠΟΕ σε ίχνη. Επιπλέον το κόστος του PTR-TOF-MS είναι σημαντικά μεγαλύτερο το GC-MS [9].



Εικόνα 10: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του PTR-MS [23]

Στη τεχνική του **SIFT-MS**, οι ΠΟΕ του εκπνεόμενου αέρα δεν χρειάζεται να διαχωριστούν αλλά ιονίζονται με ιόντα όπως τα H_3O^+ , NO^+ ή O_2^+ και στη συνέχεια ταυτοποιούνται με ευκολία από το MS [9]. Η συσχέτιση των ΠΟΕ του εκπνεόμενου αέρα, των ιόντων ιονισμού αλλά και με τις κινητικές των προϊόντων ιονισμού που προέκυψαν, καθιστούν την μέθοδο ικανή για ποσοτικές αναλύσεις [24].

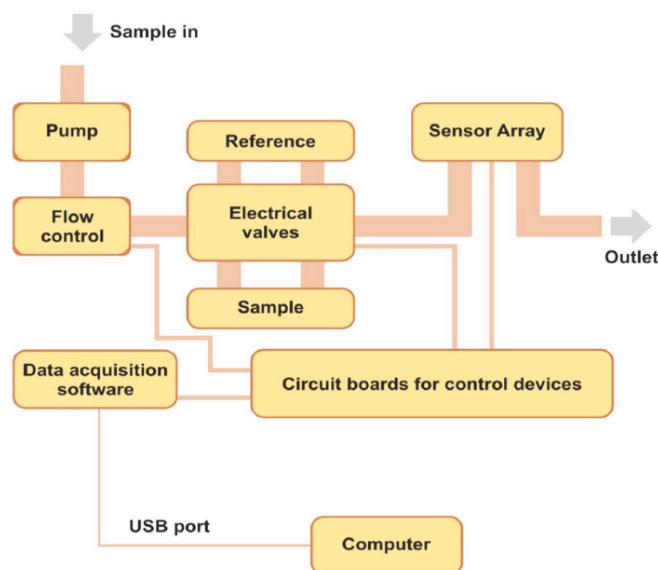


Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του SIFT-MS [23]

Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι το ανθρώπινο σύστημα όσφρησης έχει τη δυνατότητα να ξεχωρίσει έως και 1 τρισεκατομμύριο διαφορετικά ερεθίσματα, καταλαβαίνοντας διαφορετικές οσμές από τα μοτίβα που ορίζουν οι πτητικές ενώσεις [9]. Η δεδομένη παρατήρηση υποδεικνύει τη πολυπλοκότητα των μεταβολικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στο ανθρώπινο σώμα, δίνοντας το έναυσμα στην επιστημονική κοινότητα για ανάπτυξη μιας τεχνολογίας που θα μπορούσε να μιμηθεί τη δεδομένη

βιολογική δράση, κατασκευάζοντας συστήματα αισθητήρων που λειτουργούν συνεργατικά, δηλαδή μια **Ηλεκτρονική Μύτη (E-nose)**.

Η ιδέα της τεχνολογίας **E-nose** υπάρχει από τις δεκαετίες του 1970, με τους Wilkens και Hatman το 1964, να χρησιμοποιούν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις επί ηλεκτροδίου για αναγνώριση δεδομένων οσμών. Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν αισθητήρες που ανιχνεύουν φυσικές ή χημικές αλλαγές στις ενώσεις του εκπνεόμενου αέρα, όπως οι αισθητήρες οξειδίων μετάλλου (Metal-Oxide sensors). Οι δεδομένοι αισθητήρες έχουν όρια ανίχνευσης στο εύρος των ppm, εμφανίζοντας μακροχρόνια επίδοση και σταθερότητα. Επιπρόσθετα, έχει γίνει χρήση αισθητήρων MOSFET σε συστήματα όπως το SpiroNose[®], το οποίο χρησιμοποιεί 5 αισθητήρες, 2 για την ανάλυση των εξωγενών ΠΟΕ και 3 για την ανάλυση των ΠΟΕ του εκπνεόμενου αέρα [25]. Η δεδομένη τεχνολογία φαίνεται να αποτελεί το μέλλον της ανάλυσης του εκπνεόμενου αέρα, ιδιαίτερα σε κλινικές εφαρμογές, αλλά εμφανίζει σημαντικά προβλήματα στην ακρίβεια και στην επαναληψιμότητα των μετρήσεων τη δεδομένη στιγμή. Σε πρόσφατη μελέτη, όπου χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Cyranose 320[®], μια συσκευή e-nose, για να συγκρίνει το μοτίβο των εκπνεόμενων ουσιών ανάμεσα σε υγιείς ανθρώπους και ασθενείς με τη νόσο του καρκίνου, εμφανίστηκαν σημαντικές αποκλίσεις στα αποτελέσματα των υγιών ασθενών όταν άλλαζαν τον ρυθμό εκπνοής τους [26].



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση της αρχής λειτουργίας ενός συστήματος e-nose [23]

1.3. Οξειδωτικό Στρες

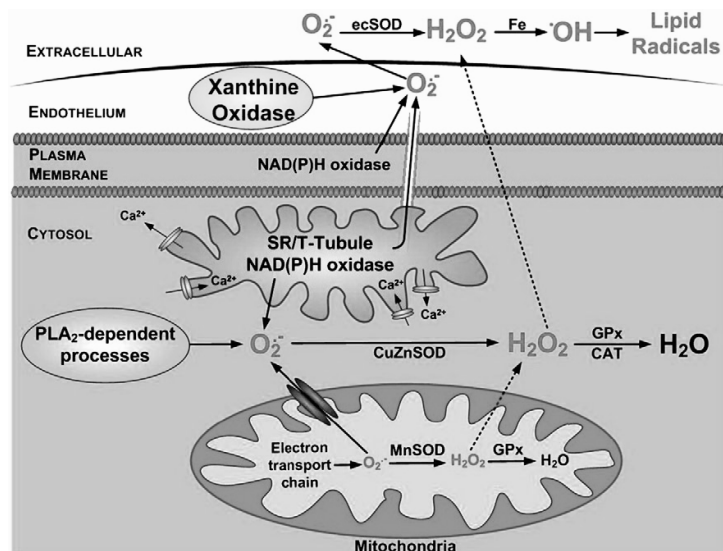
1.3.1. Το Οξειδωτικό Στρες στον Ανθρώπινο Οργανισμό

Στον ανθρώπινο οργανισμό, κατά τη πραγματοποίηση των μεταβολικών διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα, παράγονται συνεχώς ελεύθερες ρίζες, δηλαδή μόρια ή θραύσματα μορίων με ένα ή περισσότερα μη συζευγμένα ηλεκτρόνια. Οι ελεύθερες ρίζες που προκύπτουν από το οξυγόνο, αλλά και ενώσεις κοντινού οξειδωτικού χαρακτήρα όπως μερικές αζωτούχες ενώσεις, αποτελούν τις **Ενώσεις Αντιδρόντος Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS)**, οι οποίες διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη πορεία του Οξειδωτικού Στρες στον άνθρωπο [27]. Οι παραπάνω ενώσεις, όπως το υπεροξείδιο το οξυγόνου (H_2O_2), το υδροξύλιο ($OH\cdot$) ή το υπεροξεινιτρικό ($NO_3\cdot$) είναι υπεύθυνες για τη μεταφορά σημάτων εντός του σώματος και για την οργάνωση κρίσιμων φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών και για αυτό αποτελούν κρίσιμους παράγοντες για την ανάπτυξη παθολογικά ασταθών καταστάσεων και συνθηκών [28].

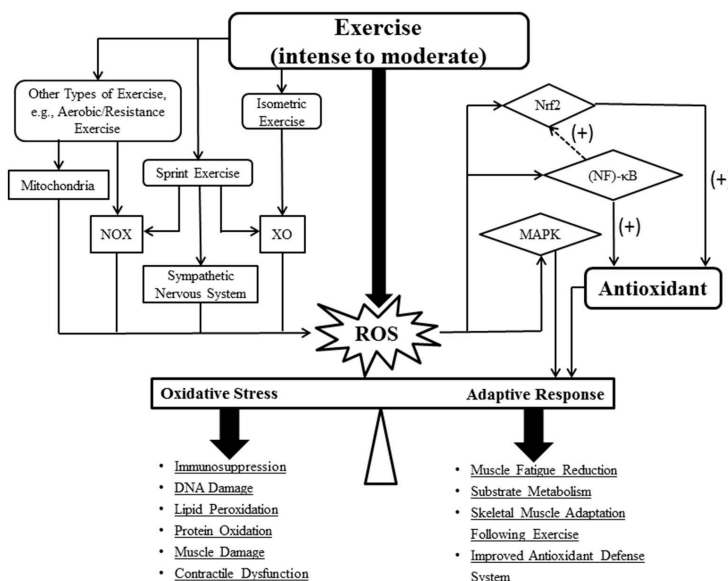
Στη ρυθμιστική δράση των ROS για τον ανθρώπινο οργανισμό, καίριο ρόλο διαδραματίζουν και οι αντιοξειδωτικές ενώσεις. Καθώς τα αεροβικά κύτταρα είναι ικανά να ελέγχουν τα ενδογενή επίπεδα των ROS μέσω αντιοξειδωτικών ενώσεων, επικράτησε η υπόθεση ότι ο οργανισμός στηρίζεται σε αυτά τα ασταθή μόρια για να μεταφέρει μοριακά σήματα [29]. Όταν υπάρχει ανισορροπία ανάμεσα του ρυθμού παραγωγής ROS με τον ρυθμό όπου ο οργανισμός είναι ικανός να τα αδρανοποιήσει, τότε προκαλείται **Οξειδωτικό Στρες (Oxidative Stress)** [30]. Σε κατάσταση Οξειδωτικού Στρες υπάρχει περίσσεια ROS η οποία προκαλεί φθορές στους ιστούς και στον οργανισμό, οι οποίες φθορές, μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρές κλινικές καταστάσεις όπως χρόνιες καρδιακές ασθένειες, καρκινικούς όγκους, νευρικές διαταραχές και μερικές δερματικές διαταραχές [31].

1.3.2. Οξειδωτικό Στρες προκαλούμενο από την σωματική άσκηση

Κατά την σωματική άσκηση απαιτείται ενέργεια, ενώ ταυτόχρονα πλήθος μοριακών σημάτων αποστέλλονται στους μυϊκούς ιστούς. Κατά την παραγωγή και κατανάλωση της απαιτούμενης ενέργειας που απαντάται στον ανθρώπινο σώμα υπό τη μορφή του ενεργειακού νομίσματος, της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), πραγματοποιούνται πλήθος βιοχημικών αντιδράσεων που οδηγούν στη παραγωγή ROS (Εικόνα 8). Η συνεχής και έντονη σωματική άσκηση μπορεί να οδηγήσει στη παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ROS με ρυθμό που μπορεί να προκαλέσει Οξειδωτικό Στρες, καταστρέφοντας μέσω οξειδωτικής δράσης τμήματα των αεροβικών κυττάρων, όπως τη λιπιδική διπλοστιβάδα, πρωτεΐνες του κυττάρου αλλά και το γενετικό υλικό που φυλάσσεται στον πυρήνα.



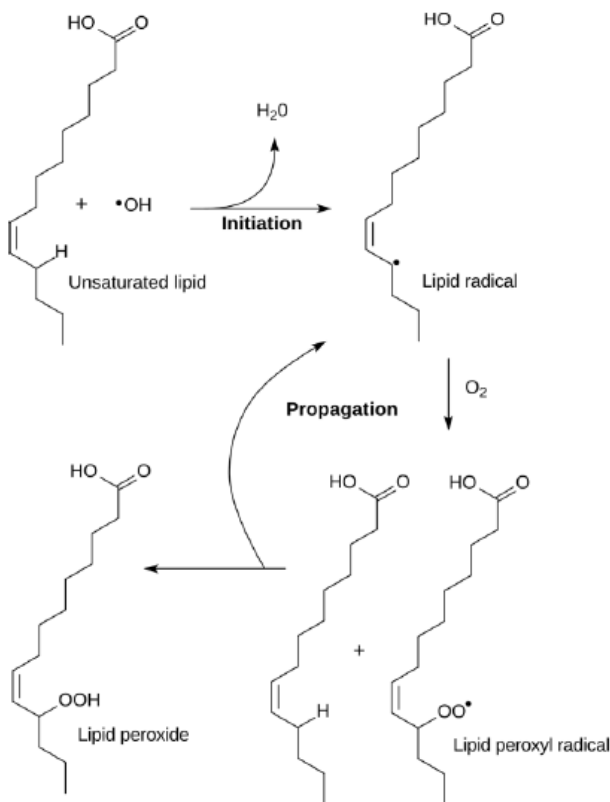
Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση της παραγωγής ROS κατά τη σωματική άσκηση [32]



Εικόνα 14: Διαγραμματική απεικόνιση της επίδρασης της σωματικής άσκησης στις μεταβολικές διεργασίες των αεροβικών κυττάρων [33]

1.3.3. Δείκτες του Οξειδωτικού Στρες στον Εκπνεόμενο Αέρα

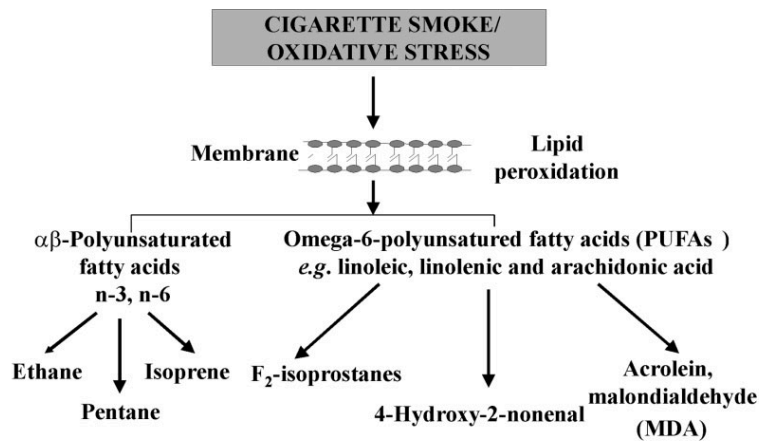
Κάθε ασθένεια ή καταπόνηση του οργανισμού μεταφράζεται από απόκλιση από τη φυσιολογική συμπεριφορά του οργανισμού σε συνέργεια με παραγωγή μεταβολιτών που υποδεικνύουν το δεδομένο πρόβλημα. Συνεπώς είναι φυσικό επόμενο να υπάρχουν πτητικές ενώσεις μεταβολικής προέλευσης στον εκπνεόμενο αέρα, ικανές να δώσουν πορίσματα για τα επίπεδα του Οξειδωτικού Στρες στον οργανισμό. Έπειτα από έρευνες, έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα του Οξειδωτικού Στρες μπορούν να εκτιμηθούν μέσω βιοδεικτών που προκύπτουν από την διεργασία **Λιπιδικής Υπεροξείδωσης (Lipid Peroxidation)**, καθώς η λιπιδική διπλοστιβάδα αποτελείται κυρίως από πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία οξειδώνονται εύκολα σε υπεροξείδια λιπιδίων, όπως το Αραχιδονικό, το Λινολεϊκό και το Λινολενικό Οξύ [29].



***Εικόνα 15:** Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας Λιπιδικής Υπεροξείδωσης του Παλμιτικού Λιπαρού Οξέως [29]*

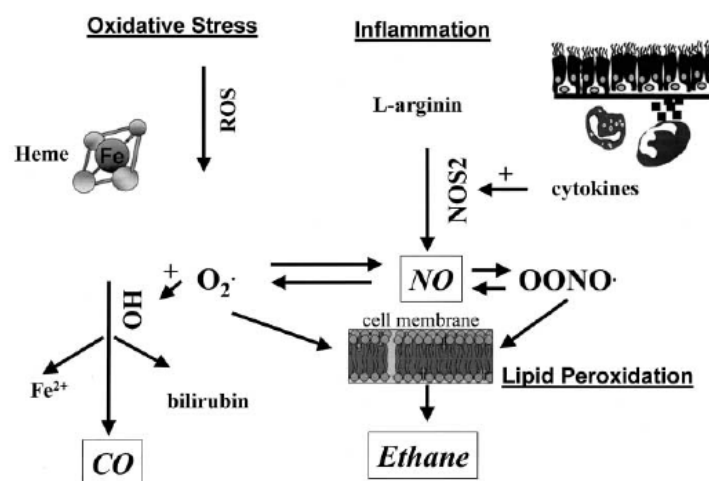
Είναι ευρέως γνωστό ότι τα υπεροξείδια λιπιδίων που προκύπτουν από την παραπάνω διεργασία, μετατρέπονται εύκολα σε υδρογονάνθρακες, αλδεϋδες και αλκοόλες [34]. Δύο ενώσεις μπορούν να χαρακτηριστούν ως τα κύρια τελικά προϊόντα της Λιπιδικής Υπεροξείδωσης, το **MDA** (Malondialdehyde) και το **4-HNE** (4-hydroxy-

2-nonenal). Πάρα αυτά, λόγω του δύσκολου εντοπισμού των παραπάνω 2 ενώσεων σε δείγματα εκπνεόμενου αέρα, έχουν προταθεί ως βιοδείκτες του Οξειδωτικού Στρες ενώσεις που συνδέονται άμεσα με τη Λιπιδική Υπεροξείδωση όπως το Αιθάνιο, το Πεντάνιο, η Προπανόλη, η Βουτανόλη, η Εξανάλη, η Οκτανάλη και η Νονανάλη.

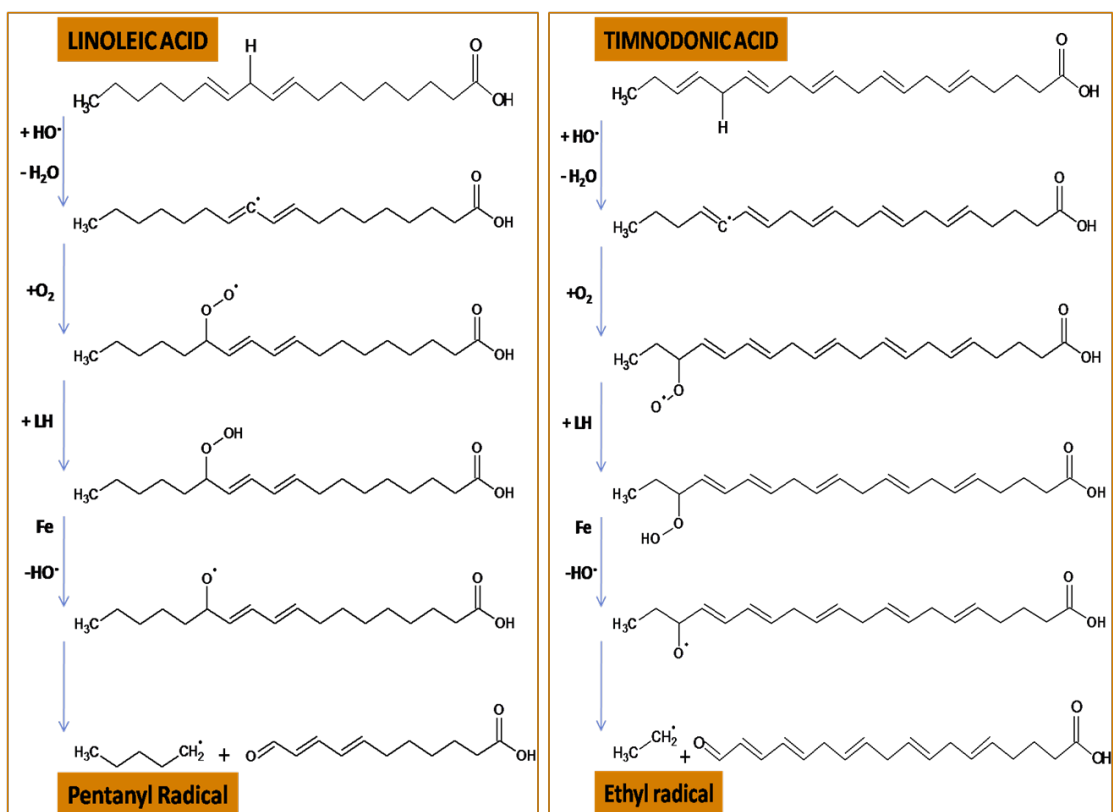


Εικόνα 16: Παραγωγή ΠΟΕ κατά τη Λιπιδική Υπεροξείδωση [35]

Πιο συγκεκριμένα, το **Πεντάνιο** αποτελεί παραπροϊόν της Λιπιδικής Υπεροξείδωσης του Λινολεϊκού Οξέως και χρησιμοποιείται εδώ και χρόνια ως δείκτης της Λιπιδικής Υπεροξείδωσης, υπό την υπόθεση ότι παράγεται αλλά δεν μεταβολίζεται παρακάτω. Όμως, σύγχρονες έρευνες έχουν παρουσιάσει ότι ο δεδομένος υδρογονάνθρακας μπορεί να μεταβολιστεί σε 2-πεντανόλη στο συκώτι, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν τόσο η παραγόμενη ποσότητα Πεντανίου, όσο και η ποσότητα που μεταβολίζεται [34].



