



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**Επίδραση της κατανάλωσης συμπληρώματος
διατροφής στην αντιοξειδωτική κατάσταση
φαινομενικά υγιών εθελοντών**

ΧΟΛΕΒΑ ΜΑΡΙΑ (Α.Μ.: 21138)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ, ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ

ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
SUMMARY	7
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	8
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	13
1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ.....	13
Είδη ελεύθερων ριζών.....	13
Ρίζα υδροξυλίου (OH·).....	13
Ανιόν υπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$).....	14
Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)	14
Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)	14
Μονοξειδίο του αζώτου ($\text{NO}\cdot$).....	14
Υπεροξυνιτρώδες (ONOO^-)	14
1.2 ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ	15
1.2.1 Ενδογενείς.....	15
Αναπνευστική αλυσίδα	15
Κυτόχρωμα P_{450}	16
Οξειδάση της ξανθίνης.....	17
NADPH οξειδάση	17
1.2.2 Εξωγενείς.....	17
Ακτινοβολία	17
Ατμοσφαιρική ρύπανση	17
Κάπνισμα	18
Διατροφή.....	18
1.3 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ	19
Ανοσοποιητικό σύστημα	19
Λιπίδια.....	19
DNA.....	23
Πρωτεΐνες	23
1.4 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ.....	24
1.4.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά	25
Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD).....	25
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)	26
Καταλάση (CAT)	27
Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)	28
1.4.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	29
Γλουταθειόνη (GSH)	29
Βιταμίνη C.....	29
Βιταμίνη E	30
Βιταμίνη A.....	31
Συνένζυμο Q_{10} (CoQ).....	32

Φλαβονοειδή.....	32
A-λιποϊκό οξύ (ALA)	33
1.4.3 Πρωτεΐνες δέσμευσης μετάλλων	34
Φερριτίνη.....	34
Αλβουμίνη	34
Τρανσφερίνη	34
1.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ.....	35
Προσδιορισμός οξειδωτικής βλάβης στα λιπίδια	35
Προσδιορισμός οξειδωτικής βλάβης στο DNA.....	35
Προσδιορισμός οξειδωτικής βλάβης στις πρωτεΐνες.....	35
Μέτρηση της δραστηριότητας ενζύμων που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες	36
Μέτρηση επιπέδων αντιοξειδωτικών	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΝΟΣΟΙ.....	39
Καρδιαγγειακά (CVD)	39
Σακχαρώδης Διαβήτης.....	39
Καρκίνος	40
Χρόνια Νεφρική Νόσος (XNN).....	41
Γήρανση	41
Νόσος Alzheimer	42
Κυστική Ίνωση	43
Δερματικές παθήσεις	44
Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ.....	54
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	55
5.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	55
5.1.1 Περιγραφή σχεδιασμού.....	55
5.1.2 Στρατολόγηση εθελοντών	55
5.1.3 Παραλαβή βιολογικών δειγμάτων.....	55
5.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ.....	55
Συστατικά	56
5.2.1 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του συμπληρώματος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu	59
5.2.2 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του συμπληρώματος να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (DPPH).....	60
5.2.3 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του συμπληρώματος να αναστέλλουν την ενζυμική (λιποξυγονάσης-LOX) οξείδωση λιπαρών οξέων.....	61
5.2.4 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του συμπληρώματος να αναστέλλουν την οξείδωση ορού.....	63
5.2.5 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του συμπληρώματος να αναστέλλουν τη μη ενζυμική οξείδωση λιπαρών οξέων.....	64

5.2.6 Προσδιορισμός ολικής δραστηριότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) σε λευκοκύτταρα.....	66
5.2.6.1 Μέθοδος Bradford.....	68
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	70
6.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ FOLIN-CIOCALTEU	70
6.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΝΑ ΔΕΣΜΕΥΟΥΝ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ (DPPH)	71
6.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΝΑ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΕΝΖΥΜΙΚΗ (ΛΙΠΟΞΥΓΟΝΑΣΗΣ-LOX) ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ	73
6.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΝΑ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΟΡΟΥ	74
6.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΟΣ ΝΑ ΑΝΑΣΤΕΛΛΟΥΝ ΤΗΝ ΜΗ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ (ΑΠΟ FE) ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ	75
6.6 ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ ΣΕ ΥΓΙΕΙΣ ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ.....	75
6.6.1 Χαρακτηριστικά των εθελοντών στην αρχή της παρέμβασης (εβδομάδα 0).....	75
6.6.2 Συσχετίσεις δεικτών με στατιστική σημαντικότητα	78
6.6.3 Δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης κατά τη διάρκεια της παρέμβασης	78
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	82
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	92

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξειδωτικό στρες είναι μια ανισορροπία στην αναλογία μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών. Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους που είναι πολύ ασταθή και πολύ δραστικά καθώς προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια. Στον οργανισμό, οι ελεύθερες ρίζες είτε συντίθενται ενδογενώς, είτε προέρχονται από εξωγενείς πηγές. Παράλληλα, οι αντιοξειδωτικές ουσίες του οργανισμού δρουν είτε σχηματίζοντας λιγότερο δραστικές ρίζες, είτε επιδιορθώνοντας τις βλάβες που προκαλούνται από αυτές και έχουν επίσης ενδογενή ή εξωγενή προέλευση. Ένα χαμηλό επίπεδο ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητο για να διατηρηθεί η φυσιολογική λειτουργία του οργανισμού, ωστόσο, η υπερβολική παραγωγή αυτών επιδρά καταστροφικά για τα βιομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA) και εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων.

Σκοπός της μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η αντιοξειδωτική ικανότητα ενός συμπληρώματος διατροφής που περιέχει ένα συνδυασμό αντιοξειδωτικών μορίων, καθώς και η επίδραση της κατανάλωσής του στη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης των λευκοκυττάρων, σε υγιείς εθελοντές. Το συμπλήρωμα περιέχει αντιοξειδωτικές ουσίες από Gel αλόης, εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού και εκχυλίσματος *Polygonum cuspidatum*, καθώς και μίγμα βιταμινών.

Πραγματοποιήθηκε διπλά τυφλή παρέμβαση με δυο σκέλη ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα. 58 υγιείς εθελοντές κατανάλωσαν είτε το συμπλήρωμα, είτε το εικονικό σκεύασμα για 8 εβδομάδες. Οι εθελοντές χωρίστηκαν σε τυχαία συνδυασμένες ομάδες με βάση το φύλο, την ηλικία, το ΔΜΣ και τις καπνιστικές συνήθειες. Για την εκτίμηση της *in vitro* αντιοξειδωτικής ικανότητας του συμπληρώματος πραγματοποιήθηκαν στο δοκιμαστικό σωλήνα προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων, προσδιορισμός της ικανότητας δέσμευσης ελευθέρων ριζών DPPH, προσδιορισμός της ικανότητας αναστολής της ενζυμικής και της μη ενζυμικής οξείδωσης λιπαρών οξέων και προσδιορισμός της ικανότητας αντίστασης στην οξείδωση του ορού. Για την επίδραση του συμπληρώματος στη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης εξετάστηκε η *ex vivo* αναγωγή του ανιόντος υπεροξειδίου σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων.

Η συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων στο συμπλήρωμα προσδιορίστηκε στα 3,1mg/mL ενώ στο placebo στα 0,3mg/mL ($p<0,00$). Τα συστατικά του συμπληρώματος προκάλεσαν την εκκαθάριση των ριζών DPPH με δοσοεξαρτώμενη σχέση, σε αντίθεση με το placebo. Στη δοκιμασία της μη ενζυμικής οξείδωσης λιπαρών οξέων δεν υπήρχαν σαφή αποτελέσματα, ενώ στην ενζυμική, το συμπλήρωμα προκάλεσε την αναστολή της οξείδωσης των λιπαρών οξέων αντίθετα με το placebo, ωστόσο τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά. Η αντίσταση του ορού στην οξείδωση ήταν δοσοεξαρτώμενη και στα δύο σκευάσματα και σημαντικά μεγαλύτερη στο συμπλήρωμα ($p<0,05$). Όσον αφορά την κλινική παρέμβαση δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στους κλασικούς βιοχημικούς δείκτες. Στο χρόνο 0, δεν υπήρχε διαφορά στη δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης μεταξύ των εθελοντών. Την 4^η εβδομάδα παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου

($p=0,03$) στους εθελοντές που κατανάλωσαν το συμπλήρωμα, σε σχέση με αυτούς που κατανάλωσαν το placebo, καθώς και με το χρόνο 0 ($p=0,04$).

Η κατανάλωση του συμπληρώματος για 4 εβδομάδες, προσέφερε στον οργανισμό αντιοξειδωτική προστασία που οδήγησε στη μείωση της δραστηριότητας της ενδογενούς υπεροξειδικής δισμουτάσης των λευκοκυττάρων.

SUMMARY

Oxidative stress is an imbalance in the pro-oxidant and antioxidant ratio. Free radicals are molecules or atoms with one or more unpaired electrons in the outer valence shell, which are very unstable and very reactive as they try to extract electrons from other molecules. In vivo, free radicals are either endogenously synthesized or exogenously derived. Meanwhile, in vivo antioxidants act either by forming less free radicals or by repairing the damage caused by them and have also endogenous or exogenous origin. A low level of free radicals is necessary to maintain normal physiological function, however, excessive production impairs biomolecules (lipids, proteins, DNA) and is involved in the pathophysiology of many diseases.

The purpose of the study was to evaluate the antioxidant capacity of a dietary supplement containing a combination of antioxidant molecules, as well as the effect of consumption in healthy volunteers' leukocyte superoxide dismutase activity. The supplement contains antioxidants from Aloe Gel, green tea extract and *Polygonum cuspidatum* extract, and a vitamin mixture.

The intervention was double blind and placebo controlled. 58 healthy volunteers consumed either the supplement or the placebo for 8 weeks. The groups were randomly separated based on gender, age, BMI and smoking habits. The estimation of the supplement's antioxidant capacity was made in vitro by determination of total phenolic compounds, determination of free radical (DPPH) scavenging capacity, determination of enzymatic and non-enzymatic fatty acid oxidation inhibiting capacity and determination of serum resistance to oxidation. The supplement's effect on superoxide dismutase activity was examined ex vivo by reducing the superoxide radical in leukocyte homogenate.

The supplement's total phenolic compound concentration was determined to be 3,1mg/mL while the placebo's was 0,3mg/mL ($p<0,00$). The supplement's components dose-dependently scavenged the DPPH radicals, as opposed to placebo. The non-enzymatic fatty acid oxidation test results were not clear, while in the enzymatic one, the supplement inhibited the fatty acid oxidation as opposed to placebo, but there were no statistically significant results. The serum resistance to oxidation was dose-dependent in both products and significantly higher in the supplement ($p<0,05$). Concerning clinical trial no differentiation was observed in classical biochemical markers during the intervention. At time 0, there was no difference in superoxide dismutase activity among volunteers. On the 4th week, reduced superoxide dismutase activity was noticed ($p=0,03$) in volunteers who consumed the supplement, compared to those who consumed a placebo, and to time 0 ($p=0,04$).

The consumption of the supplement for four weeks, offered antioxidant protection that led to reduced endogenous superoxide dismutase activity in leukocytes.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AA	arachidonic acid, αραχιδονικό οξύ
ABAD	amyloid-β binding alcohol dehydrogenase, αλκοολική αφυδρογονάση που συνδέει το πεπτίδιο του Αβ
Αβ	amyloid-β, αμυλοειδές β
AEE	αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο
Al	aluminum, αργίλιο
ALA	alpha lipoic acid, άλφα λιποϊκό οξύ
AOPPs	advanced oxidation protein products, προϊόντα πρωτεϊνών προχωρημένης οξείδωσης
ΑpoE	apolipoprotein E, απολιποπρωτεΐνη E
APP	amyloid precursor protein, πρωτεΐνη πρόδρομος του αμυλοειδούς-β
ASL	airway surface liquid, υγρό επιφάνειας αεραγωγών
α-TP	alpha tocopherol, άλφα τοκοφερόλη
βc	β-carotene, β-καροτένιο
C	catechin, κατεχίνη
CAT	catalase, καταλάση
CFTR	transmembrane conductance regulator, διαμεμβρανικός ρυθμιστής αγωγιμότητας
Co	cobalt, κοβάλτιο
CoQ	Coenzyme Q, συνένζυμο Q
CRP	C-reactive protein, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CuSO ₄	copper sulfate, θειικός χαλκός
CuZnSOD/SOD1	copper zinc superoxide dismutase, υπεροξειδική δισμουτάση χαλκού-ψευδαργύρου
CVD	cardiovascular diseases, καρδιαγγειακές ασθένειες
CYP	cytochrome P, κυτόχρωμα P
ΔΜΣ	δείκτης μάζας σώματος
DMSO	dimethyl sulfoxide, διμεθυλο-σουλφοξείδιο

DPPH	1,1 diphenyl-2-picryl-hydrazyl, 1,1 διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζύλιο
EC	epicatechin, επικατεχίνη
ECG	epicatechin gallate, επικατεχίνη gallate
EGC	epigallocatechin, επιγαλλοκατεχίνη
EGCG	epigallocatechin gallate, επιγαλλοκατεχίνη gallate
EcSOD/SOD3	extracellular superoxide dismutase, εξωκυττάρια υπεροξειδική δισμουτάση
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay, ανοσοενζυμική μέθοδος προσρόφησης
eNOS	endothelial nitric oxide synthase, ενδοθηλιακή συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου
ET	electron transfer, μεταφορά ηλεκτρονίου
Eth	ethanol, αιθανόλη
FAD	flavin adenine dinucleotide, φλάβινο-αδένινο δινουκλεοτίδιο
Fe	iron, σίδηρος
FMN	flavin mononucleotide, φλάβινο-μονονουκλεοτίδιο
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης
GC	gas chromatography, αέρια χρωματογραφία
GFR	glomerular filtration rate, ρυθμός σπειραματικής διήθησης
GIIS	glucose-induced insulin secretion, έκκριση ινσουλίνης που προκαλείται από γλυκόζη
GPx	glutathione peroxidase, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GSSG	glutathione disulfide, δισουλφίδιο γλουταθειόνης
GSH	glutathione, γλουταθειόνη
GR	glutathione reductase, αναγωγάση της γλουταθειόνης
HAT	hydrogen atom transfer, μεταφορά ατόμου υδρογόνου
HDL	high density lipoprotein, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
HG	high glucose, υψηλή γλυκόζη
4-HNE	4-hydroxynonenal, 4-υδροξυνονενάλη

HNO ₂	nitrous acid, νιτρώδες οξύ
H ₂ O	water, νερό
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide, υπεροξείδιο του υδρογόνου
HOCl	hypochlorous acid, υποχλωριώδες οξύ
15-HPETE	15-υδροϋπεροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ
HPLC	high pressure liquid chromatography, υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
13-HPODE	13-υδροϋπεροξυδεκαοκταδιενοϊκό οξύ
HSPG	heparin sulfate proteoglycan, πρωτεογλυκάνη θειική ηπαρίνη
IGT	impaired glucose tolerance, διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη
IL	interleukin, ιντερλευκίνη
KI	κυστική ίνωση
LA	linoleic acid, λινελαϊκό οξύ
LDL	low density lipoprotein, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
LOO·	lipid peroxide radical, ρίζα λιποειδικού υπεροξειδίου
LOOH	hydroperoxide, υδροϋπεροξείδιο
LOX	lipoxygenase, λιποξυγονάση
LPO	lactoperoxidase, λακτοϋπεροξειδάση
MAPK	mitogen-activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνο ουσία
MCP-1	monocyte chemotactic protein, χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων
MDA	malondialdehyde, μηλονιλοδιαλδεΰδη
MM	mind master
MMPs	matrix metalloproteinases, μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας
MnSOD/SOD2	manganese superoxide dismutase, υπεροξειδική δισμουτάση μαγγανίου
MS	mass spectrometry, φασματομετρία μάζας
MtDNA	mitochondrial DNA, μιτοχονδριακό DNA
NaCl	sodium chloride, χλωριούχο νάτριο
Na ₂ CO ₃	sodium carbonate, ανθρακικό νάτριο

NAD(P)H	Nicotinamide-adenine (phosphate) dinucleotide, νικοτινάμιδο-αδένινο (φωσφορικό) δινουκλεοτίδιο
NaOH	sodium hydroxide, υδροξείδιο του νατρίου
NF-κβ	Nuclear factor- κβ, πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας-κβ
NO·	nitric oxide radical, ρίζα μονοξειδίου του αζώτου
NO ₂ ⁻	nitrogen dioxide, διοξείδιο του αζώτου
Nox	NADPH oxidase, NADPH οξειδάση
OH·	hydroxyl radical, ρίζα υδροξυλίου
8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη
8-OHGua	8-hydroxyguanosine, 8-υδροξυγουανοσίνη
ONOO ⁻	peroxinitrite, υπεροξυνιτρώδες ανιόν
·O ₂ ⁻	superoxide radical, ανιόν υπεροξειδίου
P	placebo
PAF	platelet activating factor, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PBS	phosphate-buffered saline, αλατόνερο ρυθμισμένο με φωσφορικό
PC	phosphatidylcholine, φωσφατιδυλοχολίνη
PC	protein carbonylation, πρωτεϊνική καρβονυλίωση
PCOS	polycystic ovarian syndrome, σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών
PE	phosphatidylethanolamine, φωσφατιδυλαιθανολαμίνη
PEMT	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, N-μεθυλοτρανσφεράση της φωσφατιδυλαιθανολαμίνης
PGH ₂	prostaglandin H ₂ , προσταγλανδίνη H ₂
PUFA	polyunsaturated fatty acids, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
RNS	reactive nitrogen species, ενεργές μορφές αζώτου
RO ⁻	alkoxide radical, ρίζα αλκοξειδίου
ROS	reactive oxygen species, ενεργές μορφές οξυγόνου
RS ⁻	sulfide radical, θειούχος ρίζα
SCN ⁻	thiocyanate, θειοκυανιούχο ανιόν

Se	selenium, σελήνιο
ΣΝ	στεφανιαία νόσος
TAC	total antioxidant capacity, συνολική αντιοξειδωτική δράση
TBA	thiobarbituric acid, θειοβαρβιτουρικό οξύ
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances, αντιδραστικές ουσίες θειοβαρβιτουρικού οξέος
TCA	trichloroacetic acid, τριχλωροοξικό οξύ
TNF-α	tumor necrosis factor α, παράγοντας νέκρωσης όγκων α
Tris	tris-hydroxymethyl-aminomethane, τρι-υδροξυλαμινομεθάνιο
TXA ₂	thromboxane A ₂ , θρομβοξάνη A ₂
UCP2	uncoupling protein 2
VCAM-1	vascular adhesion molecule 1, μόριο αγγειακής κυτταρικής προσκόλλησης 1
WST-1	4-[3-(nitrophenyl)-2H-5-tetrazole]-1,3-benzene disulfonate, 4-[3-(νιτροφαινυλ)-2H-5-τετραζόλιο]-1,3-βενζολο δισουλφονικό
XNN	χρόνια νεφρική νόσος

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1: Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι μια ανισορροπία στην αναλογία μεταξύ προ-οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ουσιών. Η μη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής και της απομάκρυνσης των ελευθέρων ριζών προκαλεί διάφορες διαταραχές στον οργανισμό.^[1]

1.1 Ελεύθερες ρίζες

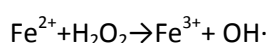
Ο όρος ελεύθερες ρίζες αναφέρεται σε μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους.^[2] Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια πολύ ασταθή και πολύ δραστικά καθώς προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια.^[3] Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό.^[4]

Είδη ελευθέρων ριζών

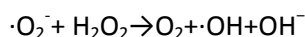
Ο όρος ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) είναι πιο γενικός και περιλαμβάνει μόρια πολύ δραστικά, συμπεριλαμβανομένου και των ελευθέρων ριζών, που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του υπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$), του υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), του αλκοξειδίου ($\text{RO}\cdot$). Επιπλέον δραστικά μόρια είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), οι θειούχες ρίζες ($\text{RS}\cdot$) και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl). Αντίστοιχα δραστικά μόρια με κεντρικό μόριο το άζωτο καλούνται δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες όπως το μονοξείδιο του αζώτου ($\text{NO}\cdot$) και το διοξείδιο του αζώτου (NO_2^-) καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες όπως το νιτρώδες οξύ (HNO_2) και το υπεροξυνιτρώδες ανιόν (ONOO^-).^[5]

Ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$)

Η ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$) είναι ιδιαίτερα δραστική, με χρόνο ημιζωής in vivo περίπου 10s^{-1} . Συνεπώς, όταν παράγεται in vivo, αντιδρά κοντά στη θέση σχηματισμού της. Υπό συνθήκες στρες, η περίσσεια $\cdot\text{O}_2^-$ ελευθερώνει σίδηρο από τις πρωτεΐνες που περιέχουν σίδηρο. Τότε το $\cdot\text{O}_2^-$ δρα ως οξειδωτική ουσία για τα μεταλλοένζυμα και διευκολύνει την παραγωγή $\text{OH}\cdot$ παρέχοντας ιόντα σιδήρου για την αντίδραση Fenton

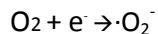


Το $\text{OH}\cdot$ στη συνέχεια μπορεί να οξειδώσει μεγάλο αριθμό οργανικών υποστρωμάτων. Το $\cdot\text{O}_2^-$ συμμετέχει επίσης στην αντίδραση Haber-Weiss προς παραγωγή $\text{OH}\cdot$.^[6]



Ανιόν υπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$)

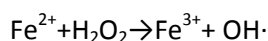
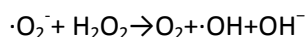
Η προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο δημιουργεί την ελεύθερη ρίζα του ανιόντος του υπεροξειδίου.



Ιn vivo το $\cdot\text{O}_2^-$ παράγεται τόσο ενζυμικά, όσο και μη ενζυμικά, με τα μιτοχόνδρια να αποτελούν την κύρια κυτταρική πηγή. Το $\cdot\text{O}_2^-$ συμμετέχει στις αντιδράσεις Haber-Weiss και Fenton προς παραγωγή δισθενούς σιδήρου και $\text{OH}\cdot$ αντίστοιχα.^[6]

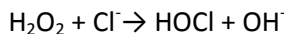
Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2)

Το H_2O_2 είναι διαπερατό στις μεμβράνες και έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής στο κύτταρο. Θεωρείται ασθενής οξειδωτικός παράγοντας ωστόσο έχει την ικανότητα να μετατρέπεται σε $\text{OH}\cdot$ στα κύτταρα μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss^[7] και Fenton.^[8-9]



Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

Το HOCl παράγεται με τη δράση της μυελοϋπεροξειδάσης χρησιμοποιώντας H_2O_2 .



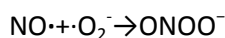
Το HOCl μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί στη $\text{OH}\cdot$ που έχει ακόμα μεγαλύτερη οξειδωτική ικανότητα.^[10]

Μονοξειδίο του αζώτου ($\text{NO}\cdot$)

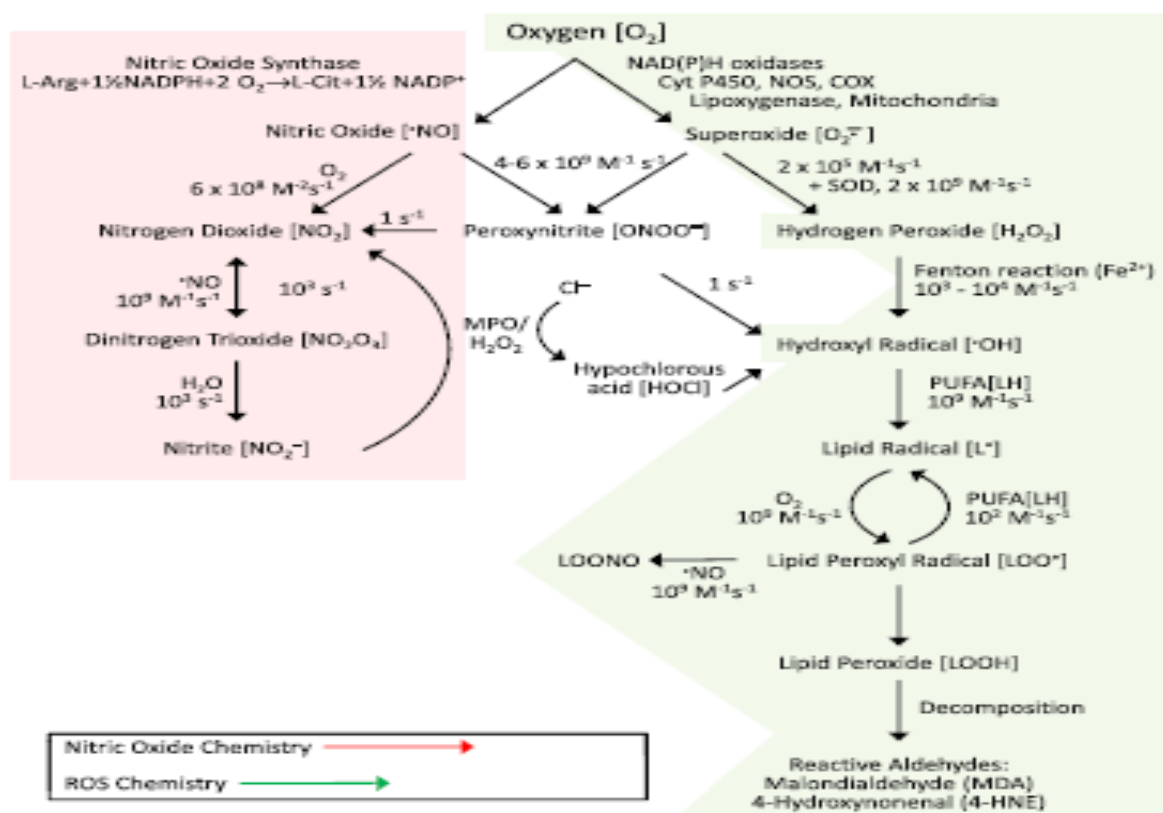
Η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου ($\text{NO}\cdot$) περιέχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Παράγεται κατά την οξείδωση της αργινίνης σε κιτρουλίνη από το ένζυμο συνθάση του NO . Το NO αποτελεί σημαντικό μόριο μεταγωγής σήματος σε μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διεργασιών, όπως η νευροδιαβίβαση, η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης, η χάλαση των λείων μυϊκών ινών, η ανοσία. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις όμως μπορεί να αντιδράσει με $\cdot\text{O}_2^-$ ή O_2 και να σχηματίσει ενεργές μορφές αζώτου.^[6]

Υπεροξυνιτρώδες (ONOO^-)

Το ONOO^- παράγεται από την αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου με το ανιόν υπεροξειδίου. Όταν τα δύο αυτά αντιδρώντα βρεθούν μαζί στο κύτταρο θα αντιδράσουν προς παραγωγή ONOO^- ανεξάρτητα από την παρουσία αντιοξειδωτικών ενζύμων.



Είναι ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας. Παράγει NO_2^+ που μπορεί να αντιδράσει με το DNA και να παράγει 8-OHdG ή 8-νιτρογουανοσίνη. Παράγει επίσης $\text{NO}_2^\bullet$ που θα οδηγήσει στην υπεροξείδωση ακόρεστων λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών.^[10]



Εικόνα 1: Ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου: παραγωγή και αντιδράσεις (Πηγή: *Redox Biol.* 2013 Feb 8;1(1):244-57. doi: 10.1016/j.redox.2013.01.014)

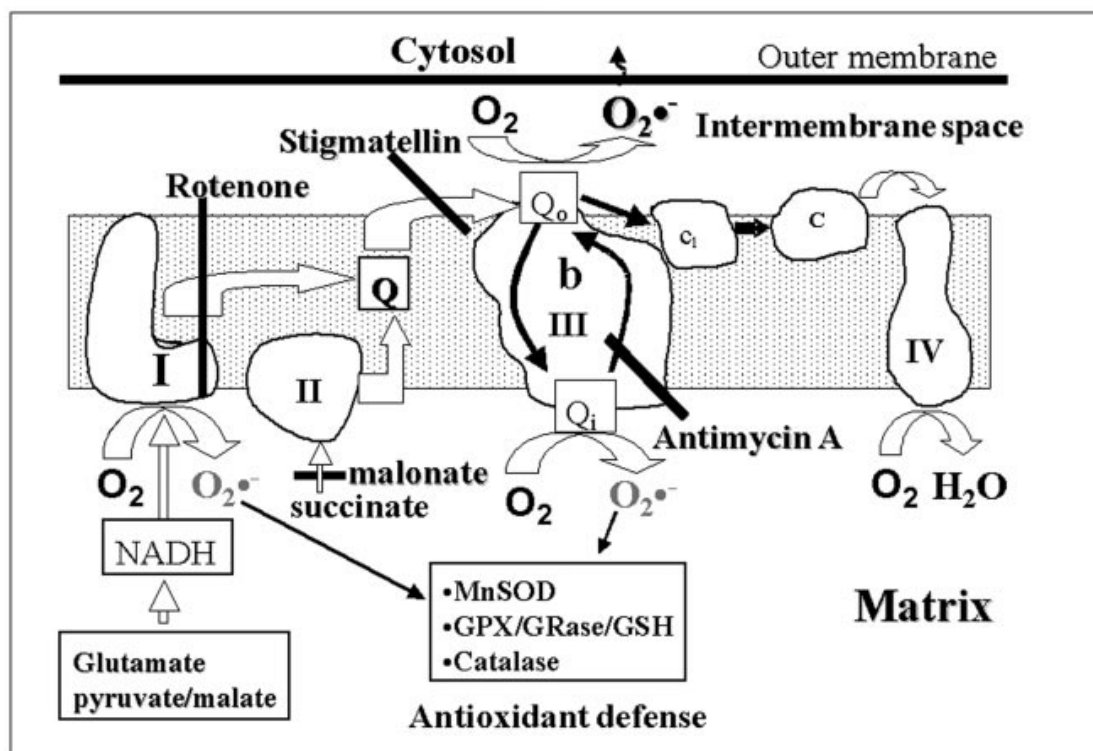
1.2 Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

1.2.1 Ενδογενείς

Αναπνευστική αλυσίδα

Η αφυδρογονάση του NADH αποτελεί το σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας και βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη από την πλευρά της μήτρας. Συγκεκριμένα οι FeS πρωτεΐνες του συμπλόκου αποτελούν πιθανή θέση διαρροής ηλεκτρονίου. Επίσης το σύμπλοκο III είναι ένα βασικό σημείο για την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Έχει δύο κέντρα: το κέντρο Qo, προσανατολισμένο προς τον ενδιάμεσο χώρο και το κέντρο Qi, που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη προσανατολισμένο προς τη μήτρα. Το $\cdot\text{O}_2^-$ που παράγεται στο κέντρο Qo απελευθερώνεται εντός του ενδιάμεσου χώρου, ενώ το $\cdot\text{O}_2^-$ που παράγεται στο κέντρο Qi είναι πιθανόν να εισέλθει στη μήτρα. Συνεπώς η οξειδωτική παραγωγή από το σύμπλοκο I και από το κέντρο Qi του συμπλόκου III κατευθύνεται προς τη μήτρα του μιτοχονδρίου και θα αντιμετωπιστεί από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Αντίθετα η οξειδωτική παραγωγή του κέντρου Qo του συμπλόκου III

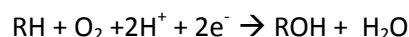
κατευθύνεται προς τον ενδιάμεσο χώρο όπου δεν υπάρχει αντιοξειδωτική άμυνα. Συνεπώς είναι πιθανό η κύρια πηγή ελευθέρων ριζών της αναπνευστικής αλυσίδας να αποτελεί το σύμπλοκο III.^[11]



Εικόνα 2: Απεικόνιση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που δείχνει τις θέσεις παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (Πηγή: *J. Biol.Chem.*2003, 278:36027-36031.doi:10.1074/jbc)

Κυτόχρωμα P₄₅₀

Το κυτόχρωμα P₄₅₀ (CYP) είναι μια μεγάλη ομάδα ενζύμων που καταλύουν την οξείδωση υδρόφοβων οργανικών μορίων. Η πιο κοινή αντίδραση είναι μίας μονοοξυγονάσης στην οποία δεσμεύεται το οξυγόνο και χρησιμοποιείται το ένα άτομο για την υδροξυλίωση του υποστρώματος και το άλλο για την παραγωγή H₂O.



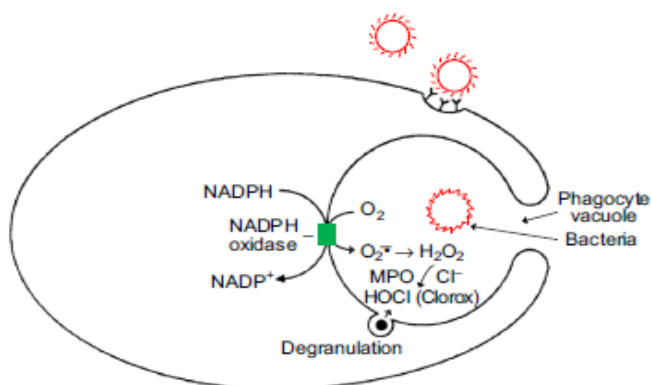
Τα δύο ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την μετατροπή του ατόμου οξυγόνου σε H₂O παρέχονται από το NADPH. Υπάρχουν δύο πορείες για τη διέλευση των ηλεκτρονίων από NADPH προς τα CYPs, παρούσες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (μικροσωμάτια) και στα μιτοχόνδρια. Στην αντίδραση της μονοοξυγονάσης στα μικροσωμάτια τα ηλεκτρόνια περνούν στο CYP μέσω της P450 αναγωγάσης που αποτελείται από δύο συνένζυμα (FAD και FMN). Η μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από την αναγωγάση της αδρενοδοξίνης (φλαβοπρωτεΐνη) και την αδρενοδοξίνη (FeS πρωτεΐνη). Κατά τις καταλυτικές αντιδράσεις του κύκλου του CYP απελευθερώνεται σημαντική ποσότητα οξυγόνου και παράγεται ·O₂⁻ ή H₂O₂.^[12]

Οξειδάση της ξανθίνης

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών.^[13] Αυτή η φλαβοπρωτεΐνη που περιέχει σίδηρο και μόλυβδο καταλύει την μετατροπή της υποξανθίνης και ξανθίνης σε ουρικό οξύ με ταυτόχρονη απελευθέρωση $\cdot\text{O}_2^-$ και H_2O_2 ως παραπροϊόντα.^[14]

NADPH οξειδάση

Υπάρχουν 7 ισομορφές της NADPH οξειδάσης που συναντώνται στα θηλαστικά (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, DUOX1, DUOX2). Κατά την καταστροφή ενός ιστού ενεργοποιούνται τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα και μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού. Σε αυτή τη διαδικασία υπάρχει μεγάλη κατανάλωση οξυγόνου από τα κύτταρα (αναπνευστική έκρηξη) που οδηγεί στην απελευθέρωση ελευθέρων ριζών. Η NADPH οξειδάση στη μεμβράνη των κυττάρων παράγει $\cdot\text{O}_2^-$ ($\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + \cdot\text{O}_2^-$) ενώ η μυελοϋπεροξειδάση στα κοκκία των κυττάρων παράγει HOCl .^[15] Οι ουσίες που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν στη συνέχεια υπεροξείδωση των λιποειδών.^[16]



Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση φαγοκυττάρωσης μικροβίου σε κενοτόπιο φαγοκυττάρου. (Πηγή: Redox Biol. 2013 Feb 8;1(1):244-57. doi: 10.1016/j.redox.2013.01.014)

1.2.2 Εξωγενείς

Ακτινοβολία

Οι ιονίζουσες ακτινοβολίες όπως οι υπεριώδεις του φωτός (UVA, UVB) και η γ-ακτινοβολία οδηγούν στην παραγωγή ελεύθερων ριζών. Οι βλάβες που οφείλονται στην ακτινοβολία εντοπίζονται κυρίως στο DNA και συγκεκριμένα στη γουανίνη. Οι οξειδωτικές διαδικασίες (είτε πρόκειται για μοναδική ή διαδοχικές βλάβες στο DNA) οδηγούν σε καταστροφή των κυττάρων και μεταλλάξεις.^[17]

Ατμοσφαιρική ρύπανση

Διάφορα συστατικά της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (κυρίως μέταλλα και αρωματικοί υδρογονάνθρακες) έχουν αποδειχθεί τοξικά για τον οργανισμό. Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από αιωρούμενα σωματίδια μπορεί να προκύψει από άμεση παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου από την επιφάνεια των διαλυτών ενώσεων ή από διαταραγμένη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Το σωματίδιο συγκεκριμένα μεταφέρει ηλεκτρόνια στο

μοριακό οξυγόνο κατά τις οξειδοαναγωγικές διαδικασίες. Επιπλέον, τα επιθηλιακά κύτταρα των αεραγωγών και τα μακροφάγα δημιουργούν ενεργές μορφές οξυγόνου κατά την πρόσληψη των σωματιδίων της ατμόσφαιρας.^[18]

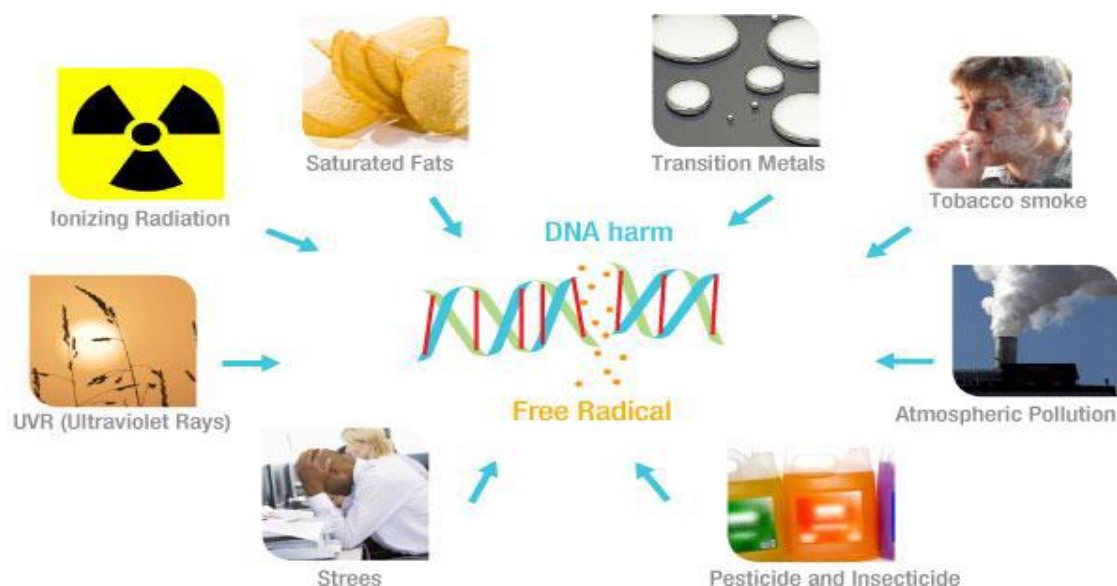
Κάπνισμα

Το κάπνισμα διεγείρει την παραγωγή των ενεργών μορφών οξυγόνου και σχετίζεται με διάφορες καρδιαγγειακές εκδηλώσεις, όπως μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου (NO), επαγωγή προθρομβωτικής κατάστασης, έναρξη και εξέλιξη φλεγμονώδους απόκρισης, οξείδωση των λιποπρωτεϊνών. Ο καπνός περιέχει υψηλά επίπεδα ελευθέρων ριζών, αλλά λόγω του σύντομου χρόνου ημίσειας ζωής τους, δεν είναι υπεύθυνες για τις συστηματικές διαδικασίες που προκαλούνται από το κάπνισμα. Στην παραγωγή των ελευθέρων ριζών κυρίαρχο ρόλο φαίνεται να παίζει η οικογένεια Nox.^[19]

Διατροφή

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών έχει συσχετιστεί με την υπέρμετρη κατανάλωση ενέργειας και κορεσμένου λίπους.^[20-21] Η κατανάλωση γεύματος με περιεκτικότητα σε λίπος 60-65% για 5 μέρες οδήγησε σε διπλασιασμό της μέγιστης παραγωγής μιτοχονδριακού H_2O_2 και υποδιπλασιασμό του λόγου GSH/GSSG σε υγιείς νορμοβαρείς ενήλικες.^[21] Σημαντική είναι και η παραγωγή τους από τη Nox2 που υπερεκφράζεται σε υπερχοληστερολαιμικά και παχύσαρκα παιδιά σύμφωνα με τα αποτελέσματα μελέτης που χρησιμοποίησε το συγκεκριμένο πληθυσμό.^[22]

Το αλκοόλ προάγει επίσης την παραγωγή ελευθέρων ριζών στο ήπαρ (το ένζυμο CYP2E1 του κυτοχρώματος P_{450} , σε χρόνια κατανάλωση αλκοόλ μετατρέπει την αλκοόλη σε ακεταλδεΐδη, δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες κατά την οξείδωση του NADPH σε $NADP^+$)^[23] και στα αστροκύτταρα του εγκεφάλου με ταυτόχρονη εξασθένηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας.^[24]



Εικόνα 4: Εξωγενείς πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών.