Εικόνα 17: Παραγωγή ΠΟΕ κατά το Οξειδωτικό Στρες και φλεγμονές [36]



Εικόνα 18: Παραγωγή Πεντανίου και Αιθανίου κατά τη Λιπιδική Υπεροξειδωση [34]

Κατά αντιστοιχία, το Αιθάνιο έχει λάβει ιδιαίτερη προσοχή από την επιστημονική κοινότητα λόγω της εύκολης και γρήγορης Χρωματογραφικής του μέτρησης σε σχέση με άλλους υδρογονάνθρακες [36].

Σε συνέργεια με όσους βιοδείκτες αναφέρθηκαν, οι Philips et al. είχαν προτείνει σε έρευνα τους το 2000 ότι το σύνολο των Alveolar Gradient των ενώσεων από C4 έως και C20, καθώς και τα μονομεθυλωμένα αλκάνια ανάμεσα σε αυτούς, μπορούν να αποτελέσουν ικανοποιητικούς δείκτες του οξειδωτικού στρες [37]. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 3) αναφέρονται μερικές από τις ουσίες των οποίων το συνολικό Alveolar Gradient μπορεί να υποδείξει μεταβολή του οξειδωτικού στρες στις ηλικίες 9-31 [37].

Πίνακας 3: Πιθανοί βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες για άτομα από 9-31 ετών [37]

1. Butane 2-methyl	2. Pentane	3. Isoprene	4. Pentane 2-methyl
5. Pentane 3-methyl	6. Hexane	7. Hexane 2-methyl	8. Hexane 3-methyl
9. Heptane	10. Heptane 4-methyl	11. Octane	12. Octane 4-methyl

1.3.4. Έλεγχος του Οξειδωτικού Στρες μέσω κατανάλωσης Αντιοξειδωτικών

Είναι προφανές ότι για τον έλεγχο του Οξειδωτικού Στρες θα πρέπει να ενισχυθεί ο οργανισμός με αντιοξειδωτικές ουσίες, ώστε να μην υπάρχει περίσσεια ROS, προκαλώντας ζημιές επί των μυϊκών ιστών και του οργανισμού. Η παραπάνω αντίληψη αποτελεί αντικείμενο συζήτησης μέχρι και σήμερα, αναφορικά με την αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων στην βελτίωση της υγείας. Πιο συγκεκριμένα, έχει γίνει λόγος ότι τα αντιοξειδωτικά θα πρέπει να χορηγούνται μόνο σε ανθρώπους που εμφανίζουν έλλειμα στη παραγωγή αντιοξειδωτικών στον οργανισμό τους (Halliwell 2000). Βάσει του παραπάνω λόγου, έχει αποδειχθεί σε μελέτη ότι η κατανάλωση αντιοξειδωτικών σε ανθρώπους με έλλειμα σε αυτά μπορεί να οδηγήσει στην απόδοση εργογενικών φαινομένων μετά τη χορήγηση, προκαλώντας εργογενική βοήθεια [38].

1.4. Σπιρουλίνα και Αντιοξειδωτική δράση

1.4.1. Γενικά

Η *Spirulina platensis* και *maxima* συνιστούν μικροφύκη τα οποία, λόγω της υψηλής τους διατροφικής αξίας σε πρωτεΐνη, αποτελούν μια από τις πρώτες επιλογές στην επιλογή Συμπληρωμάτων Διατροφής. Λόγω της πολύ υψηλής της διατροφικής αξίας, αποτελούσε το συμπλήρωμα μεγάλων Ολυμπιακών συμμετοχών, καθώς πέρα από την υψηλή του πρωτεϊνική σύσταση, συνιστά πηγή απαραίτητων αμινοξέων, γ-Λινολενικού οξέος, Λινολεϊκού οξέος, καροτενίων ενώ έχουν γίνει λόγοι για τη περιεκτικότητά της σε βιοδραστικά συστατικά [39]. Τα τελευταία χρόνια, έχουν γίνει εκτενείς μελέτες γύρω από την αντιοξειδωτική δράση της Σπιρουλίνας για καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες [40].

1.4.2. Βιοδραστικά συστατικά Σπιρουλίνας

Η Σπιρουλίνα, στη μη επεξεργασμένη της μορφή, περιέχει κατά 30% λιπίδια, καθιστώντας την πηγή πολύ-ακόρεστων λιπαρών οξέων όπως του **DHA** (Docosahexaenoic Acid), το οποίο εμφανίζει αντιοξειδωτική δράση, ενώ προσφέρει και βελτίωση στις νευρικές απολήξεις του εγκεφάλου. Επιπρόσθετα, στη Σπιρουλίνα περιέχονται **Φαινολικές** ενώσεις οι οποίες μέσω ερευνών έχουν αποδείξει την άμεση συσχέτισή τους με την αντιοξειδωτική δράση της Σπιρουλίνας [41]. Ειδικά, η Σπιρουλίνα περιέχει ρ-κουμαρικό και φερουλικό οξύ, τα οποία είναι γνωστά αντιοξειδωτικά και χρησιμοποιούμενα στη Βιομηχανία [41]. Οι υψηλές συγκεντρώσεις σε πρωτεϊνικά συστατικά είναι ένας από τους λόγους που τα μικροφύκη λαμβάνουν ιδιαίτερη προσοχή από τη βιομηχανία τροφίμων. Η Σπιρουλίνα περιέχει μια ομάδα πρωτεϊνών που ονομάζονται **Φυκοβιλιπρωτεΐνες**, οι οποίες είναι γνωστές για την αντιφλεγμονώδη, την ανοσορρυθμιστική, την αντικαρκινική και την αντιοξειδωτική τους δράση [42].

Πίνακας 4: Σύσταση εμπορικών συμπληρωμάτων διατροφής Spirulina platensis [43]

Spirulina platensis ingredients	Content (per gram)
Total protein	550-670 mg
Total fat	60-80 mg
Total fiber	20-60 mg
chlorophyll	15 mg
Total ash	60-80 mg
carbohydrate	120-200 mg
Moisture	40-60 mg
Beta Carotene	2.58 mg
Vitamin E	0.066 mg
Niacin	0,16 mg
Phosphorus	9.14 mg
Sodium	1.86 mg
Calcium	1.71 mg
Magnesium	2.6 mg
Potassium	17.7 mg
Iron	0.75 mg
Zinc	0.05 mg
Vitamin B1	48 mg
Vitamin B2	42 mg
Vitamin B6	7 mg
Vitamin B12	2.3 mg
Biotin	0.25 mg
Folic Acid	0.61 mg

1.4.3. Ασκησιογόνο Οξειδωτικό Στρες και κατανάλωση συμπληρωμάτων Σπιρουλίνας

Κατά την σωματική άσκηση όπως αναφέρθηκε, το σώμα βρίσκεται σε ανάγκη για αντιοξειδωτικές ουσίες λόγω του μεγάλου ρυθμού παραγωγής ROS. Η δεδομένη παρατήρηση έχει οδηγήσει πολλούς ανθρώπους από το χώρο του αθλητισμού στη κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής, τα οποία δύναται να βελτιώσουν τους ρυθμούς ανάκαμψής τους έπειτα από προπονήσεις αλλά και να βελτιώσουν την μυϊκή τους απόδοση. Πιο συγκεκριμένα, έρευνα σε 16 αθλητές ορφανοτροφείου του Nagpur της Ινδίας η οποία έλαβε έκταση 3 εβδομάδων, έδειξε ότι η καθημερινή κατανάλωση Σπιρουλίνας οδήγησε σε αύξηση της αντίστασης του οργανισμού σε μυϊκές ζημιές, αλλά και σε αύξηση του χρόνου εξάντλησης όταν τους ζητήθηκε να αποδώσουν μέχρι τελικής εξαντλήσεως, βελτιώνοντας τις επιδόσεις τους [44].

2. Πειραματικό Μέρος

2.1. Στόχοι και Σύνοψη της Πειραματικής Εργασίας

Στόχοι της παρούσας πειραματικής εργασίας είναι:

- *Η μελέτη της επίδρασης της λήψης συμπληρώματος Σπιρουλίνας ως προς το ασκησιογόνο οξειδωτικό στρες, μέσω της αξιολόγησης βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες στον εκπνεόμενο αέρα.*
- *Η αξιολόγηση της μεθόδου ανάλυσης των ΠΟΕ του εκπνεόμενου αέρα ως μέθοδος παρακολούθησης του ασκησιογόνου οξειδωτικού στρες.*

Για την επίτευξη των παραπάνω στόχων, πραγματοποιήθηκε συνεργασία με το Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής της Σχολής Επιστημών Υγείας και Αγωγής του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου, στο οποίο και πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες εκπνεόμενου αέρα σε εθελοντές.

Συνοπτικά, για την μελέτη του ασκησιογόνου οξειδωτικού στρες επιλέχθηκαν εθελοντές οι οποίοι μετά από μια πρώτη δειγματοληψία εκπνεόμενου αέρα που θα χρησιμοποιούνταν ως γραμμή βάσης, κατανάλωσαν για 15 ημέρες Σπιρουλίνα ως συμπλήρωμα διατροφής. Μετά το πέρας των 15 ημερών οι εθελοντές επέστρεψαν στον χώρο δειγματοληψίας, όπου και έδωσαν δείγμα του εκπνεόμενου αέρα τους πριν, αλλά και μία ώρα μετά την επιβολή του πρωτοκόλλου σωματικής άσκησης, το οποίο θα οδηγούσε στη πρόκληση ασκησιογόνου στρες. Έπειτα, για να ελεγχθεί η πορεία του ασκησιογόνου οξειδωτικού στρες στον οργανισμό των εθελοντών, έδωσαν δείγμα στις 24 και στις 48 ώρες μετά την επιβολή της άσκησης. Βάσει της πορείας – τάσης του Alveolar Gradient των πιθανών βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες στον εκπνεόμενο αέρα συναρτήσει του χρόνου, πραγματοποιήθηκε προσπάθεια ώστε να δοθεί μια απάντηση σχετικά με την βιοδραστική και αντιοξειδωτική δράση της Σπιρουλίνας, καθώς και τους υπόλοιπους πειραματικούς στόχους της εργασίας.

2.2. Προετοιμασία των Εθελοντών και Δειγματοληψία

2.2.1 Κριτήρια Επιλογής Εθελοντών, Προετοιμασία και Ηθικά

Θέματα

Οι εθελοντές που συμμετείχαν επιλέχθηκαν βάσει ορισμένων κριτηρίων. Έπρεπε να είναι υγιείς, μη καπνιστές κατά τα τελευταία 2 χρόνια με μέτριο κινητικό προφίλ χωρίς συστηματική συμμετοχή σε προπονήσεις, 19 με 35 ετών. Αποκλείστηκαν εθελοντές που εμφάνιζαν χρόνιες παθήσεις όπως χρόνια φλεγμονώδη νόσο, αυτοάνοσα νοσήματα, καρκίνο, καρδιακή ανεπάρκεια και καρδιαγγειακή νόσο. Κριτήριο αποκλεισμού αποτέλεσε και η λήψη αντιφλεγμονωδών, αντιαιμοπεταλιακών φαρμάκων, ασπιρίνης, ινσουλίνης, υπολιπιδαιμικής αγωγής και συμπληρωμάτων διατροφής.

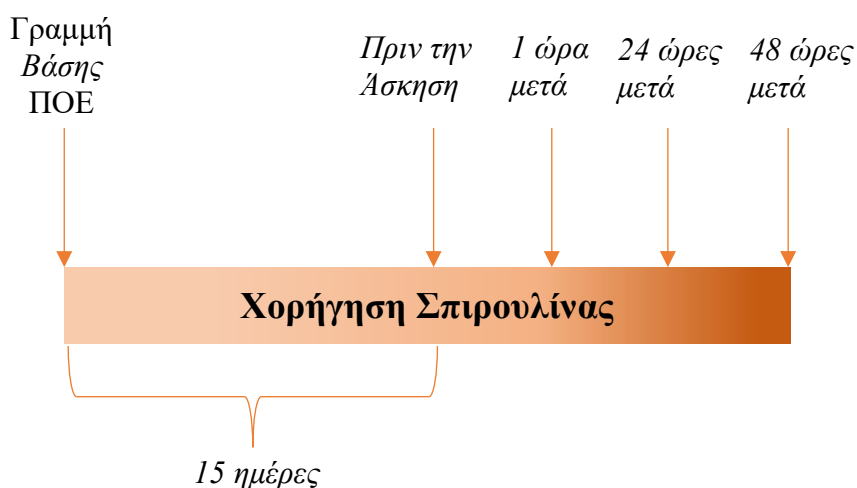
Την ημέρα δειγματοληψίας εκπνεόμενου αέρα, καθώς και το προηγούμενο βράδυ, οι συμμετέχοντες θα έπρεπε πέρα από δωδεκάωρη νηστεία, να έχουν πλύνει τα δόντια τους μόνο με αλατόνερο, καθώς επίσης και να είχαν αποφύγει τη χρήση κολόνιας, λοσιόν ξυρίσματος, καλλυντικών και άλλων προϊόντων περιποίησης με έντονη οσμή.

Τονίζεται ότι δεν υπήρχαν πιθανοί κίνδυνοι για τους συμμετέχοντες. Εφαρμόστηκαν όλοι οι κανόνες ηθικής και δεοντολογίας βάσει της διακήρυξης του Ελσίνκι (1964). Οι εθελοντές που συμμετείχαν στην μελέτη είχαν δώσει ενυπόγραφα την συγκατάθεσή τους, κατόπιν ενημέρωσης, ενώ είχαν διασφαλισθεί ότι θα τηρηθεί η ανωνυμία, εξασφαλίζοντας τα προσωπικά δεδομένα του εκάστοτε συμμετέχοντα.

2.2.2. Χορήγηση Συμπληρώματος Διατροφής

Στους συμμετέχοντες χορηγήθηκε είτε η εμπορικά διαθέσιμη *Spirulina Nigrita*® σε κάψουλες του 1 g, είτε εικονικό σκεύασμα της βρώσιμης *Μαλτοδεξτρίνης* σε κάψουλες του 1 g. Ο κάθε εθελοντής καταλάωνε 5 g/ day από το συμπλήρωμα ή το εικονικό σκεύασμα για 15 μέρες πριν το κάθε πρωτόκολλο άσκησης και για τρεις μέρες μετά το κάθε πρωτόκολλο άσκησης. Η χορήγηση γινόταν με το πρωινό όπου καταλάωνε 3 κάψουλες και με το βραδινό γεύμα όπου καταλάωνε 2 κάψουλες.

Σημειώνεται ότι η ποσότητα Σπιρουλίνας που χορηγήθηκε είναι απολύτως ασφαλής για τους εθελοντές, καθώς σε έρευνες έχουν χορηγηθεί πολύ μεγαλύτερες ποσότητες ημερήσιας κατανάλωσης Σπιρουλίνας με μηδενικές παρενέργειες επί των εθελοντών [44].



Εικόνα 20: Χρονοδιάγραμμα της πειραματικής εργασίας

2.2.3. Πρωτόκολλο σωματικής άσκησης για την επιβολή Οξειδωτικού Στρες

Για την επίτευξη συνθηκών οξειδωτικού στρες, οι συμμετέχοντες υποβλήθηκαν σε σωματική άσκηση στο εργαστήριο εργοφυσιολογίας του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής μετά από δωδεκάωρη νηστεία. Μετά από ολιγόλεπτη προθέρμανση και ορισμένες διατάξεις οι εθελοντές ακολούθησαν συγκεκριμένο πρωτόκολλο άσκησης με τη βοήθεια ισοκινητικού δυναμομέτρου το οποίο βρίσκεται στους χώρους του εργαστηρίου εργοφυσιολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου (Εικόνα 20).



*Εικόνα 21: Όργανο ισομετρικής μυϊκής συστολής BIODEX System 3 PRO (αριστερά),
Εφαρμογή πρωτοκόλλου άσκησης σε εθελοντή (δεξιά)*

Το πρωτόκολλο περιλάμβανε 80 μέγιστες εκκεντρικές μυϊκές συστολές, σε 10 σετ των 8 επαναλήψεων, των καμπτήρων μυών του αγκώνα του μη επιδέξιου χεριού. Ο δοκιμαζόμενος καλούνταν να αντισταθεί με όλη του τη δύναμη στην κίνηση του βραχίονα του δυναμομέτρου το οποίο θα εξανάγκαζε τελικά το άνοιγμα της άρθρωσης του αγκώνα μεταξύ προεπιλεγμένων θέσεων που ορίζονταν στην αρχή της άσκησης. Σε κάθε εκκεντρική συστολή, το εύρος της κίνησης ήταν 90° με αρχική γωνία του αγκώνα τις 110° και τελική τις 20°, ενώ η γωνιακή ταχύτητα του 30°/ sec. Μεταξύ δύο

διαδοχικών επαναλήψεων του ιδίου σετ δινόταν στον δοκιμαζόμενο μικρό χρονικό διάστημα ξεκούρασης, σχεδόν 10 δευτερολέπτων. Μετά την πραγματοποίηση κάθε σετ ο συμμετέχοντας είχε 1 λεπτό ξεκούρασης. Σημειώνεται πώς για την αποφυγή απρόοπτων τραυματισμών, την έναρξη κάθε εκκεντρικής συστολής την έδινε πάντοτε ο δοκιμαζόμενος.

Η δεδομένη μέθοδος επιλέχθηκε έναντι άλλων μεθόδων παραγωγής ROS, καθώς επιφέρει υψηλή αξιοπιστία και επαναληψιμότητα. Πιο συγκεκριμένα θα μπορούσε να προκληθεί οξειδωτικό στρες και μέσω αερόβιας άσκησης σε διάδρομο, αλλά το αποτέλεσμα θα ήταν σαφώς ασθενέστερο λόγω της καθημερινής κόπωσης των μυών των γλουτιαίων στον μέσο συμμετέχοντα. Επιλέγοντας την έκκεντρη άσκηση του μη επιδέξιου χεριού του συμμετέχοντα αυξάνεται η αξιοπιστία της μεθόδου, λόγω βέβαιης φλεγμονής.

2.3. Δειγματοληψία Εκπνεόμενου Αέρα

2.3.1. Διαδικασία καθαρισμού και προετοιμασίας αναλωσίμων

Για τη συλλογή των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα από τους εθελοντές, έγινε χρήση σάκων Tedlar® 5 L. Επιδιώχθηκε ο κάθε εθελοντής να χρησιμοποιεί σάκους στους οποίους έχει γίνει αποκλειστική δειγματοληψία του δικού του εκπνεόμενου αέρα.