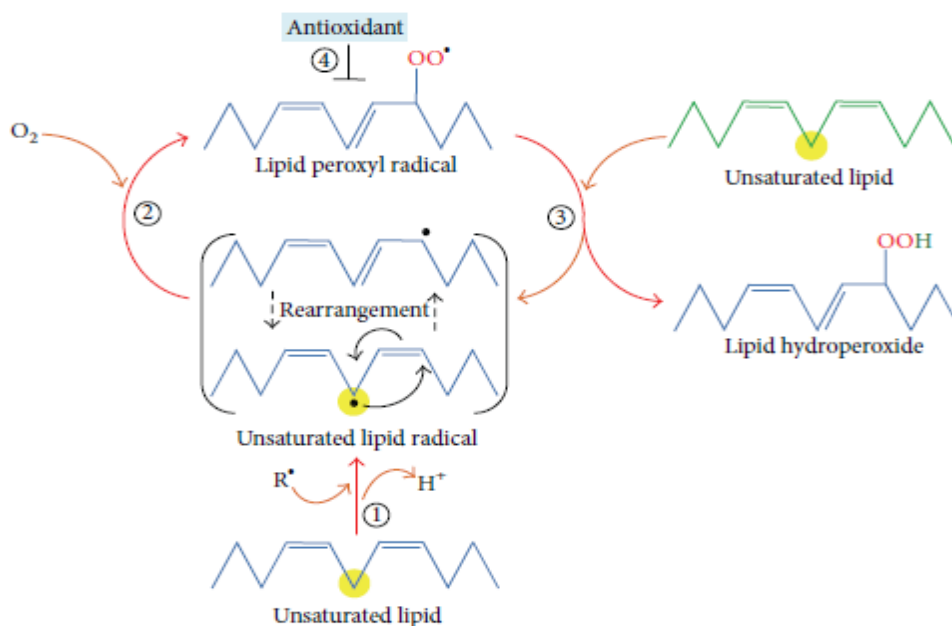
1.3 Επιδράσεις των ελευθέρων ριζών

Ανοσοποιητικό σύστημα

Ο τραυματισμός ενός ιστού επάγει την ταχεία πρόσληψη λευκοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων, που λειτουργούν για να περιορίσουν τη ζημιά από την απελευθέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου (όπως το H_2O_2), επακόλουθα της αναπνευστικής έκρηξης. Η απελευθέρωσή τους από τα λευκοκύτταρα αν και είναι αναγκαία για τη θανάτωση των μικροοργανισμών, μπορεί να προκαλέσει στους ιστούς ζημιά σε υψηλές συγκεντρώσεις και να συμβάλλει στην ανάπτυξη χρόνιας φλεγμονής. Το H_2O_2 όμως, εκτός του ότι σκοτώνει τους μικροοργανισμούς, προσελκύει και λευκοκύτταρα στο μέρος της φλεγμονής, λειτουργώντας επίσης και ως δεύτερος αγγελιοφόρος για τη ρύθμιση της μεταγραφής, του πολλαπλασιασμού ή της ενζυμικής δραστηριότητας.^[25]

Λιπίδια

Η υπεροξείδωση των λιπιδίων είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα προ-οξειδωτικά επιτίθενται στα λιπίδια που περιέχουν διπλό δεσμό άνθρακα, ιδιαίτερα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), προκαλώντας αφαίρεση υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου αφήνοντας ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στον άνθρακα ($\cdot CH$) (στάδιο έναρξης). Η παραπάνω διαδικασία οδηγεί στην δημιουργία μιας ασταθούς ελεύθερης ρίζας άνθρακα με ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο το οποίο συνήθως υφίσταται μια ενδομοριακή αναδιάταξη και μεταπίπτει σε συζυγές διένιο. Η προκύπτουσα ρίζα αντιδρά με O_2 δημιουργώντας μια ρίζα λιποξειδικού υπεροξειδίου ($LOO\cdot$) (στάδιο διάδοσης). Σε περίπτωση που αυτή αντιδράσει με άλλο λιπαρό οξύ, προκύπτει το υδροϋπεροξείδο ($LOOH$). Η διαδικασία αυτή θα σταματήσει όταν αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη Ε δώσουν ένα άτομο υδρογόνου στη ρίζα λιποξειδικού υπεροξειδίου ($LOO\cdot$) και σχηματιστεί μια ρίζα βιταμίνης Ε που αντιδρά με μία άλλη $LOO\cdot$ προς παραγωγή μη ριζικών προϊόντων (στάδιο τερματισμού). Μόλις ξεκινήσει η υπεροξείδωση του λιπιδίου, η διάδοση των αλυσιδωτών αντιδράσεων θα πραγματοποιηθεί μέχρι να παραχθούν τα προϊόντα τερματισμού.



Εικόνα 5: Διαδικασία υπεροξειδωσης λιπιδίων. (Πηγή: *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438. Epub 2014 May 8)

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων παράγει μία μεγάλη ποικιλία προϊόντων οξείδωσης. Τα κύρια πρωτογενή προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης είναι τα υδροϋπεροξειδία ($LOOH$). Ανάμεσα στις πολλές διαφορετικές αλδεΐδες που μπορούν να σχηματιστούν ως δευτερογενή προϊόντα κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι η μηλόνυλοδιαλδεΐδη (MDA), η προπανάλη, η εξανάλη, και η 4-υδροξυνονενάλη (4-HNE).^[26] Η MDA φαίνεται να είναι το πιο μεταλλαξιογόνο προϊόν της υπεροξειδωσης των λιπιδίων, ενώ 4-HNE είναι η πιο τοξική.^[27]

MDA: Σχηματίζεται με ενζυμικές ή μη ενζυμικές διαδικασίες. Παράγεται *in vivo* από ενζυμικές διαδικασίες κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης της θρομβοξάνης A_2 (TXA_2). Η TXA_2 είναι μεταβολίτης του αραχιδονικού οξέος (AA) που σχηματίζεται με τη δράση της συνθάσης της θρομβοξάνης A_2 , στην προσταγλανδίνη H_2 (PGH_2), η οποία έχει προηγουμένως δημιουργηθεί από το AA με την επίδραση της κυκλοξυγονάσης. Μέσω της μη ενζυμικής διαδικασίας, στις αντιδράσεις που εξαρτώνται από τη ρίζα οξυγόνου, το AA είναι ο κύριος πρόδρομος των προϊόντων, που θα καταλήξουν στο σχηματισμό MDA .

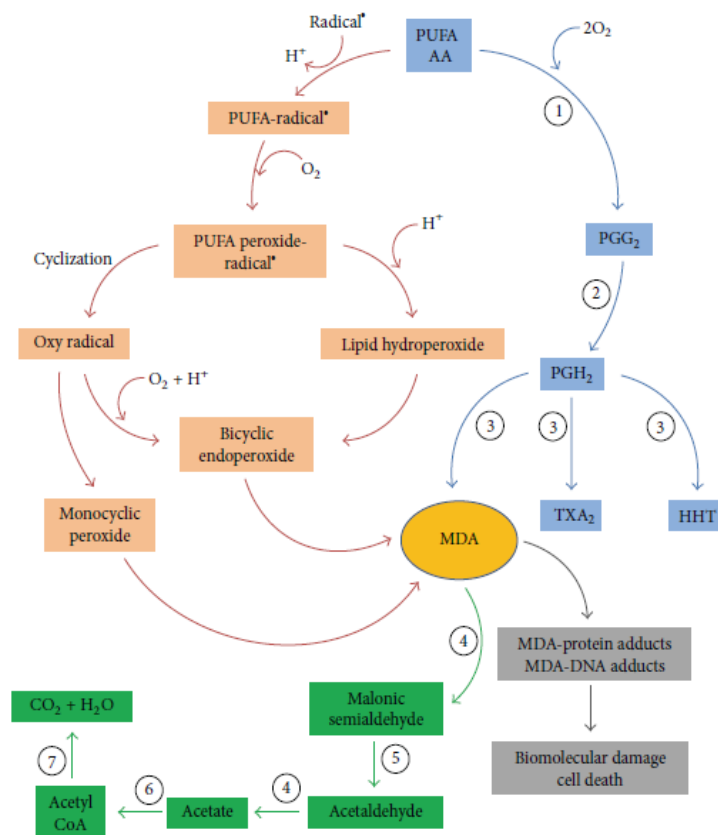
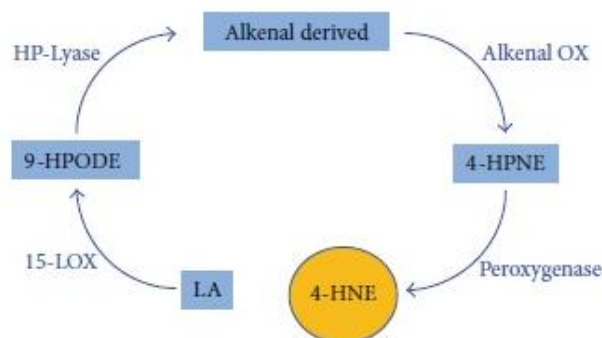


FIGURE 3: MDA formation and metabolism. MDA can be generated *in vivo* by decomposition of arachidonic acid (AA) and larger PUFAs as a side product by enzymatic processes during the biosynthesis of thromboxane A_2 (TXA₂) and 12-l-hydroxy-5,8,10-heptadecatrienoic acid (HHT) (blue pathway), or through nonenzymatic processes by bicyclic endoperoxides produced during lipid peroxidation (red pathway). One formed MDA can be enzymatically metabolized (green pathway). Key enzymes involved in the formation and metabolism of MDA: cyclooxygenases (1), prostacyclin hydroperoxidase (2), thromboxane synthase (3), aldehyde dehydrogenase (4), decarboxylase (5), acetyl CoA synthase (6), and tricarboxylic acid cycle (7).

Εικόνα 6: Σχηματισμός και μεταβολισμός της MDA. (Πηγή: *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438. Epub 2014 May 8)

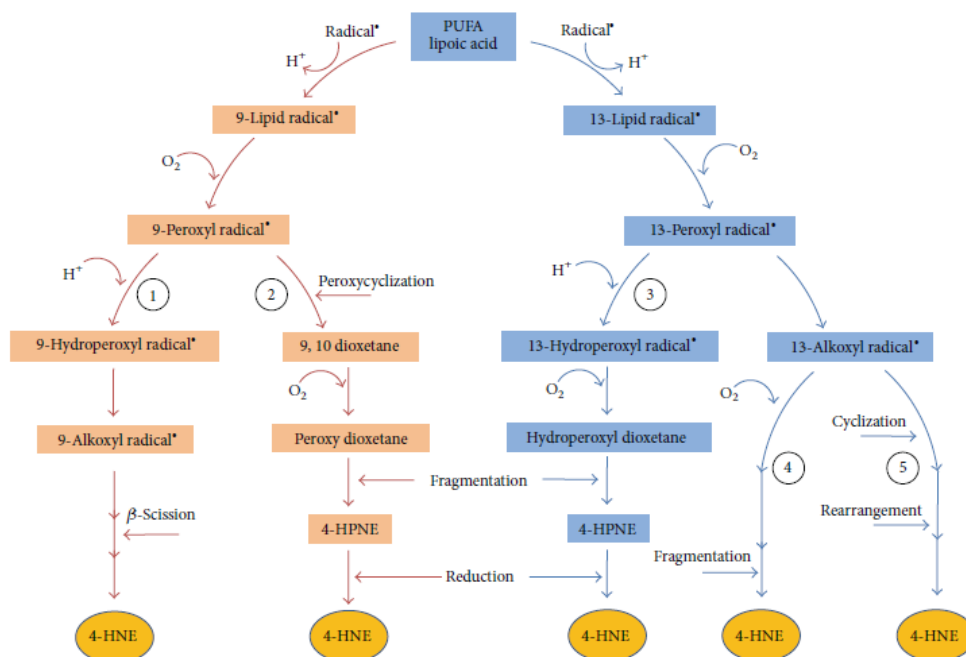
Υπό φυσιολογικές συνθήκες, και σε ουδέτερο pH, η MDA βρίσκεται με τη μορφή ενολικού ανιόντος, χαμηλής χημικής δραστηριότητας. Όταν το pH μειώνεται η δραστηριότητά της αυξάνεται. Μπορεί να αντιδράσει με κατάλοιπα βασικών αμινοξέων όπως η ιστιδίνη, η τυροσίνη, η αργινίνη και η μεθειονίνη. Οι πρωτεΐνες αντιδρούν ευκολότερα με την MDA σε σχέση με τα ελεύθερα αμινοξέα. Αν και δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί οι λόγοι που συμβαίνει αυτό, μάλλον οι πρωτεΐνες προσφέρουν πιο ενεργό περιβάλλον για τη συμπύκνωσή της. Προωθεί επίσης τις αντιδράσεις διασταύρωσης μεταξύ πρωτεϊνών και DNA προκαλώντας μεταβολή στις βιοχημικές ιδιότητες των βιομορίων αυτών. Έχει επίσης προταθεί ότι η MDA μπορεί να αντιδράσει με διάφορους νουκλεοζίτες (δεοξυ-γουανοσίνη και κυτιδίνη) με κύριο προϊόν την πυριμιδο-[1,2-α] πουριν-10(3H)-δεοξυριβόζη (M1G ή M1dG). Όταν η βλάβη δεν μπορεί να διορθωθεί, τα προϊόντα μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις, παρεμπόδιση του κυτταρικού κύκλου και επαγωγή της κυτταρικής απόπτωσης. Επίσης αυτή η αλλοίωση του DNA λόγω της επίδρασης της MDA μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στον καρκίνο και άλλες γενετικές ασθένειες.^[26]

4-HNE: Παράγεται επίσης με ενζυμικές ή μη ενζυμικές διαδικασίες. Η 4-HNE είναι το τελικό προϊόν ω-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (όπως AA, LA) με την επίδραση των 15-λιποξυγενασών (15-LOX). Συγκεκριμένα υπάρχουν δύο 15-LOX: η 15-LOX-1 που εκφράζεται στα δικτυοερυθροκύτταρα, στα ηωσινόφιλα και στα μακροφάγα, και η 15-LOX-2 που εκφράζεται στο δέρμα, στον κερατοειδή χιτώνα, στον προστάτη, στους πνεύμονες και στον οισοφάγο. Πρόδρομες ενώσεις της 4-HNE αποτελούν το 13-υδροϋπεροξυδεκαοκταδιενοϊκό οξύ (13-HPODE) από την οξείδωση του LA με την 15-LOX-1 και το 15-υδροϋπεροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ (15-HPETE) που παράγεται από την οξείδωση του AA με την 15-LOX-2.



Εικόνα 7: Ενζυμική παραγωγή της 4-HNE (Πηγή: *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438. Epub 2014 May 8)

Η 4-HNE μπορεί να σχηματιστεί και μη ενζυμικά μέσω διαφόρων αντιδράσεων που εξαρτώνται από τη ρίζα οξυγόνου με ενδιάμεσα προϊόντα υπεροξειδία, ρίζες αλκοξυλίου, εποξειδία.

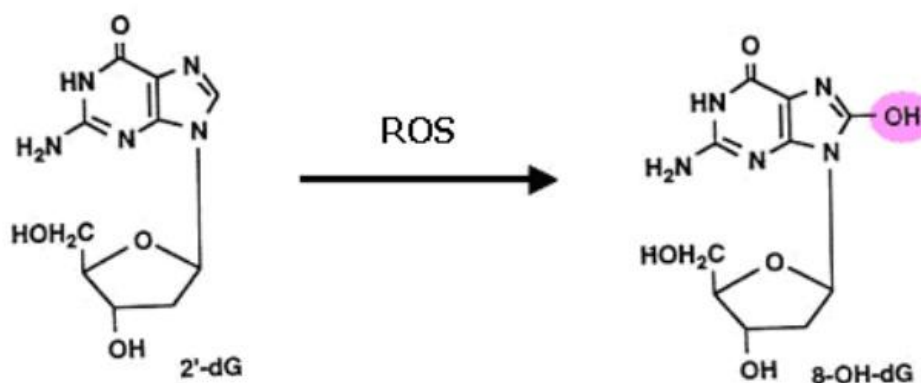


Εικόνα 8: Μη ενζυμική παραγωγή της 4-HNE (Πηγή: *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438. Epub 2014 May 8)

Η 4-HNE προάγει την επιβίωση του κυττάρου ή τον κυτταρικό θάνατο ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου, τη βλάβη που προκλήθηκε και τις ικανότητες επιδιόρθωσης του κυττάρου. Σε φυσιολογικά επίπεδα μεταβολίζεται και σε χαμηλά επίπεδα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο ως μόριο μεταγωγής σήματος, διέγερσης της έκφρασης γονιδίων, ενίσχυσης της κυτταρικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. Σε μέτρια επίπεδα οδηγεί σε καταστροφή πρωτεϊνών, γήρας, αναστολή του κυτταρικού κύκλου ενώ σε υψηλά επίπεδα σε απόπτωση των κυττάρων.^[26]

DNA

Το DNA είναι ίσως ο πιο σημαντικό στόχος της οξειδωτικής προσβολής και θεωρείται ότι η συνεχής οξειδωτική βλάβη στο DNA συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη καρκίνου σχετιζόμενου με την ηλικία, όπως του παχέος εντέρου, του μαστού, του ορθού και του προστάτη.^[28] Αυξημένη οξείδωση του RNA έχει τεκμηριωθεί σε ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση συμπεριλαμβανομένης της άνοιας,^[29] του Alzheimer^[30] και του Parkinson.^[31] Ειδικά το μιτοχονδριακό DNA, καθώς βρίσκεται κοντά στους μηχανισμούς παραγωγής ενέργειας και ελευθέρων ριζών σε συνδυασμό με τη μικρή επιδιορθωτική του ικανότητα, είναι πιο ευαίσθητο. Η επίδραση των ελευθέρων ριζών προκαλεί τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις στο DNA, απώλεια πουρινών, αλλαγές στη δεοξυριβόζη και βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου συγκεκριμένα αντιδρά με τη γουανίνη στην θέση C8 και σχηματίζει την 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG).



Εικόνα 9: Σχηματισμός 8-OHdG από ενεργές μορφές οξυγόνου.

(Πηγή: <http://100books.kr/data/cheditor4/1106/X1bLΜaovXpqDEFB.jpg>)

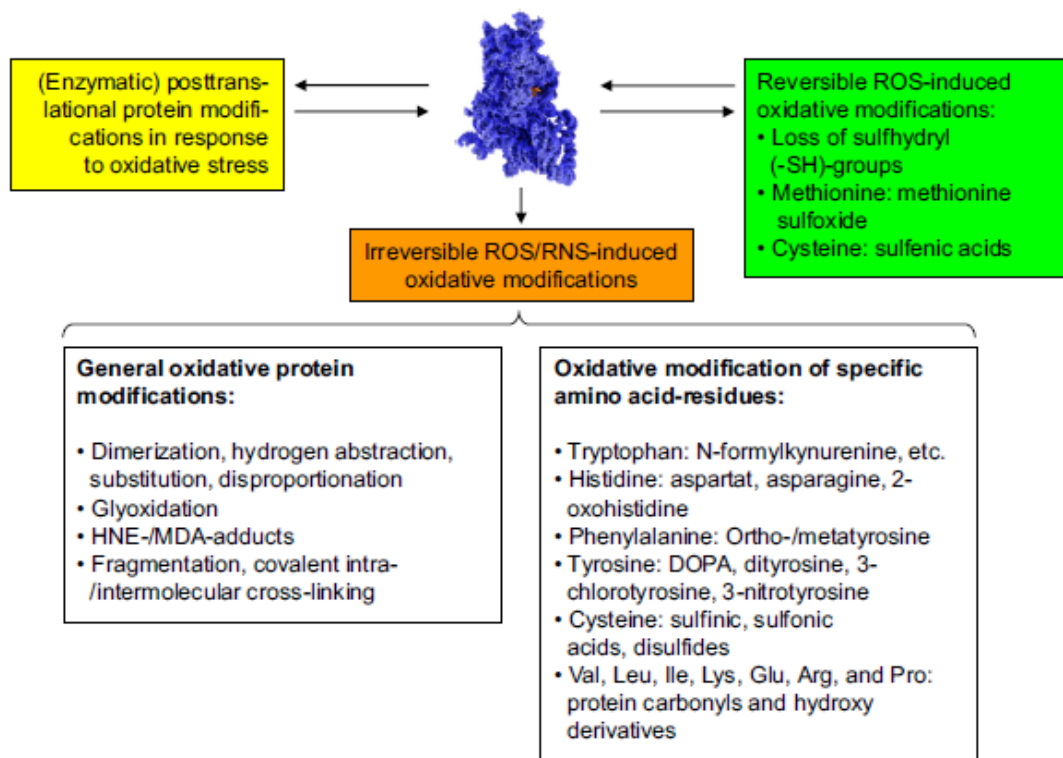
Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να αντιδράσουν και με άλλες βάσεις όπως η αδενίνη προς σχηματισμό 8-υδροξαδενίνης. Οι αντιδράσεις μεταξύ πυριμιδινών και ρίζας υδροξυλίου σχηματίζουν υπεροξείδιο της θυμίνης και 5-ουρακίλη.^[32-33]

Πρωτεΐνες

Η βλάβη από τις ελεύθερες ρίζες σε μεγάλες πρωτεΐνες του πλάσματος προσδιορίζεται από αμινοξέα που έχουν τροποποιηθεί με χλωρίωση, νιτροζυλίωση, οξείδωση, αντίδραση crosslinking, γλυκοζυλίωση καθώς και από την επίδραση της MDA και της 4-HNE.^[34] Η αντίδραση crosslinking προκαλείται από την οξείδωση των πρωτεϊνών και γίνεται με τουλάχιστον έξι διαφορετικούς τρόπους. Πιο συχνοί είναι οι παρακάτω:

- σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ πρωτεϊνών μέσω της οξείδωσης της κυστεΐνης
- σχηματισμός βάσης Schiff μεταξύ ενός καρβονυλίου μιας οξειδωμένης πλευρικής αλυσίδας σε μια πρωτεΐνη και ενός κατάλοιπου λυσίνης σε μια άλλη
- σχηματισμός βάσης Schiff μεταξύ της ομάδας καρβονυλίου της 4-HNE που έχει αντιδράσει με μια πρωτεΐνη και ενός υπολείμματος λυσίνης σε μια άλλη πρωτεΐνη
- ίδια διαδικασία όπως η παραπάνω μόνο που αντί για 4-HNE αντιδρά η MDA
- σχηματισμός βάσης Schiff μεταξύ ενός καρβονυλιωμένου προϊόντος AGE και μίας άλλης πρωτεΐνης^[35]

Οι επιπτώσεις καταστροφής της δομής της πρωτεΐνης είναι η απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, διαταραγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών.^[36]



Εικόνα 10: Η επίδραση του οξειδωτικού στρες στις πρωτεΐνες

1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

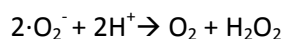
Ως αντιοξειδωτικό, ορίζεται η ουσία που βοηθάει στη μείωση της σοβαρότητας του οξειδωτικού στρες, είτε σχηματίζοντας λιγότερο δραστικές ρίζες είτε επιδιορθώνοντας τις βλάβες που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες.^[37] Όταν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερούν ή αναστέλλουν την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων. Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα

αντιοξειδωτικά που διασπούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις και τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν τα προ-οξειδωτικά μέταλλα.

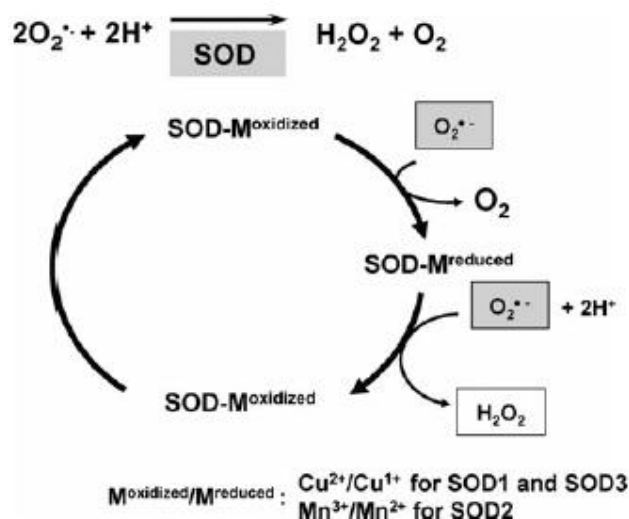
1.4.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)

Η κύρια κυτταρική άμυνα ενάντια στο $\cdot\text{O}_2^-$ και στο ONOO^- είναι μια ομάδα οξειδοαναγωγασών, οι SODs, που καταλύουν τη μετατροπή του $\cdot\text{O}_2^-$ σε O_2 και H_2O_2 .



Στα θηλαστικά υπάρχουν τρεις ισομορφές της SOD: η κυτταροπλασματική SOD1 ή CuZnSOD, η μιτοχονδριακή SOD2 ή MnSOD και η εξωκυττάρια SOD3 ή ecSOD. Το κάθε ένζυμο είναι προϊόν διαφορετικών γονιδίων, με ξεχωριστή θέση στο κύτταρο, ωστόσο καταλύει την ίδια αντίδραση. Ο μηχανισμός της μετατροπής του $\cdot\text{O}_2^-$ σε H_2O_2 περιλαμβάνει αναγωγή και επανοξείδωση ενός δραστικού μετάλλου μεταπτώσεως, όπως ο χαλκός (Cu) και το μαγγάνιο (Mn) που βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.^[38]



Εικόνα 11: Κοινός μηχανισμός απενεργοποίησης του $\cdot\text{O}_2^-$ από τις υπεροξειδικές δισμουτάσες.
 (Πηγή: *Antioxid Redox Signal*. 2011 Sep 15;15(6):1583-606. doi: 10.1089/ars.2011.3999)

CuZnSOD: Είναι η κύρια ενδοκυτταρική SOD και αποτελείται από δύο ταυτόσημες υπομονάδες. Εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα με ένα μικρό ποσοστό να εντοπίζεται στο διάμεσο χώρο των μιτοχονδρίων.^[39-40] Έχει επίσης αναφερθεί ότι είναι εντοπισμένη σε πυρήνες, λυσοσωμάτα και υπεροξυσωμάτια^[41] και παρουσιάζει ευρεία κατανομή σε μία ποικιλία κυττάρων. Το γονίδιο για το ένζυμο έχει εντοπιστεί στην περιοχή 21q22.1 του χρωμοσώματος 21. Έχει χρόνο ημίσειας ζωής 6-10 λεπτά. Η ενζυμική δραστηριότητα της SOD1 εξαρτάται από την παρουσία του Cu και του ψευδαργύρου (Zn). Ο Zn συμμετέχει στη σωστή αναδίπλωση της πρωτεΐνης και τη σταθερότητα του μορίου. Η δραστηριότητά της είναι ανάλογη με την ποσότητα του Cu που δεσμεύεται στο ενεργό κέντρο.^[42-43] Ο Cu δεν μπορεί να αντικατασταθεί με άλλο μέταλλο, ενώ ο Zn μπορεί με κοβάλτιο (Co) και Cu, και δεν είναι αναγκαίος για τη δραστηριότητα του ενζύμου σε χαμηλό pH. Επίσης η εκκαθάριση

της $\cdot\text{O}_2^-$ από τη SOD περιλαμβάνει αναγωγή και επανοξείδωση του Cu στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.^[44]

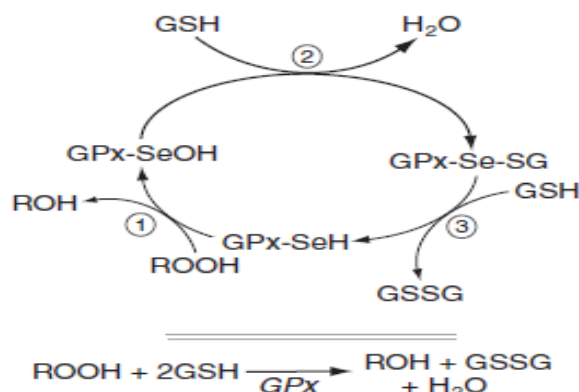
MnSOD: Η SOD2 είναι ένα ομοτετραμερές ένζυμο που περιέχει μαγγάνιο (Mn) και εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μήτρα.^[45-46] Το Mn στη δραστική θέση του ενζύμου χρησιμεύει για τη μετατροπή της $\cdot\text{O}_2^-$ (που παράγεται από την αναπνευστική αλυσίδα) σε H_2O_2 με παρόμοιο τρόπο όπως η SOD1.^[47] Συντίθενται στο κυτταρόπλασμα και κατευθύνεται προς τα μιτοχόνδρια με τη βοήθεια ενός πεπτιδίου. Επίσης, η SOD2 έχει χρόνο ημίσειας ζωής 5-6 ώρες. Ο ουσιαστικός ρόλος της στη διατήρηση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων αποδεικνύεται από τη νεογνική θνησιμότητα ποντικών με στοχευμένη καταστροφή του γονιδίου για την SOD2.^[44] Πλήρης απουσία του ενζύμου προκαλεί μυοκαρδιοπάθεια και νευροεκφυλισμό που οδηγεί σε πρόωμο θάνατο.^[48-50]

ecSOD: Η SOD3 είναι μία τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη που περιέχει Cu και Zn. Είναι η κύρια SOD στον αγγειακό εξωκυττάριο χώρο. Επίσης απαντάται και στην κυτταρική μεμβράνη προς την εξωκυτταρική πλευρά με μία ποσότητα στο πλάσμα. Η SOD3 των ιστών αποτελεί το 90% -99% της SOD3 στο σώμα. Η κατανομή στους ιστούς διαφέρει μεταξύ των ειδών, αλλά γενικά εκφράζεται στα αιμοφόρα αγγεία, στον πνεύμονα, στο νεφρό, στη μήτρα και σε μικρότερο βαθμό στην καρδιά.^[44] Στα αγγεία κυρίως συντίθεται από τα λεία μυϊκά κύτταρα και τους ινοβλάστες.^[51] Σε τραυματισμό ιστού και στην αθηροσκλήρωση, η SOD3 βρίσκεται επίσης σε φλεγμονώδη κύτταρα.^[52-54] Εκκρίνεται και προσκολλάται στο ενδοθήλιο μέσω πρόσδεσης με την πρωτεογλυκάνη θειική ηπαρίνη (HSPGs), με το κολλαγόνο και τη fibulin-5. Έτσι, παρά το γεγονός ότι παρασκευάζεται κυρίως στον αγγειακό λείο μυ και όχι στα ενδοθηλιακά κύτταρα, συνδέεται με την κυτταρική τους μεμβράνη και μπορεί να εισέλθει σε αυτά. *In vivo* είναι παρόντες και οι δύο τύποι: αυτός στην κυκλοφορία (Τύπος A) και αυτός που δεσμεύεται στους ιστούς (τύπος C). Η σημασία του ενζύμου στον εξωκυττάριο χώρο τονίζεται περαιτέρω από το γεγονός ότι σε ποντίκια η απουσία της SOD3 οδήγησε στο θάνατο το 85% αυτών μέσα σε μόλις μια εβδομάδα από την επαγωγή της αφαίρεσης.^[44] Επίσης οι ιστολογικές μεταβολές ήταν παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας, υποδηλώνοντας ότι είναι απαραίτητη για την επιβίωση.^[55] Άλλες μελέτες ποντικών υποδεικνύουν ότι η SOD3 παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες όπως η υπέρταση, η καρδιακή ανεπάρκεια, η ισχαιμία, η βλάβη των πνευμόνων.^[56-58] Το ενεργό κέντρο της SOD3 είναι παρόμοιο με εκείνο της SOD1^[59] και η δραστηριότητά της εξαρτάται από τον διαθέσιμο Cu.^[60]

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

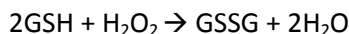
Οι GPx καταλύουν την αναγωγή του H_2O_2 και των οργανικών υδροϋπεροξειδίων ώστε να προστατέψουν τα κύτταρα από την οξειδωτική καταστροφή. Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο μορφές του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η μία μορφή εξαρτάται από το σελήνιο (Se) GPx, ενώ η άλλη είναι ανεξάρτητη του σεληνίου (glutathione S-transferase GST). Αυτές οι δύο μορφές διαφέρουν ως προς τον αριθμό των υπομονάδων, τη φύση του δεσμού με το σελήνιο στο ενεργό κέντρο, καθώς και ως προς τους μηχανισμούς κατάλυσης. Σήμερα είναι πλέον γνωστές τέσσερις διαφορετικές GPx (1,2,3,4) στα θηλαστικά, φέρουν όλες στην ενεργό θέση κυστεΐνη συνδεδεμένη με σελήνιο και συνεπώς η δράση τους

εξαρτάται από τη διαθεσιμότητά του. Τα επίπεδα κάθε ισομορφής ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο ιστού στον οποίο εκφράζονται.



Εικόνα 12: Αναγωγή του H_2O_2 από την GPx. (Πηγή: *Antioxid Redox Signal*. 2011 Oct 1;15(7):1957-97. doi: 10.1089/ars.2010.3586.)

GPx1: Πρόκειται για μία τετραμερή πρωτεΐνη με 4 πανομοιότυπες υπομονάδες και ένα κατάλοιπο σεληνοκυστεΐνης σε κάθε μία από αυτές.^[61] Η GPx1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. Ανάγει τα υδροϋπεροξειδία λιπαρών οξέων και εξουδετερώνει το H_2O_2 οξειδώνοντας τη γλουταθειόνη (GSH). Η GSH, ένα τριπεπτίδιο από γλυκίνη, κυστεΐνη και γλουταμινικό, απαιτείται στην ανηγμένη της μορφή για να αποδώσει αναγωγικά ισοδύναμα στην αντίδραση που καταλύει η GPx:



GPx2: Εντοπίζεται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα της γαστρεντερικής οδού. Η δομή και η εξειδίκευση στο υπόστρωμα είναι παρόμοια με της GPx1.^[62] Ανάγει δηλαδή επίσης τα υδροϋπεροξειδία λιπαρών οξέων και εξουδετερώνει το H_2O_2 .

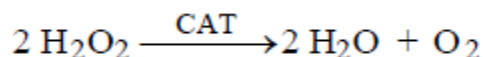
GPx3: Είναι μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη που απαντάται κυρίως εξωκυτταρικά στο πλάσμα και στους νεφρούς. Χρησιμοποιεί ως υποστρώματα το H_2O_2 , υδροϋπεροξειδία λιπαρών οξέων καθώς και υδροϋπεροξειδία φωσφολιπιδίων γεγονός που την καθιστά το ρόλο της σημαντικό για την προστασία των μεμβρανών.^[63]

GPx4: Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα διάφορων ιστών ενώ μπορεί να εξουδετερώσει τα υδροϋπεροξειδία φωσφολιπιδίων, των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης που προκύπτουν από υπεροξείδωση μεμβρανών και οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών.^[64] Η αναστολή της παραγωγής της οδηγεί σε πρώιμο εμβρυικό θάνατο ενώ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δομική ακεραιότητα και ωρίμανση των σπερματοζωαρίων.^[62]

Καταλάση (CAT)

Είναι μία πρωτεΐνη με 4 υπομονάδες, με μία ομάδα πρωτοπορφυρίνης σε κάθε μία από αυτές. Βρίσκεται στα αερόβια βακτήρια, στους μύκητες, στα κύτταρα των φυτών και των

ζώων. Εντοπίζεται στα υπεροξυσωμάτια αλλά και στα μιτοχόνδρια μόνο της καρδιάς. Καταλύει τη μετατροπή του H_2O_2 σε H_2O και O_2 σε δύο στάδια



Εικόνα 13: Η δράση της καταλάσης. (Πηγή: *Front Biosci.* 1999 Mar 15;4:D339-45)

Είναι πολύ αποτελεσματικό ένζυμο και δεν μπορεί να κορεστεί σε μεγάλες συγκεντρώσεις H_2O_2 . Η CAT προστατεύει τα κύτταρα από το H_2O_2 που παράγεται στο εσωτερικό τους. Ακόμη και δεν είναι απαραίτητη για ορισμένα κύτταρα σε φυσιολογικές συνθήκες, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην άμυνά τους σε συνθήκες οξειδωτικού στρες.^[65]

Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει τη μετατροπή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή (GSH) καθώς προκειμένου η γλουταθειόνη να εκπληρώσει το ρόλο της ως αντιοξειδωτική ουσία απαιτείται η διατήρηση υψηλής ενδοκυττάριας αναλογίας GSH:GSSG. Είναι ένα φλαβοένζυμο με κάθε υπομονάδα να περιέχει θέσεις δέσμησης για το NADPH και την GSSG στο FAD. Κάθε θέση δέσμησης για τη GSSG σχηματίζεται και από τις δύο υπομονάδες, ως εκ τούτου το ένζυμο είναι λειτουργικό μόνο ως ομοδιμερές. Οι υπομονάδες της ανθρώπινης GR είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους με ένα δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα στα αμινοξέα κυστεΐνης. Λειτουργικά, η GR είναι μία NADPH: GSSG οξειδοαναγωγή. Το ένζυμο στην πραγματικότητα έχει τρία υποστρώματα, το NADPH, το H^+ και την GSSG και δύο προϊόντα τις GSH και H_2O , αν και το πρωτόνιο δεν αναφέρεται συχνά ως υπόστρωμα. Πρώτα το ένζυμο ανάγεται από το NADPH και στη συνέχεια, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στην GSSG ανάγοντάς τη. Με αυτό τον τρόπο βοηθά να διατηρηθεί ένα ενδοκυτταρικό περιβάλλον επαρκές σε αναγωγικά ισοδύναμα GSH με χαμηλά επίπεδα GSSG.^[66] Διαφορετικές ισομορφές GR έχουν βρεθεί όχι μόνο στο κυτταρόπλασμα αλλά επίσης και στη μιτοχονδριακή μήτρα.^[67-68]



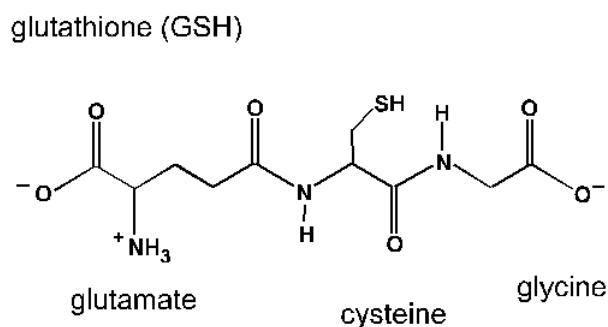
Εικόνα 14: Η οξειδοαναγωγή της γλουταθειόνης.