Για τον καθαρισμό ενός αχρησιμοποιήτου σάκου Tedlar®, γινόταν πλήρωση του εσωτερικού του με αέριο Άζωτο καθαρότητας 99.999% και στη συνέχεια, το περιεχόμενο απομακρύνονταν εντός εργαστηριακού απαγωγού, τηρώντας ταυτόχρονα όλα τα μέτρα ατομικής προστασίας του εργαστηριακού χώρου. Για τον βέλτιστο καθαρισμό, η διαδικασία καθαρισμού εκτελείτο 4 φορές για κάθε σάκο.

Σημειώνεται ότι λόγω της πανδημίας του ιού COVID-19, επιπλέον μέτρα λήφθηκαν για τον καθαρισμό σάκων Tedlar® που είχαν χρησιμοποιηθεί, καθώς ο εκπνεόμενος αέρα αποτελεί βιολογικό δείγμα. Οι χρησιμοποιημένοι σάκοι του κάθε εθελοντή, οδηγούνταν σε εργαστηριακό φούρνο, όπου και θερμαίνονταν στους 65°C για 2 ώρες. Η δεδομένη θερμοκρασία αποτελεί μια ασφαλής επιλογή, τόσο για την καταστροφή του ιού [45], όσο και για την υλική φθορά των σάκων. Μετά το πέρας των

2 ωρών, απομακρύνονται το υπόλειμμα εκπνεόμενου αέρα εντός εργαστηριακού απαγωγού και πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία καθαρισμού που αφορούσε και τους αχρησιμοποίητους σάκους.

Για τον καθαρισμό των προσροφητικών σωλήνων, αναπτύχθηκε πρωτόκολλο καθαρισμού μέσω θερμο-προγραμματισμού του TDU. Ο σωλήνας προς καθαρισμό εισάγεται στο TDU και η ροή του He ορίζεται στα 80-90 mL/ min. Το He ρέει διαμέσου του σωλήνα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ούτως ώστε να απομακρυνθούν ενώσεις που θα μπορούσαν να βλάψουν το σύστημα του TDU ή το προσροφητικό υλικό των σωλήνων σε υψηλές θερμοκρασίες. Μετά το πέρας των 5 λεπτών, ο σωλήνας θερμαίνεται στους 320 °C για 25 λεπτά, ούτως ώστε να εκροφηθούν όσες ενώσεις έχουν προσροφηθεί και απομακρύνονται με τη ροή του φέροντος αερίου.

Για την ευκολότερο εντοπισμό των πιθανών βιοδεικτών κατά την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων, αλλά και για την κανονικοποίηση των αποκρίσεων του MS για καλύτερη επαναληψιμότητα και ακρίβεια των μετρήσεων, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Εσωτερικού Προτύπου (IS). Ο προσροφητικός σωλήνας τοποθετείται σε ειδική συσκευή, η οποία επιτρέπει την ροή He διαμέσου αυτού. Η ροή ορίζεται στα 100 mL/ min και με σύριγγα των 2 μ L γίνεται ένεση 1 μ L *Chlorobenzene-d₅*. Μετά την ένεση, η ροή του He διατηρείται για 3 λεπτά ώστε το εσωτερικό πρότυπο να μεταφερθεί ομοιόμορφα εντός του σωλήνα. Τόσο μετά τον καθαρισμό των σωλήνων, όσο και μετά την ένεση εσωτερικού προτύπου, οι σωλήνες αποθηκεύονται εντός ψυγείου, περιτυλιγμένοι σε αλουμινόχαρτο, το οποίο αποτρέπει την διάχυση πτητικών ενώσεων στο εσωτερικό των σωλήνων.



Εικόνα 22: Σύστημα εισαγωγής του εσωτερικού προτύπου στους προσροφητικούς σωλήνες της μελέτης

2.3.2. Πρωτόκολλο λήψης δειγμάτων Εκπνεόμενου Αέρα και Χώρου

Δειγματοληψίας

Ο εθελοντής φθάνει στο εργαστήριο εργοφυσιολογίας του Τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, όπου θα λάβει χώρα το πρωτόκολλο της επιβολής ασκησιογόνου οξειδωτικού στρες και η δειγματοληψία εκπνεόμενου αέρα. Παραμένει σε αυτόν για μισή ώρα πριν τη δειγματοληψία ούτως ώστε να επέλθει εξισορρόπηση των εξωγενών οργανικών πτητικών ενώσεων στο αναπνευστικό του σύστημα.

Μετά το πέρας της μισής ώρας, δίνεται στον εθελοντή προσωπικό σωληνάκι Teflon, απολυμασμένο με αιθανόλη 95°. Συνδέει το σωληνάκι στην Tedlar® και, εισπνέοντας από την μύτη και εκπνέοντας από το στόμα, συλλέγει στη σακούλα το δείγμα του εκπνεόμενου αέρα του. Αφού βεβαιωθεί από τον εκάστοτε υπεύθυνο ότι έχουν συλλεχθεί τουλάχιστον 3 L δείγματος στην σακούλα, δίνεται ευγενική νουθέτηση στον εθελοντή να σταματήσει να εκπνέει εντός του σάκου. Το δείγμα φυλάσσεται στην Tedlar® μέχρι περαιτέρω μεταφορά.



Εικόνα 23: Δειγματοληψία εκπνεόμενου αέρα από εθελοντή

Όσο ο εθελοντής δίνει δείγμα εκπνεόμενου αέρα, ο υπεύθυνος έχει φροντίσει να συλλεχθεί δείγμα αέρα του εργαστηρίου εργοφυσιολογίας, ούτως ώστε να μπορεί να υπολογισθεί το Alveolar Gradient. Πιο συγκεκριμένα, συνδέεται σε ηλεκτρική αντλία

αερίων προσροφητικός σωλήνας και μέσω της αντλίας περνάνε διαμέσου του σωλήνα 3 L του περιβάλλοντος αέρα. Η ροή του αέρα διαμέσου του σωλήνα είναι 200 mL/ min και η διαδικασία διαρκεί 15 λεπτά. Μόλις ολοκληρωθεί η συλλογή του δείγματος αέρα του εργαστηρίου, ο σωλήνας περιτυλίσσεται με αλουμινόχαρτο και φυλάσσεται σε δοχείο με παγίδες υγρασίας το οποίο ψύχεται εξωτερικά από παγοκύστες και βρίσκεται εντός ισοθερμικού σάκου μεταφοράς.

Τα δείγματα αέρα των εθελοντών που έχουν συλλεχθεί σε Tedlar® πρέπει να συμπυκνωθούν και για το λόγο αυτό μεταφέρονται σε προσροφητικούς σωλήνες. Ο σάκος συνδέεται με τον προσροφητικό σωλήνα ο οποίος συνδέεται με την ηλεκτρική αντλία (Εικόνα 24). Τότε ο υπεύθυνος ξεκινά την λειτουργία της αντλίας, μεταφέροντας 200 mL δείγματος εκπνεόμενου αέρα το λεπτό, έως ότου έχουν μεταφερθεί διαμέσου του σωλήνα 3 L δείγματος. Μόλις ολοκληρωθεί η μεταφορά του δείγματος από την Tedlar® στον σωλήνα, αυτός περιτυλίσσεται με αλουμινόχαρτο και φυλάσσεται στο ίδιο δοχείο όπου φυλάσσονται και τα δείγματα αέρα του εργαστηρίου. Ο σάκος φυλάσσεται και καθαρίζεται βάσει του αντίστοιχου πρωτοκόλλου στο Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.



Εικόνα 24: Συνδεσμολογία μεταφοράς του δείγματος εκπνεόμενου αέρα από την Tedlar® στον προσροφητικό σωλήνα

2.4. Ανάλυση Εκπνεόμενου Αέρα

2.4.1. Οργανολογία

Για την ανάλυση των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα ή των δειγμάτων αέρα του εργαστηριακού χώρου, επιλέχθηκε η προσέγγιση της **Off-line** ανάλυσης, με τη χρήση Μονάδος Θερμικής Εκρόφησης (TDU, *Markes Unity 2*), Αερίου Χρωματογράφου (GC, *Shimadzu 2010 GC*) για διαχωρισμό των ενώσεων και Φασματογράφου Μάζας (MS, *Agilent Technologies 5975C*) για ταυτοποίηση των ΠΟΕ.



Εικόνα 25: Το σύστημα TDU-GC-MS που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις στη Σχολή Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ

2.4.2. Πειραματικές Συνθήκες

Στην αρχή εισάγεται στο TDU ο εκάστοτε σωλήνας προς ανάλυση στην θέση του φούρνου του οργάνου. Η ροή του He στο Split του TDU ορίζεται στα 3 mL/ min και για λόγους ασφαλείας κατά την ανάλυση, για να μην χαθεί το δείγμα σε περίπτωση διακοπής ρεύματος ή για δεύτερη ανάλυση του ίδιου δείγματος τοποθετείται καθαρός σωλήνας ανάκτησης δείγματος, χωρίς εσωτερικό πρότυπο, στην αντίστοιχη θέση του οργάνου (Recollection Tube).



Εικόνα 26: Κάτωψη του TDU που χρησιμοποιήθηκε: (Α) Φούρνος, (Β) Κρυοπαγίδα, (Γ) Θύρα κατακράτησης ΠΟΕ

Κατά την εκκίνηση της ανάλυσης, ρέει για 5 λεπτά μια ποσότητα He διαμέσου του συστήματος ούτως ώστε να απομακρυνθούν επιβλαβείς ενώσεις για το TDU, το GC και το MS όπως το O₂ σε υψηλές συγκεντρώσεις. Στη συνέχεια ο σωλήνας θερμαίνεται στους 200 °C για 20 λεπτά, οι ΠΟΕ εκροφώνται και μεταφέρονται στην κρυοπαγίδα, η οποία βρίσκεται στους -10 °C, στην οποία παγιδεύονται οι ΠΟΕ προς ταυτοποίηση. Έπειτα, για 1 λεπτό ρέει He στη κρυοπαγίδα για τον ίδιο λόγο που ρέει και στην αρχή της εκρόφησης από τον σωλήνα και τελικά η κρυοπαγίδα θερμαίνεται απότομα στους 220 °C για 5 λεπτά, ούτως ώστε η εισαγωγή των ΠΟΕ στον Χρωματογράφο να παρομοιάζεται με στιγμιαία παλμική επιβολή. Μόλις εισαχθεί ο στιγμιαίος παλμός στον Χρωματογράφο, ενεργοποιείται ο θερμοπρογραμματισμός του και μετά από έναν χρόνο καθυστέρησης 5 λεπτών, για να αποφευχθεί η απότομη αύξηση της τάσης στο Filament του MS από παρουσία O₂, ξεκινά ο σχεδιασμός του Χρωματογραφήματος. Οι θερμοπρογραμματισμοί, καθώς και πληροφορίες των οργάνων παρατίθενται στο ***Παράρτημα.***

2.4.3. Ανάλυση Προτύπων Δειγμάτων

Για την ταυτοποίηση των αναζητούμενων αλκανίων, τα οποία μπορεί να αποτελούν πιθανούς δείκτες του οξειδωτικού στρες, έγινε ανάλυση προτύπου μίγματος παραφινών, της εταιρίας Supelco με SKU 44585-U. Βάσει του MSDS που παρέχει ο υπεύθυνος προμηθευτής του δελτίου δεδομένων ασφαλείας, το μίγμα περιείχε n-Pentane, n-Hexane, n-Heptane, n-Octane, n-Nonane, n-Decane, n-Undecane, n-Dodecane, n-Tridecane, n-Tetradecane, n-Pentadecane.

2.5. Αποτελέσματα Πειραματικής Εργασίας

Από την συνολική πειραματική διαδικασία, αναλύθηκαν τα δείγματα εκπνεόμενου αέρα 2 εθελοντών, καθώς οι συνθήκες της πανδημίας του ιού COVID-19, μετά το πρώτο άνοιγμα των ερευνητικών δραστηριοτήτων των πανεπιστημίων, κατέστησαν υποχρεωτικό το κλείσιμο αυτών που διεξάγουν έρευνες με βιολογικά δείγματα για πάυση της διασποράς του ιού. Οι εθελοντές κατάφεραν να ολοκληρώσουν τον πρώτο κύκλο μετρήσεων, κατά τον οποίο χορηγήθηκε και στους 2 Σπιρουλίνα για 15 ημέρες και 2 ημέρες μετά την άσκηση.

Η ταυτοποίηση των κορυφών έγινε χειροκίνητα, με χρήση της βιβλιοθήκης φασμάτων Wiley. Όσες ενώσεις ταυτοποιήθηκαν, είχαν συντελεστή ομοιότητας τουλάχιστον ίσο ή μεγαλύτερο από 85% με την προτεινόμενη ένωση της βιβλιοθήκης. Στη συνέχεια, το εμβαδόν των κορυφών των ταυτοποιημένων ενώσεων βρέθηκε μέσω υπολογιστικής ολοκλήρωσης που προσέφερε το πρόγραμμα ανάλυσης δεδομένων του MS.

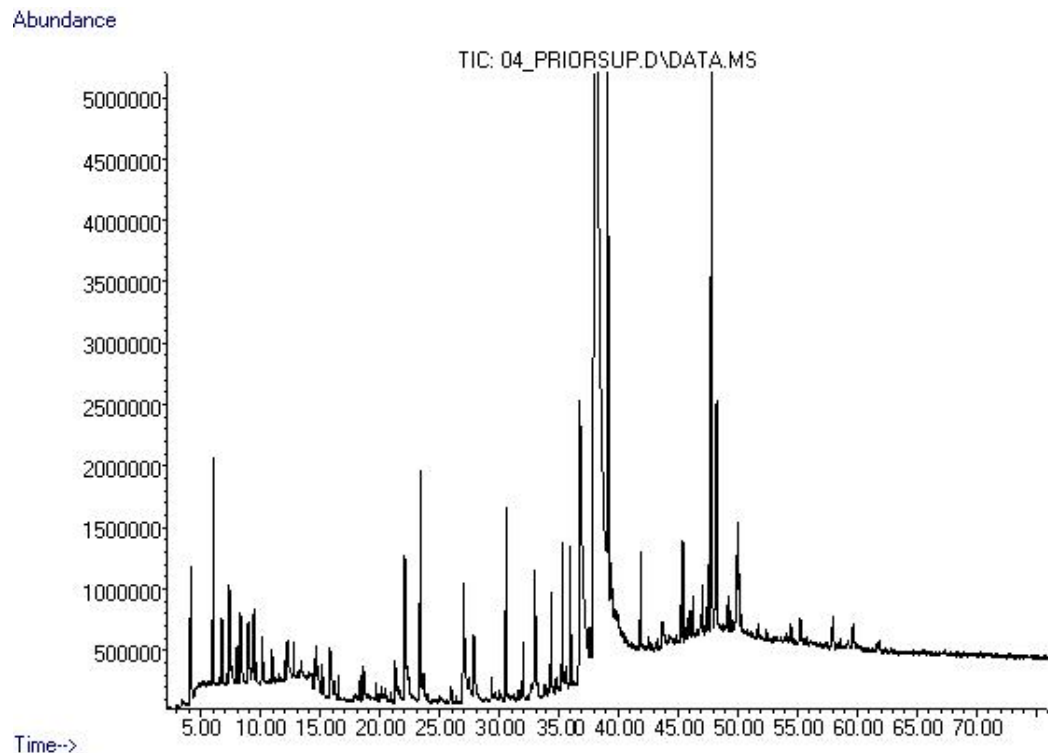
Για την ελαχιστοποίηση των πιθανών σφαλμάτων που θα μπορούσαν να προκύψουν τόσο κατά την χειροκίνητη ταυτοποίηση, όσο και κατά την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων, αντί του χρόνου ανάλυσης και του εμβαδού των ταυτοποιημένων κορυφών, χρησιμοποιήθηκαν οι μεταβλητές Σχετικός Χρόνος Ανάλυσης και το Σχετικό Εμβαδό Κορυφής. Οι παραπάνω μεταβλητές προκύπτουν από τη κανονικοποίηση του χρόνου ανάλυσης και του εμβαδού κορυφής της κάθε ουσίας, προς το αντίστοιχο μέγεθος του εσωτερικού προτύπου. Με αυτή τη μεθοδολογία εξισορροπείται η πιθανή μεταβολή της απόκρισης του MS μεταξύ

μετρήσεων που έχουν πραγματοποιηθεί σε διαφορετικές μέρες, καθώς οι συνθήκες λειτουργίας του MS δεν είναι συνεχώς σταθερές. Επίσης σταθεροποιείται ο αναμενόμενος χρόνος έκλουσης των μελετώμενων ΠΟΕ, ανεξαρτήτως της διαφοράς πίεσης εντός της Χρωματογραφικής Στήλης η οποία θα οδηγούσε σε μη σταθερούς χρόνους ανάσχεσης.

Κάτω από κάθε χρωματογράφημα βρίσκεται ο συγκεντρωτικός πίνακας δεδομένων για τις ταυτοποιήσιμες κορυφές, δίνοντας δεδομένα για τον **χρόνο ανάσχεσης** (Retention Time), τον **σχετικό χρόνο ανάσχεσης** (Relative Retention Time) ως προς το εσωτερικό πρότυπο, το **εμβαδό της κορυφής** (Area) και το **σχετικό εμβαδό της κορυφής** (Relative Area) προς το εμβαδό της κορυφής του εσωτερικού προτύπου.

Βάσει της μεταβλητής του Σχετικού Εμβαδού Κορυφής, υπολογίζεται το Alveolar Gradient για κάθε εθελοντή, συναρτήσει του χρόνου. Ο υπολογισμός προκύπτει από την Σχέση A (βλ. σελ.10).

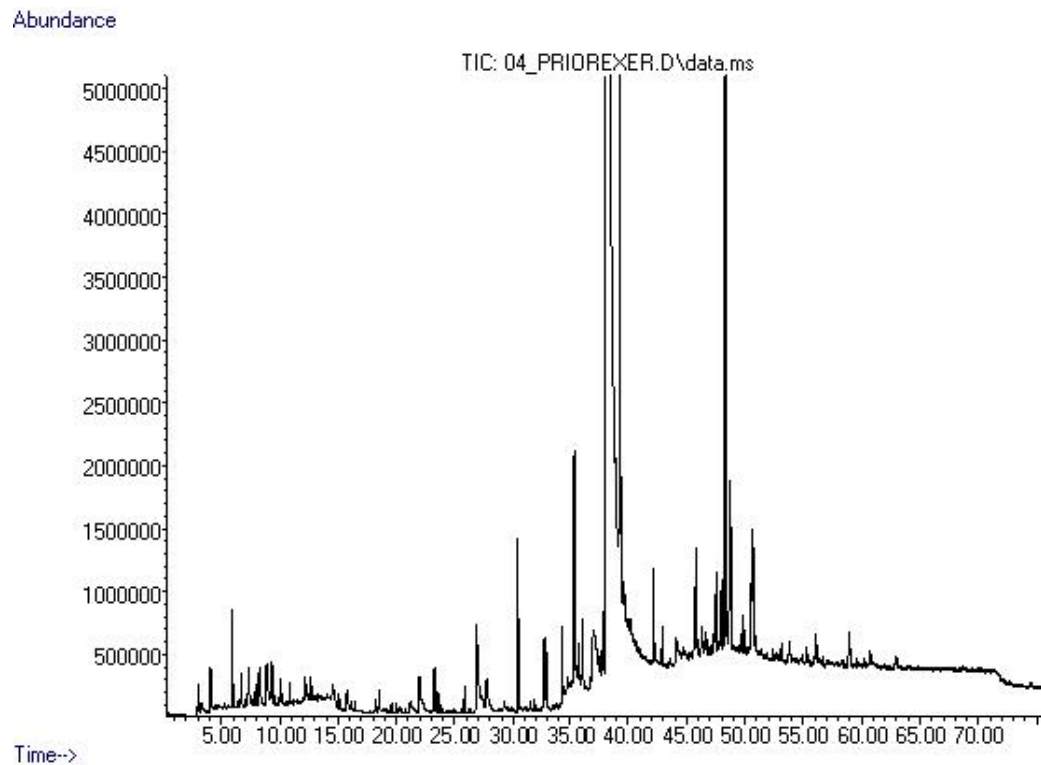
Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων, η ένωση του Ισοπρενίου δεν εντάχθηκε εντός των υπολογισμών λόγω της μη συσχέτισής της με το οξειδωτικό στρες.