(Πηγή: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/minerals/selenium/gsh.html>)

1.4.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Γλουταθειόνη (GSH)

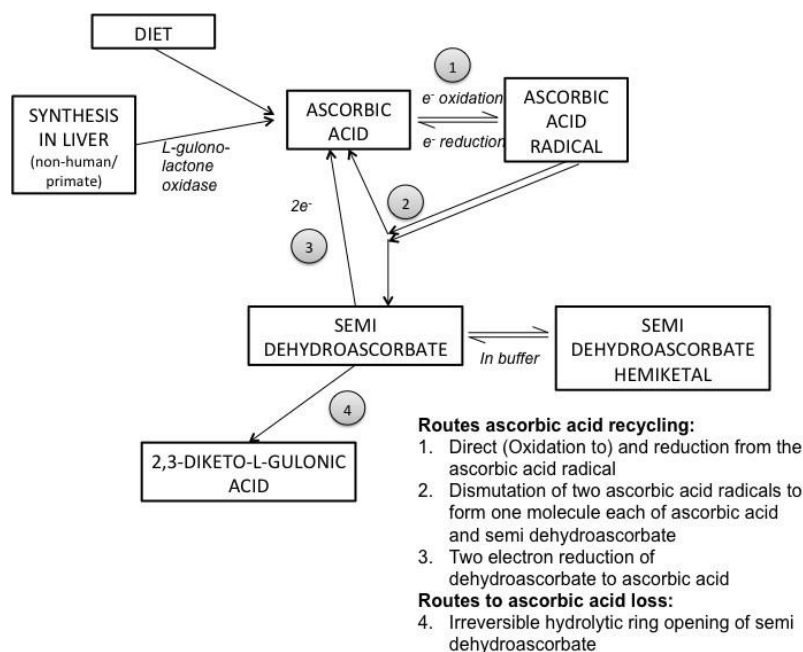
Η GSH (γ-L-γλουτάμυλο-L-κυστεϊνογλυκίνη) είναι ένα τριπεπτίδιο από γλυκίνη, κυστεΐνη και γλουταμινικό. Είναι το πιο σημαντικό υδρόφιλο αντιοξειδωτικό που προστατεύει τα κύτταρα από τις ελεύθερες ρίζες. Αυτές απομακρύνονται μέσω μη-ενζυμικής αναγωγής με GSH, ενώ τα υδροϋπεροξείδια και το H_2O_2 καταλύονται ενζυμικά με τη βοήθεια της GPx (που χρειάζεται επίσης GSH). Επίσης μπορεί να ανάγει και αντιοξειδωτικά των κυττάρων όπως οι βιταμίνες C και E. Η προκύπτουσα οξειδωμένη μορφή της GSH (GSSG), χαρακτηρίζεται από ένα δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ των δύο μορίων της GSH και ανάγεται αποτελεσματικά ξανά σε GSH από τη GR που εξαρτάται από το NADPH. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ανηγμένη GSH αποτελεί την κύρια μορφή του μορίου με συγκέντρωση 10 έως 100 φορές μεγαλύτερη από την οξειδωμένη της μορφή. Συνεπώς η αναλογία μεταξύ ανηγμένης και οξειδωμένης μορφής είναι ένας σημαντικός δείκτης του οξειδοαναγωγικού περιβάλλοντος και την ίδια στιγμή, συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στη διαφοροποίηση, ή στην απόπτωση. Η GSH συντίθεται στο κυτταρόπλασμα όπου και βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό (σχεδόν 90%). Από εκεί διανέμεται σε οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, ο πυρήνας και το ενδοπλασματικό δίκτυο. Σε αυτές τις περιοχές βρίσκεται κυρίως στην ανηγμένη μορφή, εκτός από το ενδοπλασματικό δίκτυο.^[69]



Εικόνα 15: Η δομή της γλουταθειόνης. (Πηγή:<https://amit1b.wordpress.com/the-molecules-of-life/about/amino-acids/>)

Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) είναι ένα υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό, δότης ενός ηλεκτρονίου που αντιδρά άμεσα με μια σειρά από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου εξουδετερώνοντας αυτές ή μειώνοντας τη δραστηριότητά τους. Η απώλεια του ηλεκτρονίου οδηγεί στο σχηματισμό της ρίζας ασκορβικού οξέος, η οποία μπορεί να αναχθεί αποτελεσματικά σε ασκορβικό οξύ ενζυμικά. Οι ρίζες ασκορβικού οξέος αντιδρούν κατά προτίμηση μεταξύ τους σχηματίζοντας ασκορβικό οξύ και δεϋδροασκορβικό οξύ. Αυτή η οξειδωμένη μορφή μπορεί επίσης να μετατραπεί πάλι σε ασκορβικό οξύ, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις υφίσταται μη αναστρέψιμο άνοιγμα του δακτυλίου και καταστροφή.



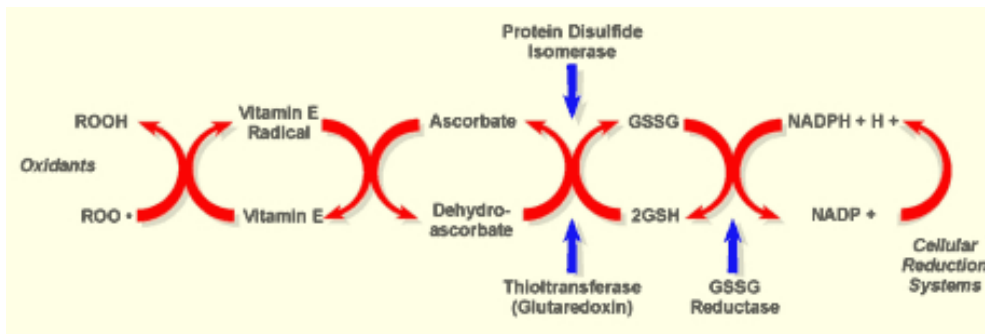
Εικόνα 16: Η οξείδωση και η ανακύκλωση του ασκορβικού οξέος. (Πηγή: *Nutrients* 2014, 6, 1752-1781; doi:10.3390/nu6041752)

Είναι το πιο ισχυρό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό του οργανισμού, συμβάλλοντας στην πρόληψη της οξειδωτικής βλάβης των λιπιδίων σε βιολογικά συστήματα καθώς μπορεί γρήγορα να αντιδράσει με τις ελεύθερες ρίζες στην υδατική φάση πριν αντιδράσουν με τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών. Το ασκορβικό οξύ προάγει την αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών, όπως η βιταμίνη E και η GSH. Δρα ως συμπράγοντας για μια σειρά ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση της καρνιτίνης, του κολλαγόνου και νευροδιαβιβαστών όπως η ντοπαμίνη, η νορεπινεφρίνη και η σεροτονίνη. Μπορεί να αναστέλλει την οξείδωση της LDL και να αυξήσει την αντίστασή της στην οξείδωση. Επίσης συμβάλλει στη λειτουργία της συνθάσης του νιτρικού οξέος στο ενδοθήλιο, προάγοντας την αρτηριακή ελαστικότητα και τη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Ο άνθρωπος εξαρτάται πλήρως από τις διατροφικές πηγές βιταμίνης C, δεν είναι εφικτή η σύνθεση του ενζύμου οξειδάσης της γουλονολακτόνης που απαιτείται για τη σύνθεση ασκορβικού οξέος από γλυκόζη.^[70]

Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό αναστέλλοντας την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου όταν το λίπος υφίσταται οξείδωση. Υπάρχουν οκτώ μορφές της βιταμίνης E: α, β, γ και δ κατηγορίες τοκοφερόλης και τοκοτριενόλης, οι οποίες συντίθενται στα φυτά από ομογεντισικό οξύ. Οι α- και γ-τοκοφερόλες είναι οι δύο κύριες μορφές της βιταμίνης. Βρίσκεται κυρίως στις κυτταρικές μεμβράνες και οργανίδια όπου μπορούν να ασκήσουν τη μέγιστη προστατευτική δράση, ακόμη και όταν η αναλογία συγκέντρωσής της μπορεί να είναι ένα μόριο ανά 2.000 μόρια φωσfolιπιδίων. Επίσης ένα μίγμα τοκοφερολών έχει ισχυρότερη ανασταλτική επίδραση στην υπεροξείδωση των λιπιδίων σε σύγκριση με την α-τοκοφερόλη μόνη της. Η βιταμίνη E προστατεύει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στα φωσfolιπίδια της μεμβράνης και στις λιποπρωτεΐνες στο πλάσμα. Έχει βρεθεί ότι η α-τοκοφερόλη, κυρίως αναστέλλει την παραγωγή των νέων ελευθέρων ριζών, ενώ η γ-

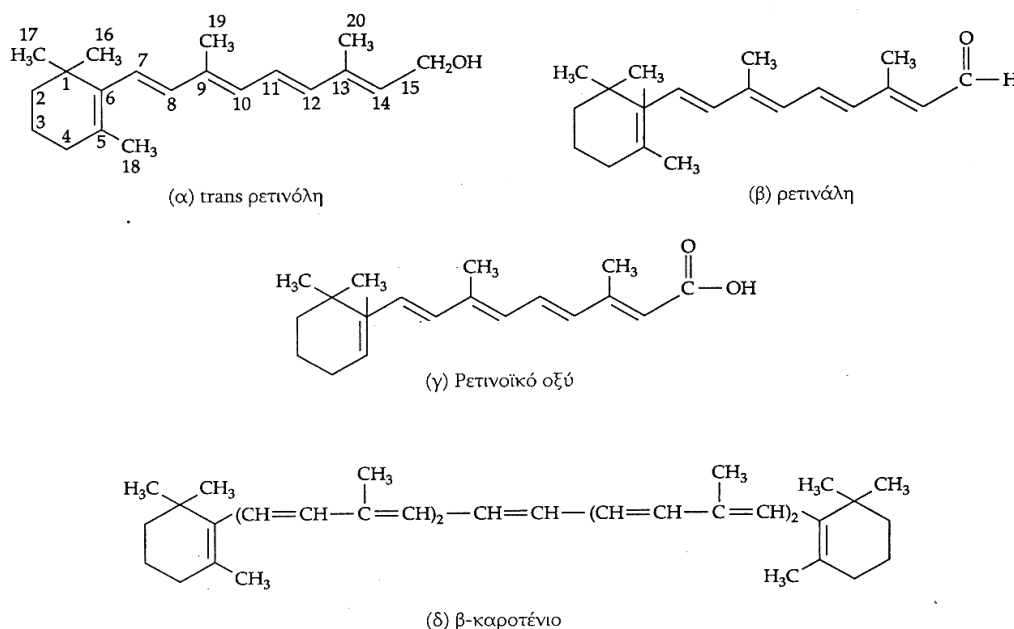
τοκοφερόλη εξουδετερώνει τις υπάρχουσες. Μετά την απενεργοποίηση των ελευθέρων ριζών, οι ρίζες τοκοφερόλης που σχηματίζονται μπορούν να οξειδώσουν άλλα λιπίδια, να οξειδωθούν περαιτέρω προς κινόνες τοκοφερόλης, να αντιδράσουν με άλλη ρίζα τοκοφερόλης σχηματίζοντας διμερή τοκοφερόλης, να αναχθούν προς τοκοφερόλη από άλλα αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη C.^[71]



Εικόνα 17: Η αντιοξειδωτική δράση και η ανακύκλωση της τοκοφερόλης

Βιταμίνη Α

Ο όρος βιταμίνη Α αναφέρεται σε μια ομάδα συστατικών με τη δράση της trans ρετινόλης, τα ρετινοειδή (ρετινόλη, ρετινάλη, ρετινοϊκό οξύ, ρετινυλικός εστέρας). Πρόδρομες μορφές της βιταμίνης αποτελούν τα καροτενοειδή ή προβιταμίνη Α. Από τα 700 περίπου καροτενοειδή που υπάρχουν, μόνο το α-καροτένιο, το β-καροτένιο και η β-κρυπτοξανθίνη θεωρούνται πρόδρομες μορφές της βιταμίνης Α. Μαζί με το λυκοπένιο και τη λουτεΐνη αποτελούν τα κύρια καροτενοειδή που απαντώνται στο πλάσμα του ανθρώπου.



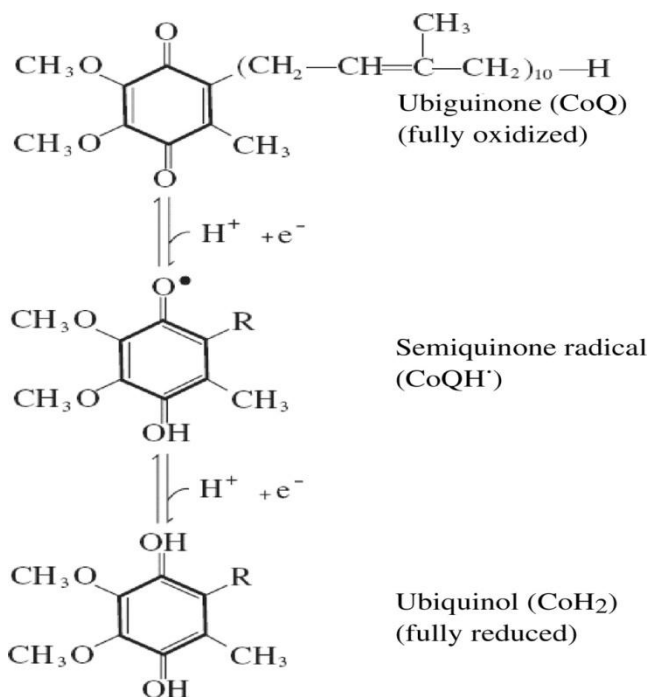
Εικόνα 18: Δομές των ρετινοειδών και του β-καροτενίου.

Τα καροτενοειδή που θεωρούνται προβιταμίνη Α, εν μέρει μετατρέπονται σε βιταμίνη Α (εστέρες ρετινόλης) στον εντερικό βλεννογόνο. Στα εντεροκύτταρα, τα καροτενοειδή και οι

εστέρες ρετινόλης ενσωματώνονται σε χυλομικρά και εκκρίνονται στη λέμφο για τη μεταφορά τους στο αίμα. Με την κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν καροτενοειδή, απελευθερώνονται και ενσωματώνονται σε μικκύλια που αποτελούνται από λιπίδια και συστατικά της χολής. Το β-καροτένιο δρα ως ένα αντιοξειδωτικό που απενεργοποιεί ελεύθερες ρίζες στις LDL και HDL χοληστερόλες, καθώς και σε κυτταρικές μεμβράνες. Μελέτες *in vitro* έχουν τεκμηριώσει την ικανότητα του β-καροτενίου να εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες με προσθήκη της ρίζας στο καροτενοειδές, με απόσπαση υδρογόνου και με μεταφορά ηλεκτρονίων. Το β-καροτένιο μπορεί να ανάγει την οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης E, αλλά όχι της βιταμίνης C. Στις λιποπρωτεΐνες, προστατεύει τη βιταμίνη E από την οξείδωση και οξειδώνεται πριν από αυτή.^[72] Επίσης έχει αποδειχθεί πως υπάρχει συνεργιστική δράση μεταξύ του β-καροτενίου, της βιταμίνης E και της βιταμίνης C στην προστασία των μεμβρανικών λιπιδίων.^[73-74] Επιπρόσθετα έχει μελετηθεί η αποτελεσματικότητα του β-καροτενίου σε διαφορετικές πιέσεις οξυγόνου (σε πιέσεις παρατηρήθηκαν στο επίπεδο της θάλασσας, στον πνεύμονα, το αίμα και εντός των κυττάρων). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική δράση του β-καροτενίου είναι υψηλότερη στις χαμηλές πιέσεις οξυγόνου στο ανθρώπινο σώμα.^[73]

Συνένζυμο Q₁₀ (CoQ)

Το CoQ ή ουβικινόνη, είναι μια λιποδιαλυτή βενζοκινόνη με μία πλευρική αλυσίδα 10 ισοπρενοειδών μονάδων, που συνθέτεται ενδογενώς στο σώμα από φαινυλαλανίνη και μεβαλονικό οξύ. Στον οργανισμό συμβάλλει στη μεταγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια, όπου δέχεται ηλεκτρόνια από διάφορους δότες (NADH, ηλεκτρικό οξύ, 3-φωσφορική γλυκερόλη) και τα μεταφέρει στο σύμπλοκο κυτοχρωμάτων. Το CoQ είναι επίσης ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, περισσότερο από τη βιταμίνη E και είναι σε θέση να αναστείλλει την προ-οξειδωτική της δραστηριότητα.^[75] Η λήψη συμπληρωμάτων CoQ αυξάνει τη συγκέντρωση του CoQ στην LDL και αναστέλλει την οξείδωσή της.^[76] Σε μελέτη που έγινε *in vivo* σε ποντίκια με έλλειψη του γονιδίου της ApoE, το CoQ μείωσε δείκτες υπεροξείδωσης λιπιδίων.^[77] Επίσης κατάφερε να αναστείλλει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης σε κουνέλια.^[78]



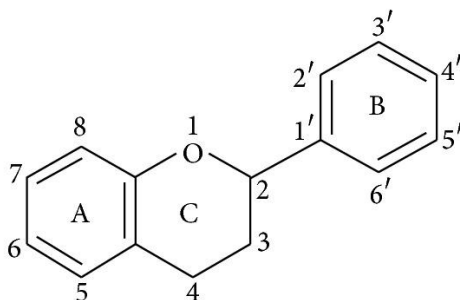
Εικόνα 19: Η οξειδοαναγωγή του συνενζύμου Q.

(Πηγή: *Q J Med* 2004; 97:537-548)

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια ομάδα φυσικών ενώσεων που βρίσκονται στα φυτά. Χημικώς τα φλαβονοειδή βασίζονται σε ένα σκελετό δεκαπέντε ατόμων άνθρακα που αποτελούνται

από δύο βενζολικούς δακτυλίους (A και B) συνδεδεμένους μέσω ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου πυρανίου (C).

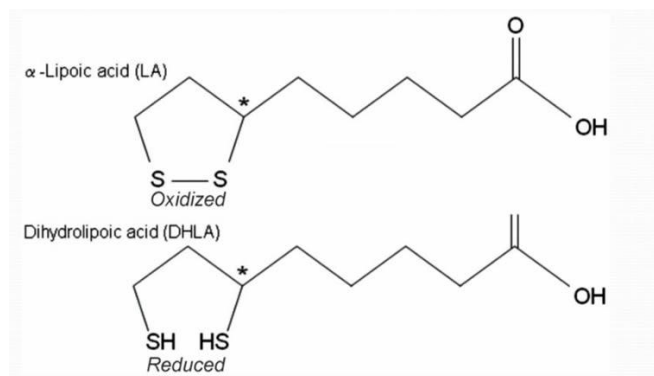


Εικόνα 20: Η δομή των φλαβονοειδών. (Πηγή: *ScientificWorldJournal*.2013; 2013: 162750.)

Μπορούν να διαιρεθούν σε διάφορες τάξεις, όπως φλαβόνες (π.χ. λουτεολίνη), φλαβονόλες (π.χ. κερκετίνη), φλαβανόνες (π.χ. εσπεριδίνη, ναριγκενίνη), φλαβανόλες (π.χ. κατεχίνη), ισοφλαβόνες (π.χ. γενιστίνη), ανθοκυανιδίνες (π.χ. απιγενιδίνη). Οι διάφορες κατηγορίες των φλαβονοειδών διαφέρουν στο επίπεδο της οξείδωσης και στους υποκαταστάτες του δακτυλίου C, ενώ μεμονωμένες ενώσεις μιας κατηγορίας διαφέρουν στο πρότυπο υποκατάστασης των δακτυλίων A και B. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φλαβονοειδών είναι αυτή που περιγράφεται καλύτερα. Η αντιοξειδωτική τους δράση εξαρτάται από τη διάταξη των λειτουργικών ομάδων. Συγκεκριμένα η διαμόρφωση, υποκατάσταση, και ο συνολικός αριθμός των ομάδων υδροξυλίου επηρεάζουν ουσιαστικά διάφορους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Η διαμόρφωση του υδροξυλίου του δακτυλίου B είναι ο πιο σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της απομάκρυνσης των ROS και των RNS καθώς δρα ως δότης υδρογόνου και ηλεκτρονίου για τη ρίζα υδροξυλίου, το ανιόν υπεροξειδίου, και το υπεροξυνιτρώδες. Εκτός από την απενεργοποίηση των ελευθέρων ριζών, μπορούν να αναστείλουν και την παραγωγή τους μέσω της δέσμευσης ιόντων μετάλλων (σίδηρος, χαλκός,) σε συγκεκριμένες θέσεις των διαφόρων δακτυλίων.^[79]

A-λιποϊκό οξύ (ALA)

Το ALA είναι μία ένωση θειόλης που συντίθεται στα μιτοχόνδρια. Διαιτητικές πηγές του ALA αποτελούν κυρίως το κρέας, η καρδιά, τα νεφρά, το ήπαρ. Σε μικρότερο ποσοστό βρίσκεται και στα φρούτα και στα λαχανικά. Μόνο μικρές ποσότητες του ALA μπορούν να ληφθούν από τη δίαιτα, ως εκ τούτου, οι περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τα κλινικά αποτελέσματα προέρχονται από μελέτες συμπληρωματικής χορήγησης ALA.^[80] Είναι ικανό να επάγει τη σύνθεση της ενδογενούς γλουταθειόνης.^[81] Μαζί με την ανηγμένη του μορφή, το διυδρολιποϊκό οξύ, το οποίο επίσης ασκεί ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, το ALA εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες, αναγεννά τηθειορεδοξίνη και τη βιταμίνη C που με τη σειρά της μπορεί να ανακυκλώσει τη βιταμίνη E.



Εικόνα 21: Οι δομές α-λιποϊκού οξέος και διυδρολιποϊκού οξέος.

1.4.3 Πρωτεΐνες δέσμησης μετάλλων

Φερριτίνη

Ο σίδηρος είναι ένα απαραίτητο στοιχείο για την ανάπτυξη των κυττάρων καθώς αποτελεί συστατικό πολλών ενζύμων, της αίμης, των πρωτεϊνών της αναπνευστικής αλυσίδας. Ωστόσο, ο ελεύθερος σίδηρος έχει την ικανότητα να συμμετέχει στο σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου μέσω της αντίδρασης Fenton. Η φερριτίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας του ενδοκυτταρικού σιδήρου. Αυτή η πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να δεσμεύει έως 4500 άτομα σιδήρου και λειτουργεί ως αποθήκη για το σίδηρο που δεν απαιτείται για άμεση μεταβολική χρήση. Αποτελείται από 24 υπομονάδες δύο τύπων (H και L). Η υπομονάδα H πιστεύεται ότι παίζει ένα ρόλο στη γρήγορη οξείδωση του σιδήρου σε τρισθενή, για την εναπόθεσή του εντός του πυρήνα. Η L υπομονάδα διευκολύνει την αποθήκευσή του. Αυτές οι λειτουργίες υποδεικνύουν ότι μπορεί να δράσει κυτταροπροστατευτικά, ελαχιστοποιώντας το σχηματισμό ελεύθερων ριζών οξυγόνου καθώς απομονώνει τον ενδοκυτταρικό σίδηρο.^[82]

Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη είναι η πλέον ευρέως κυκλοφορούσα πρωτεΐνη στο πλάσμα. Αποτελεί δείκτη θρέψης και έχει βρεθεί ότι κατέχει σημαντική θέση μεταξύ των αντιοξειδωτικών ενώσεων. Η αντιοξειδωτική της ικανότητα είναι πιθανό να σχετίζεται με την παρουσία ομάδων θειόλης. Από τα 35 κατάλοιπα κυστεΐνης η Cys-34 είναι το μόνο ελεύθερο που δεν εμπλέκεται στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών (λόγω της αφθονίας της στο πλάσμα, μία ανηγμένη Cys-34 είναι αρκετή για να αποτελέσει τη μεγαλύτερη πηγή θειολών στο αίμα). Επίσης είναι ικανή να δεσμεύει τα ιόντα χαλκού προλαμβάνοντας με αυτό τον τρόπο τον σχηματισμό $\text{OH}^\cdot$ από το H_2O_2 .^[83]

Τρανσφερρίνη

Η τοξικότητα του ελεύθερου σιδήρου στο αίμα και η ανάγκη για εξειδίκευση στην ανταλλαγή του σιδήρου μεταξύ των κυττάρων, απαιτεί την παρουσία ενός παράγοντα μεταφοράς σιδήρου στο κυκλοφορικό σύστημα. Αυτό επιτυγχάνεται από την τρανσφερρίνη, μία πρωτεΐνη η οποία δεσμεύει στο μόριό της δύο ιόντα τρισθενούς σιδήρου^[84] μεταφέροντάς τον και ταυτόχρονα εμποδίζοντάς τον να ασκήσει την οξειδωτική του δράση.

1.5 Μέθοδοι προσδιορισμού οξειδωτικού στρες

Προσδιορισμός οξειδωτικής βλάβης στα λιπίδια

Η λιπιδική υπεροξείδωση οδηγεί στην παραγωγή ενός εύρους ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων όπως υδροϋπεροξείδια λιπιδίων, αλδεΐδες, MDA. Η πιο κοινή μέθοδος για τον προσδιορισμό αυτών των προϊόντων βασίζεται στο θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA). Το TBA αντιδρά με μια σειρά από οξειδωμένα λιπίδια (κορεσμένα και ακόρεστα), αλδεΐδες, σακχαρόζη και ουρία, για να σχηματίσει διάφορες έγχρωμες ουσίες (TBARS). Η αντίδραση του TBA με την MDA παράγει ένα έγχρωμο προϊόν (ροζ) με μέγιστη απορρόφηση στα 532nm. Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι το γεγονός ότι δεν είναι απόλυτα ειδική για την MDA και πιθανόν να οδηγεί στην υπερεκτίμηση των επιπέδων της στο πλάσμα και στους ιστούς. Η MDA μπορεί επίσης να ανιχνευθεί και τη μέθοδο υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) που θεωρείται πιο ακριβής από αυτή του TBA.^[85]

Τα ισοπροστάνια είναι ένας τύπος εικοσανοειδών που παράγονται μη ενζυμικά μέσω της υπεροξείδωσης των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών από τη ρίζα οξυγόνου. Είναι ενώσεις παρόμοιες με την προσταγλανδίνη που εμφανίζονται φυσιολογικά στο πλάσμα και στα ούρα, αλλά είναι αυξημένα λόγω οξειδωτικού στρες σε ιστούς, πλάσμα και ούρα. Η 8-ισο-προσταγλανδίνη P2α (επίσης γνωστή ως 8-epi-PGF2α, 8-ισοπροστανόιο, ή 15-ισοπροστανόιο F2t), έχει αποδειχθεί ότι είναι χρήσιμη για την εκτίμηση του οξειδωτικού στρες *in vivo*. Η ανίχνευσή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί με την ανοσοενζυμική μέθοδο προσρόφησης (ELISA) καθώς και με αέρια χρωματογραφία (GC).^[86]

Προσδιορισμός οξειδωτικής βλάβης στο DNA

Πολλά διαφορετικά προϊόντα της οξείδωσης του DNA έχουν ανιχνευθεί με κυρίαρχα την 8-υδροξυγουανίνη (8OHGua) και τον αντίστοιχο δεοξυνουκλεοζίτη την 8OHdG. Η 8OHdG που προέρχεται από τα ούρα θεωρείται σημαντικός δείκτης της ενδογενούς οξειδωτικής βλάβης του DNA. Τα ούρα χρειάζονται συνήθως εκτεταμένες προπαρασκευαστικές διαδικασίες καθαρισμού πριν τη δοκιμασία της 8OHdG. Ο δείκτης αυτός συχνά μετράται με HPLC-ECD αλλά η μέθοδος μπορεί να είναι πολύπλοκη και η ακρίβειά της έχει ορισμένες φορές αμφισβητηθεί. Μια ανοσοδοκιμασία για την ανίχνευση της ουρικής 8OHdG με ένα εμπορικό μονοκλωνικό αντίσωμα (N45.1) έχει ευαισθησία, είναι απλή και παρουσιάζει καλή συσχέτιση με την καθιερωμένη μέθοδο HPLC-ECD. Επίσης χρησιμοποιείται και μία δοκιμασία κατά την οποία τα δείγματα ούρων καθαρίζονται με μία μόνο εκχύλιση και η 8OHdG μετρείται με GC-MS χρησιμοποιώντας ένα σταθερό επισημασμένο ισότοπο ανάλογο του 8OHdG.^[87]

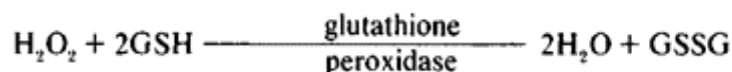
Προσδιορισμός οξειδωτικής βλάβης στις πρωτεΐνες

Τα AOPPs (προχωρημένα προϊόντα οξείδωσης πρωτεϊνών ή Advanced Oxidation Protein Products) είναι πρωτεΐνες, κυρίως αλβουμίνη, που καταστρέφονται από το οξειδωτικό στρες. Περιέχουν άφθονες διτυροσίνες που επιτρέπουν τη δημιουργία πλάγιων ομοιοπολικών δεσμών (crosslinking), δισουλφιδικές γέφυρες και καρβονυλικές ομάδες και δημιουργούνται κυρίως από χλωριωμένα οξειδωτικά (HOCl και χλωραμίνες που προέρχονται από τη δράση της μυελοϋπεροξειδάσης). Ο καθορισμός των AOPP βασίζεται

στην φασματοφωτομετρική ανίχνευση. Η απορρόφηση του δείγματος μετριέται στα 340nm και η χλωραμίνη T χρησιμοποιείται ως πρότυπο. [88-89]

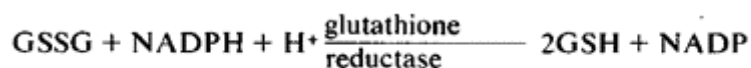
Μέτρηση της δραστηριότητας ενζύμων που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες

Δραστηριότητα GPx: Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της GPx πραγματοποιούνται δύο αντιδράσεις. Αρχικά δύο μόρια GSH αντιδρούν με H₂O₂ προς σχηματισμό GSSG με την επίδραση της GPx.



Εικόνα 22: Η οξείδωση της γλουταθειόνης

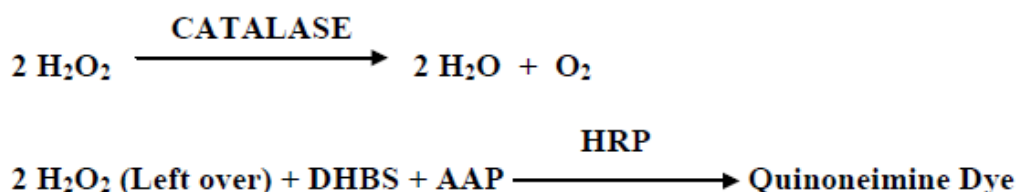
Στη συνέχεια η οξειδωμένη GSSG θα αναχθεί με τη βοήθεια της GR. Το NADPH ταυτόχρονα θα οξειδωθεί σε NADP⁺ μεταβάλλοντας την απορρόφηση στα 340nm.



Εικόνα 23: Η αναγωγή της γλουταθειόνης.

Μετρώντας την απορρόφηση του καταναλισκόμενου NADPH υπολογίζεται έμμεσα πόσα μόρια GSH οξειδώθηκαν με τη δράση της GPx. [90]

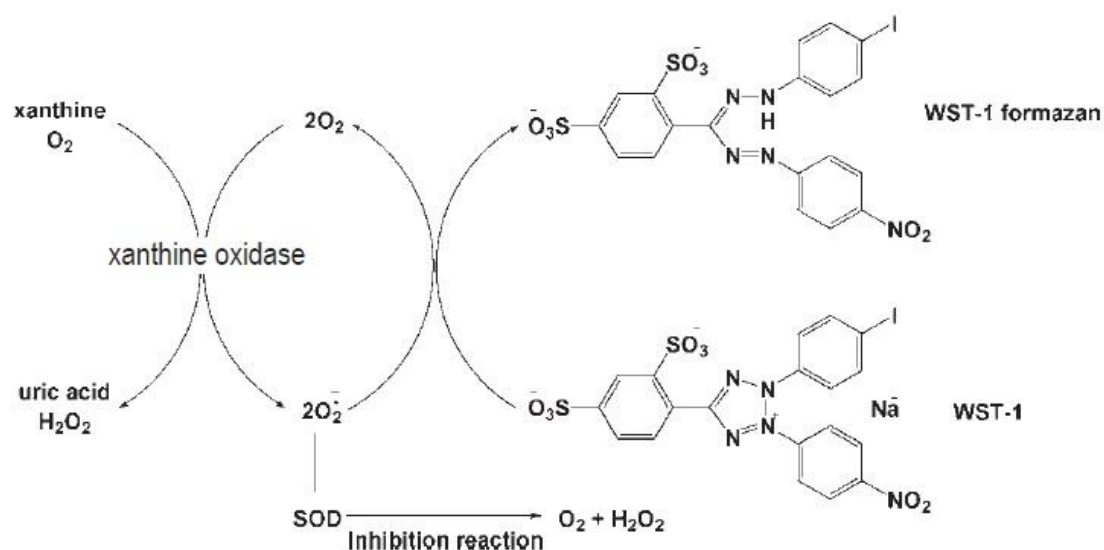
Δραστηριότητα CAT: Η CAT διασπά το H₂O₂ σε νερό και μοριακό οξυγόνο. Το ποσοστό της μείωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση της CAT. Η CAT που περιέχεται στο δείγμα επωάζεται σε μια γνωστή ποσότητα υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η αντίδραση προχωρά για ακριβώς ένα λεπτό, όπου η CAT απενεργοποιείται με προσθήκη sodium azide. Το υπόλοιπο του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μίγμα της αντίδρασης διευκολύνει την αντίδραση σύζευξης των χρωμοφόρων DHBS και AAP σε συνδυασμό με έναν καταλύτη HRP. Το προϊόν σύζευξης της κινονεμινικής χρώσης μετράται στα 520nm, που συσχετίζεται με την ποσότητα του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παραμένει στο μίγμα της αντίδρασης. [90]



Εικόνα 24: Μέθοδος προσδιορισμού καταλάσης. (Πηγή: OxiSelect™ Catalase Activity Assay Kit, Colorimetric)

Δραστηριότητα SOD: Η SOD καταλύει τη μετατροπή του ·O₂⁻ σε H₂O₂. Η δραστηριότητά της προσδιορίζεται με τη χρήση του υδατοδιαλυτού άλατος 4-[3-(νιτροφαινυλ)-2H-5-τετραζόλιο]-1,3- βενζολο δισουλφονικό (WST-1). Η μέθοδος στηρίζεται στην παραγωγή του προϊόντος formazan έπειτα από σύνδεση του WST-1 με το ·O₂⁻ και τη μετέπειτα αναγωγή του. Ο ρυθμός αναγωγής σχετίζεται γραμμικά με τη δραστηριότητα της οξειδάσης της

ξανθίνης και αναστέλλεται από τη SOD. Το WST-1- formazan εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση στα 450nm, αναλογική δηλαδή με το ποσό ελεύθερων $\cdot\text{O}_2^-$. Η δραστηριότητα της SOD προσδιορίζεται με τη μέτρηση της μείωσης εμφάνισης χρώματος στα 450nm.^[91]



Εικόνα 25: Η αναστολή της παραγωγής του WST-1- formazan από την υπεροξειδική δισμουτάση.

Μια δεύτερη μέθοδος προσδιορισμού της SOD χρησιμοποιεί επίσης την οξειδάση της ξανθίνης καθώς και το κυτόχρωμα c. Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει την αντίδραση μεταξύ ξανθίνης και O_2 προς παραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$. Το $\cdot\text{O}_2^-$ στη συνέχεια, ανάγει το φερροκυτόχρωμα c σε φερροκυτόχρωμα c προκαλώντας μία αύξηση στην απορρόφηση στα 550nm. Αντίστοιχα, η μείωση της απορρόφησης που επέρχεται από την προσθήκη δείγματος που περιέχει SOD, αντανακλά τη δραστηριότητά της.^[92]

Μέτρηση επιπέδων αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά που καταναλώνονται κατά την διάρκεια των αντιδράσεων με ROS θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για να αξιολογηθεί έμμεσα η αντιοξειδωτική κατάσταση του οργανισμού. Μία προσέγγιση είναι να μετρηθούν μεμονωμένα αντιοξειδωτικά (π.χ. ασκορβικό οξύ, α-τοκοφερόλη, ουρικό οξύ) στο αίμα, στο πλάσμα, ή στους ιστούς. Όλα τα μεμονωμένα μόρια αντιοξειδωτικών που έχουν αναγνωριστεί έως σήμερα πρέπει να μετρώνται. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση έχει πολλά μειονεκτήματα: είναι χρονοβόρα, δαπανηρή, απαιτητική, δεν μπορεί να ανιχνεύσει τις συνεργιστικές επιδράσεις μεταξύ των αντιοξειδωτικών, καθώς και την επίδραση των αντιοξειδωτικών ενώσεων που πιθανόν να μη γνωρίζουμε. Η άλλη προσέγγιση είναι η μέτρηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας ή της δραστηριότητας με υποβολή των δειγμάτων σε ελεγχόμενες συνθήκες οξειδωτικού στρες και στη συνέχεια μέτρηση είτε του ρυθμού οξείδωσης ή του χρόνου που απαιτείται για να συμβεί η οξείδωση. Ο προσδιορισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας καθαυτή δεν είναι επαρκής, δεδομένου ότι είναι δύσκολο να καθοριστεί πώς λειτουργεί κάθε ξεχωριστό αντιοξειδωτικό: με την πρόληψη του σχηματισμού ROS, απενεργοποιώντας τις ελεύθερες ρίζες, με την ενεργοποίηση οδών σηματοδότησης, ή με την επιδιόρθωση της οξειδωτικής βλάβης. Επιπλέον, η αντιοξειδωτική κατάσταση διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ατόμων και μεταξύ των εργαστηριακών μεθόδων που χρησιμοποιούνται σε αυτούς. Η τυπική

κατάσταση οξειδωτικού στρες ενός ατόμου δεν έχει αποδειχθεί μέχρι στιγμής.^[93] Δεν υπάρχουν τιμές αναφοράς για τα βέλτιστα επίπεδα των αντιοξειδωτικών στα ούρα, στο αίμα, σε ενδοκυττάριο επίπεδο. Επιπλέον, αρκετές ελεύθερες ρίζες δεν μπορούν να διασχίσουν τις κυτταρικές μεμβράνες λόγω του φορτίου τους. Καθώς δεν υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ των δεικτών οξειδωτικού στρες στο αίμα και των επιπέδων τους εντός των κυττάρων, η μέτρηση δειγμάτων αίματος μπορεί να είναι παραπλανητική. Εκτός αυτού, άγνωστα είναι επίσης τα ποσά και οι συνδυασμοί αντιοξειδωτικών που απαιτούνται για την ευεργετική επίδραση *in vivo*.^[94]

Κεφάλαιο 2: Οξειδωτικό στρες και νόσοι

Καρδιαγγειακά (CVD)

Τα CVD αποτελούν μια κατηγορία ασθενειών που αφορούν τα αιμοφόρα αγγεία της καρδιάς και της περιφέρειας. Στη στεφανιαία νόσο (ΣΝ), στο αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (ΑΕΕ) ή στην περιφερική αρτηριακή νόσο, η διαταραχή στη λειτουργία των αιμοφόρων αγγείων οδηγεί σε ανεπαρκή αιμάτωση των οργάνων. Η φλεβική θρόμβωση και η πνευμονική εμβολή συνήθως προκαλούνται από τη δημιουργία θρόμβων. Η πολυπαραγοντική αιτιολογία της νόσου καθιστά δύσκολη την ανίχνευση των πρώιμων εκδηλώσεων, καθώς τα συμπτώματα είναι υποκλινικά. Η φλεγμονή θεωρείται ότι διαδραματίζει καίριο ρόλο τόσο στην έναρξη της νόσου όσο και στην εξέλιξή της. Οι χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις μειώνουν την αντιοξειδωτική ικανότητα του οργανισμού λόγω συνεχούς παραγωγής ROS. Οι ασθενείς συχνά παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών στο αίμα και αυξημένα επίπεδα δεικτών οξειδωτικού στρες. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη ζήτηση αντιοξειδωτικών σε καταστάσεις υψηλής παραγωγής ROS από ενεργοποιημένα κύτταρα του ανοσοποιητικού όπως τα μακροφάγα. Η αθηροσκλήρωση είναι η πιο κοινή παθολογική διαδικασία που οδηγεί σε CVD. Πρώιμο συμβάν στην αθηρογένεση είναι η «υπόθεση της οξειδωτικής τροποποίησης» δηλαδή η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL).^[95] Κατά την οξείδωση της LDL παράγονται οξειδωμένα φωσφολιποειδή και ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF), μόρια τα οποία έχουν ισχυρή φλεγμονώδη δράση.^[96] Τα μόρια της LDL συγκρατούνται στο τοίχωμα της αρτηρίας ενώ τα ενδοθηλιακά κύτταρα επάγουν την παραγωγή μορίων για την προσκόλληση των μακροφάγων αλλά και την ενδοκυτταρική συσσώρευση χοληστερόλης σε αυτά.^[97] Τα μακροφάγα μετατρέπονται με αυτό τον τρόπο σε αφρώδη κύτταρα που εκκρίνουν κυτταροκίνες, παράγοντες φλεγμονής, παράγοντες θρόμβωσης, μορίων προσκόλλησης προκαλώντας περαιτέρω μετανάστευση μονοπύρηνων και πολλαπλασιασμό των λείων κυττάρων της έσω στιβάδας. Η οξειδωμένη LDL επάγει την παραγωγή ROS στον αγγειακό χώρο μέσω ενεργοποίησης της NADPH οξειδάσης και απενεργοποίησης της ενδοθηλιακής συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (eNOS) επιδεινώνοντας την αγγειακή δυσλειτουργία.^[98] Οι χρόνιες φλεγμονώδεις συνθήκες διατηρούνται λόγω της παραγωγής προφλεγμονωδών μεσολαβητών, μέσω των κυττάρων του ανοσοποιητικού.^[99]

Σακχαρώδης Διαβήτης

Πολλά στοιχεία αποδεικνύουν ότι η υπερπαραγωγή μιτοχονδριακών ROS (κυρίως το $\cdot\text{O}_2^-$) εμπλέκεται στο σακχαρώδη διαβήτη και στις επιπλοκές του, αν και είναι δύσκολο να εντοπιστεί η ακριβής τοποθεσία του σχηματισμού ROS στα μιτοχόνδρια. Κάποια δεδομένα υποστήριζαν ότι η γλυκόζη μπορεί άμεσα να διεγείρει την υπερπαραγωγή ROS,^[100] αλλά αργότερα φάνηκε ότι η υψηλή γλυκόζη (HG) ενεργοποιεί ενζυμικές διαδικασίες στα μιτοχόνδρια, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης της NADPH οξειδάσης, της απενεργοποίησης της NOS και της διέγερσης της οξειδάσης της ξανθίνης.^[100-103] Οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες μπορεί επίσης να επάγουν το σχηματισμό ROS,^[101] γεγονός που υποδηλώνει ότι διαφορετικές πηγές μπορεί να είναι υπεύθυνες για την υπερπαραγωγή τους και το οξειδωτικό στρες στο σακχαρώδη διαβήτη. Ο ακριβής ρόλος των μιτοχονδρίων δεν είναι εντελώς σαφής. Για κάποιο χρονικό διάστημα, τα μιτοχόνδρια θεωρούνταν η κύρια

πηγή των ROS στο σακχαρώδη διαβήτη ωστόσο μελέτη έχει δείξει ότι η HG μπορεί πράγματι να καταστείλει την παραγωγή μιτοχονδριακού $\cdot\text{O}_2^-$ σε παγκρεατικά β-κύτταρα.^[104] Παρομοίως, αναφέρεται ότι δεν υπάρχει υπερπαραγωγή $\cdot\text{O}_2^-$ από τα σύμπλοκα I και III σε διαβητικούς αρουραίους.^[105] Επιπλέον, έχει αναφερθεί σημαντική παραγωγή ROS υπό συνθήκες χαμηλής γλυκόζης σε β-κύτταρα ποντικών.^[106] Παρά το γεγονός ότι ο ρόλος τους είναι αμφιλεγόμενος, τα μιτοχόνδρια φαίνεται να είναι η κύρια πηγή των ROS στο σακχαρώδη διαβήτη. Παράλληλα, τα παγκρεατικά β-κύτταρα σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας μπορεί να παράγουν ROS που θα καταστείλουν την έκκριση της ινσουλίνης που προκαλείται από τη γλυκόζη (GIIS). Οι μιτοχονδριακές ROS που δημιουργούνται από τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης καταστέλλουν την πρώτη φάση της GIIS μέσω αναστολής της αφυδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεϋδης (GAPDH). Επίσης το μιτοχονδριακό $\cdot\text{O}_2^-$ που παράγεται ενδογενώς, ενεργοποιεί τη διαρροή πρωτονίων επαγόμενη από την πρωτεΐνη UCP2, μειώνοντας τα επίπεδα ATP συνεπώς και της GIIS.^[107] Από την άλλη μεριά υπάρχουν αποτελέσματα που υποδεικνύουν οι ROS λόγω της HG μπορούν να επάγουν την έκκριση ινσουλίνης.^[108] Το εύρημα αυτό ενισχύεται και από άλλη μελέτη που έδειξε ότι η παραγωγή μιτοχονδριακών ROS είναι αναγκαία για την GIIS.^[109] Ωστόσο, το οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι επιβλαβές για την έκκριση ινσουλίνης καθώς η εκκριτική απόκριση στη γλυκόζη μειώθηκε κατά 40% σε κύτταρα αρουραίων που βρίσκονταν υπό στρες για 3 ημέρες,^[110] και η GIIS επαγόμενη από ROS είναι πιθανό να αυξήσει περαιτέρω την παραγωγή τους.^[111]

Καρκίνος

Το οξειδωτικό στρες έχει συσχετιστεί ισχυρά με την καρκινογένεση, την πρόοδο του καρκίνου και με διάφορους επιθετικούς φαινότυπους καρκινικών κυττάρων. Η OH $\cdot$ είναι η δραστική μορφή οξυγόνου που προκαλεί άμεση ζημιά στο DNA και σε άλλα μακρομόρια, οδηγώντας σε καταστροφές στην έλικα και σε μεταλλάξεις. Συγκεκριμένα, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), λόγω της κοντινής θέσης του με την αναπνευστική αλυσίδα, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στις βλάβες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, γεγονός που μπορεί να ευθύνεται για μεταλλάξεις στην έκφραση γονιδίων μιτοχονδριακών και σωματικών κυττάρων σε πολλά είδη καρκίνου. Το mtDNA είναι δίκλωνο κυκλικό μόριο με πολλαπλά αντίγραφα επομένως, είναι λογικό οι βλάβες στην έλικα να έχουν άμεση επίδραση στη μιτοχονδριακή λειτουργία. Εκτός από τη βλάβη στο DNA, οι ROS μπορούν επίσης να προκαλέσουν πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τοξικότητα.^[112] Τα υψηλά επίπεδα παραγωγής ROS και η συσσώρευσή τους μπορεί να οδηγήσει σε τοξικότητα και κυτταρικό θάνατο, μετατρέποντας κάποια καρκινικά κύτταρα σε πιθανούς στόχους για απόπτωση.^[113-114] Τα χαμηλά επίπεδα των ROS από την άλλη, μπορούν να σηματοδοτήσουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.^[115] Σε πολλά ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα, όπως του προστάτη, του μαστού, του παχέος εντέρου, καθώς και στου παχέος εντέρου και στου ήπατος ποντικών, τα επίπεδα των ROS φαίνονται να είναι αυξημένα και τα κύτταρα να βρίσκονται υπό συνθήκες συνεχούς οξειδωτικού στρες.^[116-119] Αυτό μπορεί να οφείλεται σε αυξημένη δραστηριότητα της NADPH οξειδάσης, στο διαταραγμένο μεταβολισμό της ενέργειας που συνδέεται με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, και στη μειωμένη αντιοξειδωτική ικανότητα των SOD και GSH.^[112]

Χρόνια Νεφρική Νόσος (XNN)

Ο κύριος παθολογικός μηχανισμός που συνδέει το οξειδωτικό στρες, τη φλεγμονή, και την εξέλιξη της XNN χαρακτηρίζεται από μια αρχική βλάβη στο νεφρό λόγω των δραστηριοτήτων των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων ριζών οξυγόνου και από την προκύπτουσα φλεγμονώδη απόκριση. Ρίζες όπως οι $\text{OH}\cdot$ και $\cdot\text{O}_2^-$ εύκολα αλληλεπιδρούν με τα μοριακά συστατικά ενός νεφρώνα.^[120] Αρκετές αναφορές έχουν περιγράψει τις αλληλεπιδράσεις ρίζας-μορίου, συμπεριλαμβανομένης της οξείδωσης αμινοξέων με αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικών λειτουργικών ιδιοτήτων,^[121-122] της λιπιδικής υπεροξείδωσης κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα τη μειωμένη βιωσιμότητα των μεμβρανών,^[121, 123] της διάσπασης και crosslinking του νεφρικού DNA με αποτέλεσμα επιβλαβείς μεταλλάξεις.^[124-125] Αλληλεπιδράσεις αυτού του είδους οδηγούν σε άμεση βλάβη στο νεφρώνα και σε δευτερογενείς ρίζες ($\text{OH}\cdot$, HOCl , $\text{ONOO}\cdot$). Αυτές οι δευτερεύουσες ρίζες επιφέρουν τις ίδιες καταστροφικές συνέπειες με τις πρώτες, γεγονός που οδηγεί σε αλυσιδωτές αντιδράσεις που χαρακτηρίζονται από βλάβες σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο στο νεφρώνα. Επιπλέον, η επακόλουθη φλεγμονώδης απόκριση, που συμβαίνει κανονικά για προστασία και επιδιόρθωση των βλαβών, διεγείρει το σχηματισμό πρόσθετων ελεύθερων ριζών. Τα ουδετερόφιλα (και άλλα φαγοκύτταρα) που εισέρχονται στον κατεστραμμένο νεφρώνα παράγουν $\cdot\text{O}_2^-$ μέσω της NADPH οξειδάσης καθώς τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται με τη βοήθειά της μέσα στο κύτταρο και συνδέονται με μοριακό οξυγόνο. Το $\cdot\text{O}_2^-$ και οι άλλες ρίζες, συνεχίζουν να προωθούν τον τραυματισμό του νεφρώνα και να δίνουν σήμα για παράταση της φλεγμονώδους απόκρισης. Μετά από παρατεταμένη προσβολή (δηλαδή, χρόνια οξειδωτικό στρες και φλεγμονή), οι νεφρώνες υποβαθμίζονται σε βαθμό που να υπάρχουν κλινικά σημεία (όπως μειωμένη τιμή GFR).^[120]

Γήρανση

Το 1956, ο Denham Harman πρότεινε ότι οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη διάρκεια των αερόβιων αντιδράσεων προκαλέσει αθροιστική οξειδωτική βλάβη, με αποτέλεσμα τη γήρανση και τον θάνατο. Ως εκ τούτου, υπέθεσε ότι η ενδογενής παραγωγή ριζών οξυγόνου συμβαίνει *in vivo*, ως υποπροϊόν της ενζυμικής οξειδοαναγωγής και ότι τα υπεύθυνα ένζυμα θα είναι εκείνα που εμπλέκονται στην άμεση αξιοποίηση του μοριακού οξυγόνου, ιδιαίτερα εκείνα που περιέχουν σίδηρο. Τέλος, υπέθεσε ότι τα ίχνη του σιδήρου και άλλων μετάλλων καταλύουν οξειδωτικές αντιδράσεις *in vivo*. Όλα τα παραπάνω έχουν επιβεβαιωθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων 40 χρόνων και άνοιξαν το δρόμο για την ανάπτυξη νέων ιδεών, τρεις από τις οποίες είναι οι πλέον επικρατέστερες: η εξελικτική θεωρία της ανταγωνιστικής πλειοτροπίας, η θεωρία της σωματικής μετάλλαξης στη γήρανση του πληθυσμού και η μιτοχονδριακή θεωρία της γήρανσης του πληθυσμού.^[126]

Η εξελικτική θεωρία της ανταγωνιστικής πλειοτροπίας: Η ενδοκυτταρική παραγωγή ελευθέρων ριζών που μπορεί να περιορίσει τη διάρκεια ζωής μπορεί να φαίνεται παράδοξο. Είναι λογικό να αναμένει κανείς ότι η φυσική επιλογή θα μπορούσε να επινοήσει αερόβια κύτταρα που δεν έχουν διαρροή τοξικών υποπροϊόντων. Εξελικτικοί βιολόγοι υποστηρίζουν ότι η φυσική επιλογή ευνοεί τα γονίδια που δρουν νωρίς στη ζωή και στην αύξηση της αναπαραγωγής, παρά τα γονίδια που δρουν για τη διατήρηση των κυττάρων. Η έννοια της ανταγωνιστικής πλειοτροπίας τονίζει ότι στη φύση, η αναπαραγωγική επιτυχία είναι κυρίως συνάρτηση εξωτερικών παραγόντων. Με εξαίρεση τους σύγχρονους ανθρώπους, οι

οργανισμοί συνήθως δεν πεθάνουν από γηρατειά καθώς γίνονται τροφή για άλλους, αποικίζονται από παράσιτα, ή δεν επιβιώνουν από τον ανταγωνισμό. Ως εκ τούτου, η διατήρηση ακέραιων σωματικών κυττάρων δεν έχει ιδιαίτερο νόημα. Η τοξικότητα της αναπνευστικής έκρηξης για παράδειγμα δεν μπορεί εύκολα να εξαλειφθεί από την εξέλιξη, καθώς αυτό θα οδηγήσει σε θάνατο από μόλυνση σε μικρή ηλικία. Τυχόν νέες μεταλλάξεις που μειώνουν την οξειδωτική βλάβη πρέπει πρώτα να καθιστούν τον οργανισμό ικανό να ανταγωνιστεί αποτελεσματικά για τη νεανική αναπαραγωγή, γεγονός που εμποδίζει τη διατήρηση των σωματικών κυττάρων μακροπρόθεσμα.^[126]

Η θεωρία της σωματικής μετάλλαξης στη γήρανση του πληθυσμού: Η θεωρία υποστηρίζει ότι η συσσώρευση μεταλλάξεων του DNA είναι υπεύθυνη για την εκφυλιστική γήρανση.^[127-131] Επιχείρημα για την υποστήριξή της δόθηκε χρόνια πριν με την ανακάλυψη ότι η ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA συσχετίζεται με τη διάρκεια ζωής συγκεκριμένων ειδών^[132] φαινόμενο που επιβεβαιώθηκε πρόσφατα.^[133] Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι η επιδιόρθωση του DNA είναι απαραίτητη αλλά όχι επαρκής για τη μακροζωία.^[133] Σε κάθε περίπτωση έχει αποδειχθεί σε πολυάριθμες μελέτες με προκαρυωτικά κύτταρα, ζυμομύκητες και κύτταρα θηλαστικών, ότι οι οξειδωτικές ουσίες είναι μεταλλαξιογόνες και ότι τα κύτταρα επιδιώκουν την προστασία του γενετικού τους υλικού. Αν και δεν είναι ακόμη σαφές ποιες ακριβώς μεταλλάξεις μπορούν να αποδοθούν σε οξειδωτική βλάβη, η ανίχνευση και η κλωνοποίηση των γονιδίων άμυνας, καθώς και η αναπαραγωγή των διαδικασιών μετάλλαξης *in vivo*, δίνουν όλο και καλύτερη εικόνα.^[126]

Μιτοχονδριακή θεωρία της γήρανσης του πληθυσμού: Το μιτοχόνδριο θεωρείται επίσης ένα οργανίδιο του οποίου η δυσλειτουργία έχει σοβαρές αρνητικές συνέπειες στον οργανισμό. Η ιδέα ότι είναι εξαιρετικά ευάλωτο είχε από νωρίς αρκετούς υποστηρικτές. Στις αρχές της δεκαετίας του 1980,^[129, 134-135] προτάθηκε ότι η οξειδωτική βλάβη στο μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) σε μεταμιτωτικά κύτταρα θα οδηγήσει σε μεταλλάξεις και εμπόδια στην αντιγραφή, και κατά συνέπεια στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Αυτή η θεωρία που συνδυάζει τις ελεύθερες ρίζες, τις σωματικές μεταλλάξεις και τον κεντρικό ρόλο των μιτοχονδρίων, είναι προς το παρόν υπό εξονυχιστικό έλεγχο.^[126]

Νόσος Alzheimer

Η ΝΑ είναι η πιο κοινή μορφή άνοιας με 35,6 εκατομμύρια ασθενείς το 2010. Στα συμπτώματα περιλαμβάνεται η προοδευτική έκπτωση των γνωστικών ικανοτήτων, όπως η μνήμη, η διάθεση και η συμπεριφορά, οδηγώντας σε κοινωνική και διανοητική αναπηρία. Η υποκείμενη παθοφυσιολογία της νόσου περιλαμβάνει την απώλεια νευρώνων και συνάψεων στον εγκεφαλικό φλοιό και στις υποφλοιώδεις περιοχές. Η απόπτωση φαίνεται να είναι ένας από τους μηχανισμούς που οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο στη ΝΑ καθώς και εξωκυττάριας εναποθέσεις αμυλοειδούς-β (Αβ), οι λεγόμενες πλάκες. Με τη συσσώρευση αποδείξεων για τη συμβολή του οξειδωτικού στρες ως ένα σημαντικό παθογόνο παράγοντα στη ΝΑ, έχουν προκύψει εικασίες ότι το οξειδωτικό στρες συμβάλλει και στην έναρξη της νόσου. Στην πραγματικότητα, η οξειδωτική βλάβη βρέθηκε να είναι η πρώτη εκδήλωση στην εξέλιξη της νόσου μεταξύ όλων των χαρακτηριστικών της.^[136] Αυτό έχει παρατηρηθεί επίσης σε ζώα, όπου δείκτες οξειδωτικού στρες εμφανίζονται πριν τη συσσώρευση αμυλοειδούς-β (Αβ).^[137] Καθώς το οξειδωτικό στρες αποτελεί μέρος της φυσιολογικής γήρανσης, μια διαφορά της με την ΝΑ θα μπορούσε να είναι η διαφορετική ικανότητα των

νευρώνων να αντιμετωπίσει την αυξημένη παραγωγή ROS. Ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στην οξειδωτική βλάβη και έχει υψηλή κατανάλωση οξυγόνου. Περίπου το 20% του συνόλου των οξυγόνου και 25% του συνόλου της γλυκόζης καταναλώνονται για εγκεφαλικές λειτουργίες. Στον εγκέφαλο περιέχονται επίσης αρκετά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, που είναι πιο ευαίσθητα στην οξείδωση. Από την άλλη, τα επίπεδα της αντιοξειδωτικής άμυνας του εγκέφαλου είναι μέτρια, γεγονός που καθιστά τους νευρώνες ιδιαίτερα ευαίσθητους στην οξειδωτική βλάβη. Η κατάσταση επιδεινώνεται με το υψηλό περιεχόμενό του σε οξειδοαναγωγικά δραστικά μέταλλα, τα οποία μπορούν να προάγουν τον σχηματισμό ROS. Ξεκάθαρα, υπάρχει σχέση μεταξύ του Αβ και του οξειδωτικού στρες. Είναι γνωστό ότι το Αβ μπορεί να προκαλέσει αύξηση των ROS και επίσης να βλάψει μιτοχόνδρια, οδηγώντας σε περαιτέρω παραγωγή.^[136] Αυτές οι επιδράσεις φαίνονται στον εγκέφαλο μοντέλου ποντικού με NA, όπου η υπεροξείδωση των λιπιδίων είναι αυξημένη και ταυτόχρονα τα επίπεδα GSH και βιταμίνης E είναι μειωμένα,^[137] με αυτή την αλλαγή να έχει προηγηθεί της εμφάνισης της πλάκας. Σε άλλο μοντέλο ποντικού, ομόζυγο για τη μετάλλαξη του γονιδίου της προδρομίου αμυλοειδούς-β πρωτεΐνης (APP), η επαγωγή του οξειδωτικού στρες και η φλεγμονή, επιδείνωσαν την παθολογία της πλάκας και την αύξηση των επιπέδων του Αβ.^[138] Σε ασθενείς με NA αλλά και ποντικούς, το Αβ φαίνεται να δεσμεύεται στην αλκοολική αφυδρογονάση που συνδέει το πεπτίδιο του Αβ (ABAD) στα μιτοχόνδρια νευρικών κυττάρων.^[139] Προκαλείται με αυτό τον τρόπο εκφύλιση του ABAD, αυξημένο σχηματισμό ROS, μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και τελικά, απόπτωση.^[140] Το οξειδωτικό στρες έχει επίσης συνδεθεί με τον γενετικό παράγοντα κινδύνου ApoE4, τόσο σε ασθενείς με NA όσο και σε υγιή άτομα. Στον ιππόκαμπο ασθενών με NA, η ApoE4 σχετίστηκε με υψηλότερο οξειδωτικό στρες και μειωμένη ενζυμική αντιοξειδωτική δράση.^[141]

Κυστική Ίνωση

Η Κυστική Ίνωση (KI) είναι μια αυτοσωμική υπολειπόμενη διαταραχή που προκαλείται από ελάττωμα σε ένα μόνο γονίδιο στο χρωμόσωμα 7. Το γονίδιο κωδικοποιεί το διαμεμβρανικό ρυθμιστή αγωγιμότητας (CFTR), που εκφράζεται κυρίως στην κορυφαία μεμβράνη των επιθηλιακών κυττάρων. Αρκετές μεταλλάξεις δημιουργούν αυτό το ελαττωματικό γονίδιο με το Phe508del ή ΔF508, να είναι μία από τις πιο κοινές μεταλλάξεις στους Καυκάσιους. Φυσιολογικές διεργασίες που επηρεάζονται από αυτές τις μεταλλάξεις σχετίζονται με τον ρόλο του CFTR ως διάυλο ανιόντων ρυθμίζει την εκροή Cl⁻, αλλά και άλλων μεγαλύτερων ανιόντων όπως η ανηγμένη γλουταθειόνη. Και άλλα συστήματα μεταφοράς ιόντων είναι υπό την επιρροή του, όπως του διττανθρακικού ανιόντος και του νατρίου, συνεπώς ο ελαττωματικός CFTR μπορεί να βλάψει διάφορες διεργασίες, όπως είναι η ρύθμιση του όγκου των κυττάρων, η ρύθμιση του pH, οι μεταφορές μέσω του επιθηλίου, η αγωγιμότητα της μεμβράνης, και η αντιοξειδωτική ικανότητα της GSH. Η δυσλειτουργία του CFTR σχετίζεται με μεταβλημένη σύνθεση εκκρίσεων σε υγρά και ηλεκτρολύτες, αυξημένο ιξώδες και προοδευτική απόφραξη και ίνωση των οργάνων. Ο πνεύμονας, το πάγκρεας, το ήπαρ επηρεάζονται σοβαρά από αυτά τα γεγονότα. Οι υποτροπιάζουσες λοιμώξεις των αεραγωγών μαζί με την παγκρεατική ανεπάρκεια και το σακχαρώδη διαβήτη αποτελούν τις πιο κοινές επιπλοκές της KI. Πλέον έχει αποδειχθεί η ύπαρξη οξειδωτικού στρες στην KI. Οι βλάβες του πνευμονικού επιθηλίου και η ενεργοποίηση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων λόγω των λοιμώξεων δημιουργούν τις προϋποθέσεις για μια μη φυσιολογική παραγωγή ROS στον πνεύμονα με KI.^[142] Οι διαταραγμένοι δείκτες της

δραστηριότητας των ROS και της φλεγμονής, είναι πιο εμφανείς στις οξείες αναπνευστικές εξάρσεις και βελτίωση εμφανίζεται με τη θεραπεία της λοίμωξης.^[143-145] Οι ROS τροποποιούν την ομοιόσταση της θειόλης των εξωκυττάρων υγρών και του επιθηλίου,^[146] και προωθούν την ενεργοποίηση του MAPK,^[147] που ρυθμίζει τόσο την ανεξάρτητη όσο και την εξαρτώμενη από τον NF-κβ μεταγραφή των προ-φλεγμονωδών γονιδίων που προωθούν τη φλεγμονώδη απόκριση που παρατηρήθηκε στον πνεύμονα με ΚΙ. Είναι σε μεγάλο βαθμό αποδεκτό ότι τα ουδετερόφιλα μεταναστεύουν στο εσωτερικό του βρογχικού αυλού και απελευθερώνουν μεγάλες ποσότητες ROS, συμπεριλαμβανομένου του $\cdot\text{O}_2^-$, του H_2O_2 και της $\text{OH}\cdot$, κυρίως από την ενεργοποίηση της NADPH οξειδάσης (Nox). Ως εκ τούτου, τα ουδετερόφιλα έχουν αναγνωριστεί ως σημαντική πηγή ROS στο υγρό της επιφάνειας των αεραγωγών (ASL) των μικρών παιδιών με ΚΙ. Ωστόσο, και τα κυψελιδικά κύτταρα τύπου II είναι σε θέση να παράγουν σημαντικές ποσότητες ROS, μέσω των δύο ισομορφών της NADPH οξειδάσης που εκφράζονται στην ακραία μεμβράνη αυτών των επιθηλιακών κυττάρων, τις DUOX1 και DUOX2. Μια σημαντική προτεινόμενη λειτουργία των DUOXs είναι να υποστηρίξει τη λειτουργία της λακτοϋπεροξειδάσης (LPO), που απελευθερώνεται τα κύτταρα του υποβλεννογόνιου αδένος των αεραγωγών, για τη δημιουργία του βακτηριοκτόνου υποθειοκυανικού ανιόντος (OSCN^-) ξεκινώντας από θειοκυανιούχο ανιόν (SCN^-) και H_2O_2 .^[142] Η απελευθέρωση των ROS από τα επιθήλια είναι συνεχής και ανεξάρτητη από την παρουσία βακτηριακής λοίμωξης.^[148] Όσον αφορά την GSH, η ελαττωματική λειτουργία του CFTR έχει προταθεί ότι οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση αυτής στο κύτταρο. Η GSH είναι ζωτικής σημασίας για τον έλεγχο της συγκέντρωσης του H_2O_2 στα επιθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα με ΚΙ, γεγονός που συνδέεται με χαρακτηριστικές βλάβες σε ένζυμα σχετιζόμενα με τη GSH και μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα βασικό παράγοντα που συμβάλλει στο οξειδωτικό στρες των αεραγωγών.^[142]

Δερματικές παθήσεις

Το δέρμα είναι το μεγαλύτερο ανθρώπινο όργανο και διαδραματίζει καίριο ρόλο στο σώμα προστατεύοντας τον οργανισμό από χημικούς και φυσικούς βλαβερούς παράγοντες. Αποτελείται από τρεις στιβάδες: την εξωτερική (επιδερμίδα), τη στιβάδα κάτω από την επιδερμίδα (χόριο) και την κατώτερη (υποδόριο). Η επιδερμίδα περιέχει κερατίνη, μελανίνη και προστατεύει από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Το χόριο παρέχει δομική ακεραιότητα και φυσική υποστήριξη στη δερματική αγγείωση. Η δομική ακεραιότητα και η λειτουργία του χορίου εξαρτώνται από την ύπαρξη ινών κολλαγόνου τύπου I, που παράγονται από ινοβλάστες παρόντες στην περιοχή. Η κανονική λειτουργία των ινοβλαστών στο χόριο απαιτεί αλληλεπίδραση με ίνες κολλαγόνου, διαδικασία που πραγματοποιείται από μια οικογένεια ενζύμων, τις μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (MMPs). Συγκεκριμένα, οι MMP-1 και MMP-3 μπορούν να ξεκινήσουν την καταστροφή του κολλαγόνου τύπου I, τα επίπεδα των οποίων είναι αυξημένα στη χρόνια έκθεση σε ακτινοβολία UVB και στη γήρανση, διεργασίες που σχετίζονται με την ύπαρξη ROS. Η καταστροφή των ινών κολλαγόνου μειώνει τους ινοβλάστες και την αλληλεπίδρασή τους με τις ίνες, μεταβάλλοντας με αυτό τον τρόπο τις μηχανικές ιδιότητες του δερματικού συνδετικού ιστού της εξωκυττάριας μήτρας και τις λειτουργίες των κυττάρων του χορίου του. Το δέρμα είναι σημαντικός στόχος των ROS καθώς εκτίθεται στην υπεριώδη ακτινοβολία, σε μια ποικιλία περιβαλλοντικών ρύπων, σε υψηλή πίεση μοριακού οξυγόνου και, επιπλέον, είναι πλούσιο σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Με την υπερβάλλουσα έκθεση σε ROS, η οξειδοαναγωγική κατάσταση του

μεσοκυττάριου περιβάλλοντος μετατοπίζεται προς τις οξειδωτικές συνθήκες. Οι ROS, είτε άμεσα είτε μέσω της δράσης τους στα βιομόρια που περιέχουν ομάδες θειόλης, μπορούν να τροποποιήσουν την δραστηριότητα αυξητικών παραγόντων, να αναστείλουν φωσφατάσες, να ενεργοποιήσουν πρωτεϊνικές κινάσες, να ενεργοποιήσουν ή να αναστείλουν μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτές οι μεταβολές οδηγούν ρυθμίζουν την έκφραση ενός γονιδίου ή επάγουν απόπτωση. Οι ακριβείς μηχανισμοί που συνδέουν τις μηχανικές ιδιότητες του χορίου με το οξειδωτικό στρες στους ανθρώπινους δερματικούς ινοβλάστες και ο ρόλος τους στις δερματικές παθήσεις απαιτούν περαιτέρω μελέτες.^[149] Ωστόσο είναι αποδεδειγμένο ότι το οξειδωτικό στρες, ο κατακερματισμός του κολλαγόνου και η αποδιοργάνωση των ινών κολλαγόνου στο χόριο, οδηγούν στην ανάπτυξη μιας ποικιλίας επιπλοκών και ασθενειών, όπως ερύθημα, οίδημα, φωτοαλλεργικές αντιδράσεις, ψωρίαση, ακμή, νόσο Rosacea, ατοπική δερματίτιδα, μελάνωμα, γήρανση του δέρματος.^[150-157]

Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών

Το Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών (PCOS) είναι μια από τις πιο συχνές ενδοκρινείς και μεταβολικές διαταραχές, που επηρεάζουν το 6-14% των γυναικών της αναπαραγωγικής ηλικίας. Το PCOS έχει συσχετισθεί με μεταβολικές διαταραχές, όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη, η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης. Ο επιπολασμός της παχυσαρκίας σε ασθενείς με PCOS κυμαίνεται από 30 έως 75% καθώς και το 28% των υπέρβαρων και παχύσαρκων γυναικών έχουν PCOS. Ακόμη και με απουσία παχυσαρκίας, οι ασθενείς με PCOS έχουν συχνά υπερβάλλον σωματικό λίπος, κεντρική παχυσαρκία και αντίσταση στην ινσουλίνη. Το PCOS και τα μεταβολικά συνοδά νοσήματά του μπορούν να εξηγηθούν από την ύπαρξη ενός φαύλου κύκλου. Μία χρόνια περίσσεια ανδρογόνων από ωοθήκες ή/και επινεφρίδια, ξεκινώντας προγεννητικά ή νωρίς μετά τη γέννηση, οδηγεί σε κοιλιακή παχυσαρκία. Η κοιλιακή παχυσαρκία μειώνει τη συγκέντρωση αδιπονεκτίνης, ευνοεί τη δυσλειτουργία στο λιπώδη ιστό, επάγοντας τοπική και συστηματική έκκριση κυτταροκινών, και προάγει το οξειδωτικό στρες. Προωθείται με αυτό τον τρόπο περαιτέρω έκκριση ανδρογόνων ως άμεση απάντηση των ωοθηκών και των επινεφριδίων στη φλεγμονή ή έμμεσα από την αντίσταση στην ινσουλίνη (καθώς η ινσουλίνη διευκολύνει την έκκριση ανδρογόνων). Εκτός από τη χρόνια φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες μπορεί επίσης να συμβάλλει στο PCOS και στις μεταβολικές επιπλοκές του.^[158] Αρκετές μελέτες έχουν αναφερθεί σε αυξημένα επίπεδα οξειδωτικού στρες στην παχυσαρκία.^[159-164] Πιθανά αίτια αποτελούν η υπεργλυκαιμία, η υπερτριγλυκεριδαιμία, η αυξημένη μυϊκή δραστηριότητα για να μεταφερθεί το υπερβάλλον βάρος, η υπερλεπτιναιμία, η χρόνια φλεγμονή και η ανεπαρκής αντιοξειδωτική άμυνα. Η παραγωγή ROS έχει συνδεθεί με αντίσταση στην ινσουλίνη, μείωση της πρόσληψης γλυκόζης από το μυϊκό και το λιπώδη ιστό και μείωση της έκκρισης ινσουλίνης από τα παγκρεατικά β κύτταρα.^[165-167] Επίσης η ενεργοποίηση των ευαίσθητων στο στρες ενδοκυτταρικών μονοπατιών σηματοδότησης, οδηγεί σε ινσουλινοαντίσταση και μειωμένη έκκριση ινσουλίνης, in vitro^[168-170] και in vivo.^[171-172] Η παθογένεια του συνδρόμου είναι πολύπλοκη και παραμένει ασαφής. Αρκετά χαρακτηριστικά του, συμπεριλαμβανομένης της περίσσειας ανδρογόνων, της κοιλιακής παχυσαρκίας, της αντίστασης στην ινσουλίνη και της παχυσαρκίας, μπορεί να συμβάλλουν στην ανάπτυξη του οξειδωτικού στρες που ενδέχεται να επιδεινώσει αυτές τις μεταβολικές επιπλοκές.^[158]

Κεφάλαιο 3: Συμπληρώματα αντιοξειδωτικών και οξειδωτικό στρες

Έχει αποδειχθεί ότι το οξειδωτικό στρες συναντάται σε πάνω από 100 ασθένειες, ως αιτία ή συνέπεια.^[173-174] Διαταραχές στην ισορροπία οξειδωτικής/αντιοξειδωτικής κατάστασης του κυττάρου μπορεί να προκαλέσει μέχρι και απόπτωση. Στην πραγματικότητα, η παραγωγή ROS είναι ελαφρώς αυξημένη, συνεπώς υπάρχει συνεχής χαμηλού βαθμού οξειδωτική βλάβη στο ανθρώπινο σώμα. Η κατάσταση αυτή δημιουργεί την ανάγκη για ένα αμυντικό σύστημα ενδογενών αντιοξειδωτικών για την απομάκρυνση ή την επιδιόρθωση των κατεστραμμένων βιομορίων πριν συσσωρευτούν και οδηγήσουν σε αλλοίωση του μεταβολισμού των κυττάρων και μόνιμη βλάβη.^[175] Ένα συμπλήρωμα διατροφής είναι ένα παρασκεύασμα που προορίζεται να παρέχει θρεπτικά συστατικά όπως βιταμίνες, ανόργανα άλατα, ίνες, λιπαρά οξέα, ή αμινοξέα που είτε λείπουν ή δεν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες από τη διατροφή του ατόμου. Η χρήση συμπληρωμάτων βιταμινών δεν προτείνεται ως μέθοδος αντικατάστασης της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών. Οι περισσότεροι άνθρωποι είναι σε θέση να διατηρήσουν ισορροπία μέσω της διατροφής ανεξαρτήτων των πρόσθετων αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων.^[176-177] Τα συμπληρώματα αντιοξειδωτικών φαίνεται να έχουν αποτελεσματική δράση στη μείωση των δεικτών του οξειδωτικού στρες ενός ατόμου εάν τα επίπεδα ελευθέρων ριζών είναι πάνω από το φυσιολογικό όριο και δεν μπορούν να ελεγχθούν από τα ενδογενή αντιοξειδωτικά.^[176] Από την άλλη, πολλές κλινικές δοκιμές στις οποίες τα άτομα έλαβαν ένα ή περισσότερα συνθετικά αντιοξειδωτικά απέτυχε να αποδείξει τα οφέλη τους. Παρακάτω παρατίθενται διάφορες κλινικές δοκιμές χορήγησης συμπληρωμάτων αντιοξειδωτικών, σε υγιείς και σε άτομα με συγκεκριμένες ασθένειες, καθώς και οι επιδράσεις τους σε δείκτες οξειδωτικού στρες.

Πίνακας 1: Χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων σε υγιείς.