*Διάγραμμα 10: Χροματογράφημα εκπνεόμενου
αέρα του εθελοντή 1, πριν την χορήγηση
Σπιρουλίνας*

Πίνακας 7: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 1, πριν την χορήγηση Σπιρουλίνας

#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	BUTANE 2-METHYL	6,002	0,223	7.099.417	0,703
2	PENTANE	6,739	0,250	2.310.336	0,229
3	ISOPRENE	-	-	-	-
4	PENTANE 2-METHYL	9,406	0,349	1.990.200	0,197
5	PENTANE 3-METHYL	10,130	0,376	1.652.210	0,164
6	HEXANE	10,934	0,406	1.125.007	0,111
7	HEXANE 2-METHYL	14,593	0,542	2.110.047	0,209
8	HEXANE 3-METHYL	15,143	0,562	1.158.160	0,115
9	HEPTANE	16,523	0,613	842.323	0,083
10	HEPTANE 4-METHYL	20,062	0,745	466.413	0,046
11	OCTANE	-	-	-	-
12	OCTANE 4-METHYL	25,933	0,963	517.311	0,051
13	CHLOROBENZENE D5	26,938	1,000	10.102.426	1,000

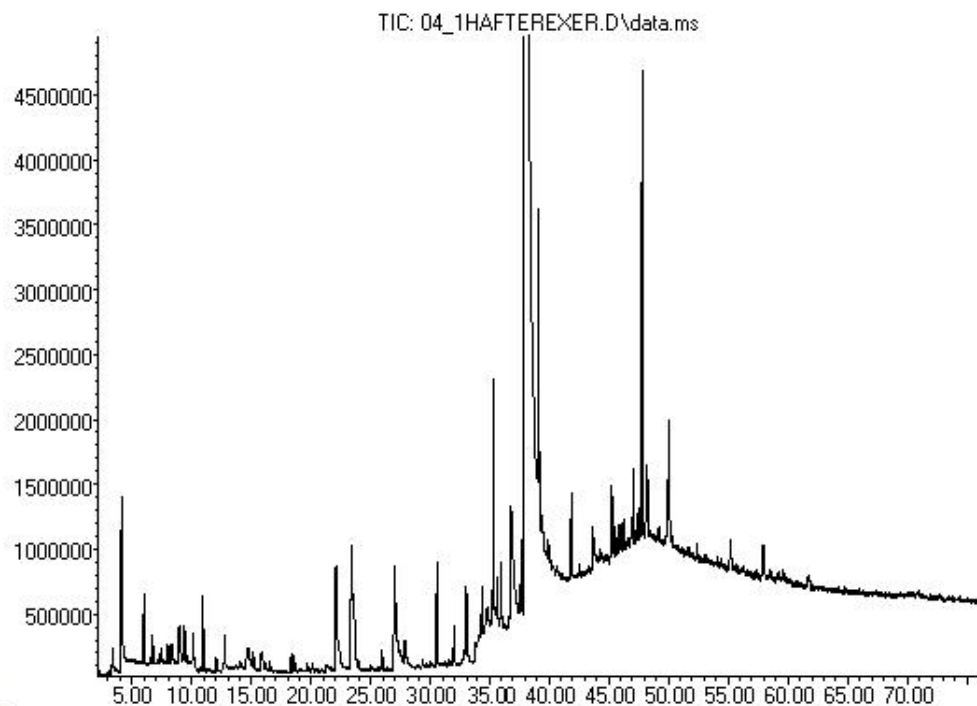


Διάγραμμα 11: Χρωματογράφημα εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 1, πριν την επιβολή άσκησης

Πίνακας 8: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 1, πριν την επιβολή άσκησης

#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	BUTANE 2-METHYL	5,954	0,222	2.874.626	0,268
2	PENTANE	6,691	0,249	1.181.277	0,110
3	ISOPRENE	-	-	-	-
4	PENTANE 2-METHYL	9,345	0,348	1.054.195	0,098
5	PENTANE 3-METHYL	10,069	0,375	926.876	0,086
6	HEXANE	10,873	0,405	722.999	0,067
7	HEXANE 2-METHYL	14,519	0,541	477.038	0,044
8	HEXANE 3-METHYL	15,082	0,562	581.773	0,054
9	HEPTANE	16,449	0,613	371.631	0,035
10	HEPTANE 4-METHYL	19,599	0,730	384.848	0,036
11	OCTANE	-	-	-	-
12	OCTANE 4-METHYL	25,831	0,962	978.903	0,091
13	CHLOROBENZENE D5	26,850	1,000	10.740.342	1,000

Abundance

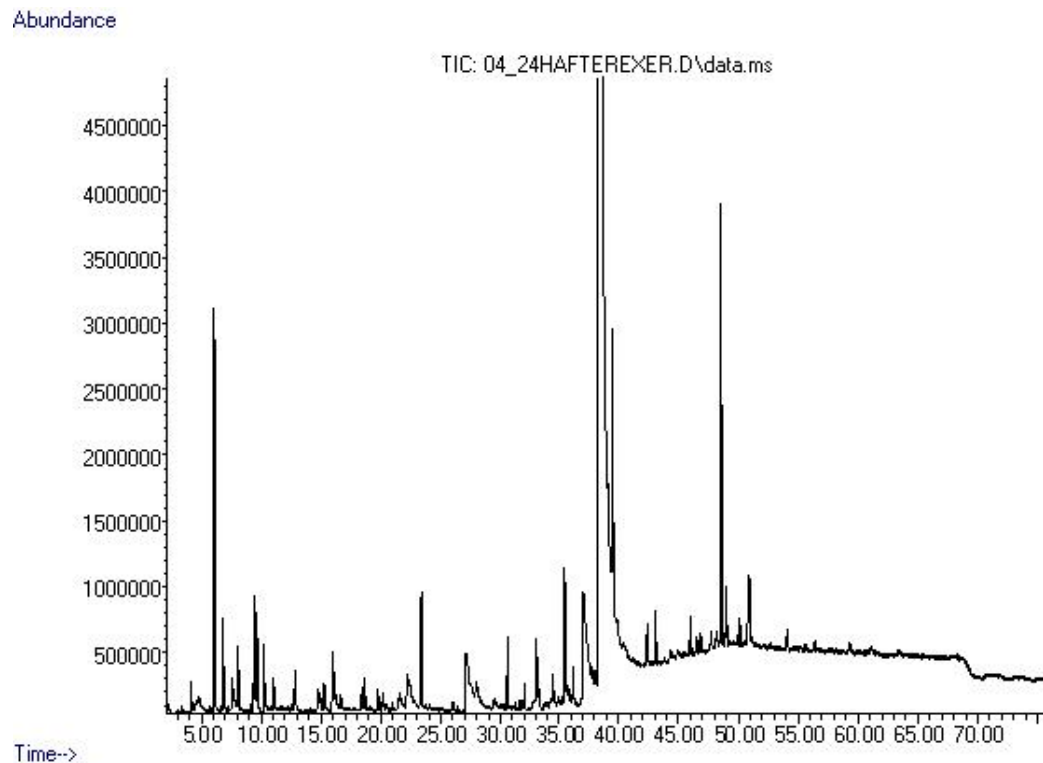


Time-->

***Διάγραμμα 12:** Χρωματογράφημα εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 1, 1 ώρα μετά την άσκηση*

***Πίνακας 9:** Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 1, 1 ώρα μετά την άσκηση*

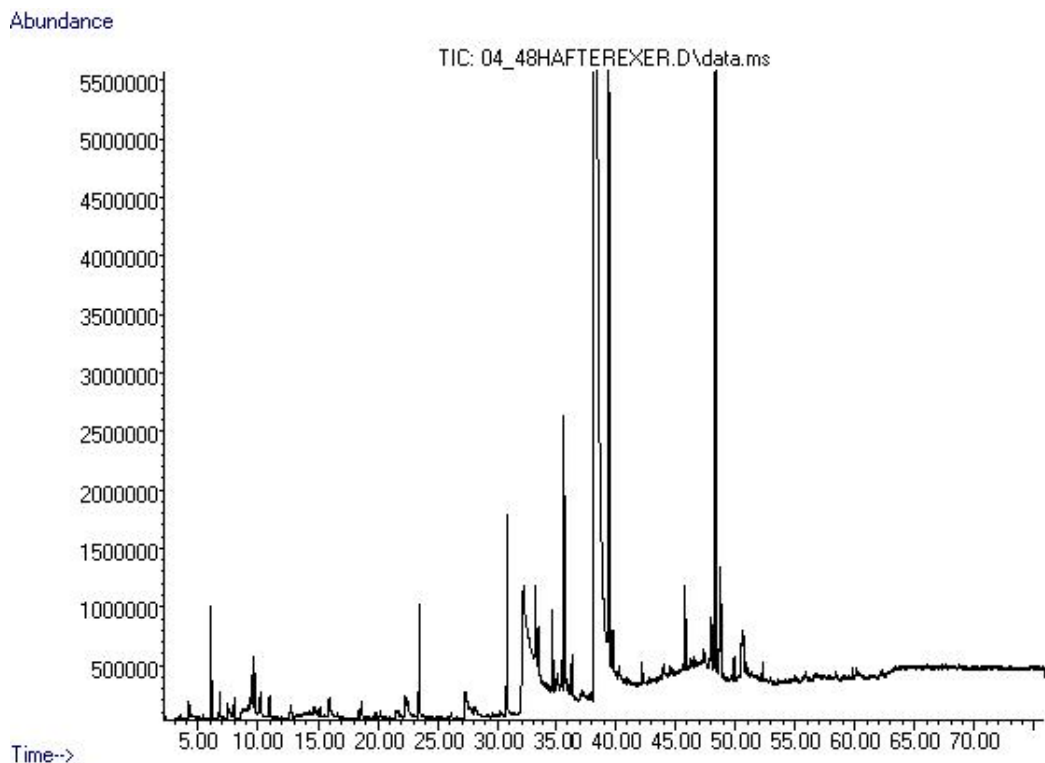
#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	BUTANE 2-METHYL	5,988	0,222	1.953.178	0,139
2	PENTANE	6,725	0,250	862.903	0,062
3	ISOPRENE	7,409	0,275	649.277	0,046333917
4	PENTANE 2-METHYL	9,393	0,344	998.228	0,019
5	PENTANE 3-METHYL	10,103	0,375	1.080.772	0,077
6	HEXANE	10,921	0,405	2.496.727	0,178
7	HEXANE 2-METHYL	-	-	-	-
8	HEXANE 3-METHYL	15,156	0,563	590.379	0,042
9	HEPTANE	16,537	0,614	304.923	0,022
10	HEPTANE 4-METHYL	19,673	0,730	315.026	0,022
11	OCTANE	-	-	-	-
12	OCTANE 4-METHYL	25,906	0,962	701.564	0,050
13	CHLOROBENZENE D5	26,938	1,000	14.012.996	1,000



Διάγραμμα 13: Χρωματογράφημα εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 1, 24 ώρες μετά την άσκηση

Πίνακας 10: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 1, 24 ώρες μετά την άσκηση

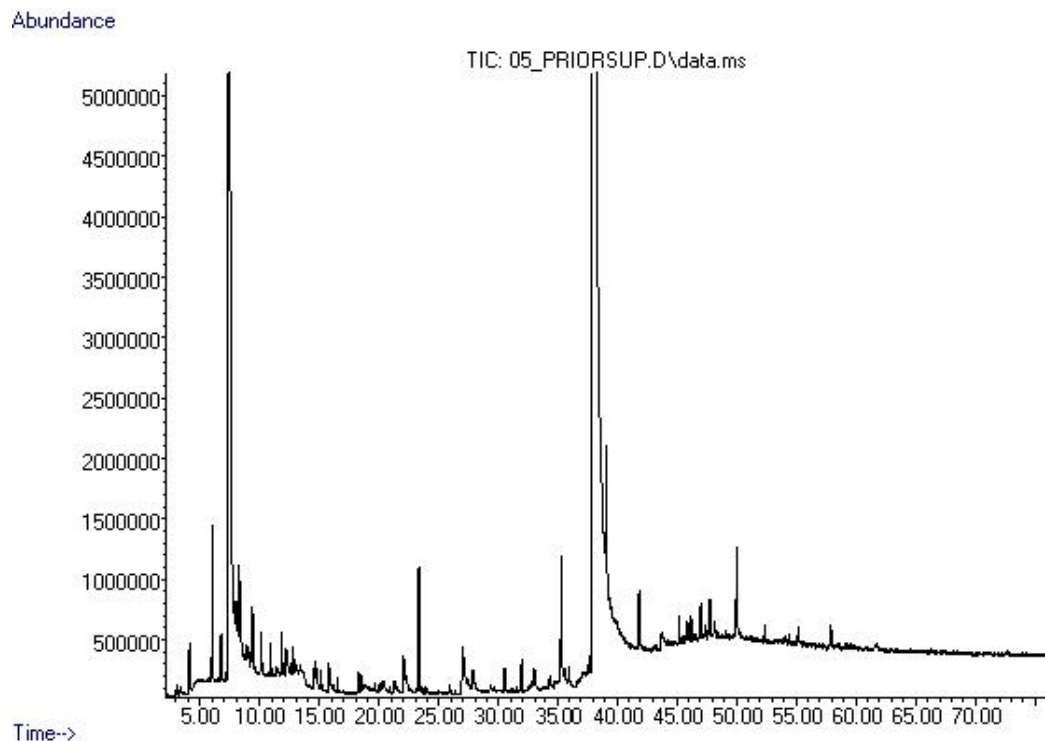
#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	BUTANE 2-METHYL	6,082	0,224	12.110.367	1,334
2	PENTANE	6,833	0,252	3.383.824	0,373
3	ISOPRENE	-	-	-	-
4	PENTANE 2-METHYL	9,500	0,350	3.246.664	0,358
5	PENTANE 3-METHYL	10,224	0,376	2.532.585	0,279
6	HEXANE	11,055	0,407	1.074.732	0,118
7	HEXANE 2-METHYL	14,714	0,542	811.094	0,089
8	HEXANE 3-METHYL	15,263	0,562	973.027	0,107
9	HEPTANE	16,644	0,613	484.147	0,053
10	HEPTANE 4-METHYL	19,767	0,728	850.409	0,094
11	OCTANE	-	-	-	-
12	OCTANE 4-METHYL	26,013	0,958	351.910	0,039
13	CHLOROBENZENE D5	27,166	1,000	9.075.760	1,000



Διάγραμμα 14: Χρωματογράφημα εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 1, 48 ώρες μετά την άσκηση

Πίνακας 11: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 1, 48 ώρες μετά την άσκηση

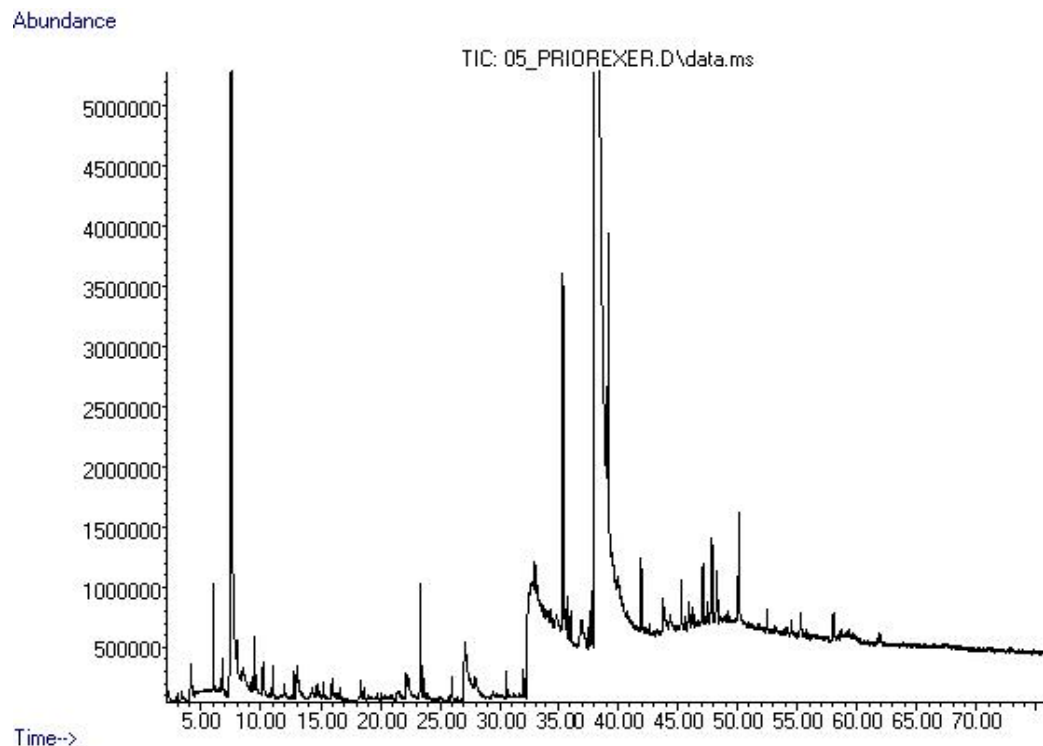
#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	BUTANE 2-METHYL	6,068	0,222	3.666.545	0,757
2	PENTANE	6,765	0,248	1.037.003	0,214
3	ISOPRENE	-	-	-	-
4	PENTANE 2-METHYL	9,473	0,347	1.108.206	0,229
5	PENTANE 3-METHYL	10,170	0,372	1.167.796	0,241
6	HEXANE	10,947	0,401	1.100.184	0,227
7	HEXANE 2-METHYL	14,606	0,535	241.025	0,050
8	HEXANE 3-METHYL	15,169	0,555	330.311	0,068
9	HEPTANE	16,590	0,607	200.777	0,041
10	HEPTANE 4-METHYL	19,807	0,725	303.352	0,063
11	OCTANE	-	-	-	-
12	OCTANE 4-METHYL	26,160	0,958	338.109	0,070
13	CHLOROBENZENE D5	27,313	1,000	4.845.450	1,000



*Διάγραμμα 15: Χρωματογράφημα εκπνεόμενου
αέρα του εθελοντή 2, πριν την χορήγηση
Σπιρουλίνας*

Πίνακας 12: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 2, πριν την χορήγηση Σπιρουλίνας

#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	BUTANE 2-METHYL	6,015	0,223	4.961.674	0,709
2	PENTANE	6,752	0,251	1.709.686	0,244
3	ISOPRENE	7,409	0,275	336.344.002	48,093
4	PENTANE 2-METHYL	9,379	0,348	2.010.690	0,288
5	PENTANE 3-METHYL	10,103	0,375	1.567.937	0,224
6	HEXANE	10,921	0,405	1.247.476	0,178
7	HEXANE 2-METHYL	14,580	0,541	873.369	0,125
8	HEXANE 3-METHYL	15,129	0,561	776.361	0,111
9	HEPTANE	16,510	0,613	541.203	0,077
10	HEPTANE 4-METHYL	20,035	0,743	262.867	0,038
11	OCTANE	22,300	0,827	245.413	0,035
12	OCTANE 4-METHYL	25,892	0,961	355.740	0,051
13	CHLOROBENZENE D5	26,951	1,000	6.993.585	1,000