Αντιοξειδωτικά	Άλλοι παράμε-τροι	Πληθυσμός	Διάρκεια δοκιμής	Αποτελέσματα	Πηγή
vitamin E (300mg)	Περπάτημα (30-60min 2φ/ω)	Εμμηνοπαυσιακές γυναίκες	12w (κάθε μέρα)	↑TAC, ↑θειορεδοξίνης	[178]
vitamin E (15, 60, 200mg)		Υγιείς ενήλικες	4w (κάθε μέρα)	↑ επιπέδων α-TP και GSH πλάσματος για τις δύο ομάδες με υψηλότερη πρόσληψη Μη στατιστική διαφορά στο επίπεδο προστασίας του DNA	[179]
vitamin E (440, 880,		Υγιείς ενήλικες	28d (κάθε μέρα)	↑ επιπέδων α-TP από την 4 ^η ημέρα της μελέτης και επαναφορά στην αρχική τιμή τους μετά από 12-20 ημέρες μετά τη	[180]

1320mg)				διακοπή της χορήγησης	
vitamin E (800 IU)	30min αερόβια άσκηση 3φ/ω	18-55y υγιείς ενήλικες, μη καπνιστές	8w (2 κάψουλες των 400 IU καθημερινά)	Μη στατιστικά σημαντικές αλλαγές σε λιποπρωτεΐνες/ MPO/ F2-isoprostane	[181]
vitamin E (80, 160, 320 mg)		♂ υγιείς	2m (κάθε μέρα)	↑ επιπέδων α, γ, δ τοκοτριενόλης ↑ TAS στην ομάδα των 320mg	[182]
vitamin E (300, 600, 1200 mg)		Υγιείς ενήλικες καπνιστές	3w (κάθε μέρα)	↑ επιπέδων vitamin E πλάσματος Μη στατιστική επίδραση στο F2- isoprostane ούρων και στη βιοσύνθεση θρομβοξανίων	[183]
vitamin E (800 mg)		Υγιείς ενήλικες	1m (κάθε μέρα)	↑ επιπέδων vitamin E πλάσματος ↓ λιπιδικών υπεροξειδίων πλάσματος	[184]
vitamin C (500mg)	Βιταμίνες συμπλέγ- ματος Β	♂ 30-50y Πλήρους απασχόλησης	33d (κάθε μέρα)	Βελτίωση επιπέδων στρες και γνωστικής απόδοσης σε έντονες καταστάσεις	[185]
vitamin C (1000mg)		Υγιείς ενήλικες, μη καπνιστές	4w (κάθε μέρα)	↑ επιπέδων ασκορβικού οξέος/α-TP/ GSH ↓ MDA Δε φάνηκε ↓ στην οξείδωση της LDL	[186]
vitamin C (500, 1000 mg)		25-64 y υγιείς ενήλικες με ασκορβικό οξύ πλάσματος <33 mmol/L	13w (κάθε μέρα)	↑ ασκορβικού οξέος και γλουταθειόνης λεμφοκυττάρων	[187]
ALA (600 mg)	Άσκηση στους τετρακέ- φαλους μύες	♂ 13 προπονημένοι και 20 μη προπονημένοι	8d (μετά την άσκηση)	↑ GSH και GPx πλάσματος μετά την άσκηση ↓ GR μετά την άσκηση ↓ TBARS, PC πριν και μετά την άσκηση	[188]
Zn (45mg)		Υγιείς 56-83y	6m (κάθε μέρα)	↑ Zn πλάσματος, ↓ CRP/IL-6/ MCP-1/ VCAM-1/ MDA	[189]

Zn (45mg)		Υγιείς 55–87γ	12m (κάθε μέρα)	↑ Zn πλάσματος ↓ MDA/TNF-α	[190]
Se (100 μg)		Υγιείς ενήλικες	2m (κάθε μέρα)	↑ Se πλάσματος και δραστηριότητας GPx	[191]
Resveratrol (200mg)		Υπέρβαροι	26w (κάθε μέρα)	↓ TNF-α/IL-6	[192]
Quercetin (50, 100, 150 mg)		Υγιείς ενήλικες	2w (κάθε μέρα)	↑ επιπέδων quercetin σε όλες τις ομάδες Μη στατιστική διαφορά σε επίπεδα οξειδωμένης LDL/TAC/TNF-α/ουρικού οξέος/ vitamin E	[193]
Glutathione (500mg)		Υγιείς ενήλικες	4w (δύο φορές την ημέρα)	Μη στατιστική διαφορά στα επίπεδα 8- OHdG/ F2-isoprostane/ στο λόγο GSH:GSSG	[194]
CoQ (150mg)		21–48γ υγιείς ενήλικες	14d (κάθε μέρα)	↓ επιπέδων γ-γλουταμιντρανσφοράσης	[195]
β-carotene (90mg)		♀ 62-80γ	3w (κάθε μέρα)	↑ επιπέδων β-καροτενίου πλάσματος Καμία διαφορά σε επίπεδα ασκορβικού οξέος, α-TP καθώς και υδροϋπεροξειδίων πλάσματος	[196]
Lutein (12mg)	Εκχύλισμα πράσινου τσαγιού (200mg) Δίαιτα ↓ σε ανοιχτό- χρωμα φρούτα και λαχανικά 2w πριν την έναρξη	50–70γ υγιείς ενήλικες	112d (κάθε μέρα)	↑ επιπέδων lutein/ολικών καροτενοειδών/ασκορβικού οξέος στις ομάδες lutein και lutein + green tea από την 4 ^η εβδομάδα Μη στατιστική ↑TAC ή ↓MDA/ F2- isoprostane	[197]
Lycopene (6,5, 15, 30 mg)	Δίαιτα ↓ σε lycopene 2w πριν την	≥40γ υγιείς ενήλικες	8w (κάθε μέρα)	↑ επιπέδων lycopene σε όλες τις ομάδες ↓ 8-OHdG Μη στατιστική ↓ επιπέδων MDA/	[198]

	έναρξη			HNE	
Soy isoflavones (100mg)	Ανθρακικό ασβέστιο (500mg)	Εμμηνοπαυσιακές γυναίκες	12m (κάθε μέρα)	↓ MDA	[199]
vitamin C (272 mg) vitamin E (31 mg)	Φυλλικό οξύ (400 μg)	20– 51γ Υγιείς με ↓ κατανάλωση φρούτων και λαχανικών	3m (κάθε μέρα)	↑ ασκορβικού οξέος και τοκοφερόλης ορού Καμία αλλαγή σε TBARS/PC/F2-isoprostane	[200]
vitamin C (500 mg) vitamin E (400 IU)		Υγιείς ενήλικες, μη καπνιστές	2m (κάθε μέρα)	Μη στατιστική ↓ επιπέδων 8-OHdG	[201]
vitamin C (500 mg) vitamin E (400 IU)	Άσκηση για τα πόδια	Υγιείς ενήλικες	29d (κάθε μέρα)	↑ ασκορβικού οξέος και τοκοφερόλης ορού Τα επίπεδα F2-isoprostane δεν παρουσίασαν ↑ μετά την άσκηση	[202]
vitamin E (400 IU) ή β-carotene (15 mg) for	δωρη έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία	Υγιείς ενήλικες	8w(κάθε μέρα)	↑ vitamin E στο πλάσμα και στο δέρμα ↑ β-carotene μόνο στο πλάσμα ↓ MDA στο δέρμα της ομάδας με vitamin E	[203]
β-carotene lutein lycopene (4mg από το καθένα ή 12mg μόνο από ένα)	Δίαιτα ↓ σε φρούτα και λαχανικά 2w πριν την έναρξη	50–70γ Υγιείς, μη καπνίστριες, εμμηνοπαυσιακές γυναίκες	56d (κάθε μέρα)	↑ επιπέδων lutein στις ομάδες mixed carotenoids/lutein ↑ επιπέδων β-carotene στις ομάδες mixed carotenoids/ β-carotene ↑ επιπέδων lycopene στην ομάδα lycopene αλλά ↓ στις ομάδες lutein/ β-carotene ↓ σε βλάβες στο DNA σε όλες τις ομάδες μετά τις 56d	[204]
CoQ (300 mg) astaxanthin (15 mg)	omega-3 acids (1350 mg) cholecalciferol	♀ 35–55γ	12w (κάθε μέρα)	↑ TAC/ δραστικότητας SOD ↓ MDA	[205]

lycopene (45 mg) lutein (30 mg) zeaxanthine (6 mg) L-seleno-methionine (330 mg) vitamin E (45mg)	ferol (30 μg)			Μη στατιστική διαφορά στη δραστικότητα της GPx και στα επίπεδα 8-OHdG	
14 vitamins & 9 minerals		Υγιείς με ↓ κατανάλωση φρούτων και λαχανικών	8w (12 χάπια την ημέρα)	↑ φυλλικού οξέος ορού, αντίσταση στην καταστροφή του DNA και στην οξείδωση της LDL μη στατιστικά σημαντική βελτίωση δραστικότητας SOD/GPx/CAT	[206]

Συνοπτικά, σύμφωνα με τις παραπάνω έρευνες: η χορήγηση βιταμίνης E οδήγησε στην πλειοψηφία, σε αύξηση των επιπέδων της στο πλάσμα των εθελοντών, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις με κατανάλωση 300mg και άνω, παρατηρήθηκε και μείωση της λιπιδικής υπεροξείδωσης. Τα συμπληρώματα βιταμίνης C προκάλεσαν την αύξηση του ασκορβικού οξέος πλάσματος που σε αρκετές μελέτες συνοδεύτηκε με αύξηση βιταμίνης E και γλουταθειόνης. Στις μελέτες χορήγησης καροτενοειδών -σε εθελοντές με χαμηλή πρόσληψη- αυξήθηκε η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα, που συνοδεύτηκε από μείωση δεικτών λιπιδικής υπεροξείδωσης και καταστροφής του DNA. Η χρήση φλαβονοειδών οδήγησε κυρίως σε μείωση δεικτών φλεγμονής. Στις μελέτες χορήγησης μετάλλων αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις τους στο πλάσμα. Επιπλέον, ο Zn οδήγησε σε μείωση της φλεγμονής και της λιπιδικής υπεροξείδωσης, ενώ το Se σε αύξηση της δραστικότητας του αντιοξειδωτικού ενζύμου GPx.

Πίνακας 2: Χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων σε ασθενείς.

Αντιοξειδωτικά	Άλλοι παράμε-τροι	Πληθυσμός	Διάρκεια δοκιμής	Αποτελέσματα	Πηγή
α-Tocopherol (400IU)		Παιδιά 7-15γ με σύνδρομο Down	4m (κάθε μέρα)	↓8OHdG	[207]
vitamin C (500 mg)		Ασθενείς με αρθρίτιδα και ουρικό οξύ >6mg/dL	8w (κάθε μέρα)	↑ ασκορβικού οξέος ορού	[208]
vitamin C (200 mg)		Ασθενείς σε αιμοδιάλυση	3m (κάθε μέρα)	↓CRP, ↑ προαλβουμίνης μόνο κατά τη διάρκεια λήψης του συμπληρώματος	[209]
vitamin C (500 mg)		Ασθενείς με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο	10d (αμέσως μετά το επεισόδιο)	↑TAC ωστόσο δε βελτιώθηκε η κλινική εικόνα 3 μήνες μετά	[210]
vitamin C (250 mg)		Ασθενείς σε αιμοδιάλυση ή με GFR <20 mL/min	3m (3φ την εβδομάδα)	↑ ασκορβικού οξέος	[211]
vitamin C (500 mg)		Παχύσαρκα παιδιά 8-12γ	45d (κάθε μέρα)	↓ μέσης αρτηριακής πίεσης, βελτίωση περιφερικής αγγειοδιαστολής σε στρες	[212]
Zn (11mg στοιχειακός)		Ασθενείς σε αιμοδιάλυση με ↑Al πλάσματος	2m (κάθε μέρα)	↑Zn πλάσματος/ Se/ δραστηριότητας SOD, ↓Al πλάσματος/ MDA	[213]
ALA (1000mg)	Άσκηση 30min/d 5d/w	Παχύσαρκοι με IGT	12w (κάθε μέρα)	↑TAC	[214]
ALA (500 mg)		Ασθενείς με σχιζοφρένεια	3m (κάθε μέρα)	Μη στατιστικά σημαντική ↓TBARS/TAS ↓ δραστηριότητας SOD	[215]
ALA	Ω-3 λ.ο. (675 mg DHA	Ασθενείς με ν. Alzheimer	12m (κάθε μέρα)	Μη στατιστικά σημαντική ↓F2-isoprostane	[216]

(600 mg)	& 975 mg EPA)				
ALA (300, 600, 900, 1200 mg)		Ασθενείς με ΣΔΙΙ	6m (κάθε μέρα)	Μη στατιστικά σημαντική ↓8-OHdG	[217]
Se (200 µg)		Ασθενείς σε αιμοδιάλυση τουλάχιστον 3 μήνες	12w (κάθε μέρα)	↓MDA	[218]
Se (200 µg)		Ασθενείς με μεταμόσχευση αρχέγονων αιμοποιητικών κυττάρων	2 φ/ημέρα μέχρι και 14 μέρες μετά τη χημειο- θεραπεία	Μη στατιστικά σημαντική ↓TNF-α/IL- 1β/IL-6	[219]
Resveratrol (500mg)		Παχύσαρκοι (BMI>30 kg/m ²) 17-80γ	4w (κάθε μέρα)	Μη στατιστικά σημαντική ↓ στη λιποειδική υπεροξείδωση	[220]
Quercetin (500mg)		Ασθενείς με σαρκοείδωση μη καπνιστές	24h (4 φορές)	↑TAC/↓MDA/IL-10 όταν οι τιμές τους ήταν αυξημένες	[221]
α-tocopherol (400mg) β-carotene (40mg) vitamin C (1000mg)		Ασθενείς με καρδιαγγειακά προβλήματα	2m (κάθε μέρα)	↑ σε επίπεδα α-TP και βC μόνο σε αυτούς με αρχικές τιμές ορού: <18 µM για την α-TP και <0.30 µM για το βC	[222]
vitamin A (10000IU) vitamin E (400mg) vitamin C (600mg)		Ασθενείς σε ΜΕΘ	(μέχρι να βγουν από τη ΜΕΘ)	↓MDA	[223]
α-tocopherol (221mg) vitamin C (167mg)	Βιταμίνες συμπλέγ- ματος Β	Ασθενείς με ΣΔΙΙ	3m (κάθε μέρα)	↑ επιπέδων vit E/ φυλλικού οξέος ↓ επιπέδων ομοκυστεΐνης	[224]

ALA (600 mg) vitamin E (400 IU)		Ασθενείς σε αιμοδιάλυση	2m (κάθε μέρα)	↓ IL-6 Μη στατιστικά σημαντική ↓MDA/CRP	[225]
14 vitamins & 14 minerals		♀ αναπαραγωγι- κής ηλικίας με CFS	2m (κάθε μέρα)	βελτίωση δραστηκότητας SOD	[226]
α-tocopherol (800 IU) vitamin C (500 mg) ALA (900 mg)		Ασθενείς με ν. Alzheimer	16w (3 φορές την ημέρα)	↓ F2-isoprostane	[227]
vitamin E (400 IU) vitamin C (500 mg) selenium (50 µg)		Υπέρβαρα ή παχύσαρκα παιδιά	4m (κάθε μέρα)	↑ α-TP ορού/ ασκορβικού οξέος/ Se ↓ F2-isoprostane	[228]

Κεφάλαιο 4: Σκοπός

Σκοπός της μελέτης ήταν να αξιολογήσει το αποτέλεσμα που έχει η βραχυπρόθεσμη κατανάλωση ενός μίγματος βιταμινών, ανόργανων ουσιών και φυσικών εκχυλισμάτων στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού φαινομενικά υγιών εθελοντών. Γ' αυτό το σκοπό α) πιστοποιήθηκαν *in vitro* οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες του συμπληρώματος και η περιεκτικότητά του σε φαινολικά συστατικά και β) πραγματοποιήθηκε διπλά τυφλή κλινική παρέμβαση σε υγιείς εθελοντές που κατανάλωναν είτε το συμπλήρωμα είτε το εικονικό σκεύασμα και προσδιορίστηκε η δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης στα λευκοκύτταρα των εθελοντών στις 0, 4, και 8 εβδομάδες.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 5: Μεθοδολογία

5.1 Σχεδιασμός κλινικής μελέτης

5.1.1 Περιγραφή σχεδιασμού

Βάση του πρωτοκόλλου οι εθελοντές χωρίστηκαν σε τυχαία συνδυασμένες ομάδες, (block randomization) με βάση την ηλικία, το φύλο, το ΔΜΣ (Δείκτης Μάζας Σώματος) και τις καπνιστικές συνήθειες. Οι εθελοντές λάμβαναν μετά από το γεύμα, είτε το συμπλήρωμα Mind Master (MM) (80mL/ημέρα), είτε το εικονικό σκεύασμα Placebo (P)(80mL/ημέρα) για 8 εβδομάδες και προσήλθαν στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο 3 φορές συνολικά (πριν την παρέμβαση, στις 4 εβδομάδες και στις 8 εβδομάδες). Πριν από κάθε επίσκεψη ζητήθηκε από τους εθελοντές να φέρουν μαζί τους δείγμα από πρωινά ούρα σε ειδική συσκευασία που τους είχε χορηγηθεί από πριν. Μετά από 12ωρη νηστεία πραγματοποιήθηκαν λήψη αίματος, ανθρωπομετρικές μετρήσεις (βάρος, ύψος, περιφέρεια μέσης) συμπλήρωση ερωτηματολογίου διατροφικών συνηθειών και φυσικής δραστηριότητας και μέτρηση αρτηριακής πίεσης (διαστολικής και συστολικής). Οι αιμοληψίες έγιναν από ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό, παρουσία ιατρού. Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών μετρήθηκαν από έμπειρο διαιτολόγο και η μέτρηση της αρτηριακής πίεσης έγινε από τον ιατρό της μελέτης. Κατά τη διάρκεια των 8 εβδομάδων πραγματοποιήθηκαν τηλεφωνικές 3ήμερες ανακλήσεις 24ώρου την πρώτη εβδομάδα της παρέμβασης, την εβδομάδα μετά τη δεύτερη αιμοληψία και την τελευταία εβδομάδα της παρέμβασης από εξειδικευμένο διαιτολόγο προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπήρχε αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες των εθελοντών.

5.1.2 Στρατολόγηση εθελοντών

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε είναι τυφλή παρέμβαση με δύο σκέλη, ελεγχόμενη από εικονικό συμπλήρωμα. Οι εθελοντές που επιλέχθηκαν ήταν φαινομενικά υγιείς εθελοντές, με $\Delta\text{ΜΣ} > 23 \text{ kg/m}^2$, χωρίς χρόνιες παθήσεις και χωρίς λήψη φαρμακευτικής αγωγής ή συμπληρωμάτων διατροφής. Από τους εθελοντές ζητήθηκε να αποφύγουν τη λήψη οποιουδήποτε αντιφλεγμονώδους ή αναλγητικού φαρμάκου ή συμπληρώματος διατροφής κατά τη διάρκεια της συμμετοχής τους στην έρευνα. Επιπλέον δόθηκαν οδηγίες για τη διατήρηση των διατροφικών τους συνηθειών κατά το χρονικό διάστημα της συμμετοχής τους στην έρευνα. Οι εθελοντές που πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια ενημερώθηκαν πλήρως για τις διαδικασίες, τις υποχρεώσεις και τα δικαιώματά τους και υπέγραψαν συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής στη μελέτη.

5.1.3 Παραλαβή ομογενοποιημένου λευκοκυττάρων

Για την απομόνωση των λευκοκυττάρων συλλέχθηκαν 6mL αίμα σε vacutainer με ηπαρίνη. Ακολούθησε προσθήκη 2mL διαλύματος δεξτράνης 3%, ανάδευση και παραμονή του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μεταφορά του υπερκείμενου (LRP) με πιπέτα σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα και φυγοκέντρηση στα 500g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στο ίζημα των

λευκοκυττάρων που προέκυψε (μετά από απόρριψη του υπερκείμενου), έγινε προσθήκη 6mL Lysis Buffer για τη λύση των εναπομεινάντων ερυθροκυττάρων. Μετά από 5 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, έγινε απομόνωση των λευκοκυττάρων με φυγοκέντρηση στα 300g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 15°C. Έπειτα πραγματοποιήθηκε διάλυση του ιζήματος των λευκοκυττάρων σε 1mL παγωμένου ρυθμιστικού διαλύματος Tris 50mM pH 7,4. Ακολούθησε κατεργασία με υπέρηχους για 10 δευτερόλεπτα υπό ψύξη (για να αποφευχθεί η υπερθέρμανση του δείγματος), καθώς και φυγοκέντρηση σε 500g για 10 λεπτά στους 4°C. Τέλος, έλαβε χώρα η παραλαβή του ομογενοποιημένου των λευκοκυττάρων, η διανομή του σε erpendorfs και η αποθήκευσή τους στους -80°C.

5.2 Μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του συμπληρώματος

Το συμπλήρωμα MM που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη περιείχε τα εξής χαρακτηριστικά:

Συστατικά

Gel από Aloe barbedensis Miller (ΗΠΑ/Μεξικό 36%), συμπυκνωμένος χυμός σταφυλιού, νερό, δεξτρόζη, μίγμα εκχυλισμάτων (πράσινου τσαγιού, Polygonum cuspidatum που περιέχει ρεσβερατρόλη), σταθεροποιητής (κόμμι ξανθάνης), L-καρνιτίνη, μίγμα βιταμινών (βιταμίνη B1, φυλλικό οξύ, βιταμίνη B12, βιταμίνη E), χρωστική ουσία (χλωροφύλλη από φυτικά εκχυλίσματα), μέσο οξύτητας (κιτρικό οξύ), φωσφορικός σίδηρος (III), συντηρητικό (σορβικό κάλιο), φυσικό άρωμα, γλυκαντική ουσία (στεβιογλυκοζίδες), συνένζυμο Q₁₀, ασκορβικό οξύ, χολίνη, σεληνιώδες νάτριο.

Aloe vera ή *Aloe barbedensis* Miller: είναι ένας τροπικός κάκτος που στο παρελθόν έχει χρησιμοποιηθεί για τις θεραπευτικές του ιδιότητες από διαφορετικούς πολιτισμούς. Το gel AV περιέχει βιολογικά ενεργείς ενώσεις όπως 6-φωσφορική-μαννόζη, καρβοξυπεπτιδάση, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και υπεροξειδική δισμουτάση. Αυτές οι ενώσεις διακρίνονται για τις αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, ανοσοδιεγερτικές, αντιβακτηριδιακές, υπογλυκαιμικές, υπολιπιδαιμικές δράσεις τους, καθώς και για την ιδιότητα ως προς την επούλωση πληγών. Εκτός από την καλά τεκμηριωμένη θετική επίδραση του φυτού, υπήρξαν επίσης αναφορές για τις τοξικές επιδράσεις, όπως η ηπατίτιδα και οξεία νεφρική ανεπάρκεια.^[229]

Χυμός σταφυλιού: έχει μεγάλη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις που συναντώνται και στους σπόρους και στη φλούδα του φρούτου. Μετά την κατάποση, οι πολυφαινόλες ανιχνεύονται στο πλάσμα στη διαλυτή μορφή τους και συνδεμένες με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Έχει δειχθεί πως η από του στόματος χορήγηση φλαβονοειδών σταφυλιού προσδίδει αντιοξειδωτική προστασία, αναστέλλει τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, το σχηματισμό θρόμβου, τη συγκέντρωση των φλεγμονωδών κυτταροκινών και αναστέλλει την ενεργοποίηση του NF-κΒ. Στον αγγειακό χώρο, οι πολυφαινόλες του σταφυλιού ασκούν αγγειοδιασταλτικές επιδράσεις, αναστέλλουν την προσκόλληση των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο και βελτιώνουν την ενδοθηλιακή λειτουργία.^[230]

Εκχύλισμα πράσινου τσαγιού: Το πράσινο τσάι παρασκευάζεται από τα αποξηραμένα φύλλα του φυτού *Camellia sinensis*. Τα κυρίαρχα συστατικά του πράσινου τσαγιού είναι πολυφαινόλες που ανήκουν στην οικογένεια των κατεχινών, κυρίως η επιγαλλοκατεχίνη gallate (EGCG), και σε μικρότερες ποσότητες η κατεχίνη (C), η επικατεχίνη (EC), η επιγαλλοκατεχίνη (EGC) και επικατεχίνη gallate (ECG). Επιπλέον, η καφεΐνη, η θεανίνη, οι θεαφλαβίνες και τα φαινολικά οξέα όπως το γαλλικό οξύ, είναι παρόντα σε μικρότερες ποσότητες. Τα οφέλη υγείας του πράσινου τσαγιού αποδίδονται κυρίως σε αντιοξειδωτικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας των κατεχινών να απενεργοποιούν ROS. Εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, οι κατεχίνες του πράσινου τσαγιού θεωρείται ότι μπορούν να επηρεάσουν διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που σχετίζονται με κυτταρικό θάνατο και επιβίωση.^[231]

Ρεσβερατρόλη: ανήκει στις πολυφαινόλες και πρόκειται για την ένωση (3,5,4-τριυδροξυ-trans-στιλβένιο), η οποία εμφανίζεται φυσικά στη φλούδα των κόκκινων σταφυλιών, το κόκκινο κρασί, τα βατόμουρα, το φυτό *Polygonum cuspidatum*. Η ρεσβερατρόλη έχει νευροπροστατευτικές ιδιότητες, μειώνοντας τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, την οξειδωτική βλάβη, τη χρόνια φλεγμονή και βελτιώνοντας την αγγειακή λειτουργία. Σε διάφορες κλινικές μελέτες η χορήγηση ρεσβερατρόλης οδήγησε σε βελτιωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη και μιτοχονδριακή λειτουργία σε παχύσαρκα τρωκτικά. Επιπλέον, σε διαβητικά ή υπερτασικά μοντέλα ζώων, έχει αποδειχτεί ότι η ρεσβερατρόλη βελτιώνει την ενδοθηλιακή λειτουργία, μειώνει την αρτηριακή πίεση και ασκεί αντιαθηρογόνο δράση με τη μείωση της χοληστερόλης καθώς και με τη μείωση των φλεγμονωδών κυτταροκινών. Θετικά αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί μετά από 4 εβδομάδες συμπληρωματικής λήψης ρεσβερατρόλης, στο μεταβολισμό γλυκόζης/ινσουλίνης σε ασθενείς που πάσχουν από ΣΔΙΙ, από IGT, και είναι παχύσαρκοι. Επιπλέον, τα επίπεδα στο πλάσμα των φλεγμονωδών κυτταροκινών μειώθηκαν μετά από 6 εβδομάδες θεραπείας με ρεσβερατρόλη. Άμεσες θετικές επιπτώσεις στο αγγειακό σύστημα παρατηρήθηκαν σε δύο μελέτες οι οποίες επικεντρώνονται στην ενδοθηλιακή λειτουργία και την εγκεφαλική ροή του αίματος.^[192]

L-καρνιτίνη: αποτελεί μία ενδογενή πρόδρομη ουσία της καρνιτίνης-παλμιτόϋλοτρανσφεράσης-1, που συμμετέχει στη β-οξείδωση των λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια. Περίπου το ¼ της καρνιτίνης του σώματος συντίθεται από μεθειονίνη και λυσίνη στο ήπαρ και στα νεφρά, ενώ το υπόλοιπο λαμβάνεται μέσω της διατροφής, κυρίως από το κόκκινο κρέας και το γάλα. Η L-καρνιτίνη έχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ιδιότητες, καθώς απενεργοποιεί ελεύθερες ρίζες προστατεύοντας τους ιστούς από οξειδωτικές βλάβες. Σε μια μελέτη, η λήψη συμπληρώματος L-καρνιτίνης μείωσε τα επίπεδα TNF-α, βελτίωσε δείκτες λειτουργίας του ήπατος, καθώς και τα επίπεδα γλυκόζης πλάσματος. Ωστόσο, ακόμη και αν η πλειοψηφία των μελετών έχουν δείξει ότι τα συμπληρώματα L-καρνιτίνης μπορεί να βελτιώσουν παράγοντες που σχετίζονται με μεταβολικό σύνδρομο και καρδιαγγειακή νόσο, άλλες υποδεικνύουν ότι η διαιτητική L-καρνιτίνη μπορεί να επιταχύνει την αθηροσκλήρωση μέσω μεταβολιτών της εντερικής μικροχλωρίδας. Συνεπώς, περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη για να διερευνηθεί η επίδραση της χρόνιας συμπληρωματικής χορήγησης L-καρνιτίνης.^[232]

Χολίνη: αποτελεί βασικό θρεπτικό συστατικό που απαιτείται για τη σύνθεση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη, για το μεταβολισμό μεθυλο-ομάδων, για τη δομή της

κυτταρικής μεμβράνης, τη σηματοδότηση και τη μεταφορά λιπιδίων. Η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) συντίθεται σε όλα τα εμπύρρηνα κύτταρα θηλαστικών μέσω της οδού CDP-χολίνης που χρησιμοποιεί χολίνη ως αρχικό υπόστρωμα. Η οδός εξαρτάται κυρίως από τη διαιτητική πρόσληψη της χολίνης. Το ήπαρ διαθέτει και ένα δεύτερο μονοπάτι για σύνθεση PC μέσω της φωσφατιδυλαιθανολαμίνη-N-μεθυλοτρανσφεράσης (PEMT) που μετατρέπει τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (PE) σε το PC. Το PEMT είναι η μοναδική οδός για de novo βιοσύνθεση χολίνης σε θηλαστικά. Μελέτες έχουν δείξει ότι μια ανεπαρκής δίαιτα σε χολίνη μειώνει την επαναμεθυλίωση της μεθειονίνης, αυξάνει τα επίπεδα ομοκυστεΐνης, και προωθεί την ηπατική βλάβη που χαρακτηρίζεται από οξειδωτικό στρες και λιπώδες ήπαρ.^[233]

Σελήνιο: δρα ως συμπαραάγοντας στο αντιοξειδωτικό ένζυμο GPx, η δράση του οποίου εξαρτάται από τη διαθεσιμότητά του. Προσλαμβάνεται από τη διατροφή, από ζωικά και φυτικά τρόφιμα. Η συγκέντρωσή του σεληνίου στο έδαφος διαφέρει από περιοχή σε περιοχή περισσότερο από κάθε άλλο απαραίτητο ιχνοστοιχείο.^[234]

Για τα συστατικά *βιταμίνη E*, *ασκορβικό οξύ* και *συνένζυμο Q₁₀* γίνεται αναφορά στο κεφάλαιο 1.4.2

Πίνακας 3: Διατροφική ανάλυση

Συστατικά	Ανά 100 mL	ανά ημερήσια δόση (80mL)	% ΣΗΔ*
Θερμιδική αξία (kJ/kcal)	226/ 53	180,8/ 42,4	-
Πρωτεΐνη	< 0,1 g	< 0,1 g	-
Υδατάνθρακες	13,1 g	10,48 g	-
Λιπαρά	<0,1 g	<0,1 g	-
Φυλλικό οξύ	250 µg	200 µg	100%
Βιταμίνη E (α-TP)	15 mg	12 mg	100%
Βιταμίνη B1	1,38 mg	1,1 mg	100%
Βιταμίνη B12	3,13 µg	2,5 µg	100%
Σίδηρος	5,25 mg	4,2 mg	30%
Σελήνιο	34,37 µg	27,5 µg	50%

*Συνιστώμενη Ημερήσια Δόση: η μέση ημερήσια πρόσληψη για την κάλυψη των διατροφικών απαιτήσεων του 97-98% των υγίων ατόμων του πληθυσμού.

5.2.1 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του συμπληρώματος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu

Αντιδραστήρια

-Διάλυμα Folin-Ciocalteu

-Πρότυπο διάλυμα γαλλικού οξέος 1mg/mL: Ζυγίζονται 0,005g γαλλικό οξύ και προστίθενται σε 5,5mL αιθανόλη.

-Διάλυμα Na_2CO_3 35% w/v: Ζυγίζονται 35g Na_2CO_3 και διαλύονται σε 100mL νερό.

- Διαλύματα MM και P: Γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων με νερό.

Αρχή μεθόδου

Παρουσία του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu οι φαινόλες οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες και τα προαναφερθέντα οξέα ανάγονται μερικώς από την κατάσταση σθένους +6, σε ένα μίγμα ενώσεων με σθένη +6 και +5, που έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκου με μπλε χρώμα, το οποίο φωτομετρείται στα 725nm.

Αναλυτική πορεία

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθενται οι ποσότητες του Πίνακα 4:

Πίνακας 4: Πειραματική διαδικασία

	Τ	Σ1	Σ2	Σ3	Σ4	Σ5	Σ6	δείγματα
Γαλλικό οξύ	-	2 μL	5 μL	25 μL	30 μL	45 μL	60 μL	-
Δείγμα	-	-	-	-	-	-	-	1mL
Εξάτμιση αιθανόλης μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου								-
Νερό	3,5 mL	3,5 mL	3,5 mL	3,5 mL	3,5 mL	3,5 mL	3,5 mL	2,5mL
FC	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Παραμονή 3min								
Na_2CO_3	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL
Επώαση για 1 ώρα σε σκοτεινό μέρος								
Φωτομέτρηση στα 725nm								

Κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς απορρόφηση- μg γαλλικού οξέος. Στην εξίσωση της καμπύλης εισάγονται οι τιμές της απορρόφησης των δειγμάτων και βρίσκεται η ποσότητα φαινολικών στην αντίστοιχη ποσότητα αραιωμένου διαλύματος καθώς και στο αρχικό.

5.2.2 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του συμπληρώματος να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (DPPH)^[235]

Αντιδραστήρια

-Διάλυμα DPPH 0,4μg/μL: Σε κάθε πείραμα ζυγίζονται 0,8mg DPPH και αναδιαλύονται σε 2mL απόλυτης αιθανόλης.

- Διαλύματα MM και P: Γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων με νερό.

Αρχή μεθόδου

Το DPPH (1,1 διφαινυλο-2-πικρυλ-υδραζύλιο) είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα, η οποία έχει ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Λόγω του απεντοπισμού του ηλεκτρονίου αυτού στο μόριο, η ρίζα έχει χαρακτηριστικό μπλε-μωβ χρώμα σε διάλυμα αιθανόλης, που απορροφά περίπου στα 510nm. Όταν στο διάλυμα βρεθεί ένωση δότης ηλεκτρονίου, προκύπτει η ανηγμένη μορφή του DPPH η οποία δεν είναι ελεύθερη ρίζα, το μωβ χρώμα χάνεται και τη θέση του παίρνει το κίτρινο που οφείλεται στις πικρυλ-ομάδες του μορίου. Η μείωση της απορρόφησης στα 510nm είναι αντιστρόφως ανάλογη της ποσότητας των ελευθέρων ριζών DPPH στο διάλυμα.

Αναλυτική πορεία

Σε plate τοποθετούνται οι ποσότητες του Πίνακα 5:

Πίνακας 5: Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια	Τυφλό (δεν περιέχει την υπό μελέτη ουσία)	Δείγμα
Eth	145μL	145μL
H ₂ O	20μL	Τελικός όγκος 20μL ανάλογα με την ποσότητα σε κάθε assay
Δείγμα (MM ή P)	-	
DPPH	35μL	35μL
Επώαση στους 37°C		
Μέτρηση στα 492nm στους χρόνους 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60min		

Κάθε assay περιείχε 35μL διαλύματος DPPH με συγκέντρωση 0,4μg/μL δηλαδή 14μg DPPH.

Τα αποτελέσματα υπολογίζονται από τον παρακάτω τύπο:

$$\% \text{Αναστολή} = 100 * (\text{Ατυφλού} - \text{Αδείγματος}) / \text{Ατυφλού}$$

και εκφράζονται ως EC50, δηλαδή η ποσότητα που χρειάζεται για την αναγωγή του 50% του DPPH.

5.2.3 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του συμπληρώματος να αναστέλλουν την ενζυμική (λιποξυγονάσης-LOX) οξειδωση λιπαρών οξέων^[236]

Αντιδραστήρια

-Ρυθμιστικό Διάλυμα (buffer) Βορικών 0,2M pH 9: Σε ποτήρι ζέσεως των 500mL, ζυγίζονται 6.18g βορικού οξέος και προστίθεται νερό. Η ρύθμιση του pH στην τιμή 9 γίνεται με διάλυμα NaOH 50% w/v. Προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα ύδατος ώστε ο όγκος του διαλύματος να γίνει 500ml σε ογκομετρική φιάλη.

-Διάλυμα λιποξυγονάσης (LOX) 100units/μl stock: Το διάλυμα του ενζύμου που παρασκευάζεται για τα πειράματα περιέχει προσεγγιστικά 100 μονάδες ενζύμου/μL ρυθμιστικού διαλύματος. Σύμφωνα με τα παραπάνω και λαμβάνοντας υπόψη τον αριθμό των μονάδων ανά mg παρασκευάσματος (80000 μονάδες), ζυγίζονται 1mg παρασκευάσματος για κάθε 800μL ρυθμιστικού διαλύματος που προστίθενται.

-Διάλυμα εργασίας LOX: Για να υπάρχουν 60units ενζύμου/assay, σύμφωνα με το νόμο της αραιώσης προστίθενται 9,6μL stock ενζύμου και 70,4μL buffer.

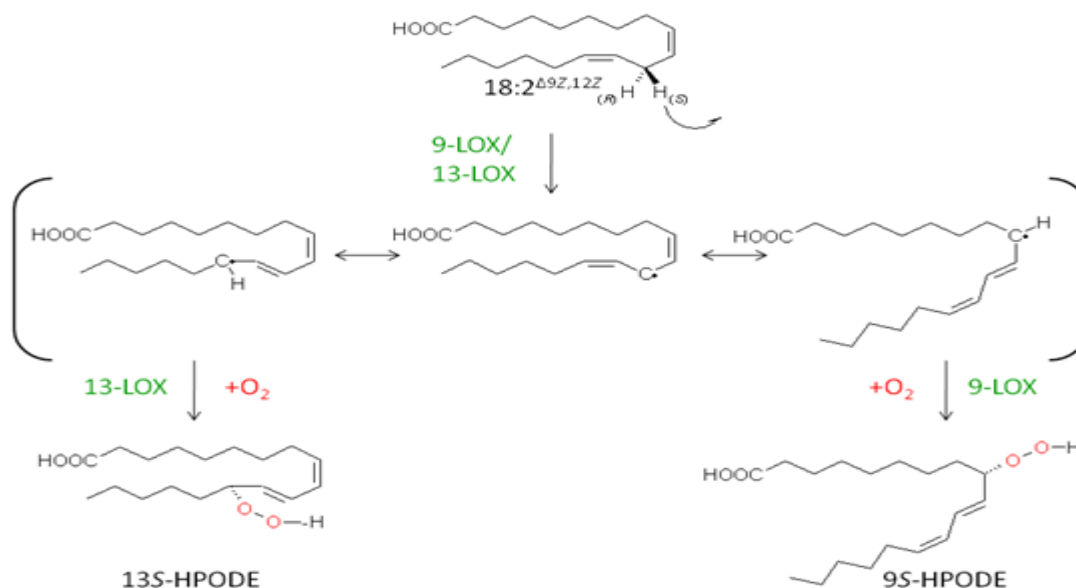
-Λινελαϊκό οξύ σε μορφή ελαίου σε αμπούλα: Με 5μL stock λινελαϊκού και προσθήκη 338,15μL DMSO προκύπτουν 46,875mM (η συγκέντρωση αυτή δίνει τελική τα 150μM).

-Διάλυμα εργασίας λινελαϊκού: 25μl από το παραπάνω διάλυμα και προσθήκη 1225μL buffer.

-Διαλύματα MM και P: Γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων με buffer.

Αρχή μεθόδου

Η επίδραση των διαλυμάτων MM και P στην καταλυτική δράση του ενζύμου λιποξυγονάση (LOX), προσδιορίζεται κινητικά με τη χρήση υπεριώδους φασματοφωτομετρίας. Η παραγωγή του προϊόντος της ενζυμικής οξειδωσης του λινελαϊκού οξέος, το υδροϋπεροξυλινελαϊκό οξύ, προκαλεί αύξηση της απορρόφησης. Ο προσδιορισμός γίνεται στα 234nm, σε σταθερό όγκο αντιδρώντος μίγματος 255μL.



Εικόνα 26: Η ενζυμική παραγωγή του υδροϋπεροξυλινελαϊκού οξέος.

Αναλυτική Πορεία

Για τελικό όγκο αντιδρώντος μίγματος 255 μ L σε πηγάδι στο Plate UV για κάθε assay τοποθετούνται οι ποσότητες του Πίνακα 6:

Πίνακας 6: Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια	LOX (δεν περιέχει την υπό μελέτη ουσία)	Δείγμα
Buffer βορικών	165 μ L	165 μ L
H ₂ O	40 μ L	Τελικός όγκος 40 μ L ανάλογα με την ποσότητα σε κάθε assay
Δείγμα (MM ή P)	-	
Διάλυμα εργασίας LOX	5 μ L	5 μ L
Επώαση για 5min		
Διάλυμα εργασίας λινελαϊκού	40 μ L	40 μ L
Καταγράφεται η αύξηση της απορρόφησης στα 234nm για 10 λεπτά.		

Η επίδραση του διαλύματος που δεν περιέχει την υπό μελέτη ουσία μελετάται για να προσδιοριστεί η δράση της υπό μελέτη ουσίας. Προσδιορίζεται η ταχύτητα σχηματισμού του προϊόντος 50-100sec μετά την έναρξη της αντίδρασης από την κλίση της καμπύλης της

κινητικής. Στη συνέχεια υπολογίζεται η %αναστολή του ενζύμου από την υπό μελέτη ουσία σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{Αναστολή} = (\text{κλίση LOX} - \text{κλίση Δείγματος}) / \text{κλίση LOX} * 100.$$

5.2.4 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του συμπληρώματος να αναστέλλουν την οξειδωση ορού^[237]

Αντιδραστήρια

-Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) pH=7,4, 146mM σε NaCl: Σε 240mL H₂O που βρίσκονται υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα προστίθενται προς διαλυτοποίηση 0,2269 g Na₂HPO₄·2H₂O, 0,0602g NaH₂PO₄·2H₂O και 2,1332g NaCl. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και προστίθεται H₂O έως τελικό όγκο 250mL.

-Υδατικό διάλυμα CuSO₄·5H₂O συγκέντρωσης 20mM stock

-Διάλυμα working CuSO₄: Αραίωση 1:1000 του stock, 15mL και 14985mL PBS.

-Ορός: Αραίωση 1:12, 40μL ορού και 440μL PBS.

-Διαλύματα MM και P: Γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων με PBS.

Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση της *in vitro* οξειδωσης του πλάσματος από ιόντα Cu²⁺, βασίζεται στη συνεχή καταγραφή της απορρόφησης στα 245nm. Η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος οφείλεται κυρίως στα συζυγή διένια των υδροϋπεροξειδίων και κατά μικρότερο βαθμό σε άλλες ενώσεις όπως συζυγή διένια υδροξειδίων, που παράγονται κατά την οξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) που απαντούν στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, όταν προστίθενται ιόντα Cu²⁺. Καταγράφοντας την απορρόφηση στα 245nm παρέχεται η δυνατότητα να παρακολουθείται η κινητική της οξειδωσης που λαμβάνει χώρα στο πλάσμα. Η κινητική αυτή είναι περίπλοκη καθώς οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος περιέχουν πληθώρα αντιοξειδωτικών τα οποία οξειδώνονται πρώτα εκδηλώνοντας την αντιοξειδωτική τους δράση. Στο διάστημα της οξειδωσης των αντιοξειδωτικών η απορρόφηση στα 245 αυξάνεται ελάχιστα. Ο χρόνος που απαιτείται για να οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά καλείται χρόνος λανθάνουσας φάσης και αποτελεί μέτρο της αντίστασης του πλάσματος στην οξειδωση. Μόνο όταν οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά αρχίζουν να παράγονται τα συζυγή διένια και να αυξάνεται η απορρόφηση στα 245nm. Η καταγραφή της απορρόφησης παρέχει μια σιγμοειδή καμπύλη, η οποία έχει τα εξής χαρακτηριστικά: 1) χρόνος της λανθάνουσας φάσης (lag-time), 2) η μέγιστη ταχύτητα (V_{max}) της συσσώρευσης των προϊόντων που απορροφούν στα 245 nm που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης/min, 3) ο χρόνος (t_{max}) κατά τον οποίο παρατηρείται η V_{max} και 4) η μέγιστη συσσώρευση προϊόντων που απορροφούν που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης.

Αναλυτική πορεία

Για τελικό όγκο αντιδρώντος μίγματος 250μL σε πηγάδι στο Plate UV για κάθε assay τοποθετούνται οι ποσότητες του Πίνακα 7:

Πίνακας 7: Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια	Control (δεν περιέχει την υπό μελέτη ουσία)	Δείγμα
Προεπώαση του ELIZA READER στους 37 °C		
Ορός	20μL	20μL
PBS	30μL	Τελικός όγκος 30μL ανάλογα με την ποσότητα σε κάθε assay
Δείγμα (MM ή P)	-	
Διάλυμα εργασίας CuSO ₄	200μL	200μL
Η αντίδραση γίνεται στους 37 °C στα 245nm για 7 ώρες		

5.2.5 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του συμπληρώματος να αναστέλλουν τη μη ενζυμική οξείδωση λιπαρών οξέων^[238]

Αντιδραστήρια

-Tris HCl 100mM: Ζυγίζονται 1,2114g Tris (τρι-υδροξυλαμινομεθάνιο) και αναδιαλύονται σε νερό. Ρυθμίζεται το pH στα 7,5 με διάλυμα HCl και συμπληρώνεται ο όγκος σε ογκομετρική φιάλη μέχρι τα 10 mL.

-Διάλυμα Λινελαϊκού οξέος 20mM: Ζυγίζονται 0,0284g λινελαϊκού οξέος σε 5mL Tris HCl. Στους 25°C (με $\rho=0,902\text{g/ml}$ MB=280.45) τα 0,0284 g είναι 31,5μL λινελαϊκού στα 5 mL.

-Διάλυμα FeSO₄·7H₂O 40mM σε H₂O: Ζυγίζονται 0,056g FeSO₄·7H₂O και αναδιαλύονται σε 5mL νερό.

-Διάλυμα ασκορβικού οξέος 20mM. Ζυγίζονται 3,5mg ασκορβικού οξέος και αναδιαλύονται σε 1mL H₂O. Το διάλυμα συντηρείται στους 4°C.

-Διάλυμα NaOH 50mM: Σε 10 mL ζυγίζονται 0,02g NaOH

-Διάλυμα TBA (2-θειοβαρβιτουρικό) 1%w/v: Ζυγίζονται 0,05g TBA και αναδιαλύονται σε 5mL NaOH 50mM. Το διάλυμα αυτό φτιάχνεται τη μέρα του πειράματος.

-TCA (τριχλωροοξικό οξύ) 40% w/v: Ζυγίζονται 40g TCA σε 100 mL νερό.

-Διαλύματα MM και P: Γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις των δειγμάτων με νερό ή αιθανόλη.

-Διάλυμα ρεσβερατρόλης 40mM: Αραίωση 1/1 με νερό ή αιθανόλη.

Αρχή μεθόδου

Το λινελαϊκό οξύ παρουσία του ασκορβικού οξέος και των ιόντων σιδήρου (Fe^{2+}) οξειδώνεται σε μηλονιλοδιαδεϋδη (MDA). Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη τριχλωροοξικού οξέος (TCA). Η προσθήκη στη συνέχεια του θειοβαρβιτουρικού οξέος οδηγεί στη δημιουργία ροζ-κόκκινου συμπλόκου MDA-TBA το οποίο φωτομετρείται στα 532nm. Παρουσία αντιοξειδωτικών ενώσεων, η ποσότητα του λινελαϊκού που οξειδώνεται είναι μικρότερη άρα και οι ποσότητες MDA και του συμπλόκου MDA-TBA που σχηματίζονται.

Αναλυτική πορεία

Παράλληλα με το δείγμα που εξετάζεται μετρώνται και τα εξής διαλύματα:

α) Τυφλό: περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός των εκχυλισμάτων και το σίδηρο

β) Control: περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός των εκχυλισμάτων

Πίνακας 8: Πειραματική διαδικασία

Αντιδραστήρια	Τυφλό	Control	Δείγμα	Ρεσβερατρόλη
Tris	80μL	80 μL	80 μL	80 μL
Λινελαϊκό	500 μL	500 μL	500 μL	500 μL
Δείγμα (MM ή P)	-	-	Τελικός όγκος 50 μL ανάλογα το assay	-
H ₂ O	60 μL	60 μL		Τελικός όγκος 50 μL ανάλογα το assay
Eth	ανάλογα το assay	ανάλογα το assay		
Ρεσβερατρόλη	-	-		
Ασκορβικό οξύ	10 μL	10 μL	10 μL	10 μL
FeSO ₄	-	10 μL	10 μL	10 μL
Τοποθέτηση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 10min				
TCA	103,5 μL	103,5 μL	103,5 μL	103,5 μL
Παραλαβή 500 μL από κάθε errendorf και τοποθέτηση σε καινούργια				
TBA	200 μL	200 μL	200 μL	200 μL
Τοποθέτηση σε υδατόλουτρο στους 95°C για 10min				
Ψύξη στο σκοτάδι για 5min				
Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 3500 g για 10min				
Τοποθέτηση 200 μL κάθε δείγματος στο plate και φωτομέτρηση στα 532nm				

Τα αποτελέσματα εκφράζονται στο ποσοστό της αναστολής σχηματισμού του συμπλόκου MDA-TBA σύμφωνα με τον τύπο:

$$\% \text{Αναστολή} = 100 * (\text{Αδείγματος} - \text{Ατυφλού}) / (\text{Αcontrol} - \text{Ατυφλού})$$

5.2.6 Προσδιορισμός ολικής δραστηριότητας της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) σε λευκοκύτταρα^[92]

Αντιδραστήρια

-PBS

-Cocktail: Σε 141mL PBS, προστίθενται 7,5 ml stock ξανθίνης 1mM και 1,5 ml διαλύματος κυτοχρώματος c 1mM. Η συγκέντρωση του κυτοχρώματος c ελέγχεται με τοποθέτηση δείγματος σε κυψελίδα και μέτρηση της απορρόφησης στα 550nm. Στη συνέχεια προστίθενται μερικοί κρύσταλλοι στερεού διθειονώδους νατρίου (που αποτελεί ισχυρό αναγωγικό μέσο), γίνεται ανάδευση και πραγματοποιείται εκ νέου μέτρηση της απορρόφησης, που θα πρέπει να αυξηθεί κατά 0,20 ακριβώς. Εάν δεν γίνει και ανάλογα τη μεταβολή, προστίθεται στο διάλυμα είτε ποσότητα κυτοχρώματος c ή PBS μέχρι να επιτευχθεί η αύξηση κατά 0,20. Η αποθήκευση γίνεται στους 4°C.

-Διάλυμα οξειδάσης της ξανθίνης εργασίας: Αραίωση 1:10 του stock διαλύματος οξειδάσης της ξανθίνης 0,3IU/mL με νερό. Η αποθήκευση γίνεται στους -20°C.

-Πρότυπο διάλυμα SOD: Αραίωση 1/100 του stock διαλύματος SOD 15IU/μL με νερό. Η αποθήκευση γίνεται στους -20°C.

-Δείγματα λευκοκυττάρων. Αποθήκευση στους -80°C.

Αρχή μεθόδου

Η οξειδάση της ξανθίνης καταλύει την αντίδραση μεταξύ ξανθίνης και O_2 , παράγοντας $\cdot O_2^-$. Το $\cdot O_2^-$ ανάγει στη συνέχεια το φερρουκυτόχρωμα c σε φερροκυτόχρωμα c προκαλώντας μία αύξηση στην απορρόφηση στα 550nm. Η SOD στο δείγμα των λευκοκυττάρων εμποδίζει την αναγωγή του φερρουκυτοχρώματος c, καθώς μετατρέπει το $\cdot O_2^-$ σε H_2O_2 , με αποτέλεσμα τη μείωση της απορρόφησης στα 550nm.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά πραγματοποιείται μία δοκιμή χωρίς δείγμα λευκοκυττάρων για να προσδιοριστεί η ποσότητα της οξειδάσης της ξανθίνης που θα πρέπει να προστίθεται σε κάθε assay ώστε να ισχύει: $0,014 \leq \text{κλίση}_{\text{control}} \leq 0,016$. Ο όγκος σε κάθε assay ρυθμίζεται με PBS στα 250μL.

Πίνακας 9: Δοκιμασία για το Control

Αντιδραστήρια	Πηγάδι 1	Πηγάδι 2	Πηγάδι 3
Cocktail	200μL	200μL	200μL
PBS	47μL	46.5μL	46μL
ΧΟ	3μL	3.5μL	4μL

Επειδή η οξειδάση της ξανθίνης είναι πολύ δραστική, η μέτρηση πρέπει να ξεκινήσει όσο πιο γρήγορα γίνεται μετά την προσθήκη της. Γι' αυτό και κάθε φορά μετρώνται από τρία δείγματα. Εάν οι προκύπτουσες κλίσεις_{control} από τις παραπάνω ποσότητες είναι <0,014 ή >0,016 επαναλαμβάνεται η δοκιμασία με περισσότερη ή μικρότερη αντίστοιχα, ποσότητα οξειδάσης της ξανθίνης.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται η δοκιμασία για τα δείγματα λευκοκυττάρων σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 10: Δοκιμασία για τα δείγματα λευκοκυττάρων

Cocktail	PBS	Δείγμα λευκοκυττάρων	ΧΟ
200μL	Συμπληρώνεται η κατάλληλη ποσότητα ώστε Vτελ=250μL	Ποσότητα που αντιστοιχεί σε ≈30μg πρωτεΐνης*	Ποσότητα που καθορίστηκε από τη δοκιμασία για το control

*Ο προσδιορισμός πρωτεΐνης κάθε δείγματος έχει προηγηθεί σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (αναφορά της μεθόδου γίνεται στο κεφάλαιο 5.2.6.1.).

Μετρείται η κλίση κάθε δείγματος και η %αναστολή που προκαλείται από την SOD δίνεται από τον τύπο:

$$\% \text{Αναστολή} = 100 * (\text{κλίση}_{\text{control}} - \text{κλίση}_{\text{δείγματος}}) / \text{κλίση}_{\text{control}}$$

Για να προσδιοριστούν τα units της SOD που προκαλούν την εκάστοτε αναστολή, κατασκευάζεται μία πρότυπη καμπύλη. Πραγματοποιείται αραιώση 1/500 του πρότυπου διαλύματος SOD 0,15IU/μL και προστίθενται οι παρακάτω ποσότητες για την κατασκευή της καμπύλης.

Πίνακας 11: Κατασκευή πρότυπης καμπύλης SOD

Cocktail		SOD		PBS	XO
Σ1	200μL	2,5μL	0,075units	Συμπληρώνεται η κατάλληλη ποσότητα ώστε Vτελ=250μL	Ποσότητα που καθορίστηκε από τη δοκιμασία για το control
Σ2		5μL	0,15units		
Σ3		10μL	0,3units		
Σ4		20μL	0,6units		
Σ5		33,3μL	1units		
Σ6		40μL	1,2units		
Σ7		43,3μL	1,3units		

Η κινητική πραγματοποιείται στα 550nm.

Κατασκευάζεται η καμπύλη %Αναστολή-units SOD από τα σημεία που παρουσιάζουν γραμμικότητα. Με τη βοήθεια της εξίσωσης προσδιορίζεται η ποσότητα των units SOD/mg πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.

5.2.6.1 Μέθοδος Bradford

Αντιδραστήρια

-Διάλυμα BSA εργασίας (0,025μg/μL): Πραγματοποιείται αραιώση 1/4 από το πρότυπο διάλυμα BSA(100μg/mg) με νερό. Η αποθήκευση γίνεται στους -20°C.

-Διάλυμα Bradford stock: Σε 50mL μεθανόλης διαλύονται 100mg Coomassie Brilliant Blue G 250. Το διάλυμα αυτό προστίθεται σε 100mL διαλύματος 85% H₃PO₄ και αραιώνεται μέχρι τελικό όγκο 200mL με νερό. Το τελικό διάλυμα έχει βαθύ κόκκινο χρώμα και τελικές συγκεντρώσεις 0,5mg/mL Coomassie Brilliant Blue G, 25% μεθανόλη και 42,5% H₃PO₄. Η αποθήκευση γίνεται σε σκουρόχρωμη φιάλη στους 4°C.

- Διάλυμα Bradford εργασίας: Γίνεται αραιώση 1/5 από το stock διάλυμα Bradford με νερό.

-Δείγματα λευκοκυττάρων: Πραγματοποιείται αραιώση 1/40 στα δείγματα λευκοκυττάρων με νερό.

Αρχή μεθόδου

Η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G 250 μπορεί να υπάρχει σε τρεις μορφές (κατιονική, ουδέτερη, ανιονική). Οι μορφές αυτές έχουν διαφορετικό χρώμα και απορροφούν σε διαφορετικό μήκος κύματος (κόκκινο χρώμα-470nm, πράσινο χρώμα-650nm, μπλε χρώμα-595nm αντίστοιχα). Η απορρόφηση αυξάνεται όταν η χρωστική συνδεθεί με πρωτεΐνη σε όξινο περιβάλλον. Λαμβάνει δύο πρωτόνια και μετατρέπεται από κόκκινη σε μπλε.

Αναλυτική πορεία

Πίνακας 12: Δοκιμασία Bradford

Πρότυπο δ/μα BSA εργασίας			H ₂ O	Αραιωμένο δείγμα λευκοκυττάρων	Διάλυμα Bradford εργασίας
T	-		200μL	-	50μL
Σ1	5μL	0,125units	195μL	-	
Σ2	10μL	0,25units	190μL	-	
Σ3	20μL	0,5units	180μL	-	
Σ4	40μL	1units	160μL	-	
Σ5	60μL	1,5units	140μL	-	
Σ6	80μL	2units	120μL	-	
Σ7	120μL	3units	80μL	-	
Δείγμα	-		190μL	10μL	

Το plate αφού συμπληρωθεί αφήνεται για επώαση 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η φωτομέτρηση γίνεται στα 595nm.

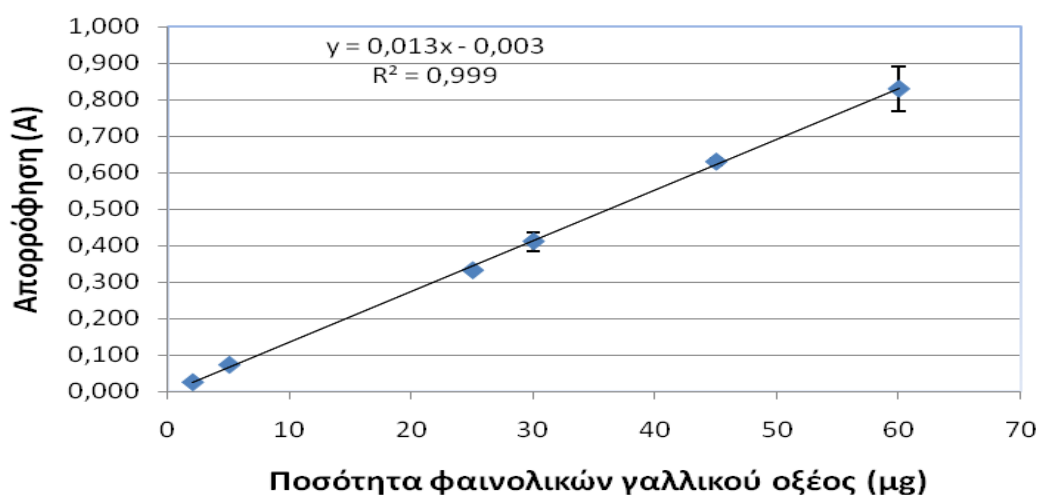
Κατασκευάζεται η καμπύλη $A_{bsa}/Units_{bsa}$ και μέσω της εξίσωσης προσδιορίζεται στο αρχικό δείγμα λευκοκυττάρων η συγκέντρωση $\mu g/\mu L$ πρωτεΐνης

Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα

6.1 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του συμπληρώματος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu

Από τις απορροφήσεις του πρότυπου διαλύματος γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε η παρακάτω πρότυπη καμπύλη (απορρόφηση-μg φαινολικών), η εξίσωση της οποίας φαίνεται στο Διάγραμμα 1.

Διάγραμμα 1: Απορρόφηση-μg φαινολικών γαλλικού οξέος



Για το πείραμα επιλέχθηκαν τυχαία κάποια από τα διαλύματα που καταναλώθηκαν από τους εθελοντές (το MM αναφέρεται στο συμπλήρωμα Mind Master, το P στο Placebo και ο αριθμός αντιστοιχεί στον εθελοντή). Εξετάστηκαν 5 τυχαία διαλύματα P και 5 MM.

Προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των φαινολικών συστατικών των άγνωστων διαλυμάτων με την εξίσωση και ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Προσδιορισμός ποσότητας φαινολικών συστατικών.

	Συμπλήρωμα	Placebo	p*
Φαινολικά συστατικά (μg/μL)	3,11 ± 0,1	0,28 ± 0,01	<0,00
*Independent t-test			

6.2 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του συμπληρώματος να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (DPPH)

Για το πείραμα επιλέχθηκαν τυχαία κάποια από τα διαλύματα που καταναλώθηκαν από τους εθελοντές. Το Placebo δεν προκάλεσε την αναγωγή των ελευθέρων ριζών, γι' αυτό και δεν αναφέρεται στον πίνακα των αποτελεσμάτων. Χρησιμοποιήθηκαν 5 τυχαία διαλύματα MM.

Για την κατασκευή της καμπύλης προστέθηκαν οι παρακάτω ποσότητες του Πίνακα 14 (1η στήλη) από κάθε υπό μελέτη διάλυμα, που αντιστοιχούν στα μg φαινολικών της 2ης στήλης με αραιώση 1/20 (σύμφωνα με το πρώτο πείραμα το συμπλήρωμα περιέχει $\approx 3\mu\text{g}$ φαινολικών/ μL) :

Πίνακας 14: Ποσότητες συμπληρώματος

μL δ/τος	μg φαινολικών
20	3
15	2,25
12	1,8
10	1,5
5	0,75
2	0,3

Από τις απορροφήσεις των δειγμάτων και των τυφλών διαλυμάτων υπολογίστηκε η %δέσμευση των ελευθέρων ριζών από το συμπλήρωμα. Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν οι καμπύλες %δέσμευση- μg φαινολικών (για κάθε διάλυμα και κάθε χρονική στιγμή) (Πίνακας 15), από τις εξισώσεις των οποίων βρέθηκε η ποσότητα των φαινολικών συστατικών που προκάλεσε την δέσμευση του 50% των ελευθέρων ριζών που υπήρχαν τη χρονική στιγμή της μέτρησης (EC_{50}). Ο μέσος όρος των EC_{50} φαίνεται στον Πίνακα 16.

Πίνακας 15: %Δέσμευση ριζών DPPH για κάθε ποσότητα φαινολικών, όγκο αρχικού διαλύματος και χρονική στιγμή

Χρόνος (min)	Ποσότητα φαινολικών MM (μg)- Όγκος αρχικού MM (μL)					
	3-1,22	2,25-0,50	1,8-0,41	1,5-0,35	0,75-0,33	0,3-0,12
0	46,05 $\pm$ 5,85	39,36 $\pm$ 5,47	35,16 $\pm$ 4,95	34,05 $\pm$ 4,92	24,83 $\pm$ 2,82	15,83 $\pm$ 13,99
15	71,77 $\pm$ 2,65	64,06 $\pm$ 6,29	57,19 $\pm$ 4,78	55,08 $\pm$ 5,19	36,97 $\pm$ 3,49	22,44 $\pm$ 13,26
30	77,37 $\pm$ 1,98	70,97 $\pm$ 5,69	63,90 $\pm$ 4,70	61,56 $\pm$ 5,25	40,70 $\pm$ 4,10	24,18 $\pm$ 13,09
45	80,15 $\pm$ 1,44	75,68 $\pm$ 4,29	68,72 $\pm$ 4,18	65,85 $\pm$ 5,37	42,63 $\pm$ 4,67	25,86 $\pm$ 13,45
60	80,58 $\pm$ 1,28	78,14 $\pm$ 2,61	71,74 $\pm$ 3,99	68,32 $\pm$ 4,78	44,48 $\pm$ 4,91	26,30 $\pm$ 13,13

Πίνακας 16: Υπολογισμός EC50 για εκκαθάριση ελεύθερων ριζών DPPH

Χρόνος μέτρησης (min)	Ποσότητα φαινολικών συμπληρώματος (μg)	Αρχικός όγκος συμπληρώματος (μL)
0	3,65 ± 1,23	1,22
15	1,49 ± 0,23	0,50
30	1,22 ± 0,31	0,41
45	1,05 ± 0,37	0,35
60	0,98 ± 0,34	0,33

Για να διαπιστωθεί εάν οι διαφορετικές ποσότητες συμπληρώματος επιδρούν σημαντικά στην τιμή της δέσμευσης των ελευθέρων ριζών, πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις για μία τυχαία χρονική στιγμή, τα 30'. Στον Πίνακα 17 φαίνονται οι τιμές δέσμευσης που συγκρίθηκαν ανά δύο και οι ποσότητες των φαινολικών που αντιστοιχούν σε αυτές.

Πίνακας 17: Ποσότητα φαινολικών και αντίστοιχη %δέσμευση ελευθέρων ριζών στα 30'

Ποσότητα φαινολικών MM (μg)	3	2,25	1,8	1,5	0,75	0,3
%Δέσμευση ριζών DPPH στα 30'	77,37 ± 1,98	70,97 ± 5,69	63,90 ± 4,70	61,56 ± 5,25	40,70 ± 4,10	24,18 ± 13,09

Πίνακας 18: Ποσότητες φαινολικών με τιμές %δέσμευσης που διαφέρουν σημαντικά ($p < 0,05$)

Ζεύγη συγκρινόμενων ποσοτήτων φαινολικών (μg)		p
3	1,8	<0,00
3	1,5	<0,00
3	0,75	<0,00
3	0,3	<0,00
2,25	1,5	0,03
2,25	0,75	<0,00
2,25	0,3	<0,00
1,8	0,75	<0,00
1,8	0,3	<0,00
1,5	0,75	<0,00
1,5	0,3	<0,00
0,75	0,3	<0,00

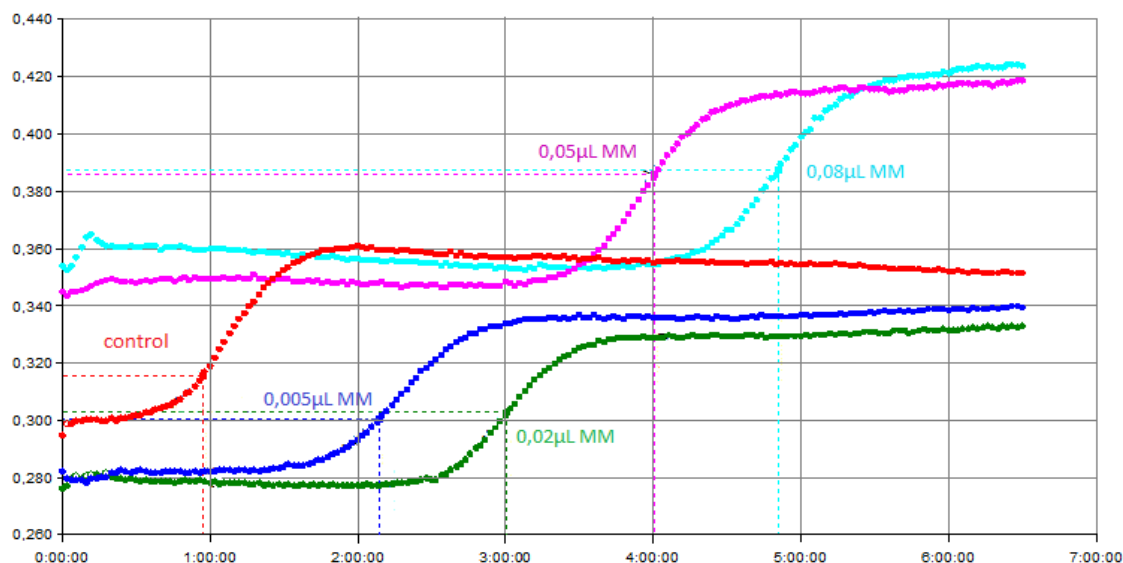
6.3 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του συμπληρώματος να αναστέλλουν την ενζυμική (λιποξυγονάσης-LOX) οξείδωση λιπαρών οξέων

Καμία από τις ποσότητες του placebo δεν κατάφερε να αναστείλλει τη δράση της LOX. Από τις ποσότητες του συμπληρώματος που εξετάστηκαν (0,05 έως 4μL), τα 3,5-4μL παρουσίασαν αναστολή της τάξης του 14% στην παραγωγή των υδροϋπεροξειδίων, ωστόσο λόγω της ετερογένειας των τιμών, τα αποτελέσματα δεν θεωρούνται σημαντικά.

6.4 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του συμπληρώματος να αναστέλλουν την οξείδωση ορού

Κάθε πηγάδι μετρείται συνεχώς για 6,5 ώρες ώστε να προσδιοριστεί ο ακριβής χρόνος στον οποίο θα αυξηθεί η απορρόφηση (lag-time). Τα lag-time δηλώνουν το χρόνο κατά τον οποίο έχουν οξειδωθεί όλα τα αντιοξειδωτικά από τα ιόντα Cu^{+2} και ξεκινά η οξείδωση του ορού (χρόνος υστέρησης). Στο Διάγραμμα 2 φαίνονται τα lag-time ενδεικτικών ποσοτήτων συμπληρώματος.

Διάγραμμα 2: Απορρόφηση (A)- Χρόνος (ώρες)



Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες ποσότητες συμπληρώματος και placebo για να διαπιστωθεί αν παρουσιάζεται διαφορά στα lag-time τους (Πίνακας 19).

Πίνακας 19: Lag-time για ίδιες ποσότητες συμπληρώματος και placebo

Ποσότητα διαλύματος (μL)	lag-time Συμπλήρωμα (min)	lag-time Placebo (min)	p_1^*	p_2^*	$p_3^\#$
control	40,7±5				
0,005	80 ± 25,1	53 ± 14,2	0,3	1	0,009
0,01	96,3 ± 17,7	47,8 ± 7,9	0,01	1	<0,00
0,02	107 ± 46,6	55,8 ± 21,7	0,001	0,4	0,006
0,05	170,9 ± 31,1	67,8 ± 14,6	<0,00	0,001	<0,00
0,08	237,9 ± 48,2	70,8 ± 111,2	<0,00	0,002	<0,00
0,1	268,4 ± 43,6	72,9 ± 13,7	<0,00	<0,00	<0,00
* One way ANOVA , Post hoc Bonferroni, p_1 μεταξύ συμπληρώματος και control, p_2 μεταξύ placebo και control $^\#$ Independent t-test, p_3 μεταξύ συμπληρώματος και placebo					

6.5 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του συμπληρώματος να αναστέλλουν την μη ενζυμική οξείδωση (από Fe) λιπαρών οξέων

Σε αυτή την αντιοξειδωτική δοκιμασία παρατηρήθηκαν προβλήματα διαλυτότητας του συμπληρώματος και του placebo (ίζημα), που εμπόδιζε την παραλαβή του υπερκείμενου διαλύματος και τη μέτρηση της απορρόφησης. Το φαινόμενο δεν παρατηρήθηκε ωστόσο στα errendorf του τυφλού, του control και της ρεσβερατρόλης. Μόνο στις μικρές ποσότητες συμπληρώματος τα 0,4 και 0,5μL δεν παρουσίασαν πρόβλημα και προκάλεσαν μια μικρή αναστολή της τάξης του 15%. Αντίθετα, η ρεσβερατρόλη την οποία χρησιμοποιήσαμε ως θετικό δείγμα, βάση προηγούμενων μελετών μας, προκάλεσε την αναστολή της υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος (Πίνακας 20).

Πίνακας 20: %Αναστολή της υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος που προκλήθηκε από τη ρεσβερατρόλη

Όγκος ρεσβερατρόλης 20mM (μL)	Συγκέντρωση ρεσβερατρόλης στο assay (mM)	%Αναστολή
10	0,209	56,84 ± 3,9
14	0,293	61,36 ± 3,6

6.6 Κλινική παρέμβαση σε υγιείς εθελοντές

6.6.1 Χαρακτηριστικά των εθελοντών στην αρχή της παρέμβασης (εβδομάδα 0)

Στρατολογήθηκαν συνολικά 62 εθελοντές, 58 από τους οποίους ολοκλήρωσαν την μελέτη, 28 στην ομάδα του placebo και 30 στην ομάδα του συμπληρώματος. Τα χαρακτηριστικά των εθελοντών παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 21: Χαρακτηριστικά των εθελοντών

	Συμπλήρωμα		Placebo	
Αριθμός ατόμων	30		28	
Φύλο	♂ 73,3%	♀ 26,7%	♂ 64,3%	♀ 35,7%
Ηλικία (έτη)	34,9 ± 5,8		32,9 ± 5,6	
BMI (kg/m ²)	27,0 ± 2,0		26,6 ± 2,9	
Κάπνισμα	46,7% ναι	53,3% όχι	25% ναι	75% όχι

Σύμφωνα με την στατιστική επεξεργασία δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ως προς τα χαρακτηριστικά μεταξύ των 2 ομάδων. Ο πληθυσμός που συμμετείχε στην παρέμβαση είχε αυξημένο BMI (≈26,8) και έτσι χαρακτηρίζεται ως υπέρβαρος.

Πίνακας 22: Γενική αίματος των εθελοντών πριν την παρέμβαση (εβδομάδα 0)

	Συμπλήρωμα	Placebo	p*
Λευκά αιμοσφαίρια (Κ/μL)	6,24 ± 1,35	5,75 ± 1,44	0,20
Λεμφοκύτταρα (Κ/μL)	2,1 ± 0,64	1,84 ± 0,37	0,07
Κοκκιοκύτταρα (Κ/μL)	3,71 ± 1	3,51 ± 1,23	0,51
Αιμοσφαιρίνη (g/dL)	15,14 ± 1,34	14,63 ± 2,72	0,38
Ερυθρά αιμοσφαίρια (Μ/μL)	4,54 ± 1,3	4,42 ± 1,37	0,74
Αιματοκρίτης (%)	40,34 ± 4,02	40,93 ± 4,17	0,59
Μέσος όγκος ερυθρών (fl)	81,88 ± 9,67	86,33 ± 5,09	0,04
Αιμοπετάλια (Κ/μL)	240,64 ± 32,42	224,04 ± 59,13	0,20
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων (fl)	7,89 ± 0,5	7,74 ± 0,63	0,41
*Independent t-test			

Πίνακας 23: Βιοχημικά χαρακτηριστικά εθελοντών πριν την παρέμβαση (εβδομάδα 0)

	Συμπλήρωμα	Placebo	p*
Συστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	122,7 ± 10,45	126,9 ± 10,2	0,08
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	74,4 ± 8,53	78,5 ± 8,84	0,1
Παλμοί	75,4 ± 11,9	75,4 ± 12,9	0,9
Γλυκόζη (mg/dL)	101,1 ± 12,7	95,6 ± 9,9	0,08
Χοληστερόλη (mg/dL)	200,9 ± 42,3	187,6 ± 42,9	0,2
HDL-χοληστερόλη (mg/dL)	46,1 ± 15,7	49,3 ± 14,1	0,4

LDL-χοληστερόλη (mg/dL)	138,2 ± 43,6	123,8 ± 43,5	0,2
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	92,0 ± 64,7	72,9 ± 38,6	0,2
Ουρικό οξύ (mg/dL)	4,56 ± 1,12	4,70 ± 1,21	0,6
*Independent t-test			

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των βιοχημικών χαρακτηριστικών των δύο ομάδων συνεπώς όταν ξεκίνησε η παρέμβαση οι εθελοντές των δύο ομάδων είχαν ίδια βιοχημικά χαρακτηριστικά.

Πίνακας 24: Δείκτες οξειδωτικού στρες των εθελοντών πριν την παρέμβαση (εβδομάδα 0)

	Συμπλήρωμα	Placebo	p
Οξειδωμένη LDL (μg/mL)	1,54 (1,01-2,31)	1,23 (0,681-2,35)	0,1*
Ισοπροσάνια (ng/mmol)	1922,4 (894,3-10138,5)	1502,6 (951,6-5222,4)	0,4*
TBARS (μM)	5,05 ± 1,59	5,21 ± 1,22	0,6 [#]
8-υδροξυ-2-δεοξυγουανωσίνη (μg/mmol)	263,2 ± 133,28	259,1 ± 172,5	0,9 [#]
Δραστικότητα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης ορού (U/mL)	0,0911 (0,0774-0,0911)	0,0826 (0,0734-0,0964)	0,4*
ex vivo αντίσταση του ορού στην οξείδωση-lagtime (min)	53 ± 12,6	56 ± 20,4	0,5 [#]
Δραστικότητα υπεροξειδικής δισμουτάσης λευκοκυττάρων (U/mg)	18,2 (11,3-25,6)	16,8 (9,6-27,2)	0,6*
* Independent-Mann-Whitney U (2 samples), [#] Independent t-test			

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δεικτών οξειδωτικού στρες των δύο ομάδων στην αρχή της παρέμβασης.

Συγκεκριμένα, η SOD που μετρήθηκε στο πλαίσιο της παρούσης πτυχιακής μελέτης μετρήθηκε σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων και οι τιμές κανονικοποιήθηκαν με τη ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης. Οι τιμές εκφράζονται ως units/mg πρωτεΐνης. Τέλος,

δεν παρουσίασε κανονική κατανομή για αυτό και παρουσιάζεται ως μέσος και οι διακυμάνσεις με τα τεταρτημόρια 25-75.

6.6.2 Συσχετίσεις δεικτών με στατιστική σημαντικότητα

Για την διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ των δεικτών πραγματοποιήθηκε έλεγχος συσχέτισης κατά Spearman, στον χρόνο 0 στο σύνολο του πληθυσμού, για όλους τους δείκτες. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας της SOD και του lag-time της *ex vivo* αντίστασης του ορού στην οξείδωση (τα αποτελέσματα του πειράματος δεν αναφέρονται στην παρούσα μελέτη) με συντελεστή συσχέτισης +0,28 και $p=0,04$.

6.6.3 Δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης κατά τη διάρκεια της παρέμβασης

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι τιμές της δραστηριότητας της SOD κατά τη διάρκεια της παρέμβασης 0, 4 και 8 εβδομάδες τόσο στην ομάδα του συμπληρώματος όσο και στην ομάδα του Placebo.

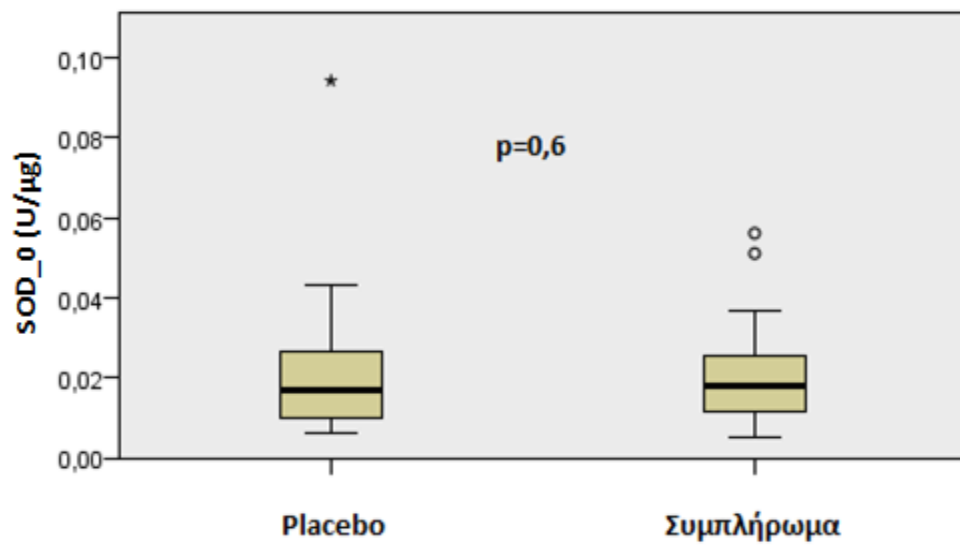
Πίνακας 25: Δραστηριότητα της SOD στις 0, 4 και 8 εβδομάδες

(units/mg pr)	SOD_0	SOD_1	SOD_2	$p_{\text{Friedman's}}$
Συμπλήρωμα	18,2 (11,3-25,6)	11,8 (9,3-16,0)	15,0 (10,4-18,4)	<0,00
Placebo	16,8 (9,6-27,2)	17,8 (10,1-25,0)	14,5 (10,2-25,8)	0,9
$p_{\text{Mann-Whitney}}$	0,6	0,03	0,4	

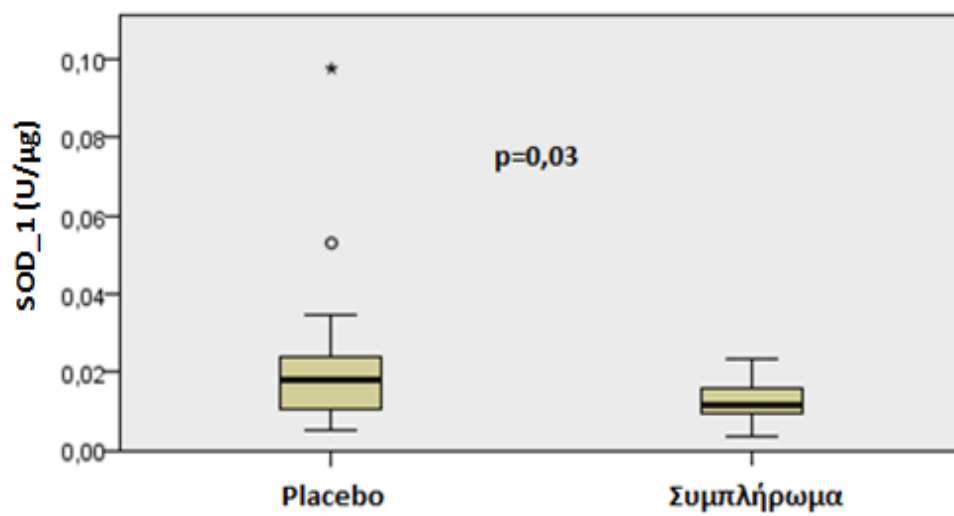
Για τη σύγκριση της δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της παρέμβασης χρησιμοποιήθηκε το Related-Samples Friedman's Test. Φάνηκε ότι στην ομάδα του placebo δεν υπήρχε διαφορά στη δραστηριότητα της SOD κατά τη διάρκεια της παρέμβασης με $p_{\text{placebo}}=0,9$. Αντίθετα, υπήρχε διαφορά στην ομάδα του συμπληρώματος με $p_{\text{συμπλήρωμα}}<0,00$ που παρατηρείται ανάμεσα στους χρόνους 0 και 1 με $p_{0-1}=0,04$ (Πίνακας 25).

Για τη σύγκριση της δραστηριότητας της SOD σε κάθε χρονική στιγμή χρησιμοποιήθηκε το Independent-Mann-Whitney U (2 samples). Στις χρονικές στιγμές 0 και 2 δεν υπήρχε διαφορά της δραστηριότητας ανάμεσα στις δύο ομάδες με $p_0=0,6$ και $p_2=0,4$ αντίστοιχα (Διαγράμματα 3,5). Στη χρονική στιγμή 1 υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων με $p_1=0,03$ (Διάγραμμα 4).

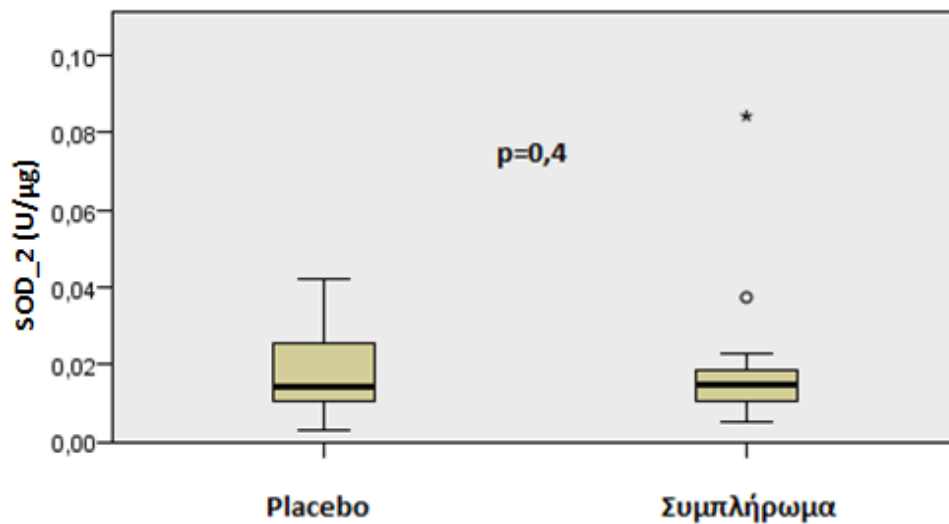
Διάγραμμα 3: Σύγκριση δραστικότητας της SOD ανάμεσα στις ομάδες παρέμβασης με Independent-Mann-Whitney U (2 samples) στο χρόνο 0 εβδομάδες



Διάγραμμα 4: Σύγκριση δραστικότητας της SOD ανάμεσα στις ομάδες παρέμβασης με Independent-Mann-Whitney U (2 samples) στο χρόνο 4 εβδομάδες

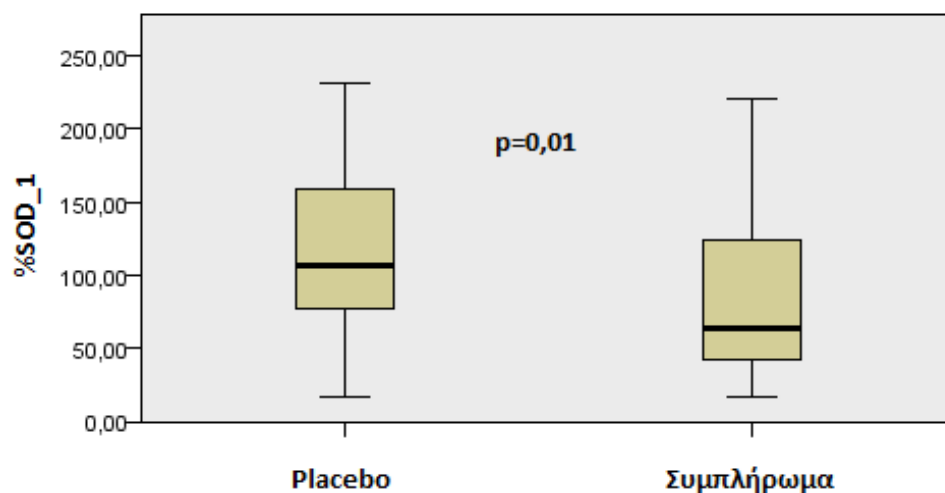


Διάγραμμα 5: Σύγκριση δραστικότητας της SOD ανάμεσα στις ομάδες παρέμβασης με Independent-Mann-Whitney U (2 samples) στον χρόνο 8 εβδομάδες

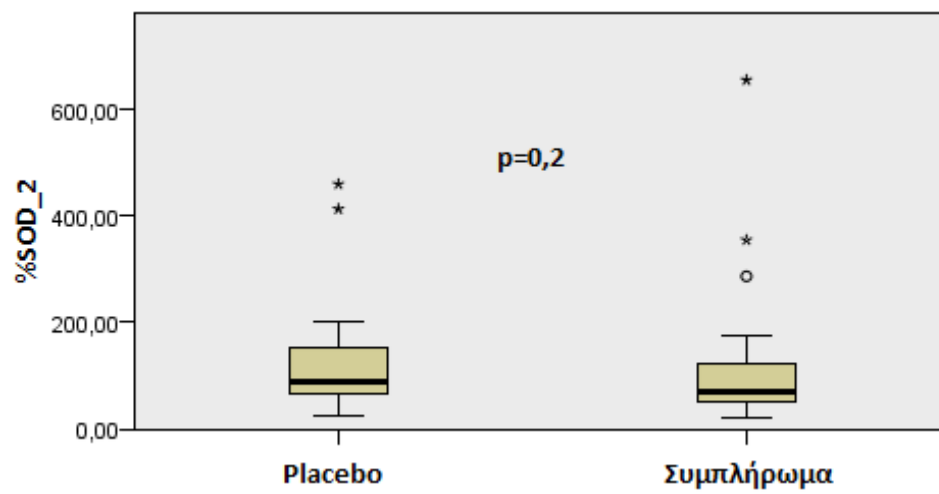


Υπολογίστηκε επίσης η %μεταβολή της δραστικότητας της SOD σε σχέση με το χρόνο 0 ώστε να εξαλειφθούν οι τυχόν διαφορές μεταξύ των εθελοντών στο χρόνο 0. Η σύγκριση έγινε με Independent-Mann-Whitney U (2 samples). Ανάμεσα στις δύο ομάδες παρέμβασης φάνηκε διαφορά στην %μεταβολή της δραστικότητας της SOD στις 4 εβδομάδες ($p_1=0,01$) (Διάγραμμα 6), όχι όμως και για την %μεταβολή της δραστικότητας της SOD στις 8 εβδομάδες ($p=0,2$) (Διάγραμμα 7).

Διάγραμμα 6: Σύγκριση της %μεταβολής της δραστικότητας της SOD_1 σε σχέση με το χρόνο 0, ανάμεσα στις δύο ομάδες παρέμβασης με Independent-Mann-Whitney U (2 samples)

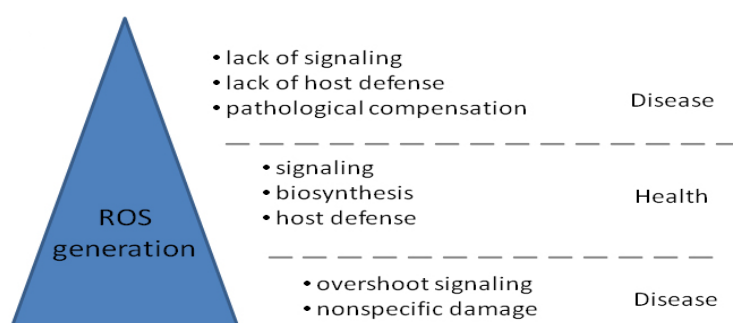


Διάγραμμα 7: Σύγκριση της %μεταβολής της δραστικότητας της SOD_2 σε σχέση με το χρόνο 0, ανάμεσα στις δύο ομάδες παρέμβασης με Independent-Mann-Whitney U (2 samples)



Κεφάλαιο 7: Συζήτηση

Είναι γνωστό πως σε κυτταρικό επίπεδο, οι ελεύθερες ρίζες ρυθμίζουν την ανάπτυξη, την απόπτωση και τη σηματοδότηση. Σε επίπεδο βιολογικών συστημάτων, συμβάλλουν σε πολύπλοκες λειτουργίες όπως η ρύθμιση της πίεσης του αίματος, της γνωστικής λειτουργίας και της ανοσοποιητικής λειτουργίας. Επιτρέπουν την απόκριση σε διέγερση του αυξητικού παράγοντα και την προαγωγή της φλεγμονώδους απάντησης διαδραματίζοντας καίριο ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα με την άμεση εξουδετέρωση παθογόνων μικροοργανισμών.^[239] Οι φυσιολογικοί μεσολαβητές της σηματοδότησης παράγονται κάτω από ελεγχόμενες και ρυθμιζόμενες συνθήκες ώστε να αντιδρούν με τα μόρια-ανιχνευτές με συγκεκριμένο τρόπο.^[240] Μόνο το $\cdot\text{O}_2^-$, το $\text{NO}\cdot$ και το H_2O_2 ασκούν τις παραπάνω δράσεις καθώς η χαμηλή τους δραστηριότητα δεν τους επιτρέπει να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια.^[241] Ωστόσο, οι διαδικασίες της υπεροξειδωσής των λιπιδίων και του σχηματισμού πρωτεϊνικών καρβονυλίων από τη $\text{OH}\cdot$ και το ONOO^- (που αποτελούν δραστικά προϊόντα των παραπάνω ελευθέρων ριζών) είναι καταστροφικές για τον οργανισμό,^[241] καθώς συμβαίνουν τυχαία και χωρίς προγραμματισμό.^[240] Μεταξύ της φυσιολογικής παρουσίας οξειδωτικών παραγόντων και του οξειδωτικού στρες υπάρχει μια λεπτή ισορροπία που εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι ελεύθερες ρίζες συμβάλλουν σε ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων.^[239]



Εικόνα 27: Οξειδοαναγωγική κατάσταση και επίδραση στον οργανισμό. (Πηγή: Brieger K. *Swiss Med Wkly.* 2012)

Η φυσική ανθρώπινη αντιοξειδωτική άμυνα δεν είναι πάντα επαρκής ώστε να διατηρηθεί η σωστή οξειδοαναγωγική ισορροπία.^[239] Αντίθετα, τα φυτά έχουν τη δυνατότητα αποτελεσματικής σύνθεσης ενζυμικών και μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων. Το γενετικό τους υπόβαθρο προσδίδει μια έμφυτη ικανότητα σύνθεσης ποικιλίας φυτοχημικών για την επίτευξη της φυσιολογικής λειτουργίας, της προστασίας από παθογόνα μικρόβια και φυτοφάγα ζώα και της επιβίωσης σε συνθήκες περιβαλλοντικού στρες.^[242] Η πρόσληψη αντιοξειδωτικών μορίων μέσω της διατροφής, όπως τα ω -3 λιπαρά οξέα και οι πολυφαινόλες που περιέχονται στα φρούτα και τα λαχανικά, είναι επαρκής για την ενίσχυση της άμυνας του οργανισμού έναντι στο οξειδωτικό στρες.^[243] Ωστόσο, σε ορισμένες ομάδες του πληθυσμού, όπως άτομα με διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος ή άτομα που δεν μπορούν να καλύψουν τις καθημερινές τους ανάγκες μέσω της διατροφής, τα συμπληρώματα διατροφής μπορεί να είναι ωφέλιμα, σε ποσότητες που δεν υπερβαίνουν τη Συνιστώμενη Ημερήσια Πρόσληψη (RDI).^[244]

Οι μέθοδοι εκτίμησης της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας *in vitro* χρησιμοποιούνται συχνά για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτών ή των φυτοχημικών τους καθώς και για την κατανόηση του πιθανού μηχανισμού δράσης τους. Τα πρωτογενή αντιοξειδωτικά μόρια δρουν είτε δίνοντας ένα άτομο υδρογόνου, είτε ένα ηλεκτρόνιο. Σύμφωνα με τον παραπάνω μηχανισμό, οι μέθοδοι ταξινομούνται σε αυτές που βασίζονται στην αντίδραση μεταφοράς ατόμου υδρογόνου (HAT), και σε αυτή της μεταφοράς ηλεκτρονίου (ET). Τα δευτερογενή αντιοξειδωτικά δρουν μέσω δέσμευσης ιόντων μετάλλων (ικανά να καταλύουν οξειδωτικές αντιδράσεις), απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας, αναστέλλοντας ένζυμα, αποσυνθέτοντας υδροϋπεροξειδία.^[242] Το συμπλήρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα μελέτη περιέχει ένα μίγμα ποικίλων αντιοξειδωτικών συστατικών, συνεπώς για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής του ικανότητας *in vitro* διεξάχθηκαν διάφορες δοκιμασίες.

Η δοκιμασία για τον προσδιορισμό ολικών φαινολικών ενώσεων έγινε με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu που βασίζεται στο μηχανισμό ET.^[242] Στην έρευνά τους οι Costa et.al.^[245] μελέτησαν τα παρακάτω εμπορικά συμπληρώματα διατροφής που είναι διαθέσιμα στην Πορτογαλία με τη ίδια μέθοδο (Πίνακας 26).

Πίνακας 26: Περιγραφή προϊόντων, μέθοδοι παρασκευής ροφημάτων, και μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu

Συμπλήρωμα διατροφής	Παρασκευή ροφήματος	Ποσότητα ολικών φαινολικών ενώσεων	
1. Εκχύλισμα πράσινου τσαγιού (<i>Camellia sinensis</i>) (2%), ζάχαρη, δεξτρόζη, κιτρικό οξύ, ασκορβικό οξύ (0,225%)	16,6g σκόνης σε 200mL νερό στους 75°C	46,2 ± 0,3mg γαλλικού οξέος/100mL	0,462 ± 0,003mg γαλλικού οξέος/mL
2. Εκχύλισμα πράσινου τσαγιού (<i>Camellia sinensis</i>) (100%)	200mL σιρόπι	13,5 ± 0,1mg γαλλικού οξέος /10mL	1,35 ± 0,01mg γαλλικού οξέος /mL
3. Σκόνη χυμού κόκκινων φρούτων (10%), εκχύλισμα πράσινου τσαγιού (6%), κιτρικό οξύ, άρωμα φρούτων, εκχύλισμα ιβίσκου (1,5%), σπόροι σταφυλιού (1%), ασκορβικό οξύ	5g σκόνης σε 200mL νερό στους 75°C	46,2 ± 0,4 mg γαλλικού οξέος /100mL	0,462 ± 0,004mg γαλλικού οξέος /mL

Στην έρευνά τους οι Henning et.al.^[246] μελέτησαν 25 συμπληρώματα διατροφής διαθέσιμα στις ΗΠΑ από 7 κατηγορίες (acai berry, goji berry, σπόροι σταφυλιού, πράσινο τσάι, γάλα γαϊδουράγκαθου, ρόδι, ρεσβερατρόλη). Ο προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu έγινε για τα 3 συμπληρώματα με τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (Πίνακας 27).

Πίνακας 27: Περιγραφή προϊόντων και μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu

Συμπλήρωμα διατροφής	Ποσότητα ολικών φαινολικών ενώσεων	
4. Εκχύλισμα ροδιού [30% πουνικαλαγίνες (240 mg)]	17419 ± 102mg γαλλικού οξέος/L	17,419 ± 0,102mg γαλλικού οξέος/mL
5. Εκχύλισμα πράσινου τσαγιού (9% πολυφαινόλες) , φύλλα πράσινου τσαγιού	14779 ± 959mg γαλλικού οξέος /L	14,779 ± 0,959mg γαλλικού οξέος /mL
6. 250mg trans-ρεσβερατρόλης, κερκετίνη (100 mg quercetin dihydrate)	552 ± 14mg γαλλικού οξέος /L	0,552 ± 0,014mg γαλλικού οξέος /mL

Οι Morillas-Ruiz et.al.^[247] εξέτασαν την επίδραση ενός αντιοξειδωτικού συμπληρώματος διατροφής στο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την άσκηση σε ποδηλάτες.

Πίνακας 28: Περιγραφή προϊόντος και μέτρηση ολικών φαινολικών ενώσεων με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu

Συμπλήρωμα διατροφής	Ποσότητα ολικών φαινολικών ενώσεων	
7. Συμπυκνωμένοι χυμοί μαύρου σταφυλιού (81,2 g/L), βατόμουρου (93,0 g/L), κόκκινης σταφίδας (39,2 g/L) Ορός γάλακτος (2,5 g/L: λευκίνη 0,28g/L, ισολευκίνη 0,13 g/L, βαλίνη 0,12 g/L, αργινίνη 0,05 g/L, γλουταμίνη 0,16 g/L), κυκλαμικό νάτριο (0,2 g/L), βιταμίνη B1 (0,004 g/L), κιτρικό νάτριο (3,4 g/L), κιτρικό οξύ (1,2 g/L), χλωριούχο νάτριο (0,6 g/L), πηκτίνη (3,6 g/L)	1,41mg γαλλικού οξέος/L	0,00141mg γαλλικού οξέος/mL

Στην παρούσα μελέτη το συμπλήρωμα που χρησιμοποιήθηκε περιέχει ολικές φαινολικές ενώσεις σε συγκέντρωση $3,11 \pm 0,1\text{mg}$ γαλλικού οξέος/mL σύμφωνα με την ίδια μέθοδο προσδιορισμού. Συγκρινόμενο με τα παραπάνω αντιοξειδωτικά συμπληρώματα 1,2,3,6,7 υπερτερεί σε ποσότητα φαινολικών ενώσεων. Παράλληλα, η εξέταση του placebo έδειξε πως περιέχει φαινολικές ενώσεις σε ποσότητα μόλις $0,3 \pm 0,28\text{mg}$ γαλλικού οξέος/mL, σημαντικά χαμηλότερη από αυτή του συμπληρώματος ($p < 0,00$). Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των φυτικών εκχυλισμάτων έχουν αποδοθεί στην περιεκτικότητά τους σε φαινολικές ενώσεις. Μέσω επιδημιολογικών μελετών έχει αποδειχθεί ότι οι φαινολικές ενώσεις (λόγω των ομάδων υδροξυλίου) δρουν ως φυσικά αντιοξειδωτικά, βοηθώντας στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών και δεσμεύοντας μέταλλα. Η δοκιμασία Folin-Ciocalteu έχει χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια για την ποσοτικοποίηση των ολικών διαλυτών φαινολικών ενώσεων. Το μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μη-φαινολικές ενώσεις που είναι κοινές σε φυτικά προϊόντα, όπως το ασκορβικό οξύ, τα σάκχαρα, οι αρωματικές

αμίνες, τα οργανικά οξέα και οι πρωτεΐνες, ανάγονται επίσης από το αντιδραστήριο οδηγώντας σε υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης των φαινολικών ενώσεων στο δείγμα.^[248]

Το placebo δεν κατάφερε να προκαλέσει την αναγωγή του DPPH σε καμία από τις εξεταζόμενες ποσότητες. Αντίθετα το συμπλήρωμα απενεργοποίησε επιτυχώς τις ελεύθερες ρίζες σε όλες τις ποσότητες, με τα 1,22μL να παρουσιάζουν τιμές δέσμευσης 46% αμέσως μετά την αρχή της αντίδρασης και 80% μετά από μία ώρα. Η δέσμευση του DPPH συμβαίνει επίσης με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, καθώς η στατιστική ανάλυση που έγινε ενδεικτικά στα 30 λεπτά, έδειξε πως ο διπλασιασμός της ποσότητας του συμπληρώματος αυξάνει τη δέσμευση στατιστικά σημαντικά. Η απενεργοποίηση του DPPH βασίζεται σε μηχανισμό ET και HAT.^[242] Η δοκιμασία δίνει αποτελέσματα με επαναληψιμότητα και είναι έγκυρη για δείγματα με υδρόφιλα ή λιπόφιλα αντιοξειδωτικά. Ωστόσο, το DPPH είναι μια σταθερή ρίζα και δεν έχει καμία ομοιότητα με τις δραστικές ρίζες που εμπλέκονται στην υπεροξειδωση των λιπιδίων. Έτσι, τα αντιοξειδωτικά που αντιδρούν γρήγορα με τις τελευταίες μπορεί να αντιδρούν αργά με το DPPH γι' αυτό χρειάζεται επαρκής χρόνος επώασης ώστε να αξιολογηθεί η δεσμευτική ικανότητα του κάθε αντιοξειδωτικού.^[248]

Η υπεροξειδωση του λινελαϊκού οξέος από τη δράση της LOX δεν επηρεάστηκε από την παρουσία του placebo, ενώ υπήρχε μια μικρή, μη σημαντική αναστολή από το συμπλήρωμα. Σε πρόσφατη έρευνα σε φλαβονοειδή,^[249] παρατηρήθηκε ότι τα λιγότερο υδρόφοβα μόρια είχαν μειωμένη πρόσβαση στην υδρόφοβη κοιλότητα όπου βρίσκεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου, γεγονός που παρατηρήθηκε και σε αντίστοιχη μελέτη του ασκορβικού οξέος και του λιπόφιλου παραγώγου του, 6-παλμιτικού ασκορβικού οξέος.^[250] Αντίθετα, από άλλη μελέτη που εξέτασε ακετυλιωμένα παράγωγα ρεσβερατρώλης, δεν παρατηρήθηκε αυξημένη αναστολή της LOX από τα πιο λιπόφιλα παράγωγα.^[251] Επίσης, σε αντίστοιχη έρευνα το gel από Aloe vera που μελετήθηκε προκάλεσε 84,6% αναστολή της υπεροξειδωσης του λινελαϊκού οξέος.^[252]

Στη μελέτη τους οι Davalos et.al.^[253] εξέτασαν την επίδραση 7 εμπορικών αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής στην επαγόμενη από ιόντα Cu^{+2} *in vitro* οξείδωση της LDL. Χρησιμοποιήθηκε ορός υπερχοληστερολαιμικού ασθενούς στον οποίο έγινε προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Τα δείγματα των συμπληρωμάτων ήταν διαλυμένα σε μεθανόλη και εξετάστηκε η ίδια ποσότητα σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις εκφρασμένες σε mg συμπληρώματος/mg LDL. Για να γίνει σύγκριση με την παρούσα μελέτη έγινε έκφραση της συγκέντρωσης των παρακάτω συμπληρωμάτων και σε mg φαινολικών/mg LDL (ο προσδιορισμός των ολικών φαινολικών είχε πραγματοποιηθεί με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu). Στο control αντί για συμπλήρωμα προστέθηκε η ίδια ποσότητα μεθανόλης, το lag-time του οποίου ήταν $236 \pm 7\text{min}$. Στα lag-time των συμπληρωμάτων παρουσιάζεται η διαφορά σε σχέση με το lag-time του control (Πίνακας 29).

Πίνακας 29: Προσδιορισμός της ικανότητας των συμπληρωμάτων να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL

Συμπλήρωμα διατροφής	Συγκέντρωση (mg συμπληρώματος/ mg LDL)	Συγκέντρωση (mg φαινολικών/ mg LDL)	Αύξηση lag-time σε σχέση με το control(min)
1. Συμπυκνωμένοι σπόροι σταφυλιού, δεντρολίβανο	0,14	0,010	-6,2 ± 23
	0,20	0,015	56 ± 17
	0,29	0,021	132 ± 33
2. Συμπυκνωμένο μαύρο σταφύλι, trans-ρεσβερατρόλη (0,025%)	3,57	0,026	-58 ± 8
	4,76	0,035	120 ± 38
	7,14	0,052	299 ± 17
3. Εκχύλισμα σταφυλιού <i>Vitis vinifera</i> L. (cv. Garnacha) (16,5%), έλαιο φύτρου σιταριού	0,29	0,010	-16 ± 5
	0,57	0,019	65 ± 5
	1,14	0,038	341 ± 79
4. Εκχύλισμα φύλλων <i>Vitis vinifera</i> L. (50%), εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού <i>Vitis vinifera</i> L. (11,7%)	0,07	0,007	-8 ± 21
	0,14	0,014	52 ± 12
	0,29	0,029	183 ± 45
5. Συμπυκνωμένη ντομάτα (31mg), βιταμίνη C (30 mg), εκχύλισμα σπόρου σταφυλιού (25mg), μαγιά πλούσια σε σεληνίο (13 mg), βιταμίνη E (4mg), α-καροτένιο (1,2 mg) (οι ποσότητες περιέχονται /φιαλίδιο)	7,7	0,008	-44 ± 13
	28,6	0,028	105 ± 32
	38	0,037	358 ± 46
6. Φλαβονοειδή εσπεριδοειδών (36%), <i>Ruscus aculeatus</i> L. (27%), <i>Ginkgo biloba</i> (18%), <i>Equisetum arvense</i> (9%), <i>Hamamelis virginiana</i> L. (4,5%), βιταμίνη C (5,4%), βιταμίνη B1 (0,13%)	0,71	0,019	6 ± 3
	0,95	0,026	129 ± 33
	1,43	0,039	304 ± 7
7. βιταμίνη C (10,3%), β-καροτένιο (10,3%), φλαβονοειδή εσπεριδοειδών (8,6%), L-κυστεΐνη (8,6%), εκχύλισμα <i>Ginkgo biloba</i> (8,3%), γλυκονικό μαγγάνιο (5,8%), εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού (3,4%), μαγιά πλούσια σε σεληνίο (3,4%), βιταμίνη E (3,4%), ZnO (2,1%), γλυκονικός χαλκός (1,2%), συνένζυμο Q10 (0,9%)	0,29	0,029	30 ± 6
	0,48	0,048	189 ± 32
	0,71	0,070	405 ± 21

Η αντιοξειδωτική ικανότητα των συμπληρωμάτων με φθίνουσα σειρά είναι η εξής: 4> 1> 6> 7>5> 3> 2. Παρατηρήθηκε ελαφρώς προ-οξειδωτική δράση στη χαμηλότερη συγκέντρωση για τα συμπληρώματα 1-5, ωστόσο η αύξηση της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του lag-time με δόσοεξαρτώμενο τρόπο.

Αντίστοιχα, στην παρούσα μελέτη το συμπλήρωμα παρουσίασε επίσης αντίσταση στην *in vitro* οξείδωση του ορού με δόσοεξαρτώμενο τρόπο, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθεί προ-οξειδωτική δράση με κάποια ποσότητα. Η μεγάλη διαφορά που παρατηρείται στα lag-time των control των δύο μελετών πιθανόν να οφείλεται στις διαφορετικές ιδιότητες της μεθανόλης και του PBS αντίστοιχα, καθώς επίσης και στο γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε ορός υπερχοληστερολαιμικού ασθενούς ενώ στη παρούσα μελέτη υγιούς εθελοντή. Για να συγκριθούν τα παραπάνω lag-time με αυτά του συμπληρώματος της παρούσας μελέτης, παρουσιάζεται σε κάθε assay και η συγκέντρωση σε mg φαινολικών/mg LDL (Πίνακας 30). Η συγκέντρωση της LDL στον ορό που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα ήταν ίση με 100mg/dL.

Πίνακας 30: Προσδιορισμός της ικανότητας του συμπληρώματος να αναστέλλει την οξείδωση της LDL

Ποσότητα συμπληρώματος (μL)	mg φαινολικών/ mg LDL	lag-time (min)
control		40,7±5
0,005	0,009	80 ± 25,1
0,01	0,018	96,3 ± 17,7
0,02	0,036	107 ± 46,6
0,05	0,090	170,9 ± 31,1
0,08	0,144	237,9 ± 48,2
0,1	0,180	268,4 ± 43,6

Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν πως τα συστατικά του συμπληρώματος έχουν δυνατότητα σύνδεσης με τις λιποπρωτεΐνες του ορού και προστασίας αυτών από την οξείδωση. Φαίνεται πως οι μικρές ποσότητες (0,005-0,01μL) κατάφεραν να αναστείλουν την οξείδωση ορού σε αντίθεση με τις ίδιες ποσότητες των συμπληρωμάτων του Πίνακα 29 που παρουσίασαν προ-οξειδωτική δράση. Στις μεγαλύτερες ποσότητες, υπερείχαν τα παραπάνω συμπληρώματα ως προς το lag-time. Από την άλλη μεριά, οι ίδιες ποσότητες placebo παρουσίασαν χαμηλότερη αντίσταση συγκρινόμενες με το συμπλήρωμα ($p<0,05$) και με μη δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Περιορισμό της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι το φυσικό περιβάλλον στο οποίο γίνεται η οξείδωση των λιποπρωτεϊνών είναι δύσκολο να αναπαραχθεί.^[253]

Τα συστατικά του συμπληρώματος δεν κατάφεραν να αναστείλουν την υπεροξείδωση του λινελαϊκού οξέος από Fe^{2+} πιθανόν λόγω της υδατοδιαλυτής τους φύσης αλλά και

προβλημάτων διαλυτοποίησης κατά τη δοκιμασία. Ωστόσο, σε αντίστοιχη μελέτη των Pereira et.al.^[254] αντιοξειδωτικά συμπληρώματα με εκχύλισμα *Ginkgo biloba* L. σε υδατοδιαλυτή μορφή που εξετάστηκαν με την ίδια μέθοδο, έδειξαν αναστολή της τάξης του 50% (Πίνακας 31).

Πίνακας 31: Συγκεντρώσεις συμπληρωμάτων που προκάλεσαν αναστολή της λιποξειδικής υπεροξείδωσης κατά 50%

Συμπλήρωμα διατροφής	EC50 (mg/mL)
1. 40mg τυποποιημένου εκχυλίσματος <i>Ginkgo biloba</i> (1 χάπι σε 100mL νερό)	0,12 ± 0,01
2. 60mg τυποποιημένου εκχυλίσματος <i>Ginkgo biloba</i> (1 χάπι σε 200mL νερό)	0,03 ± 0,00
3. 100mg τυποποιημένου εκχυλίσματος <i>Ginkgo biloba</i> (1 χάπι σε 350mL νερό)	0,02 ± 0,01

Το διάλυμα ρεσβερατρόλης που εξετάστηκε για να διαπιστωθεί η σωστή διεξαγωγή της δοκιμασίας προκάλεσε αναστολή σε ποσότητα που συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Vlachogianni et.al.^[251] Παρ' όλο που το συμπλήρωμα περιέχει ποσότητα ρεσβερατρόλης από το εκχύλισμα *Polygonum cuspidatum*, δεν κατάφερε να αναστείλει την αντίδραση μεταξύ λινελαϊκού οξέος και Fe^{2+} , μέσω του σχηματισμού χηλικού συμπλόκου ή μέσω εξουδετέρωσης των ριζών που παράγονται κατά την οξείδωση.

Το οξειδωτικό στρες έχει εμπλακεί στην παθογένεια διαφόρων ασθενειών. Ωστόσο, πολλές τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση των χορηγούμενων αντιοξειδωτικών. Η ανομοιογένεια των αποτελεσμάτων είναι λογική καθώς πολλοί οξειδωτικοί παράγοντες με διαφορετική δραστικότητα και εκλεκτικότητα συμβάλλουν στην αιτιολογία του οξειδωτικού στρες συνεπώς, πολλά αντιοξειδωτικά με διαφορετικές λειτουργίες απαιτούνται για την καταπολέμησή του.^[240] Άλλο ένα ζήτημα που αφορά την αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών είναι κατά πόσο τα αποτελέσματα από τις *in vitro* μελέτες ισχύουν και *in vivo*. Στο ανθρώπινο σώμα, τα αντιοξειδωτικά πρέπει να περάσουν μέσα από πολλές φυσιολογικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένης της απορρόφησης, της μεταφοράς, του μεταβολισμού, της αποθήκευσης και της απέκκρισης πριν να είναι σε θέση να δράσουν. Λόγω χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας πολλές καλές πηγές αντιοξειδωτικών δεν είναι σε θέση να φέρουν το επιθυμητό αποτέλεσμα. Προτείνεται λοιπόν, η ταυτόχρονη διεξαγωγή μελετών *in vitro* και *in vivo* για τη σωστή αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας.^[242]

Για την αξιολόγηση της επίδρασης του αντιοξειδωτικού συμπληρώματος στους εθελοντές μετρήθηκε η δραστικότητα της SOD των λευκοκυττάρων. Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας έδειξε πως καμία μελέτη δεν εξέτασε τη δραστικότητα της SOD των λευκοκυττάρων υγιών ενηλίκων μετά από τη χορήγηση συμπληρώματος με συνδυασμό αντιοξειδωτικών, ενώ υπήρχαν τρεις που χορήγησαν από ένα αντιοξειδωτικό (Πίνακας 32).

Πίνακας 32: Περιγραφή των μελετών που εξέτασαν την SOD των λευκοκυττάρων σε υγιείς ενήλικες μετά τη χορήγηση ενός αντιοξειδωτικού συμπληρώματος

Χορηγούμενο αντιοξειδωτικό συμπλήρωμα	Διάρκεια δοκιμής Χαρακτηριστικά πληθυσμού	Έλεγχος διατροφικών συνηθειών	Δοσολογία	Επίδραση στην SOD λευκοκυττάρων				
1. Vitamin C (η ομάδα ελέγχου δεν έλαβε σκεύασμα)	8 εβδομάδες N=16♂ μη καπνιστές 27-29y	-	500mg/d	↑ δραστηριότητας SOD των λεμφοκυττάρων σε σχέση με την αρχή της μελέτης και την ομάδα ελέγχου (οι τιμές δεν αναφέρονται)			[255]	
2. β-carotene (δεν υπήρχε ομάδα ελέγχου)	8 εβδομάδες N=22 μη καπνιστές 21-45y	FFQ στην αρχή της μελέτης	30mg/d με κατανάλωση λιπαρού γεύματος σταθερής ποσότητας	↓ δραστηριότητας SOD των λευκοκυττάρων στις 30 και στις 60 μέρες σε σχέση με την αρχή της μελέτης			[256]	
				SOD_0 (units/mg pr)	SOD_4 (units/mg pr)	SOD_8 (units/mg pr)		
				7,54±0,62	4,69±0,41*	5,98±0,33*		
3. N-acetylcysteine (NAC) (η ομάδα ελέγχου δεν έλαβε σκεύασμα)	12 εβδομάδες N=171♂ 23-58y	-		↓ δραστηριότητας SOD των λευκοκυττάρων στις NAC200 και NAC400 σε σχέση με την αρχή της μελέτης, στη NAC200 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου			[257]	
				SOD_0 (nitric units/mg pr)		SOD_12 (nitric units/mg pr)		
				NAC 200mg		44,4 ± 7,98		32,41 ± 17,9* [#]
				NAC 400mg		45,6 ± 17,93		40,22 ± 14,22*
				NAC 800mg		43,5 ± 17,6		39,02 ± 8,72
*p<0,05 σε σχέση με την αρχή της μελέτης, [#] p<0,05 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, η δραστηριότητα της SOD είναι ίση με 1 nitric unit όταν αυτή αναστέλλει την παραγωγή νιτρικού ιόντος κατά 50%								

Στην παρούσα μελέτη χορηγήθηκε ένα μίγμα αντιοξειδωτικών βιταμινών, ιχνοστοιχείων και φυσικών αντιοξειδωτικών συστατικών σε φαινομενικά υγιείς εθελοντές για διάστημα 8 εβδομάδων. Οι δύο ομάδες παρέμβασης δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τα ανθρωπομετρικά και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά στην αρχή της μελέτης. Ο πληθυσμός της μελέτης χαρακτηρίζεται ως υπέρβαρος, με τους άνδρες να έχουν αυξημένες τιμές ολικής και LDL χοληστερόλης, χωρίς ωστόσο κάποια επίδραση στην υγεία τους. Τα ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών δεν είχαν στατιστικά

σημαντικές διαφοροποιήσεις κατά τη διάρκεια της παρέμβασης. Στο διάστημα των 8 εβδομάδων έγιναν 3 τηλεφωνικές ανακλήσεις 24ώρου από τις οποίες υπολογίστηκε το MedDietScore των εθελοντών=28, χωρίς διακυμάνσεις που να υποδεικνύουν αλλαγή στις διατροφικές τους συνήθειες.

Η δραστικότητα της SOD μετρήθηκε σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων και εκφράστηκε σε units/mg πρωτεΐνης μετά από προσδιορισμό της ολικής πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford. Οι τιμές της δραστικότητας συγκρινόμενες με αυτές της δεύτερης μελέτης του Πίνακα 32 (η σύγκριση δεν είναι εφικτή με τις μελέτες 1 και 3) παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια. Πιθανή εξήγηση είναι ο διαφορετικός πληθυσμός της μελέτης.

Στην 4η εβδομάδα της παρέμβασης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της δραστικότητας του ενζύμου για την ομάδα του συμπληρώματος σε σχέση με το χρόνο 0 και την ομάδα του placebo. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με αυτά της δεύτερης μελέτης του Πίνακα 32 ως προς την αρχή της παρέμβασης (καθώς δεν υπήρχε ομάδα ελέγχου). Την 8η εβδομάδα, η δραστικότητα της SOD παρουσίασε μια τάση επαναφοράς στα επίπεδα του χρόνου 0 που δεν την διαφοροποιούσε πλέον από την αρχή της παρέμβασης και από το placebo. Η αύξηση αυτή δε συνάδει με τα αποτελέσματα των μελετών 2 και 3 (για τις ποσότητες NAC200, NAC400) του Πίνακα 32, στα οποία η δραστικότητα στις 8 και 12 εβδομάδες αντίστοιχα ήταν ακόμα σημαντικά μειωμένη σε σχέση με το χρόνο 0. Η διεξαγωγή των παραπάνω μελετών ωστόσο παρουσίαζε μειονεκτήματα (μικρό δείγμα, έλλειψη ομάδας ελέγχου, μη καταγραφή των διατροφικών συνηθειών κατά τη διάρκεια της μελέτης για τη 2 και έλλειψη εικονικού σκευάσματος, μη καταγραφή των διατροφικών συνηθειών κατά τη διάρκεια της μελέτης, απουσία επανελέγχου στο διάστημα των 12 εβδομάδων για την 3) γι' αυτό και η σύγκριση δεν οδηγεί σε σαφή συμπεράσματα. Τα αποτελέσματα διαφέρουν επίσης σε σχέση με τη μελέτη 1 στην οποία παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της δραστικότητας της SOD σε σχέση με την αρχή της μελέτης και την ομάδα ελέγχου.

Η SOD αποτελεί μέρος της πρωτογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας στα θηλαστικά καταλύοντας τη μετατροπή του $\cdot\text{O}_2^-$ σε H_2O_2 . Είναι πιθανό τα εξωγενή αντιοξειδωτικά του συμπληρώματος να προκάλεσαν την άμεση αναγωγή του $\cdot\text{O}_2^-$ ώστε να μειώθηκε η ανάγκη των λευκοκυττάρων για SOD κατά την 4η εβδομάδα της παρέμβασης. Άλλωστε οι καταλυτικές δράσεις των φαινολικών συστατικών και του ασκορβικού οξέος απέναντι στο $\cdot\text{O}_2^-$ έχουν ήδη αναφερθεί.^[242, 258] Η τάση για επαναφορά της δραστικότητας της SOD στις 8 εβδομάδες στα επίπεδα της εβδομάδας 0 ίσως αποδίδεται στην προσπάθεια προσαρμογής του οργανισμού στη "φυσιολογική κατάσταση". Ο πληθυσμός της μελέτης άλλωστε είχε υψηλό και σταθερό MedDietScore που υποδεικνύει κατανάλωση ήδη σημαντικής ποσότητας αντιοξειδωτικών συστατικών μέσω της διατροφής. Τα αποτελέσματα δηλώνουν επίσης ότι η κατανάλωση του συμπληρώματος από υγιείς ενήλικες με ποιοτικά σωστή διατροφή ήταν ευεργετική όχι για περισσότερο από 4 εβδομάδες. Παρεμπιπτόντως, ενδιαφέρον θα ήταν να μελετηθεί και να συγκριθεί η δραστικότητα της SOD των ερυθροκυττάρων, των αιμοπεταλίων και του πλάσματος των εθελοντών για μια ολοκληρωμένη εικόνα της επίδρασης του συμπληρώματος στο εν λόγω ένζυμο.