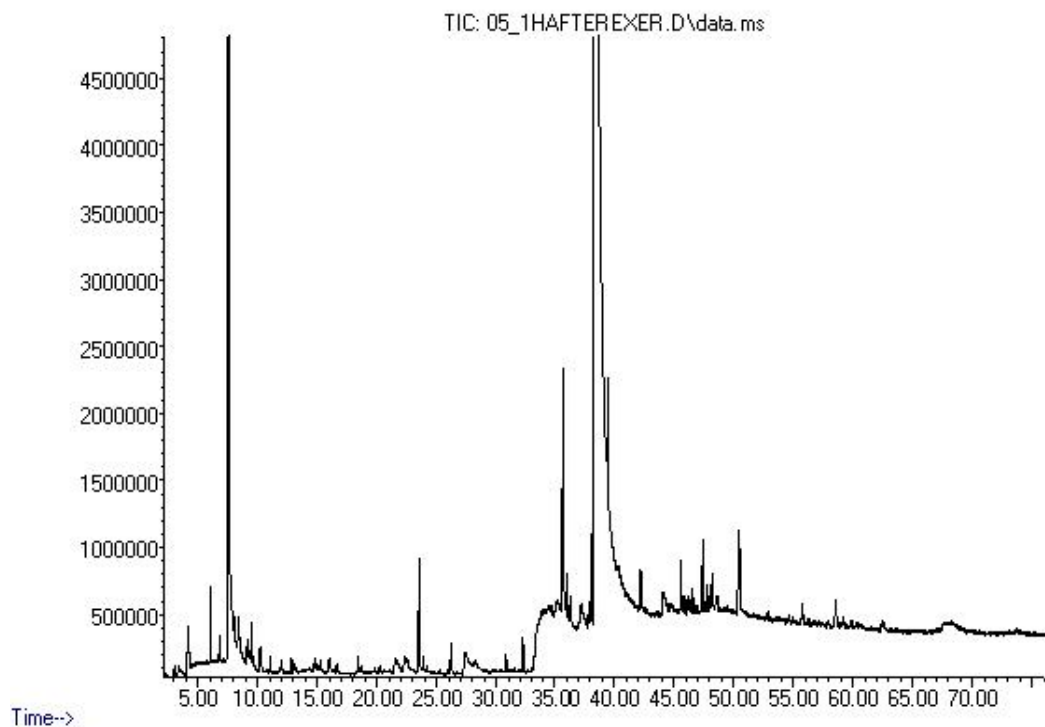


Διάγραμμα 16: Χρωματογράφημα εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 2, πριν την επιβολή άσκησης

Πίνακας 13: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 2, πριν την επιβολή άσκησης

#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	BUTANE 2-METHYL	6,028	0,223	3.267.433	0,352
2	PENTANE	6,766	0,250	1.253.388	0,135
3	ISOPRENE	7,449	0,275	249.021.662	26,862
4	PENTANE 2-METHYL	9,433	0,348	1.710.896	0,185
5	PENTANE 3-METHYL	10,170	0,376	1.004.357	0,108
6	HEXANE	10,988	0,406	1.346.907	0,145
7	HEXANE 2-METHYL	14,660	0,542	340.150	0,037
8	HEXANE 3-METHYL	15,210	0,562	648.298	0,070
9	HEPTANE	16,590	0,613	406.090	0,044
10	HEPTANE 4-METHYL	19,713	0,728	304.674	0,033
11	OCTANE	22,381	0,827	412.561	0,045
12	OCTANE 4-METHYL	25,959	0,959	901.647	0,097
13	CHLOROBENZENE D5	27,072	1,000	9.270.262	1,000

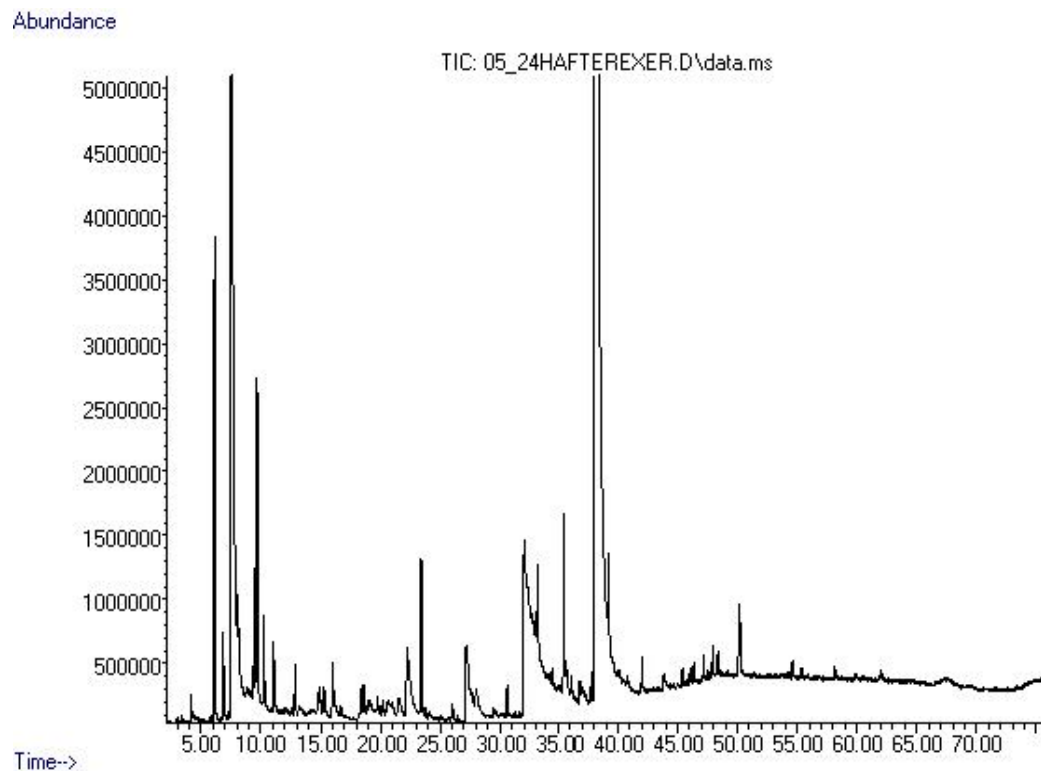
Abundance



*Διάγραμμα 17: Χρωματογράφημα εκπνεόμενου
αέρα του εθελοντή 2, 1 ώρα μετά την άσκηση*

Πίνακας 14: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 2, 1 ώρα μετά την άσκηση

#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	BUTANE 2-METHYL	6,069	0,222	2.047.243	0,576
2	PENTANE	6,806	0,248	884.008	0,249
3	ISOPRENE	7,489	0,273	147.603.740	41,547
4	PENTANE 2-METHYL	9,473	0,346	1.215.421	0,342
5	PENTANE 3-METHYL	10,210	0,373	712.092	0,200
6	HEXANE	11,028	0,403	476.528	0,134
7	HEXANE 2-METHYL	14,701	0,537	244.137	0,069
8	HEXANE 3-METHYL	15,250	0,557	360.461	0,101
9	HEPTANE	16,631	0,607	335.366	0,094
10	HEPTANE 4-METHYL	19,807	0,723	263.236	0,074
11	OCTANE	22,542	0,823	224.187	0,063
12	OCTANE 4-METHYL	26,174	0,955	1.154.295	0,325
13	CHLOROBENZENE D5	27,394	1,000	3.552.735	1,000

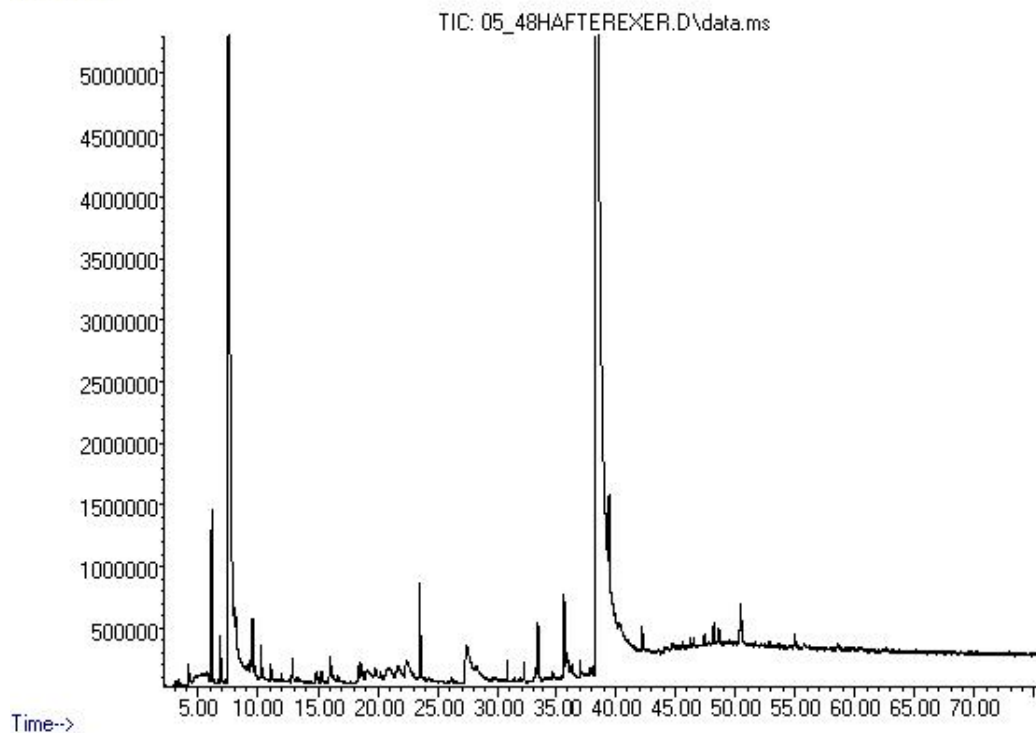


Διάγραμμα 18: Χρωματογράφημα εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 2, 24 ώρες μετά την άσκηση

Πίνακας 15: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 2, 24 ώρες μετά την άσκηση

#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	BUTANE 2-METHYL	6,109	0,225	15.777.847	1,309
2	PENTANE	6,859	0,252	3.751.128	0,311
3	ISOPRENE	7,529	0,277	223.853.377	18,569
4	PENTANE 2-METHYL	9,526	0,350	3.984.811	0,331
5	PENTANE 3-METHYL	10,250	0,377	3.770.208	0,313
6	HEXANE	11,068	0,407	3.198.823	0,265
7	HEXANE 2-METHYL	14,740	0,542	589.411	0,049
8	HEXANE 3-METHYL	15,290	0,563	932.168	0,077
9	HEPTANE	16,671	0,613	486.082	0,040
10	HEPTANE 4-METHYL	19,780	0,728	1.026.268	0,085
11	OCTANE	22,434	0,825	161.051	0,013
12	OCTANE 4-METHYL	26,026	0,958	761.562	0,063
13	CHLOROBENZENE D5	27,179	1,000	12.054.922	1,000

Abundance

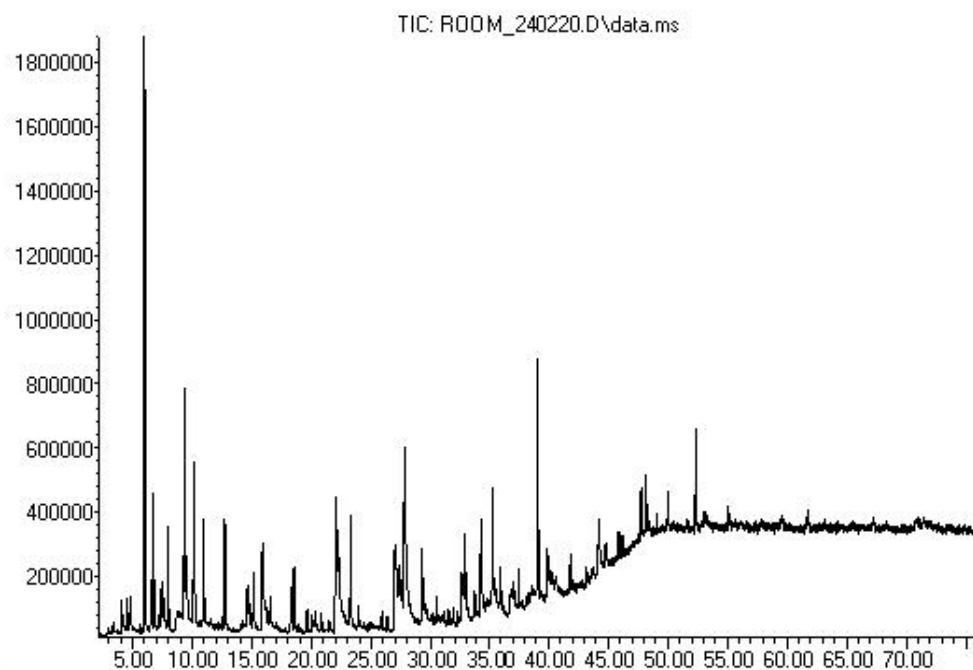


Διάγραμμα 19: Χρωματογράφημα εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 2, 48 ώρες μετά την άσκηση

Πίνακας 16: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του εκπνεόμενου αέρα του εθελοντή 2, 48 ώρες μετά την άσκηση

#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	BUTANE 2-METHYL	6,109	0,223	5.455.115	0,772
2	PENTANE	6,859	0,250	1.712.207	0,242
3	ISOPRENE	7,543	0,275	186.053.454	26,346
4	PENTANE 2-METHYL	9,526	0,348	1.852.524	0,262
5	PENTANE 3-METHYL	10,264	0,375	1.147.069	0,162
6	HEXANE	11,081	0,404	745.728	0,106
7	HEXANE 2-METHYL	14,754	0,538	266.461	0,038
8	HEXANE 3-METHYL	15,303	0,558	455.193	0,064
9	HEPTANE	16,684	0,609	359.240	0,051
10	HEPTANE 4-METHYL	19,807	0,723	489.975	0,069
11	OCTANE	-	-	-	-
12	OCTANE 4-METHYL	26,187	0,955	245.148	0,035
13	CHLOROBENZENE D5	27,407	1,000	7.062.017	1,000

Abundance



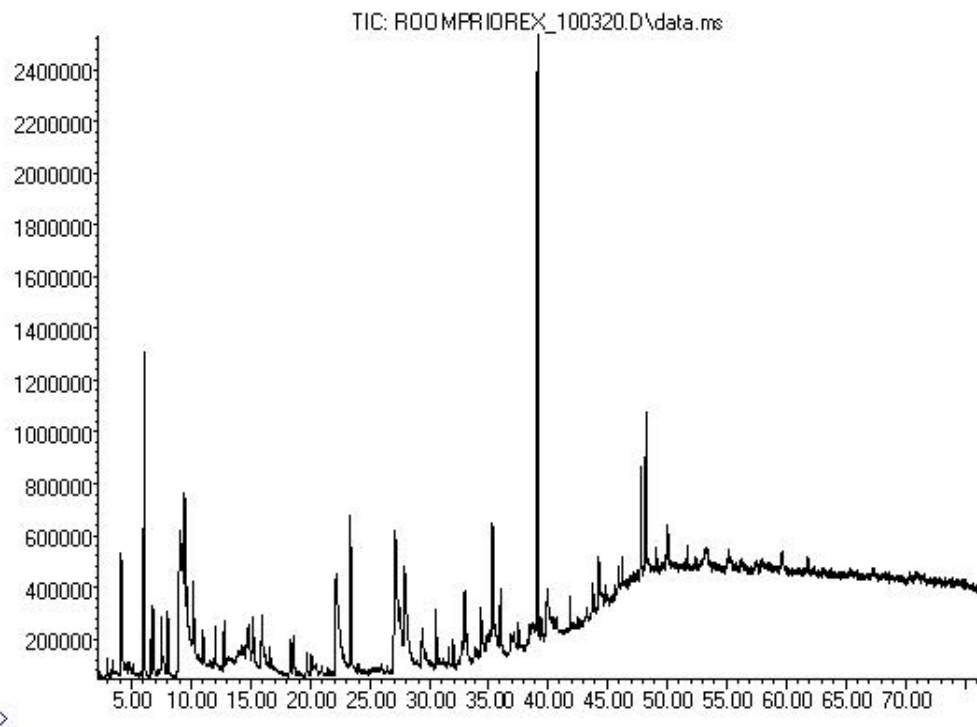
Διάγραμμα 20: Χρωματογράφημα αέρα του χώρου δειγματοληψίας, πριν την χορήγηση Σπιρουλίνας στους εθελοντές 1 και 2

Time-->

Πίνακας 17: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του αέρα του χώρου δειγματοληψίας, πριν την χορήγηση Σπιρουλίνας στους εθελοντές 1 και 2

#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	BUTANE 2-METHYL	6,001	0,222	7.470.485	2,502
2	PENTANE	6,739	0,250	2.131.199	0,714
3	ISOPRENE	7,436	0,275	782.728	0,262
4	PENTANE 2-METHYL	9,392	0,348	2.700.026	0,904
5	PENTANE 3-METHYL	10,116	0,375	3.165.788	1,060
6	HEXANE	10,934	0,405	1.853.550	0,621
7	HEXANE 2-METHYL	14,593	0,540	427.408	0,143
8	HEXANE 3-METHYL	15,143	0,561	914.193	0,306
9	HEPTANE	16,510	0,611	557.287	0,187
10	HEPTANE 4-METHYL	20,464	0,758	32.244	0,011
11	OCTANE	22,287	0,825	253.748	0,085
12	OCTANE 4-METHYL	25,892	0,959	380.798	0,128
13	CHLOROBENZENE D5	27,005	1,000	2.985.779	1,000

Abundance

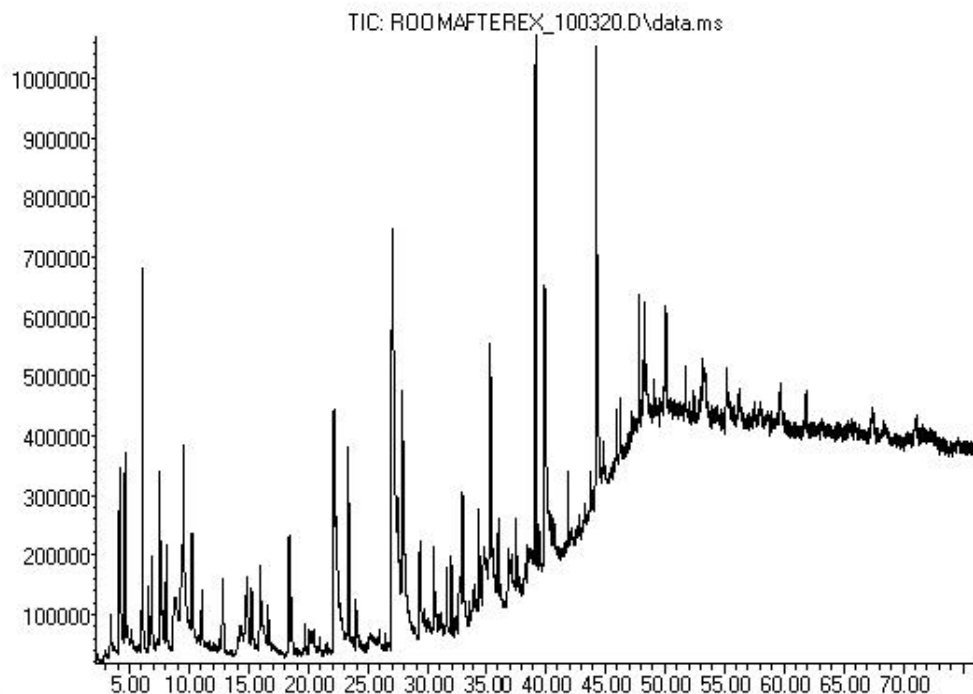


Διάγραμμα 21: Χρωματογράφημα αέρα του χώρου δειγματοληψίας, πριν την επιβολή άσκησης στους εθελοντές 1 και 2

Πίνακας 18: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του αέρα του χώρου δειγματοληψίας, πριν την επιβολή άσκησης στους εθελοντές 1 και 2