Τα αποτελέσματα από τη συσχέτιση των δεικτών στο χρόνο 0 δεν ήταν τα αναμενόμενα καθώς υποδεικνύεται ότι η αύξηση της δραστηριότητας της SOD των λευκοκυττάρων επιφέρει αύξηση του lagtime. Ισχύει ότι όσο αυξάνεται η αντίσταση του ορού στην οξείδωση μειώνεται το οξειδωτικό στρες. Αναμενόμενο θα ήταν λοιπόν η μείωση της δραστηριότητας της SOD να οδηγεί σε μείωση του οξειδωτικού στρες, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της 4ης εβδομάδας.

Συμπερασματικά, το συμπλήρωμα απέδειξε την αντιοξειδωτική του ικανότητα μέσω της πλειοψηφίας των *in vitro* δοκιμασιών καθώς και μέσω της επίδρασης σε ένα από τα κυριότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα του οργανισμού. Για να τον προσδιορισμό της συνολικής δράσης και των μηχανισμών ωστόσο, χρειάζεται η διεξαγωγή και άλλων πειραμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chandra, J., A. Samali, and S. Orrenius, *Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(3-4): p. 323-33.
2. Halliwell, B., *Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)*. Free Radic Res, 1999. **31**(4): p. 261-72.
3. Sen, C.K., *Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction*. Med Sci Sports Exerc, 2001. **33**(3): p. 368-70.
4. Halliwell, B., *Can oxidative DNA damage be used as a biomarker of cancer risk in humans? Problems, resolutions and preliminary results from nutritional supplementation studies*. Free Radic Res, 1998. **29**(6): p. 469-86.
5. Fang, Y.Z., S. Yang, and G. Wu, *Free radicals, antioxidants, and nutrition*. Nutrition, 2002. **18**(10): p. 872-9.
6. Yiannakopoulou, E., *Oxidative stress – antioxidant mechanisms: Clinical implications*. ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2009, 2009. **26**((1)): p. 23-35.
7. Liochev, S.I. and I. Fridovich, *The Haber-Weiss cycle -- 70 years later: an alternative view*. Redox Rep, 2002. **7**(1): p. 55-7; author reply 59-60.
8. Valko, M., H. Morris, and M.T. Cronin, *Metals, toxicity and oxidative stress*. Curr Med Chem, 2005. **12**(10): p. 1161-208.
9. Leonard, S.S., G.K. Harris, and X. Shi, *Metal-induced oxidative stress and signal transduction*. Free Radic Biol Med, 2004. **37**(12): p. 1921-42.
10. Kalyanaraman, B., *Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms*. Redox Biol, 2013. **1**: p. 244-57.
11. Chen, Q., et al., *Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36027-31.
12. Bae, Y.S., et al., *Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling*. Mol Cells, 2011. **32**(6): p. 491-509.
13. Downey, J.M., *Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion*. Annu Rev Physiol, 1990. **52**: p. 487-504.
14. Jarasch, E.D., et al., *Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium*. Cell, 1981. **25**(1): p. 67-82.
15. Petrone, W.F., et al., *Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(2): p. 1159-63.
16. Meydani, M., et al., *Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E*. Ann N Y Acad Sci, 1992. **669**: p. 363-4.
17. Cadet, J., et al., *Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features*. Mutat Res, 2003. **531**(1-2): p. 5-23.
18. Romieu, I., et al., *Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review*. Eur Respir J, 2008. **31**(1): p. 179-97.
19. Kim, M., C.H. Han, and M.Y. Lee, *NADPH oxidase and the cardiovascular toxicity associated with smoking*. Toxicol Res, 2014. **30**(3): p. 149-57.
20. Stowe, D.F. and A.K. Camara, *Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(6): p. 1373-414.
21. Anderson, E.J., et al., *Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans*. J Clin Invest, 2009. **119**(3): p. 573-81.

22. Loffredo, L., et al., *Obesity and hypercholesterolemia are associated with NOX2 generated oxidative stress and arterial dysfunction*. J Pediatr, 2012. **161**(6): p. 1004-9.
23. Conde de la Rosa, L., H. Moshage, and N. Nieto, *[Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease]*. Rev Esp Enferm Dig, 2008. **100**(3): p. 156-63.
24. Rathinam, M.L., et al., *Astrocyte control of fetal cortical neuron glutathione homeostasis: up-regulation by ethanol*. J Neurochem, 2006. **96**(5): p. 1289-300.
25. Yoo, S.K. and A. Huttenlocher, *Innate immunity: wounds burst H₂O₂ signals to leukocytes*. Curr Biol, 2009. **19**(14): p. R553-5.
26. Ayala, A., M.F. Munoz, and S. Arguelles, *Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal*. Oxid Med Cell Longev, 2014. **2014**: p. 360438.
27. Esterbauer, H., P. Eckl, and A. Ortner, *Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors*. Mutat Res, 1990. **238**(3): p. 223-33.
28. Halliwell, B., *Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come?* Am J Clin Nutr, 2000. **72**(5): p. 1082-7.
29. Nunomura, A., et al., *RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease*. J Neurosci, 1999. **19**(6): p. 1959-64.
30. Nunomura, A., et al., *Neuronal RNA oxidation is a prominent feature of dementia with Lewy bodies*. Neuroreport, 2002. **13**(16): p. 2035-9.
31. Kikuchi, A., et al., *Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy*. Neurobiol Dis, 2002. **9**(2): p. 244-8.
32. Ames, B.N., *Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens*. Prog Clin Biol Res, 1986. **206**: p. 3-32.
33. Dizdaroglu, M., et al., *Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(11): p. 1102-15.
34. Griffiths, H.R., et al., *Redox regulation of protein damage in plasma*. Redox Biol, 2014. **2**: p. 430-5.
35. Madian, A.G. and F.E. Regnier, *Proteomic identification of carbonylated proteins and their oxidation sites*. J Proteome Res, 2010. **9**(8): p. 3766-80.
36. Renke, J., et al., *Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(2): p. 101-4.
37. Dekkers, J.C., L.J. van Doornen, and H.C. Kemper, *The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage*. Sports Med, 1996. **21**(3): p. 213-38.
38. Abreu, I.A. and D.E. Cabelli, *Superoxide dismutases-a review of the metal-associated mechanistic variations*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1804**(2): p. 263-74.
39. Crapo, J.D., et al., *Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10405-9.
40. Okado-Matsumoto, A. and I. Fridovich, *Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38388-93.
41. Chang, L.Y., et al., *Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes*. J Cell Biol, 1988. **107**(6 Pt 1): p. 2169-79.
42. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
43. Rigo, A., et al., *The binding of copper ions to copper-free bovine superoxide dismutase. Properties of the protein recombined with increasing amounts of copper ions*. Biochem J, 1977. **161**(1): p. 31-5.

44. Fukai, T. and M. Ushio-Fukai, *Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(6): p. 1583-606.
45. Fridovich, I. and B. Freeman, *Antioxidant defenses in the lung*. Annu Rev Physiol, 1986. **48**: p. 693-702.
46. Weisiger, R.A. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. Organelle specificity*. J Biol Chem, 1973. **248**(10): p. 3582-92.
47. Hsu, J.L., et al., *Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17687-91.
48. Jang, Y.C. and H. Van Remmen, *The mitochondrial theory of aging: insight from transgenic and knockout mouse models*. Exp Gerontol, 2009. **44**(4): p. 256-60.
49. Lebovitz, R.M., et al., *Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9782-7.
50. Li, Y., et al., *Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase*. Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 376-81.
51. Stralin, P., et al., *The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(11): p. 2032-6.
52. Fukai, T., et al., *Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis*. J Clin Invest, 1998. **101**(10): p. 2101-11.
53. Luoma, J.S., et al., *Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(2): p. 157-67.
54. Tan, R.J., et al., *Inflammatory cells as a source of airspace extracellular superoxide dismutase after pulmonary injury*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006. **34**(2): p. 226-32.
55. Gongora, M.C., et al., *Loss of extracellular superoxide dismutase leads to acute lung damage in the presence of ambient air: a potential mechanism underlying adult respiratory distress syndrome*. Am J Pathol, 2008. **173**(4): p. 915-26.
56. Fukai, T., et al., *Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease*. Cardiovasc Res, 2002. **55**(2): p. 239-49.
57. Fattman, C.L., L.M. Schaefer, and T.D. Oury, *Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(3): p. 236-56.
58. Qin, Z., et al., *Extracellular superoxide dismutase (ecSOD) in vascular biology: an update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD*. Transl Res, 2008. **151**(2): p. 68-78.
59. Antonyuk, S.V., et al., *The structure of human extracellular copper-zinc superoxide dismutase at 1.7 Å resolution: insights into heparin and collagen binding*. J Mol Biol, 2009. **388**(2): p. 310-26.
60. Jeney, V., et al., *Role of antioxidant-1 in extracellular superoxide dismutase function and expression*. Circ Res, 2005. **96**(7): p. 723-9.
61. Arthur, J.R., *The glutathione peroxidases*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(13-14): p. 1825-35.
62. Papp, L.V., et al., *From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(7): p. 775-806.
63. Yamamoto, Y., et al., *Plasma glutathione peroxidase reduces phosphatidylcholine hydroperoxide*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **193**(1): p. 133-8.
64. Imai, H., et al., *Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*. J Biol Chem, 1998. **273**(4): p. 1990-7.

65. Mates, J.M. and F. Sanchez-Jimenez, *Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes*. Front Biosci, 1999. **4**: p. D339-45.
66. Deponte, M., *Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1830**(5): p. 3217-66.
67. Mbemba, F., et al., *Subcellular localization and modification with ageing of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in human fibroblasts*. Biochim Biophys Acta, 1985. **838**(2): p. 211-20.
68. Kelner, M.J. and M.A. Montoya, *Structural organization of the human glutathione reductase gene: determination of correct cDNA sequence and identification of a mitochondrial leader sequence*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **269**(2): p. 366-8.
69. Aquilano, K., S. Baldelli, and M.R. Ciriolo, *Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 196.
70. Harrison, F.E., G.L. Bowman, and M.C. Polidori, *Ascorbic acid and the brain: rationale for the use against cognitive decline*. Nutrients, 2014. **6**(4): p. 1752-81.
71. Rizvi, S., et al., *The role of vitamin e in human health and some diseases*. Sultan Qaboos Univ Med J, 2014. **14**(2): p. e157-65.
72. Eroglu, A. and E.H. Harrison, *Carotenoid metabolism in mammals, including man: formation, occurrence, and function of apocarotenoids*. J Lipid Res, 2013. **54**(7): p. 1719-30.
73. Niki, E., et al., *Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene*. Am J Clin Nutr, 1995. **62**(6 Suppl): p. 1322S-1326S.
74. Zhang, P. and S.T. Omaye, *Beta-carotene and protein oxidation: effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol*. Toxicology, 2000. **146**(1): p. 37-47.
75. Chew, G.T. and G.F. Watts, *Coenzyme Q10 and diabetic endotheliopathy: oxidative stress and the 'recoupling hypothesis'*. QJM, 2004. **97**(8): p. 537-48.
76. Stocker, R., V.W. Bowry, and B. Frei, *Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(5): p. 1646-50.
77. Witting, P.K., et al., *Anti-atherogenic effect of coenzyme Q10 in apolipoprotein E gene knockout mice*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(3-4): p. 295-305.
78. Singh, R.B., et al., *Effect of coenzyme Q10 on experimental atherosclerosis and chemical composition and quality of atheroma in rabbits*. Atherosclerosis, 2000. **148**(2): p. 275-82.
79. Kumar, S. and A.K. Pandey, *Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview*. ScientificWorldJournal, 2013. **2013**: p. 162750.
80. Shay, K.P., et al., *Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1790**(10): p. 1149-60.
81. Packer, L., E.H. Witt, and H.J. Tritschler, *alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant*. Free Radic Biol Med, 1995. **19**(2): p. 227-50.
82. Orino, K., et al., *Ferritin and the response to oxidative stress*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 1): p. 241-7.
83. Kim, K.J. and B.W. Lee, *The roles of glycated albumin as intermediate glycation index and pathogenic protein*. Diabetes Metab J, 2012. **36**(2): p. 98-107.
84. Aasa, R., B.G. Malmstroem, and P. Saltman, *The Specific Binding of Iron(III) and Copper(II) to Transferrin and Conalbumin*. Biochim Biophys Acta, 1963. **75**: p. 203-22.
85. Moselhy, H.F., et al., *A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC*. J Lipid Res, 2013. **54**(3): p. 852-8.
86. *OxiSelect™ 8-iso-Prostaglandin F2 ELISA Kit*.
87. Lin, H.S., et al., *A high-throughput and sensitive methodology for the quantification of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: measurement with gas chromatography-*

- mass spectrometry after single solid-phase extraction*. Biochem J, 2004. **380**(Pt 2): p. 541-8.
88. Kalousova, M., et al., *Advanced glycation end products and advanced oxidation protein products in hemodialyzed patients*. Blood Purif, 2002. **20**(6): p. 531-6.
 89. Witko-Sarsat, V., et al., *Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia*. Kidney Int, 1996. **49**(5): p. 1304-13.
 90. Plestina-Borjan, I., et al., *Association of age-related macular degeneration with erythrocyte antioxidant enzymes activity and serum total antioxidant status*. Oxid Med Cell Longev, 2015. **2015**: p. 804054.
 91. Peskin, A.V. and C.C. Winterbourn, *A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1)*. Clin Chim Acta, 2000. **293**(1-2): p. 157-66.
 92. McCord, J.M., *Analysis of superoxide dismutase activity*. Curr Protoc Toxicol, 2001. **Chapter 7**: p. Unit7 3.
 93. Arguelles, S., et al., *A preliminary analysis of within-subject variation in human serum oxidative stress parameters as a function of time*. Rejuvenation Res, 2007. **10**(4): p. 621-36.
 94. Poljsak, B., D. Suput, and I. Milisav, *Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants*. Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 956792.
 95. Mangge, H., et al., *Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease*. World J Cardiol, 2014. **6**(6): p. 462-77.
 96. Demopoulos CA, K.H., Antonopoulou S. , *Platelet activating factor-A molecular link between atherosclerosis theories*. Eur J Lipid Sci Technol 2003. **105**(11): p. 705-16.
 97. Tabas, I., *Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(1): p. 36-46.
 98. Galle, J., et al., *Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells*. Atherosclerosis, 2006. **185**(2): p. 219-26.
 99. Frostegard, J., *Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease*. BMC Med, 2013. **11**: p. 117.
 100. Du, X., K. Stocklauser-Farber, and P. Rosen, *Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase?* Free Radic Biol Med, 1999. **27**(7-8): p. 752-63.
 101. Mullarkey, C.J., D. Edelstein, and M. Brownlee, *Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **173**(3): p. 932-9.
 102. Nishikawa, T., et al., *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 787-90.
 103. Du, X.L., et al., *Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(22): p. 12222-6.
 104. Martens, G.A., et al., *Glucose suppresses superoxide generation in metabolically responsive pancreatic beta cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20389-96.
 105. Herlein, J.A., et al., *Superoxide and respiratory coupling in mitochondria of insulin-deficient diabetic rats*. Endocrinology, 2009. **150**(1): p. 46-55.
 106. Hou, N., et al., *Reactive oxygen species-mediated pancreatic beta-cell death is regulated by interactions between stress-activated protein kinases, p38 and c-Jun N-terminal kinase, and mitogen-activated protein kinase phosphatases*. Endocrinology, 2008. **149**(4): p. 1654-65.

107. Pitocco, D., et al., *Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(11): p. 21525-50.
108. Pi, J., et al., *Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1783-91.
109. Leloup, C., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion*. Diabetes, 2009. **58**(3): p. 673-81.
110. Li, N., et al., *Transient oxidative stress damages mitochondrial machinery inducing persistent beta-cell dysfunction*. J Biol Chem, 2009. **284**(35): p. 23602-12.
111. Fridlyand, L.E. and L.H. Philipson, *Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic beta-cells?* Diabetes, 2004. **53**(8): p. 1942-8.
112. Han, Y. and J.Z. Chen, *Oxidative stress induces mitochondrial DNA damage and cytotoxicity through independent mechanisms in human cancer cells*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 825065.
113. Nicco, C., et al., *Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species*. Biomed Pharmacother, 2005. **59**(4): p. 169-74.
114. Kong, Q., J.A. Beel, and K.O. Lillehei, *A threshold concept for cancer therapy*. Med Hypotheses, 2000. **55**(1): p. 29-35.
115. Burdon, R.H., *Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation*. Free Radic Biol Med, 1995. **18**(4): p. 775-94.
116. Kumar, B., et al., *Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype*. Cancer Res, 2008. **68**(6): p. 1777-85.
117. Laurent, A., et al., *Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species*. Cancer Res, 2005. **65**(3): p. 948-56.
118. Aykin-Burns, N., et al., *Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation*. Biochem J, 2009. **418**(1): p. 29-37.
119. Ranzato, E., S. Biffo, and B. Burlando, *Selective ascorbate toxicity in malignant mesothelioma: a redox Trojan mechanism*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **44**(1): p. 108-17.
120. Tucker, P.S., A.T. Scanlan, and V.J. Dalbo, *Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease*. Oxid Med Cell Longev, 2015. **2015**: p. 806358.
121. Avery, S.V., *Molecular targets of oxidative stress*. Biochem J, 2011. **434**(2): p. 201-10.
122. Berlett, B.S. and E.R. Stadtman, *Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20313-6.
123. Halliwell, B. and S. Chirico, *Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance*. Am J Clin Nutr, 1993. **57**(5 Suppl): p. 715S-724S; discussion 724S-725S.
124. Evans, M.D., M. Dizdaroglu, and M.S. Cooke, *Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance*. Mutat Res, 2004. **567**(1): p. 1-61.
125. Cooke, M.S., et al., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. FASEB J, 2003. **17**(10): p. 1195-214.
126. Beckman, K.B. and B.N. Ames, *The free radical theory of aging matures*. Physiol Rev, 1998. **78**(2): p. 547-81.
127. Bohr, V.A. and R.M. Anson, *DNA damage, mutation and fine structure DNA repair in aging*. Mutat Res, 1995. **338**(1-6): p. 25-34.
128. Evans, D.A., J.P. Burbach, and F.W. van Leeuwen, *Somatic mutations in the brain: relationship to aging?* Mutat Res, 1995. **338**(1-6): p. 173-82.
129. Miquel, J., *An update on the mitochondrial-DNA mutation hypothesis of cell aging*. Mutat Res, 1992. **275**(3-6): p. 209-16.

130. Morley, A.A., *The somatic mutation theory of ageing*. Mutat Res, 1995. **338**(1-6): p. 19-23.
131. Vijg, J. and J.A. Gossen, *Somatic mutations and cellular aging*. Comp Biochem Physiol B, 1993. **104**(3): p. 429-37.
132. Hart, R.W. and R.B. Setlow, *Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(6): p. 2169-73.
133. Cortopassi, G.A. and E. Wang, *There is substantial agreement among interspecies estimates of DNA repair activity*. Mech Ageing Dev, 1996. **91**(3): p. 211-8.
134. Fleming, J.E., et al., *Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome?* Gerontology, 1982. **28**(1): p. 44-53.
135. Miquel, J., et al., *Mitochondrial role in cell aging*. Exp Gerontol, 1980. **15**(6): p. 575-91.
136. Persson, T., B.O. Popescu, and A. Cedazo-Minguez, *Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail?* Oxid Med Cell Longev, 2014. **2014**: p. 427318.
137. Resende, R., et al., *Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(12): p. 2051-7.
138. Karuppagounder, S.S., et al., *Thiamine deficiency induces oxidative stress and exacerbates the plaque pathology in Alzheimer's mouse model*. Neurobiol Aging, 2009. **30**(10): p. 1587-600.
139. Lustbader, J.W., et al., *ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease*. Science, 2004. **304**(5669): p. 448-52.
140. Takuma, K., et al., *ABAD enhances Abeta-induced cell stress via mitochondrial dysfunction*. FASEB J, 2005. **19**(6): p. 597-8.
141. Ramassamy, C., et al., *Oxidative insults are associated with apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease brain*. Neurobiol Dis, 2000. **7**(1): p. 23-37.
142. Galli, F., et al., *Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(5): p. 690-713.
143. McGrath, L.T., et al., *Oxidative stress during acute respiratory exacerbations in cystic fibrosis*. Thorax, 1999. **54**(6): p. 518-23.
144. Thomson, E., et al., *Identifying peroxidases and their oxidants in the early pathology of cystic fibrosis*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(9): p. 1354-60.
145. Range, S.P., et al., *Treatment of pulmonary exacerbations of cystic fibrosis leads to improved antioxidant status*. Eur Respir J, 1999. **13**(3): p. 560-4.
146. Coppo, L. and P. Ghezzi, *Thiol regulation of pro-inflammatory cytokines and innate immunity: protein S-thiolation as a novel molecular mechanism*. Biochem Soc Trans, 2011. **39**(5): p. 1268-72.
147. Verhaeghe, C., et al., *Role of IKK and ERK pathways in intrinsic inflammation of cystic fibrosis airways*. Biochem Pharmacol, 2007. **73**(12): p. 1982-94.
148. Rada, B. and T.L. Leto, *Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases*. Contrib Microbiol, 2008. **15**: p. 164-87.
149. Kruk, J. and E. Duchnik, *Oxidative stress and skin diseases: possible role of physical activity*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(2): p. 561-8.
150. Bachelor, M.A. and G.T. Bowden, *UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression*. Semin Cancer Biol, 2004. **14**(2): p. 131-8.
151. Trenam, C.W., D.R. Blake, and C.J. Morris, *Skin inflammation: reactive oxygen species and the role of iron*. J Invest Dermatol, 1992. **99**(6): p. 675-82.
152. Boh, E.E., *Role of reactive oxygen species in dermatologic diseases*. Clin Dermatol, 1996. **14**(4): p. 343-52.

153. Nishigori, C., Y. Hattori, and S. Toyokuni, *Role of reactive oxygen species in skin carcinogenesis*. Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(3): p. 561-70.
154. Bickers, D.R. and M. Athar, *Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(12): p. 2565-75.
155. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact, 2006. **160**(1): p. 1-40.
156. Barco, D. and A. Alomar, *[Rosacea]*. Actas Dermosifiliogr, 2008. **99**(4): p. 244-56.
157. Rock, K. and J.W. Fischer, *[Role of the extracellular matrix in extrinsic skin aging]*. Hautarzt, 2011. **62**(8): p. 591-7.
158. Murri, M., et al., *Circulating markers of oxidative stress and polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review and meta-analysis*. Hum Reprod Update, 2013. **19**(3): p. 268-88.
159. Van Gaal, L.F., J. Vertommen, and I.H. De Leeuw, *The in vitro oxidizability of lipoprotein particles in obese and non-obese subjects*. Atherosclerosis, 1998. **137 Suppl**: p. S39-44.
160. Skrha, J., et al., *Insulin action and fibrinolysis influenced by vitamin E in obese Type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 1999. **44**(1): p. 27-33.
161. Dandona, P., et al., *The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(1): p. 355-62.
162. Block, G., et al., *Factors associated with oxidative stress in human populations*. Am J Epidemiol, 2002. **156**(3): p. 274-85.
163. Ozata, M., et al., *Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity*. Clin Biochem, 2002. **35**(8): p. 627-31.
164. Urakawa, H., et al., *Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(10): p. 4673-6.
165. Matsuoka, T., et al., *Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells*. J Clin Invest, 1997. **99**(1): p. 144-50.
166. Rudich, A., et al., *Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes*. Diabetes, 1998. **47**(10): p. 1562-9.
167. Takeda, E., et al., *Control of oxidative stress and metabolic homeostasis by the suppression of postprandial hyperglycemia*. J Med Invest, 2005. **52 Suppl**: p. 259-65.
168. Aguirre, V., et al., *The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)*. J Biol Chem, 2000. **275**(12): p. 9047-54.
169. Gao, D., et al., *The effects of palmitate on hepatic insulin resistance are mediated by NADPH Oxidase 3-derived reactive oxygen species through JNK and p38MAPK pathways*. J Biol Chem, 2010. **285**(39): p. 29965-73.
170. Nguyen, M.T., et al., *JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35361-71.
171. Tuncman, G., et al., *Functional in vivo interactions between JNK1 and JNK2 isoforms in obesity and insulin resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(28): p. 10741-6.
172. Masharani, U.B., et al., *Insulin resistance in non-obese subjects is associated with activation of the JNK pathway and impaired insulin signaling in skeletal muscle*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e19878.
173. Halliwell, B., J.M. Gutteridge, and C.E. Cross, *Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?* J Lab Clin Med, 1992. **119**(6): p. 598-620.
174. Gutteridge, J.M., *Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence*. Free Radic Res Commun, 1993. **19**(3): p. 141-58.

175. Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 481-93.
176. Cutler, R.G., *Genetic stability, dysdifferentiation, and longevity determinant genes*. Critical Reviews of Oxidative Stress and Damage, 2003.
177. R.G.Cutler, *Measuring oxidative stress and interpreting its relevance in humans*. Oxidative Stress and aging 2003.
178. Takahashi, M., et al., *Low-volume exercise training and vitamin E supplementation attenuates oxidative stress in postmenopausal women*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2013. **59**(5): p. 375-83.
179. Hu, J.J., et al., *Effects of dietary supplementation of alpha-tocopherol on plasma glutathione and DNA repair activities*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1996. **5**(4): p. 263-70.
180. Dimitrov, N.V., et al., *Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E*. Am J Clin Nutr, 1991. **53**(3): p. 723-9.
181. Garelnabi, M., et al., *Vitamin E differentially affects short term exercise induced changes in oxidative stress, lipids, and inflammatory markers*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2012. **22**(10): p. 907-13.
182. Rasool, A.H., et al., *Dose dependent elevation of plasma tocotrienol levels and its effect on arterial compliance, plasma total antioxidant status, and lipid profile in healthy humans supplemented with tocotrienol rich vitamin E*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2006. **52**(6): p. 473-8.
183. Patrignani, P., et al., *Effects of vitamin E supplementation on F(2)-isoprostane and thromboxane biosynthesis in healthy cigarette smokers*. Circulation, 2000. **102**(5): p. 539-45.
184. Meydani, S.N., et al., *Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects*. Am J Clin Nutr, 1990. **52**(3): p. 557-63.
185. Kennedy, D.O., et al., *Effects of high-dose B vitamin complex with vitamin C and minerals on subjective mood and performance in healthy males*. Psychopharmacology (Berl), 2010. **211**(1): p. 55-68.
186. Wen, Y., T. Cooke, and J. Feely, *The effect of pharmacological supplementation with vitamin C on low-density lipoprotein oxidation*. Br J Clin Pharmacol, 1997. **44**(1): p. 94-7.
187. Lenton, K.J., et al., *Vitamin C augments lymphocyte glutathione in subjects with ascorbate deficiency*. Am J Clin Nutr, 2003. **77**(1): p. 189-95.
188. Zembron-Lacny, A., et al., *Assessment of the antioxidant effectiveness of alpha-lipoic acid in healthy men exposed to muscle-damaging exercise*. J Physiol Pharmacol, 2009. **60**(2): p. 139-43.
189. Bao, B., et al., *Zinc decreases C-reactive protein, lipid peroxidation, and inflammatory cytokines in elderly subjects: a potential implication of zinc as an atheroprotective agent*. Am J Clin Nutr, 2010. **91**(6): p. 1634-41.
190. Prasad, A.S., et al., *Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(3): p. 837-44.
191. Neve, J., F. Vertongen, and P. Capel, *Selenium supplementation in healthy Belgian adults: response in platelet glutathione peroxidase activity and other blood indices*. Am J Clin Nutr, 1988. **48**(1): p. 139-43.
192. Witte, A.V., et al., *Effects of resveratrol on memory performance, hippocampal functional connectivity, and glucose metabolism in healthy older adults*. J Neurosci, 2014. **34**(23): p. 7862-70.
193. Egert, S., et al., *Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans*. J Nutr, 2008. **138**(9): p. 1615-21.

194. Allen, J. and R.D. Bradley, *Effects of oral glutathione supplementation on systemic oxidative stress biomarkers in human volunteers*. J Altern Complement Med, 2011. **17**(9): p. 827-33.
195. Onur, S., et al., *Ubiquinol reduces gamma glutamyltransferase as a marker of oxidative stress in humans*. BMC Res Notes, 2014. **7**: p. 427.
196. Meydani, M., et al., *Beta-carotene supplementation increases antioxidant capacity of plasma in older women*. J Nutr, 1994. **124**(12): p. 2397-403.
197. Li, L., et al., *Supplementation with lutein or lutein plus green tea extracts does not change oxidative stress in adequately nourished older adults*. J Nutr Biochem, 2010. **21**(6): p. 544-9.
198. Devaraj, S., et al., *A dose-response study on the effects of purified lycopene supplementation on biomarkers of oxidative stress*. J Am Coll Nutr, 2008. **27**(2): p. 267-73.
199. Pusparini, et al., *Effect of soy isoflavone supplementation on vascular endothelial function and oxidative stress in postmenopausal women: a community randomized controlled trial*. Asia Pac J Clin Nutr, 2013. **22**(3): p. 357-64.
200. Jacob, R.A., et al., *Moderate antioxidant supplementation has no effect on biomarkers of oxidant damage in healthy men with low fruit and vegetable intakes*. J Nutr, 2003. **133**(3): p. 740-3.
201. Huang, H.Y., K.J. Helzlsouer, and L.J. Appel, *The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2000. **9**(7): p. 647-52.
202. Fischer, C.P., et al., *Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle*. J Physiol, 2004. **558**(Pt 2): p. 633-45.
203. McArdle, F., et al., *Effects of oral vitamin E and beta-carotene supplementation on ultraviolet radiation-induced oxidative stress in human skin*. Am J Clin Nutr, 2004. **80**(5): p. 1270-5.
204. Zhao, X., et al., *Modification of lymphocyte DNA damage by carotenoid supplementation in postmenopausal women*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(1): p. 163-9.
205. Balcerzyk, A., et al., *Enhanced antioxidant capacity and anti-ageing biomarkers after diet micronutrient supplementation*. Molecules, 2014. **19**(9): p. 14794-808.
206. Kim, Y.J., et al., *Daily nutritional dose supplementation with antioxidant nutrients and phytochemicals improves DNA and LDL stability: a double-blind, randomized, and placebo-controlled trial*. Nutrients, 2013. **5**(12): p. 5218-32.
207. Mustafa Nachvak, S., et al., *alpha-Tocopherol supplementation reduces biomarkers of oxidative stress in children with Down syndrome: a randomized controlled trial*. Eur J Clin Nutr, 2014. **68**(10): p. 1119-23.
208. Stamp, L.K., et al., *Clinically insignificant effect of supplemental vitamin C on serum urate in patients with gout: a pilot randomized controlled trial*. Arthritis Rheum, 2013. **65**(6): p. 1636-42.
209. Zhang, K., et al., *Cross-over study of influence of oral vitamin C supplementation on inflammatory status in maintenance hemodialysis patients*. BMC Nephrol, 2013. **14**: p. 252.
210. Lagowska-Lenard, M., Z. Stelmasiak, and H. Bartosik-Psujek, *Influence of vitamin C on markers of oxidative stress in the earliest period of ischemic stroke*. Pharmacol Rep, 2010. **62**(4): p. 751-6.
211. Singer, R.F., *Vitamin C supplementation in kidney failure: effect on uraemic symptoms*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(2): p. 614-20.
212. Fernandes, P.R., et al., *Vitamin C restores blood pressure and vasodilator response during mental stress in obese children*. Arq Bras Cardiol, 2011. **96**(6): p. 490-7.

213. Guo, C.H., et al., *Zinc supplementation alters plasma aluminum and selenium status of patients undergoing dialysis: a pilot study*. *Nutrients*, 2013. **5**(4): p. 1456-70.
214. McNeilly, A.M., et al., *Effect of alpha-lipoic acid and exercise training on cardiovascular disease risk in obesity with impaired glucose tolerance*. *Lipids Health Dis*, 2011. **10**: p. 217.
215. Vidovic, B., et al., *Effect of alpha-lipoic acid supplementation on oxidative stress markers and antioxidative defense in patients with schizophrenia*. *Psychiatr Danub*, 2014. **26**(3): p. 205-13.
216. Shinto, L., et al., *A randomized placebo-controlled pilot trial of omega-3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease*. *J Alzheimers Dis*, 2014. **38**(1): p. 111-20.
217. Porasuphatana, S., et al., *Glycemic and oxidative status of patients with type 2 diabetes mellitus following oral administration of alpha-lipoic acid: a randomized double-blinded placebo-controlled study*. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2012. **21**(1): p. 12-21.
218. Salehi, M., et al., *Selenium supplementation improves the nutritional status of hemodialysis patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. *Nephrol Dial Transplant*, 2013. **28**(3): p. 716-23.
219. Daeian, N., et al., *Selenium supplementation in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: effects on pro-inflammatory cytokines levels*. *Daru*, 2014. **22**: p. 51.
220. Poulsen, M.M., et al., *High-dose resveratrol supplementation in obese men: an investigator-initiated, randomized, placebo-controlled clinical trial of substrate metabolism, insulin sensitivity, and body composition*. *Diabetes*, 2013. **62**(4): p. 1186-95.
221. Boots, A.W., et al., *Quercetin reduces markers of oxidative stress and inflammation in sarcoidosis*. *Clin Nutr*, 2011. **30**(4): p. 506-12.
222. Otero-Losada, M., et al., *Antioxidants supplementation in elderly cardiovascular patients*. *Oxid Med Cell Longev*, 2013. **2013**: p. 408260.
223. Nogueira, C.R., et al., *Effects of supplementation of antioxidant vitamins and lipid peroxidation in critically ill patients*. *Nutr Hosp*, 2013. **28**(5): p. 1666-72.
224. Gariballa, S., et al., *Effect of antioxidants and B-group vitamins on risk of infections in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Nutrients*, 2013. **5**(3): p. 711-24.
225. Ahmadi, A., et al., *Effect of alpha-lipoic acid and vitamin E supplementation on oxidative stress, inflammation, and malnutrition in hemodialysis patients*. *Iran J Kidney Dis*, 2013. **7**(6): p. 461-7.
226. Maric, D., et al., *Multivitamin mineral supplementation in patients with chronic fatigue syndrome*. *Med Sci Monit*, 2014. **20**: p. 47-53.
227. Galasko, D.R., et al., *Antioxidants for Alzheimer disease: a randomized clinical trial with cerebrospinal fluid biomarker measures*. *Arch Neurol*, 2012. **69**(7): p. 836-41.
228. Murer, S.B., et al., *Antioxidant supplements reduced oxidative stress and stabilized liver function tests but did not reduce inflammation in a randomized controlled trial in obese children and adolescents*. *J Nutr*, 2014. **144**(2): p. 193-201.
229. Altincik, A., et al., *Effects of Aloe vera leaf gel extract on rat peritonitis model*. *Indian J Pharmacol*, 2014. **46**(3): p. 322-7.
230. Castilla, P., et al., *Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **84**(1): p. 252-62.
231. Jowko, E., *Green Tea Catechins and Sport Performance*. 2015.
232. Polimeni, L., et al., *Oxidative stress: New insights on the association of non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis*. *World J Hepatol*, 2015. **7**(10): p. 1325-36.

233. Al Rajabi, A., et al., *Choline supplementation protects against liver damage by normalizing cholesterol metabolism in Pemt/Ldlr knockout mice fed a high-fat diet*. J Nutr, 2014. **144**(3): p. 252-7.
234. Dasgupta, A., *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements, Prevention and Treatment of Disease*. Elsevier e - book, 2014.
235. Molyneux, *The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. J. Sci. Techno, 2004. **26**: p. 211-219.
236. Tappel, A.L., *The mechanism of the oxidation of unsaturated fatty acids catalyzed by hematin compounds*. Arch Biochem Biophys, 1953. **44**(2): p. 378-95.
237. Schnitzer, E., et al., *Lipid oxidation in unfractionated serum and plasma*. Chem Phys Lipids, 1998. **92**(2): p. 151-70.
238. Chang W. Cho, et al., *Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay- guided comparison*. . Plant Science, 2002.
239. Brieger, K., et al., *Reactive oxygen species: from health to disease*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13659.
240. Niki, E., *Antioxidants: basic principles, emerging concepts, and problems*. Biomed J, 2014. **37**(3): p. 106-11.
241. Afanas'ev, I., *Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging-Free Radical Theory, Hormesis, and TOR*. Aging Dis, 2010. **1**(2): p. 75-88.
242. Kasote, D.M., et al., *Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications*. Int J Biol Sci, 2015. **11**(8): p. 982-91.
243. Chatzianagnostou, K., et al., *The Mediterranean Lifestyle as a Non-Pharmacological and Natural Antioxidant for Healthy Aging*. Antioxidants (Basel), 2015. **4**(4): p. 719-36.
244. Pham-Huy, L.A., H. He, and C. Pham-Huy, *Free radicals, antioxidants in disease and health*. Int J Biomed Sci, 2008. **4**(2): p. 89-96.
245. Costa, A.S.G., *Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds*. Food Science and Technology 2012: p. 324-328.
246. Henning, S.M., et al., *Variability in the antioxidant activity of dietary supplements from pomegranate, milk thistle, green tea, grape seed, goji, and acai: effects of in vitro digestion*. J Agric Food Chem, 2014. **62**(19): p. 4313-21.
247. Morillas-Ruiz, J., et al., *The effects of an antioxidant-supplemented beverage on exercise-induced oxidative stress: results from a placebo-controlled double-blind study in cyclists*. Eur J Appl Physiol, 2005. **95**(5-6): p. 543-9.
248. Ndhlala, A.R., M. Moyo, and J. Van Staden, *Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules?* Molecules, 2010. **15**(10): p. 6905-30.
249. Ribeiro, D., et al., *Inhibition of LOX by flavonoids: a structure-activity relationship study*. Eur J Med Chem, 2014. **72**: p. 137-45.
250. Mohamed, R., et al., *Ascorbic acid 6-palmitate: a potent inhibitor of human and soybean lipoxygenase-dependent lipid peroxidation*. J Pharm Pharmacol, 2014. **66**(6): p. 769-78.
251. Vlachogianni, I.C., et al., *In vitro assessment of antioxidant activity of tyrosol, resveratrol and their acetylated derivatives*. Food Chem, 2015. **177**: p. 165-73.
252. Das, S., et al., *Isolation and characterization of novel protein with anti-fungal and anti-inflammatory properties from Aloe vera leaf gel*. Int J Biol Macromol, 2011. **48**(1): p. 38-43.
253. Davalos, A., C. Gomez-Cordoves, and B. Bartolome, *Commercial dietary antioxidant supplements assayed for their antioxidant activity by different methodologies*. J Agric Food Chem, 2003. **51**(9): p. 2512-9.

254. Pereira, E., *Chemical characterization of Ginkgo biloba L. and antioxidant properties of its extracts and dietary supplements*. Industrial Crops and Products, 2013. **51**: p. 244–248.
255. Khassaf, M., et al., *Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle*. J Physiol, 2003. **549**(Pt 2): p. 645-52.
256. McGill, C.R., et al., *Beta-carotene supplementation decreases leukocyte superoxide dismutase activity and serum glutathione peroxidase concentration in humans*. J Nutr Biochem, 2003. **14**(11): p. 656-62.
257. Kasperczyk, S., et al., *Effect of N-acetylcysteine administration on the expression and activities of antioxidant enzymes and the malondialdehyde level in the blood of lead-exposed workers*. Environ Toxicol Pharmacol, 2014. **37**(2): p. 638-47.
258. Tsujimoto, Y., H. Hashizume, and M. Yamazaki, *Superoxide radical scavenging activity of phenolic compounds*. Int J Biochem, 1993. **25**(4): p. 491-4.