#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	BUTANE 2-METHYL	6,042	0,223	4.927.678	0,714
2	PENTANE	6,779	0,250	1.501.718	0,218
3	ISOPRENE	7,476	0,276	1.232.828	0,179
4	PENTANE 2-METHYL	9,446	0,349	1.448.117	0,210
5	PENTANE 3-METHYL	10,170	0,376	1.915.418	0,277
6	HEXANE	10,988	0,406	763.245	0,111
7	HEXANE 2-METHYL	14,647	0,541	318.484	0,046
8	HEXANE 3-METHYL	15,196	0,561	1.090.968	0,158
9	HEPTANE	16,590	0,613	514.237	0,074
10	HEPTANE 4-METHYL	19,700	0,728	423.712	0,061
11	OCTANE	-	-	-	-
12	OCTANE 4-METHYL	25,959	0,959	159.227	0,023
13	CHLOROBENZENE D5	27,072	1,000	6.902.563	1,000

Abundance



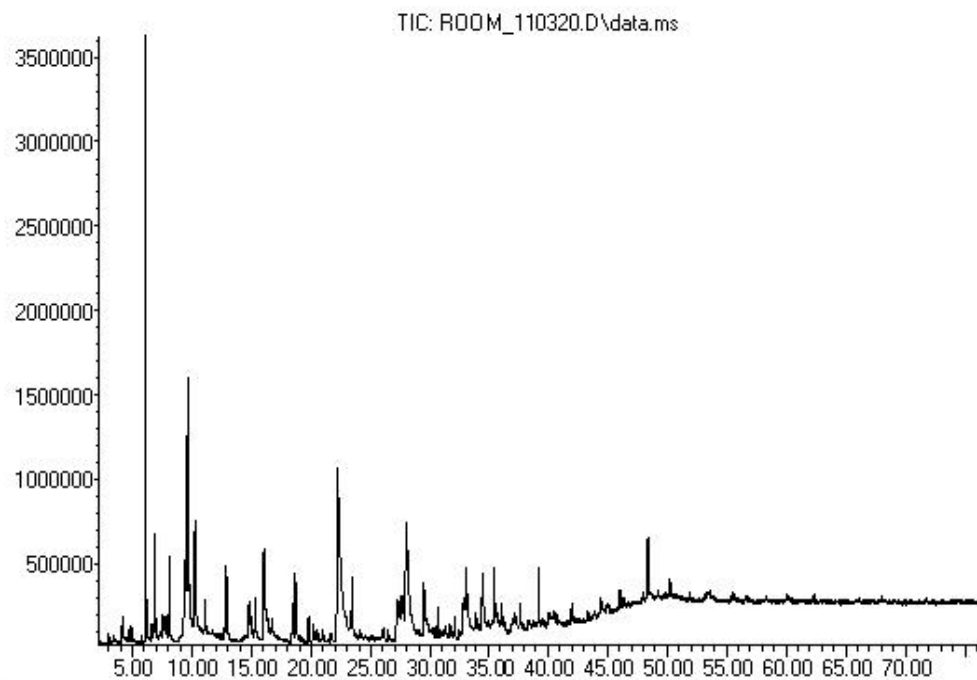
Διάγραμμα 22: Χρωματογράφημα αέρα του χώρου δειγματοληψίας, 1 ώρα μετά την άσκηση των εθελοντών 1 και 2

Time-->

Πίνακας 19: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του αέρα του χώρου δειγματοληψίας, 1 ώρα μετά την άσκηση των εθελοντών 1 και 2

#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	<i>BUTANE 2-METHYL</i>	6,068	0,225	3.315.234	0,251
2	<i>PENTANE</i>	6,832	0,253	1.010.411	0,077
3	<i>ISOPRENE</i>	7,529	0,279	1.736.294	0,132
4	<i>PENTANE 2-METHYL</i>	9,500	0,352	1.359.014	0,103
5	<i>PENTANE 3-METHYL</i>	10,237	0,379	1.256.620	0,095
6	<i>HEXANE</i>	11,054	0,409	645.853	0,049
7	<i>HEXANE 2-METHYL</i>	14,687	0,544	301.842	0,023
8	<i>HEXANE 3-METHYL</i>	15,223	0,563	694.700	0,053
9	<i>HEPTANE</i>	16,603	0,615	357.751	0,027
10	<i>HEPTANE 4-METHYL</i>	19,713	0,730	243.533	0,018
11	<i>OCTANE</i>	-	-	-	-
12	<i>OCTANE 4-METHYL</i>	25,946	0,960	197.881	0,015
13	<i>CHLOROBENZENE D5</i>	27,018	1,000	13.200.307	1,000

Abundance

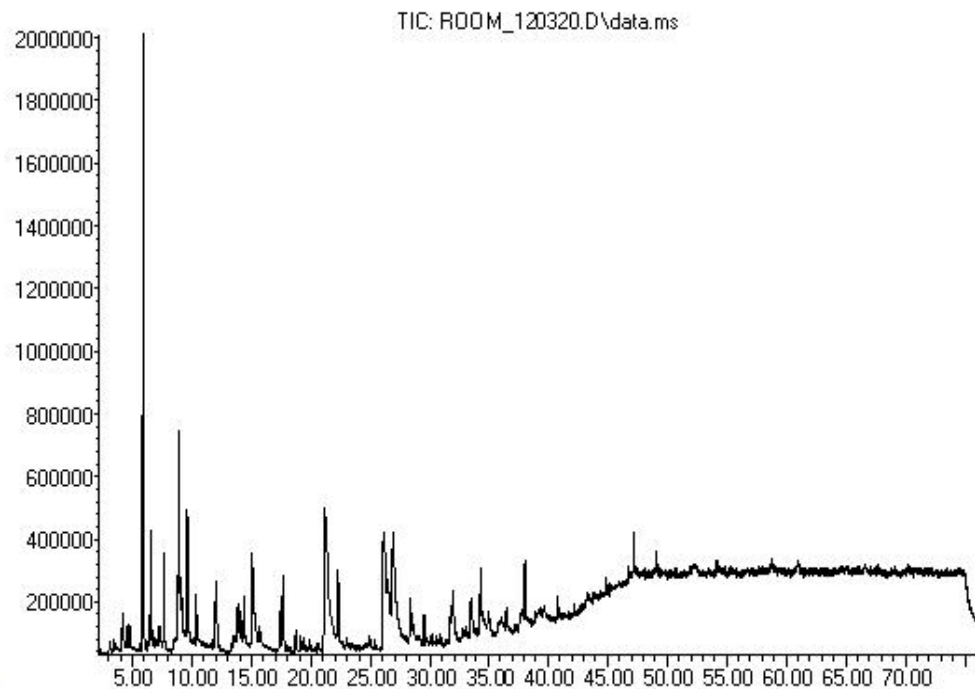


Time-->

Διάγραμμα 23: Χρωματογράφημα αέρα του χώρου δειγματοληψίας, 24 ώρες μετά την άσκηση των εθελοντών 1 και 2

Πίνακας 20: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του αέρα του χώρου δειγματοληψίας, 24 ώρες μετά την άσκηση των εθελοντών 1 και 2

#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	<i>BUTANE 2-METHYL</i>	6,095	0,224	14.448.233	5,458
2	<i>PENTANE</i>	6,846	0,252	3.656.074	1,381
3	<i>ISOPRENE</i>	7,556	0,278	783.430	0,296
4	<i>PENTANE 2-METHYL</i>	9,513	0,349	3.880.733	1,466
5	<i>PENTANE 3-METHYL</i>	10,251	0,377	4.548.076	1,718
6	<i>HEXANE</i>	11,068	0,407	1.372.367	0,518
7	<i>HEXANE 2-METHYL</i>	14,741	0,542	663.999	0,251
8	<i>HEXANE 3-METHYL</i>	15,290	0,562	1.527.924	0,577
9	<i>HEPTANE</i>	16,671	0,612	704.217	0,266
10	<i>HEPTANE 4-METHYL</i>	19,780	0,727	917.931	0,347
11	<i>OCTANE</i>	-	-	-	-
12	<i>OCTANE 4-METHYL</i>	-	-	-	-
13	<i>CHLOROBENZENE D5</i>	27,219	1,000	2.647.027	1,000



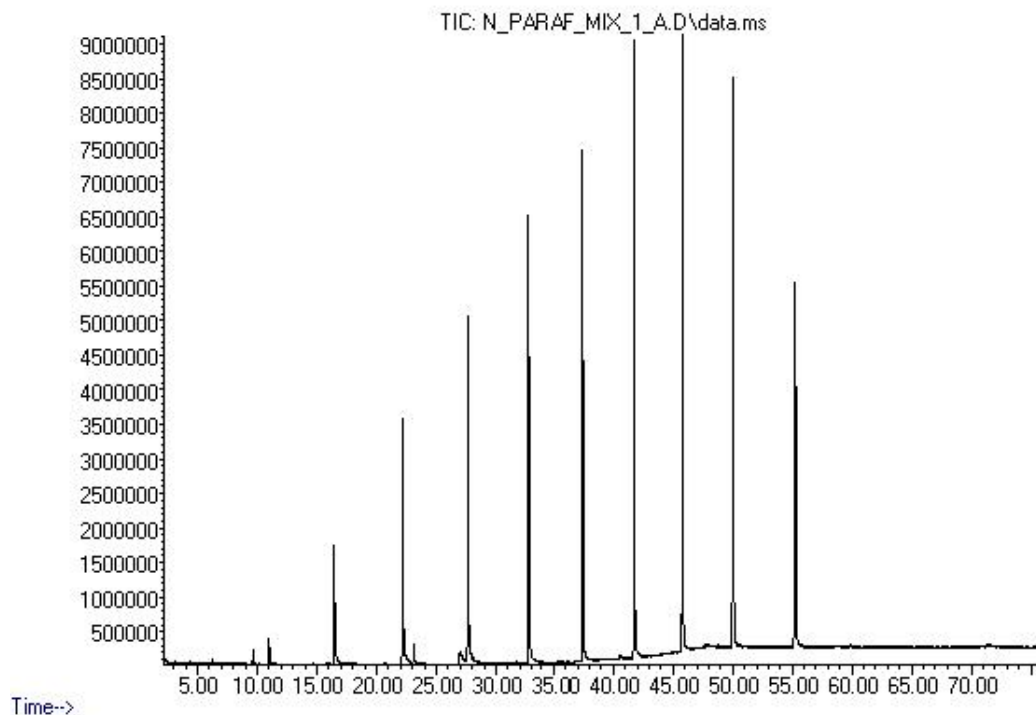
Time-->

Διάγραμμα 24: Χρωματογράφημα αέρα του χώρου δειγματοληψίας, 48 ώρες μετά την άσκηση των εθελοντών 1 και 2

Πίνακας 21: Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων του αέρα του χώρου δειγματοληψίας, 48 ώρες μετά την άσκηση των εθελοντών 1 και 2

#	COMPOUND	RETENTION TIME (min)	RELATIVE RETENTION TIME	AREA	RELATIVE AREA
1	<i>BUTANE 2-METHYL</i>	5,881	0,226	7.800.249	1,016
2	<i>PENTANE</i>	6,537	0,251	1.905.131	0,248
3	<i>ISOPRENE</i>	7,194	0,276	334.017	0,043
4	<i>PENTANE 2-METHYL</i>	8,923	0,342	2.124.967	0,277
5	<i>PENTANE 3-METHYL</i>	9,593	0,368	2.495.145	0,325
6	<i>HEXANE</i>	10,357	0,398	891.521	0,116
7	<i>HEXANE 2-METHYL</i>	14,325	0,550	888.188	0,116
8	<i>HEXANE 3-METHYL</i>	15,652	0,601	389.447	0,051
9	<i>HEPTANE</i>	-	-	-	-
10	<i>HEPTANE 4-METHYL</i>	-	-	-	-
11	<i>OCTANE</i>	-	-	-	-
12	<i>OCTANE 4-METHYL</i>	-	-	-	-
13	<i>CHLOROBENZENE D5</i>	26,053	1,000	7.680.694	1,000

Abundance



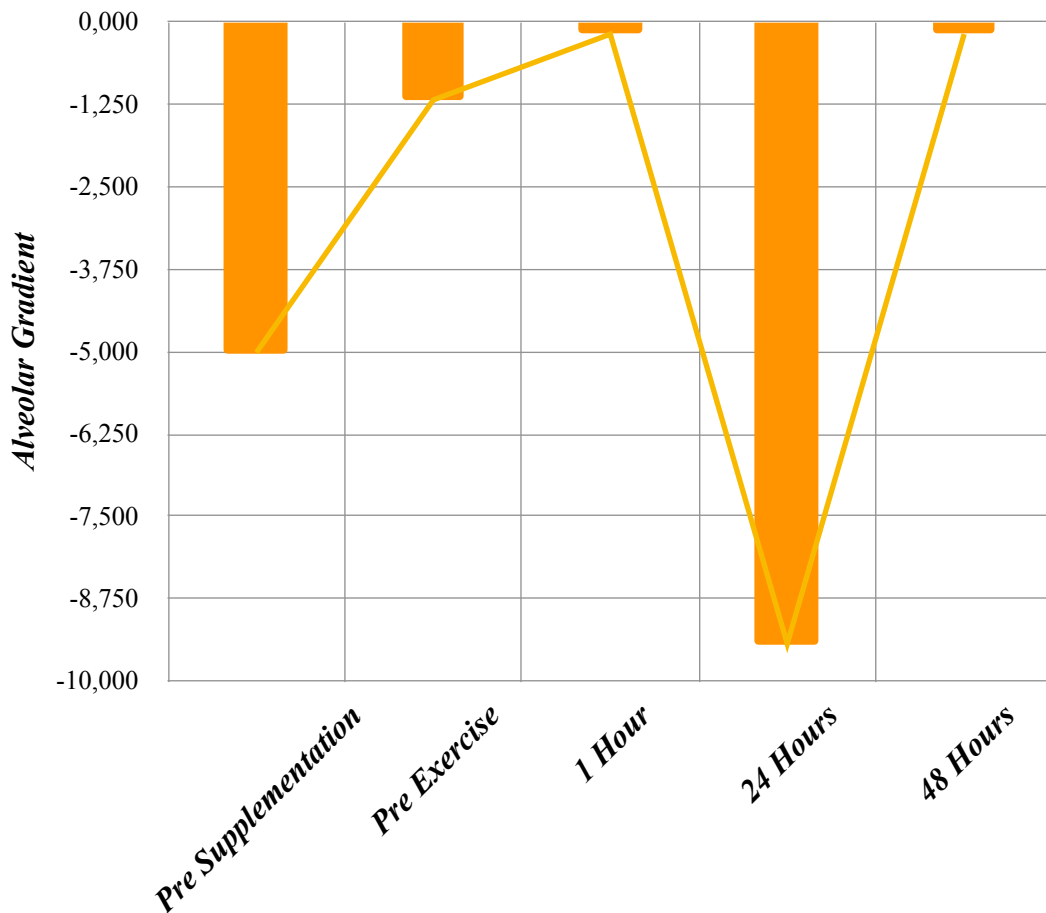
Διάγραμμα 25: Χρωματογράφημα προτύπου μείγματος παραφινών από C5-C15

Πίνακας 22: Χρόνοι ανάσχεσης των παραφινών του πρότυπου μείγματος για δεδομένες συνθήκες ανάλυσης

COMPOUND	RETENTION TIME (min)
<i>n-Pentane</i>	6,203
<i>n-Hexane</i>	10,988
<i>n-Heptane</i>	16,497
<i>n-Octane</i>	22,247
<i>n-Nonane</i>	27,689
<i>n-Decane</i>	32,675
<i>n-Undecane</i>	37,446
<i>n-Dodecane</i>	41,789
<i>n-Tridecane</i>	45,824
<i>n-Tetradecane</i>	50,006
<i>n-Pentadecane</i>	55,206

Πίνακας 5: Υπολογισμός Alveolar Gradient για τον εθελοντή 1 κατά τον κύκλο πειραμάτων

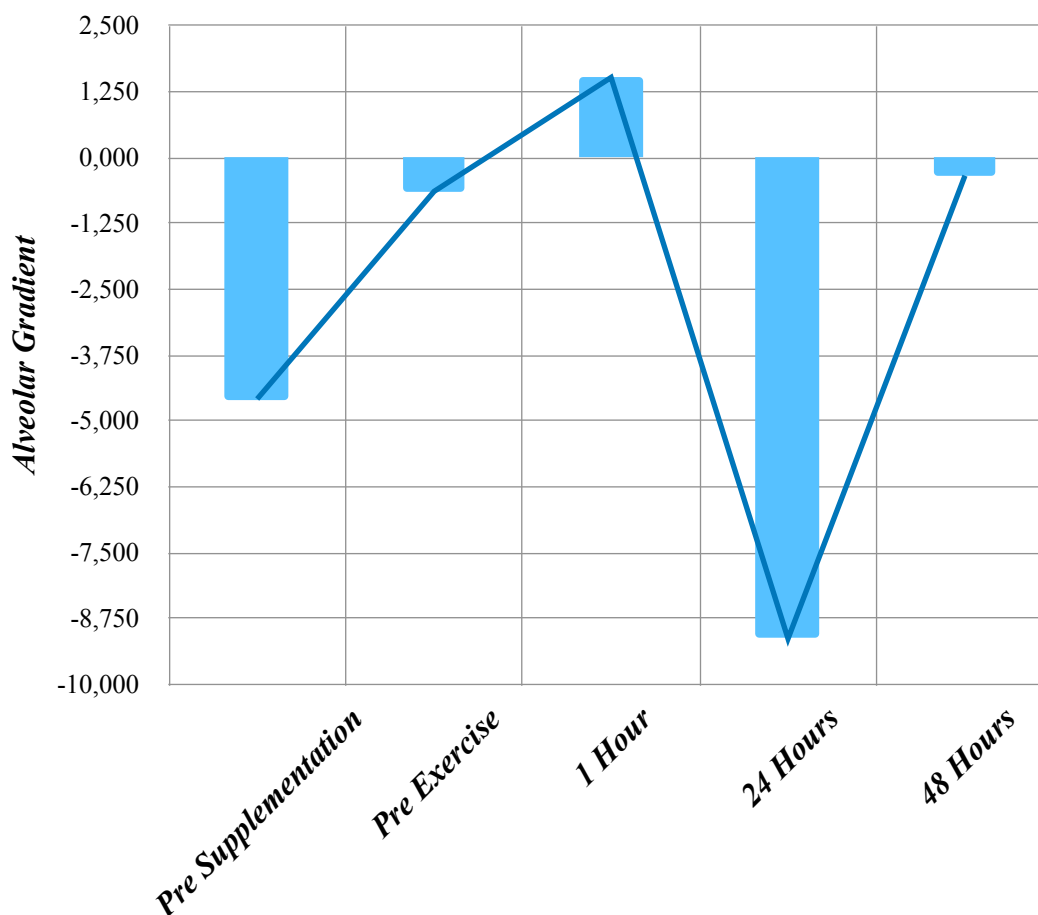
COMPOUND	ALVEOLAR GRADIENT				
	PRE SUP	PRE EX	1H	24H	48H
BUTANE 2-METHYL	-1,799	-0,446	-0,112	-4,124	-0,259
PENTANE	-0,485	-0,108	-0,015	-1,008	-0,034
ISOPRENE	-0,262	-0,179	-0,085	-0,296	-0,043
PENTANE 2-METHYL	-0,707	-0,112	-0,084	-1,108	-0,048
PENTANE 3-METHYL	-0,897	-0,191	-0,018	-1,439	-0,084
HEXANE	-0,509	-0,043	0,129	-0,400	0,111
HEXANE 2-METHYL	0,066	-0,002	-0,023	-0,161	-0,066
HEXANE 3-METHYL	-0,192	-0,104	-0,010	-0,470	0,017
HEPTANE	-0,103	-0,040	-0,005	-0,213	0,041
HEPTANE 4-METHYL	0,035	-0,026	0,004	-0,253	0,111
OCTANE	-0,085	-	-	-	-
OCTANE 4-METHYL	-0,076	0,068	0,035	0,039	0,070
CHLOROBENZENE D5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
TOTAL ALVEOLAR GRADIENT	-5,015	-1,182	-0,184	-9,434	-0,183



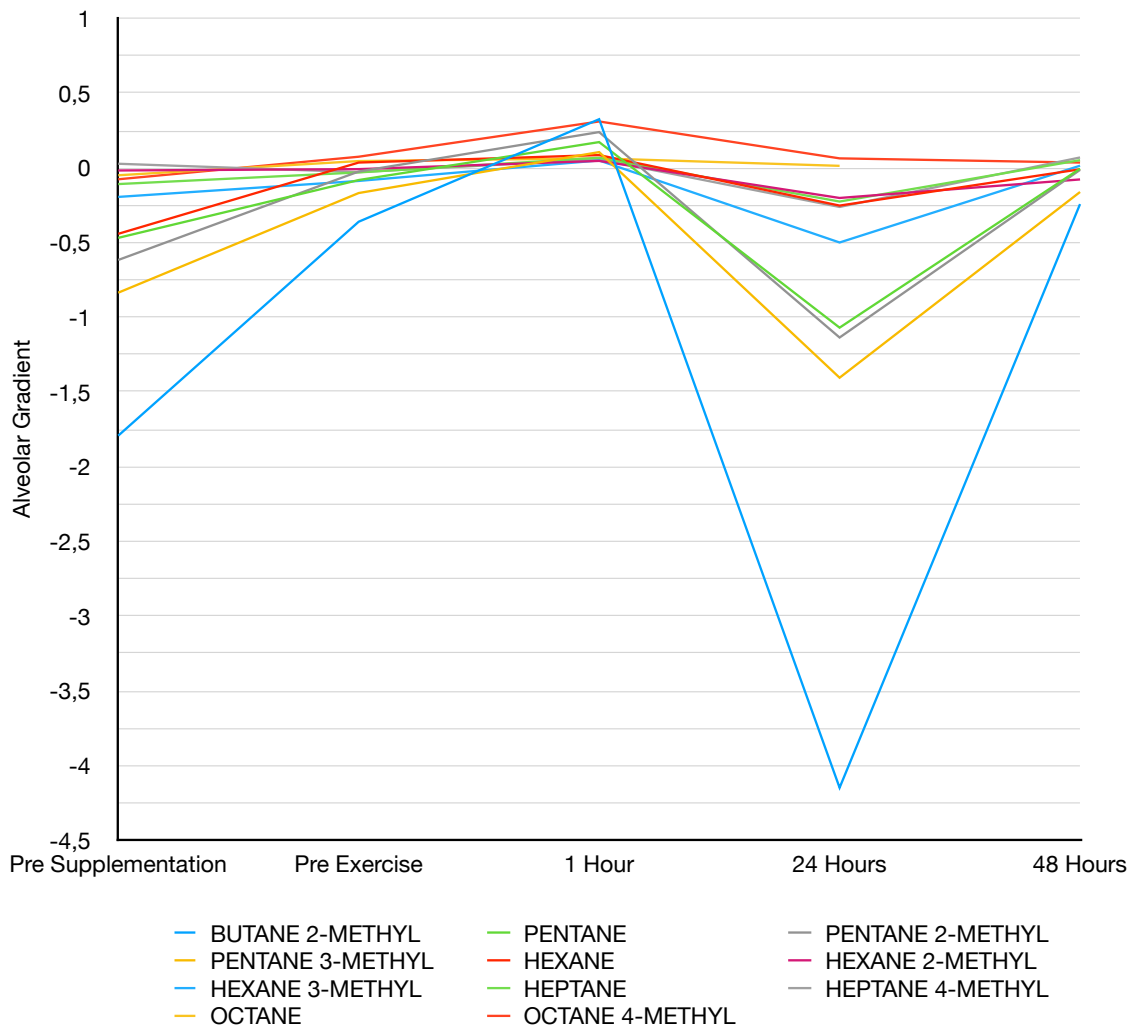
Διάγραμμα 3: Γραφική απεικόνιση του Alveolar Gradient για τον εθελοντή 1 κατά τον κύκλο πειραμάτων

Πίνακας 6: Υπολογισμός Alveolar Gradient για τον εθελοντή 2 κατά τον κύκλο πειραμάτων

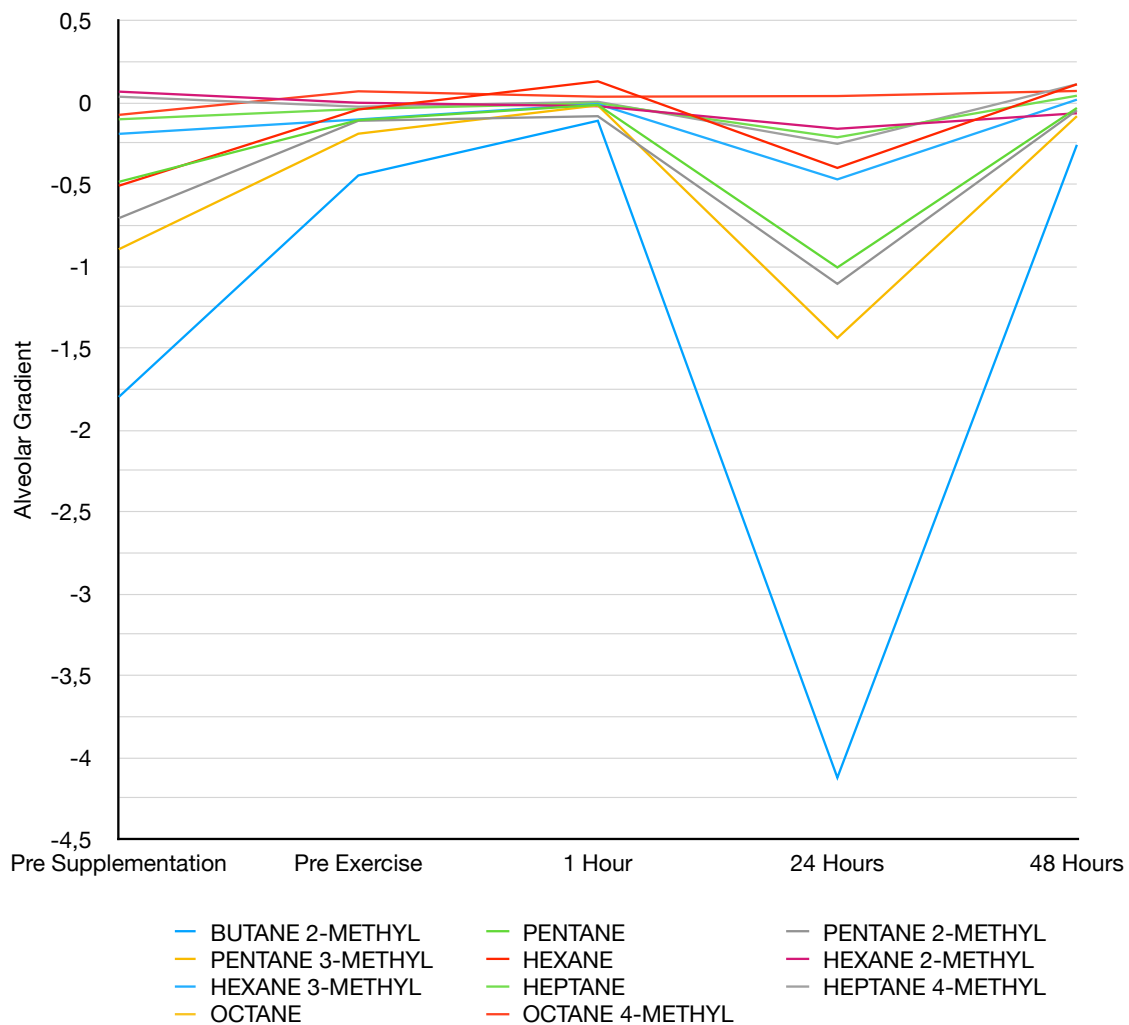
COMPOUND	ALVEOLAR GRADIENT				
	PRE SUP	PRE EX	1H	24H	48H
BUTANE 2-METHYL	-1,793	-0,361	0,325	-4,149	-0,243
PENTANE	-0,469	-0,082	0,172	-1,070	-0,006
ISOPRENE	47,831	26,684	41,415	18,273	26,302
PENTANE 2-METHYL	-0,617	-0,025	0,239	-1,136	-0,014
PENTANE 3-METHYL	-0,836	-0,169	0,105	-1,405	-0,162
HEXANE	-0,442	0,035	0,085	-0,253	-0,010
HEXANE 2-METHYL	-0,018	-0,009	0,046	-0,202	-0,078
HEXANE 3-METHYL	-0,195	-0,088	0,049	-0,500	0,014
HEPTANE	-0,109	-0,031	0,067	-0,226	0,051
HEPTANE 4-METHYL	0,027	-0,029	0,056	-0,262	0,069
OCTANE	-0,050	0,045	0,063	0,013	
OCTANE 4-METHYL	-0,077	0,074	0,310	0,063	0,035
CHLOROBENZENE D5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
TOTAL ALVEOLAR GRADIENT	-4,580	-0,642	1,518	-9,126	-0,345



Διάγραμμα 4: Γραφική απεικόνιση του Alveolar Gradient για τον εθελοντή 2 κατά τον κύκλο πειραμάτων



***Διάγραμμα 5:** Γραφική απεικόνιση του Alveolar Gradient όλων των μελετώμενων ενώσεων για τον εθελοντή 1 κατά τον κύκλο πειραμάτων*



Διάγραμμα 6: Γραφική απεικόνιση του Alveolar Gradient όλων των μελετώμενων ενώσεων για τον εθελοντή 2 κατά τον κύκλο πειραμάτων

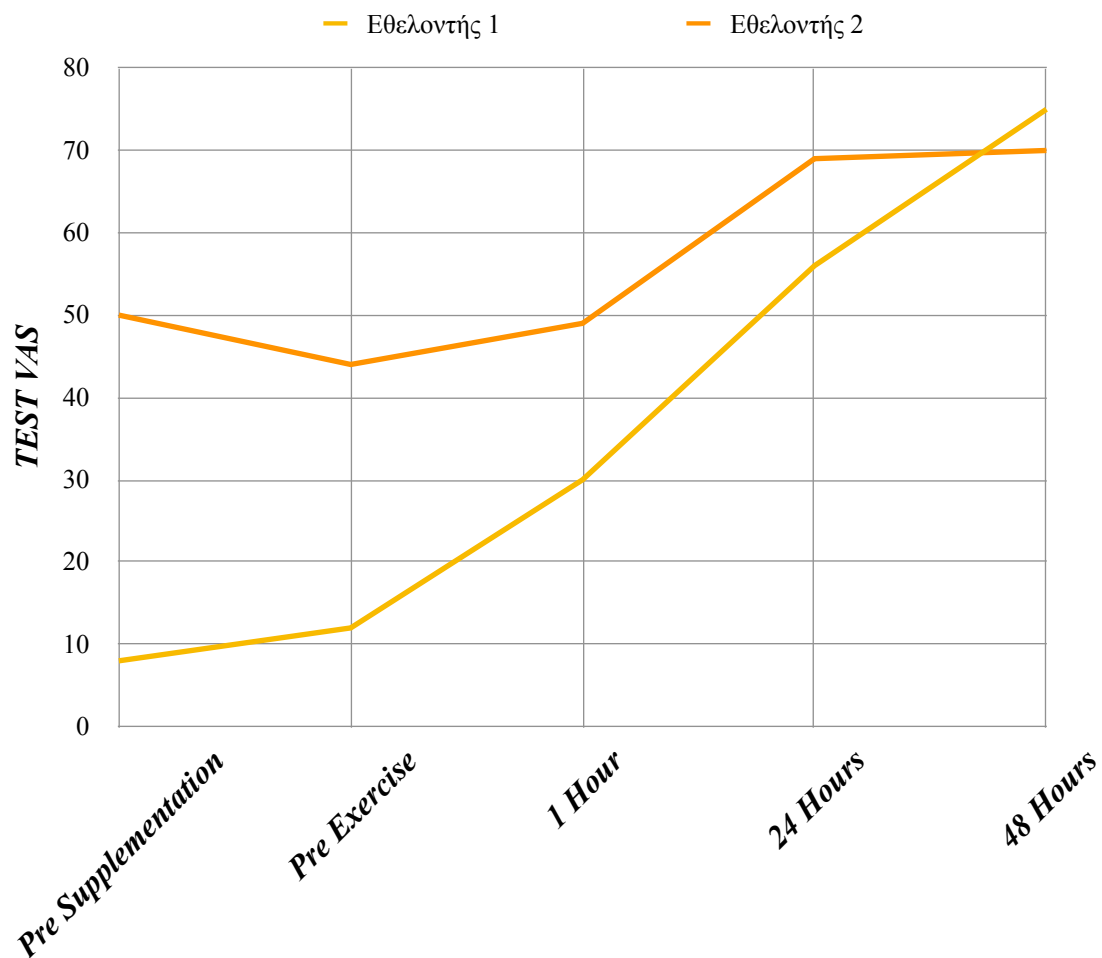
3. Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Παρατηρείται ότι, και για τους δύο εθελοντές, το Alveolar Gradient είναι συνήθως σε αρνητική τιμή. Τονίζεται ότι το Alveolar Gradient αποτελεί ένα εργαλείο ποσοτικοποίησης της πιθανότητας μια ΠΟΕ να είναι ενδογενούς προέλευσης. Καθώς οι μελετώμενες ΠΟΕ γνωρίζουμε ότι αποτελούν ενώσεις ενδογενούς προέλευσης, συσχετιζόμενες με το οξειδωτικό στρες, οι αρνητικές τιμές του Alveolar Gradient δεν αποτελούν πρόβλημα και συνεπώς δίνεται βάση στην αυξομειωτική «τάση» που εμφανίζει η μεταβλητή.

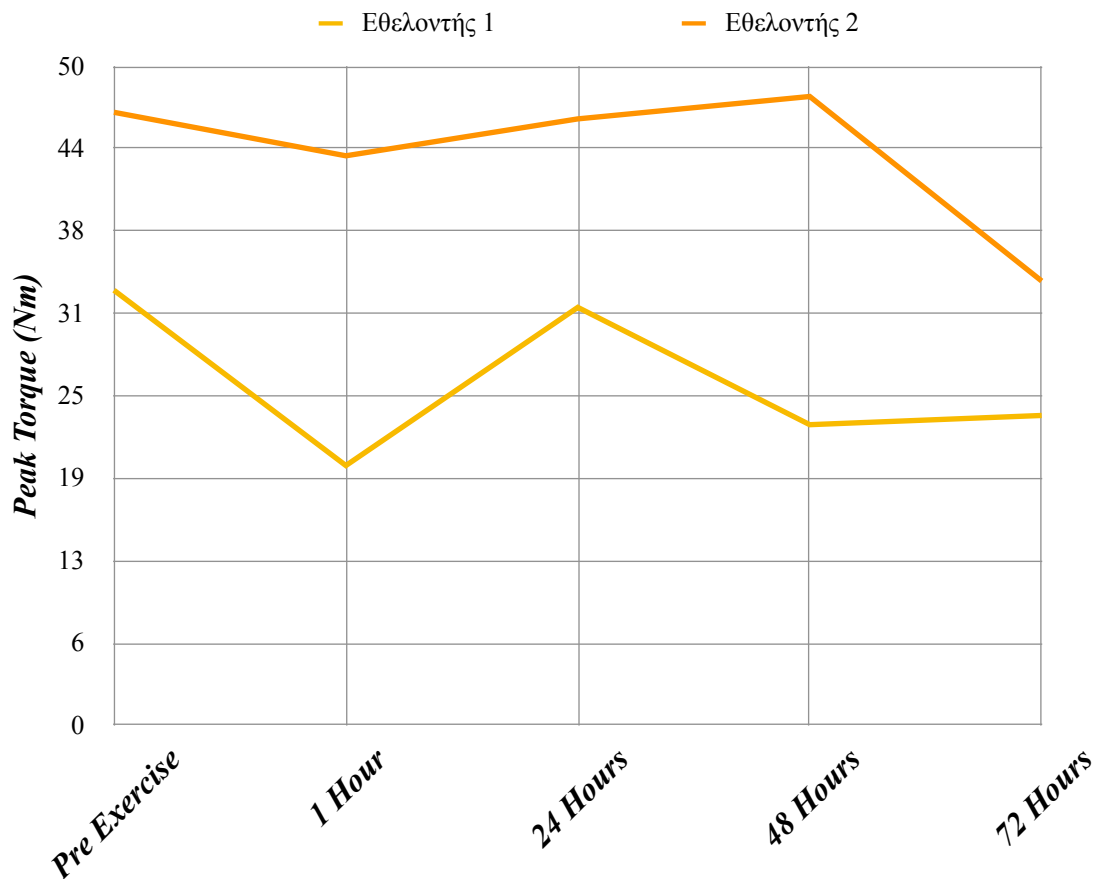
Από το στάδιο του Pre Supplementation μέχρι την πρώτη τους δειγματοληψία μετά από 15 μέρες παρουσιάζεται μια αύξηση των πιθανών βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό τους. Αυτή η αύξηση μπορεί πιθανά να εξηγηθεί από την κατανάλωση του συμπληρώματος διατροφής. Η Σπιρουλίνα, όπως έχει αναφερθεί, περιέχει πληθώρα λιπαρών οξέων (LA, GLA, DHA) τα οποία κατά τον μεταβολισμό τους αποδίδουν στον εκπνεόμενο αέρα αλκάνια που προκύπτουν και από την υπεροξείδωση των λιπιδίων όταν επικρατεί στον οργανισμό κατάσταση οξειδωτικού στρες. Στη προκειμένη περίπτωση είναι προφανές ότι δεν υπήρξε πρόκληση οξειδωτικού στρες στους εθελοντές, δεδομένου ότι τήρησαν το πρωτόκολλο προετοιμασίας και συνεπώς εικάζεται ότι η αύξηση των πιθανών βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες προκύπτει από τον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων της Σπιρουλίνας.

Στη συνέχεια παρατηρείται απότομη αύξηση του οξειδωτικού στρες μετά την άσκηση των εθελοντών, γεγονός το οποίο εξηγείται από την επιβολή ασκησιογόνου οξειδωτικού στρες και την απότομη υπεροξείδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων. Τονίζεται ότι η παραπάνω αύξηση μπορεί να μην προκύπτει μόνο από την υπεροξείδωση των λιπιδίων των κυττάρων αλλά και από την υπεροξείδωση των τριγλυκεριδίων στο αίμα των εθελοντών. Για τον έλεγχο ορθότητας της παραπάνω υπόθεσης, αναμένονται τα αποτελέσματα των αιματολογικών εξετάσεων των εθελοντών.

Μετά από 24 ώρες, αφού έχει επιβληθεί ασκησιογόνο οξειδωτικό στρες, ο δείκτης του Alveolar Gradient παρουσιάζει μια ραγδαία τάση κίνησης προς τα αρνητικά, υποδηλώνοντας την μείωση του οξειδωτικού στρες. Στην προσπάθεια ερμηνείας του φαινομένου, παρατίθενται τα παρακάτω εργομετρικά και φυσιολογικά δεδομένα των εθελοντών που λήφθηκαν από τους ερευνητές του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου (Διάγραμμα 7 και Διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 7: Διακόμανση αίσθησης πόνου στην ασκούμενη μυϊκή ομάδα για τους εθελοντές



Διάγραμμα 8: Διακύμανση της δύναμης κάμψεως της ασκούμενη μυϊκή ομάδα για τους εθελοντές

Όπως μπορεί να επιβεβαιωθεί και από τα εργομετρικά δεδομένα των εθελοντών και οι δύο βρισκόντουσαν ακόμα σε έντονη κατάσταση οξειδωτικού στρες. Πιο συγκεκριμένα, από το Διάγραμμα 7 οι εθελοντές πονούσαν αρκετά στην ασκούμενη μυϊκή ομάδα, κάτι το οποίο υποδηλώνει την ύπαρξη φλεγμονής και συνεπώς ασκησιογόνου οξειδωτικού στρες. Επίσης και οι δύο εμφάνισαν πτώση στην αντίσταση που μπορούσαν να εμφανίσουν στο δυναμόμετρο, δείχνοντας ότι η μυϊκή ομάδα δεν είχε επανέλθει στην αρχική της κατάσταση λόγω φλεγμονής και οξειδωτικού στρες.

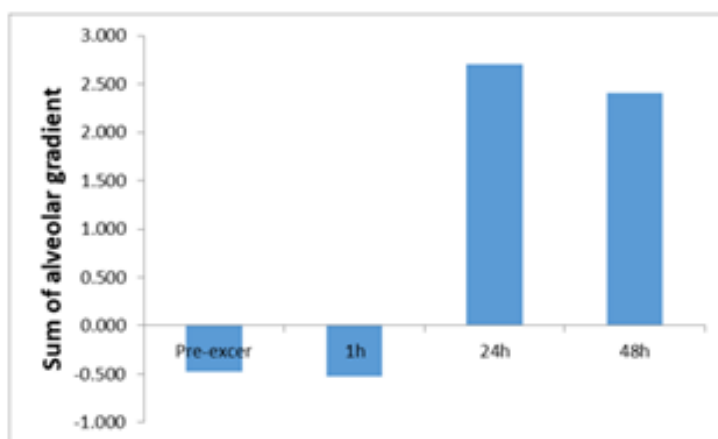
Όπως είναι προφανές, δεν είχε μειωθεί το οξειδωτικό στρες, αντιθέτως είχε αυξηθεί. Μια πιθανή εξήγηση στην αστοχία του Alveolar Gradient να εξηγήσει την παραπάνω πορεία του οξειδωτικού στρες προκύπτει από την μείωση των τριγλυκεριδίων στο αίμα την επομένη της άσκησης. Λόγω της έντονης άσκησης, οι ROS που ελευθερώθηκαν στο αίμα των εθελοντών βρήκαν υποστρώματα για να δράσουν. Μετά την πρώτη φάση αύξησης του οξειδωτικού στρες στη 1 ώρα μετά την άσκηση, οι ROS έδρασαν τόσο πάνω σε κυτταρικές μεμβράνες, όσο και σε

τριγλυκερίδια ελεύθερα στο αίμα. Την επομένη, εφόσον υπάρχουν μειωμένα τριγλυκερίδια στο αίμα, υπάρχει έλλειψη υποστρώματος ώστε να μπορέσουν να δράσουν οι ROS καθώς οι κυτταρικές μεμβράνες που θα προσβληθούν είναι πεπερασμένος και σχετικά σταθερός αριθμός.

Την τελευταία μέρα, στις 48 ώρες, εμφανίζεται αύξηση του πιθανών βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες και στους 2 εθελοντές, ενώ τα εργομετρικά και φυσιολογικά δεδομένα υποστηρίζουν την ύπαρξη πιο έντονης φλεγμονής. Αυτή η αύξηση του Alveolar Gradient προκύπτει από την αύξηση των ROS στο αίμα λόγω της μεγαλύτερης φλεγμονής. Η αύξηση της φλεγμονής φαίνεται από το τεστ VAS που δείχνει αύξηση του αισθανόμενου πόνου, ενώ στο Διάγραμμα 8 η φλεγμονή δείχνει να γίνεται εντονότερη στις 72 ώρες καθώς οι εθελοντές εμφανίζουν την χαμηλότερη επίδοσή τους στο τεστ αντίστασης. Συνεπώς, η αύξηση του οξειδωτικού στρες, προκύπτει από αύξηση των ROS οι οποίες με τη σειρά τους υπεροξειδώνουν τα λιπίδια που προκύπτουν από το μεταβολισμό της Σπιρουλίνας, τα τριγλυκερίδια του αίματος αλλά και κυτταρικές μεμβράνες.

Σε παλιότερη διπλωματική εργασία, όπου δεν είχε καταναλωθεί κάποιο συμπλήρωμα διατροφής η οποία μελετούσε την επίπτωση του οξειδωτικού στρες στα αλκάνια του εκπνεόμενου αέρα εθελοντών, είχε παρατηρηθεί το Διάγραμμα 9, στο οποίο εμφανιζόταν «θετική τάση» στον δείκτη του Alveolar Gradient, συμπεραίνοντας την αύξηση του οξειδωτικού στρες με την πάροδο του χρόνου μετά την επιβολή του πρωτόκολλου άσκησης. Σε αντίθεση με τα διαγράμματα 3 και 4 η τάση του Alveolar Gradient δείχνει να υπάρχει ελάττωση του οξειδωτικού στρες στις 24 ώρες, ενώ στις 48 ώρες εμφανίζεται απότομη αύξηση. Ο λόγος που υπάρχει αυτή η έντονη διακύμανση δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί, μέχρι τουλάχιστον να υπάρχουν τα αιματολογικά δεδομένα για να σχολιασθούν τα επίπεδα λιπιδίων στο αίμα και να επιβεβαιωθεί, ή όχι, η αντιοξειδωτική δράση της σπιρουλίνας στους εθελοντές της πειραματικής εργασίας.

No supplementation



Διάγραμμα 9: Διακύμανση του Alveolar Gradient σε εθελοντή που δεν κατανάλωνε σπιρουλίνα

4. Συμπεράσματα και μελλοντική εργασία

Συμπερασματικά, η πειραματική διαδικασία κρίνεται επιτυχής, ενώ ο στόχος παρακολούθησης του οξειδωτικού στρες διαμέσου του εκπνεόμενου αέρα επιτεύχθηκε, με τη συμπληρωματική βοήθεια ορισμένων τεστ ύπαρξης κάματου. Παρά ότι στην πειραματική διαδικασία συλλέχθηκε τόσο ο ΝΟΑ όσο και ο αέρας που προκύπτει από τις κυψελίδες, μπόρεσαν να δοθούν πορίσματα σχετικά με την διακύμανση του οξειδωτικού στρες. Προφανώς ο μικρός αριθμός εθελοντών που ήταν διαθέσιμος για την πραγματοποίηση των μετρήσεων, λόγω της πανδημίας του COVID-19, καθιστά αβέβαια τα αποτελέσματα της πειραματικής εργασίας. Η σύσταση του εκπνεόμενου αέρα επηρεάζεται από μια πληθώρα μεταβλητών όπου ο περιορισμένος αριθμός εθελοντών αποτέλεσε σημαντικό εμπόδιο στην εξαγωγή συμπερασμάτων με βεβαιότητα. Για τον λόγο αυτό η εργασία θεωρείται μια εισαγωγική έρευνα στον πολύπλοκο τομέα της ανάλυσης εκπνεόμενου αέρα και των μεταβολικών διαδικασιών που ερμηνεύουν το οξειδωτικό στρες και την έκλυση πιθανών βιοδεικτών αυτού. Επίσης θα ήταν ιδιαίτερα σημαντικό να υπήρχε σύγκριση των εθελοντών με τον εαυτό τους, καταναλώνοντας για έναν πειραματικό κύκλο σπιρουλίνα, ενώ σε δεύτερο πειραματικό κύκλο το εικονικό σκεύασμα ούτως ώστε να μπορούσε να δοθεί μια ακριβής εικόνα της επίπτωσης της σπιρουλίνας στον εκπνεόμενο αέρα.

Μελλοντικά, ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα εμφάνιζε η ανάπτυξη συστήματος On-line ανάλυσης των δειγμάτων εκπνεόμενου αέρα ούτως ώστε να υπήρχε η δυνατότητα επί τόπου ανάλυσης και στιγμιαίας αξιολόγησης αποτελεσμάτων. Επιπρόσθετα, έχει προταθεί η κατασκευή μιας δειγματοληπτικής συσκευής, από ειδικά μη προσροφητικά υλικά, η οποία θα επιτρέπει την απόρριψη του ΝΟΑ, επιτρέποντας τον καλύτερο εντοπισμό των παρατηρούμενων αλκανίων, αλλά και τον πιθανό εντοπισμό νέων πιθανών βιοδεικτών του οξειδωτικού στρες στον άνθρωπο.

Συντομογραφίες

ΠΟΕ: Πτητικές Οργανικές Ενώσεις

ΝΟΑ: Νεκρός Όγκος Αέρα

Pre Sup ή *Pre Supplementation*: Στάδιο προ χορήγησης Σπιρουλίνας

Pre Ex ή *Pre Exercise*: Στάδιο προ επιβολής Πρωτοκόλλου Άσκησης

1 Hour: Στάδιο της 1 ώρας μετά της επιβολής του Πρωτοκόλλου Άσκησης

24 Hours: Στάδιο των 24 ωρών μετά της επιβολής του Πρωτοκόλλου Άσκησης

48 Hours: Στάδιο των 48 ωρών μετά της επιβολής του Πρωτοκόλλου Άσκησης

Παράρτημα

Στοιχεία του TDU:

Εταιρία **Markes**

Μοντέλο **Unity 2**

He ως φέρον αέριο

Θερμοπρογραμματισμός του TDU:

transfer line: 150 °C

split: 2 ml He/ min

desorption: 30 ml/ min

Heating valve temperature: 200 °C

Tube desorption: 20 min στους 200 °C

Flow Path temperature: 150 °C

Minimum Carrier Pressure: 5 bar

GC Cycle Time: 0

Pre-purge time: 5 min

Pre-trap Fire Purge: 1 min

Trap Low: -10 °C

Heating Rate: MAX

Trap High: 220 °C

Trap Hold: 5 min

Στοιχεία του GC:

Εταιρία **Shimadzu**

Μοντέλο **2010 GC**

He ως φέρον αέριο

Μήκος στήλης **60 m**

Διάμετρος στήλης **10.25 mm**

Πάχος φιλμ επικάλυψης της στήλης **1.4 μm**

Θερμοπρογραμματισμός του GC:

Για τα 5 πρώτα λεπτά της ανάλυσης θερμοκρασία φούρνου στους 35 °C. Μετά το πέρας, αύξηση θερμοκρασίας φούρνου με ρυθμό 4 °C/ min και παραμονή στους 200 °C για 35 λεπτά.

Στοιχεία του MS:

Εταιρία **Agilent Technologies**

Μοντέλο **5975 C**

Παράμετροι του MS:

Πηγή ιονισμού στους 230 °C

Γραμμή μεταφοράς στους 220 °C

Καθυστέρηση ανάλυσης 5 min

Παράμετροι Σάρωσης 35-230 am

Βιβλιογραφία

- [1] J. Pereira, P. Porto-Figueira, C. Cavaco, K. Taunk, S. Rapole, R. Dhakne, H. Nagarajaram, J. S. Camara, Breath Analysis as a Potential and Non-Invasive Frontier in Disease Diagnosis: An Overview, *Metabolites*, **2014**, 5: (3-55)
- [2] C. Wang, C. Ke, X. Wang, C. Chi, L. Guo, S. Luo, Z. Guo, G. Xu, F. Zhang, E. Li, Noninvasive detection of colorectal cancer by analysis of exhaled breath, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 406: (4757–4763)
- [3] B. L. Costello, A. Amann, H. Al-Kateb, C. Flynn, W. Filipiak, T. Khalid, D. Osborne, N. M. Ratcliffe, A review of the volatiles from the healthy human body, *J. Breath. Res.*, **2014**, 8: 1-29
- [4] V. A. Ferraris, What do dogs, ancient Romans, Linus Pauling, and mass spectrometry have in common? Early lung cancer and exhaled breath, *JTCVS*, **2016**, 151: (313-314)
- [5] M. Phillips, J. Herrera, S. Krishnan, M. Zain, J. Greenberg, R. N. Cataneo, Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **1999**, 729 (1–2): 75–88.
- [6] T. H. Risby, S. F. Solga, Current status of clinical breath analysis, *Applied Physics B*, **2006**, 85: (421-426)
- [7] Owlstone Medical LTD, Breath Biopsy ® The Complete Guide, Volatile Organic Compounds (VOCs) as biomarkers for disease
- [8] W. Cao, Y. Duan, Current Status of Methods and Techniques for Breath Analysis, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2007**, 37: (3-13)
- [9] M. Alonso, J. M. Sanchez, Analytical challenges in breath analysis and its application to exposure monitoring, *Trends of Analytical Chemistry*, **2013**, 44: (78-89)

- [10] J. K. Schubert, K. Spittler, G. Braun, K. Geiger, J. Guttman, CO₂-controlled sampling of alveolar gas in mechanically ventilated patients, *Journal of Applied Physiology*, **2001**, 90: (486-492)
- [11] M. A. G. Wallace, J. D. Pleil, Evolution of clinical and environmental health applications of exhaled breath research: Review of methods and instrumentation for gasphase, condensate, and aerosols, *Analytica Chimica Acta*, **2018**, xxx: (1-21)
- [12] J. Beauchamp, J. Herbig, R. Gutmann, A. Hansel, On the use of tedlar® bags for breath-gas sampling and analysis, *J. Breath Res.*, **2008**, 2(4): 046001
- [13] M. Phillips, Breath tests in medicine, *Scientific American*, **1992**, 267: (74–79)
- [14] N. Teshima, J. Z. Li, K. Toda, P. K. Dasgupta, Determination of acetone in breath, *Analytica Chimica Acta*, **2005**, 535: (189–199)
- [15] T. H. Risby, Volatile organic compounds as markers in normal and diseased states, *NATO Science Series, Sub-Series I: Life sand Behavioral Sciences*, **2002**, 346: (113–122)
- [16] M. Phillips, J. Greenberg, Ion-trap detection of volatile organic compounds in alveolar breath, *Clinical Chemistry*, **1992**, 38: (60– 65)
- [17] E. Woolfenden, Sorbent-based sampling methods for volatile and semi-volatile organic compounds in air. Part 2. Sorbent selection and other aspects of optimizing air monitoring methods, *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217: (2685–2694)
- [18] C. Grote, J. Pawliszyn, Solid-phase microextraction for the analysis of human breath, *Anal. Chem.*, **1997**, 69: (587–596)
- [19] P. Trefz, L. Rösner, D. Hein, J. Schubert, W. Miekisch, Evaluation of needle trap microextraction and automatic alveolar sampling for point-of-care breath analysis, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, 405: (3105–3115)

- [20] K. Kim, S. A. Jahan, E. Kabir, A review of breath analysis for diagnosis of human health, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2012**, 33: (1-8)
- [21] C. Wang, P. Sahay, Breath analysis using laser spectroscopic techniques: Breath biomarkers, spectral fingerprints, and detection limits, *Sensors*, **2009**, 9: (8230–8262)
- [22] H. K. Wilson, A. C. Monster, New technologies in the use of exhaled breath analysis for biological monitoring, *Occup. Environ. Med.*, **1999**, 56(11): (753-757)
- [23] P. Shende, J. Vaidya, Y. A. Kulkarni, R.S. Gaud, Systematic approaches for biodiagnostics using exhaled air, *Journal of Controller Release*, **2017**, 268: (282-295)
- [24] P. Španel, D. Smith, Quantification of volatile metabolites in exhaled breath by selected ion flow tube mass spectrometry, SIFT-MS, *Clinical Mass Spectrometry*, **2020**, 16: (18-24)
- [25] <https://www.breathomix.com> (26/08/2020)
- [26] Andras Bikov, Marton Hernadi, Beata Zita Korosi, Laszlo Kunos, Gabriella Zsamboki, Zoltan Sutto, Adam Domonkos Tarnoki, David Laszlo Tarnoki, Gyorgy Losonczy & Ildiko Horvath, Expiratory flow rate, breath hold and anatomic dead space influence electronic nose ability to detect lung cancer, *BMC Pulmonary Medicine*, **2014**, 14(202)
- [27] T. Kawamura, I. Muraoka, Exercise-Induced Oxidative Stress and the Effects of Antioxidant Intake from a Physiological Viewpoint, *Antioxidants*, **2018**, 7(9): 119
- [28] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2007**, 39: (44–84)

- [29] Norman Ratcliffe et al, A mechanistic study and review of volatile products from peroxidation of unsaturated fatty acids: an aid to understanding the origins of volatile organic compounds from the human body, *J. Breath Res.*, **2020**
- [30] S. D. Meo, G. Napolitano, P. Venditti, Mediators of Physical Activity Protection against ROS-Linked Skeletal Muscle Damage, *International Journal of Molecular Sciences*, **2019**, 20(12): 3024
- [31] P. Ghezzi, V. Jaquet, F. Marcucci, H. H. H. W. Schmidt, The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects, *Br. J. Pharmacol.*, **2017**, 174: (1784–1796)
- [32] S. K. Powers, W. B. Nelson, M. B. Hudson, Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences, *Free Radical Biology & Medicine*, **2011**, xxx: (xxx-xxx)
- [33] F. He, J. Li, Z. Liu, C. Chuang, W. Yang, L. Zuo, Redox Mechanism of Reactive Oxygen Species in Exercise, *Frontiers in Physiology*, **2016**, 7(486)
- [34] B. Calenic, D. Miricescu, M. Greabu, A. V. Kuznetsov, J. Troppmair, V. Ruzsanyi, A. Amann, Oxidative stress and volatile organic compounds: interplay in pulmonary, cardio-vascular, digestive tract systems and cancer, *Open Chem.*, **2015**, 13: (1020-1030)
- [35] I. Rahman, S. K. Biswas, Non-invasive biomarkers of oxidative stress: reproducibility and methodological issues, *Redox Rep.*, **2004**, 9(3): (125-143)
- [36] P. Paredi, S. A. Kharitonov, P. J. Barnes, Analysis of Expired Air for Oxidation Products, *AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE*, **2002**, 166: (31-37)
- [37] M. Phillips, R. N. Cataneo, J. Greenberg, R. Gunawardena, A. Naidu, F. Rahbari-Oskoui, Effect of age on the breath methylated alkane contour, a display of apparent new markers of oxidative stress, *J Lab Clin Med*, **2000**, 136(3): (243-249)

- [38] N.V. Margaritelis, V. Paschalis, A. A. Theodorou, A. Kyparos, M.G. Nikolaidis, Redox basis of exercise physiology, *Redox Biology*, **2020**, 35(101499)
- [39] H. Lu, C. Hsieh, J. Hsu, Y. Yang, H. Chou, Preventive effects of *Spirulina platensis* on skeletal muscle damage under exercise-induced oxidative stress, *Eur J Appl Physiol*, **2006**, 98: (220–226)
- [40] Y. Liang, Y. Bao, X. Gao, K. Deng, S. An, Z. Wang, X. Huang, D. Liu, Z. Liu, F. Wang, Y. Fan, Effects of spirulina supplementation on lipid metabolism disorder, oxidative stress caused by high-energy dietary in hu sheep, *Meat Science*, **2020**, 164 (2020) 108094
- [41] S. M. Zakaria, S. M. M. Kamal, M. R. Harun, R. Omar, S. I. Siajam, Subcritical Water Technology for Extraction of Phenolic Compounds from *Chlorella* sp. Microalgae and Assessment on Its Antioxidant Activity, *Molecules*, **2017**, 22(7)
- [42] L. M. Andrade, C. J. Andrade, M. Dias, C. AO Nascimento, M. A. Mendes, *Chlorella* and spirulina microalgae as sources of functional foods, nutraceuticals, and food supplements; an overview, *MOJ Food Processing & Technology*, **2018**, 6: (45-58)
- [43] A. Shariat, M. A. Farhangi, R. Zeinalian, *Spirulina platensis* supplementation, macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1), oxidative stress markers and anthropometric features in obese individuals: A randomized controlled trial, *Journal of Herbal Medicine*, **2019**, 17_18(100264)
- [44] P.V. Torres-Durán, A. Ferreira-Hermosillo, A. Ramos-Jiménez, R.P. Hernández-Torres, M.A. Juárez-Oropeza, Effect of *Spirulina maxima* on postprandial lipemia in young runners: a preliminary report, *J Med Food*, **2012**, 15(8): (753-757)
- [45] <https://www.who.int> (24/09/2020)