



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

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

ΜΠΟΤΣΗ ΕΙΡΗΝΗ (ΑΜ: 21144)

ΤΡΙΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ, ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ
ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ

ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
SUMMARY.....	8
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	9
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο : ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	15
1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ	
ΡΙΖΕΣ.....	15
Είδη ελευθέρων ριζών.....	15
Ανιόν υπεροξειδίου.....	16
Ρίζα υδροξυλίου.....	16
Υποχλωριώδες οξύ.....	17
Υπεροξειδίο του υδρογόνου.....	17
Μονοξειδίο του αζώτου.....	17
Υπεροξυ-νιτρώδες οξύ.....	18
1.2 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ.....	19
1.2.1 αναπνευστική αλυσίδα.....	19
σύμπλοκο I αναπνευστικής αλυσίδας.....	20
σύμπλοκο III αναπνευστικής αλυσίδας.....	20
1.2.2 οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.....	21
Αντιδράσεις οξειδασών, οξυγονασών και υπεροξειδασών.....	21
Κυτόχρωμα P450.....	21
NADPH οξειδάση.....	22
1.2.3 προοξειδωτικά μέταλλα.....	23
σίδηρος.....	24
χαλκός.....	25
χρώμιο.....	25
κοβάλτιο.....	26
κάδμιο.....	26
1.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ-ΑΜΥΝΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	26
1.3.1 ενζυμικά αντιοξειδωτικά	28
δισμουτάσης της υπεροξειδάσης (SOD).....	28
Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx).....	30
Καταλάση (CAT).....	32
Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR).....	32
1.3.2 μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	33

1.3.2.1	ενδογενή.....	33
	γλουταθειόνη (GSH).....	33
	A-λιποϊκό οξύ (ALA).....	35
	Μελατονίνη.....	35
	Ουρικό οξύ.....	35
	Χολερυθρίνη (BR).....	36
1.3.2.2	εξωγενή.....	36
	Συνένζυμο Q10 (CoQ).....	36
	Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ).....	37
	Βιταμίνη E	38
	Βιταμίνη A.....	39
	Φλαβονοειδή.....	41
1.3.3	πρωτείνες δέσμησης μετάλλων.....	42
	φερριτίνη.....	42
	αλβουμίνη.....	43
	τρανσφερίνη.....	43
	σερουλοπλασμίνη (CP)	43
1.4	ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ.....	44
	πρωτεΐνες.....	44
	DNA.....	45
	λιπίδια.....	45
1.5	ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ.....	49
	Άμεση ανίχνευση ελευθέρων ριζών.....	49
	Προσδιορισμός οξειδωτικής βλάβης στα λιπίδια.....	49
	Προσδιορισμός οξειδωτικής βλάβης στο DNA.....	50
	Προσδιορισμός οξειδωτικής βλάβης στις πρωτεΐνες.....	50
	Μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων.....	51
	Μέτρηση επιπέδων αντιοξειδωτικών.....	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	: ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	52
2.1	ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	52
2.2	ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ...53	
2.2.1	πηγές οξειδωτικού στρες στα ερυθροκύτταρα.....	55
2.3	ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΑ	
ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	57	
	Οξείδωση αιμοσφαιρίνης.....	57

Οξειδωση διαμεμβρανικών πρωτεϊνών.....	58
Λιπίδια μεμβρανών.....	58
Αντιοξειδωτικά μη ενζυμικά συστήματα.....	59
Αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα.....	60
Οξειδοαναγωγικό σύστημα πλασματικής μεμβράνης	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ , ΝΟΣΟΙ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ	62
3.1 ΝΟΣΟΙ.....	62
Νόσος Alzheimer (CD).....	62
Καρδιαγγειακά(CVD)	63
Καρκίνος.....	64
Γήρανση.....	65
Σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ)	67
Δερματικές παθήσεις.....	68
3.2 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΧΟΡΗΓΗΣΗΣ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ.....	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	80
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	81
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	81
5.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	81
5.1.1 Περιγραφή σχεδιασμού.....	81
5.1.2 συστατικά συμπληρώματος.....	82
5.1.3 Παραλαβή ερυθροκυττάρων.....	82
5.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ GPX1 ΣΤΑ ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ.....	83
5.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΜΕ ΜΕΘΟΔΟ DRABKIN....	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο :ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	88
6.1 ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗ ΣΕ ΥΓΙΕΙΣ ΕΘΕΛΟΝΤΕΣ.....	88
6.1.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών στην αρχή της παρέμβασης (t=0)...	88

6.1.2 Σχέση της δραστηριότητας της GPx1 με τη ποσότητα ομογενοποιηματος ερυθροκυττάρων και κανονικοποίηση δείγματος με γραμμάρια αιμοσφαιρίνης αρχικού δείγματος ερυθροκυττάρων.....	90
6.1.3 Κατανομή δειγμάτων μελέτη.....	91
6.1.4 Η δραστηριότητα της GPx1 πριν την παρέμβαση.....	92
6.1.5 Η συσχέτιση της δραστηριότητας της GPx1 στα ερυθροκύτταρα με τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού πριν την έναρξη της παρέμβασης.....	92
6.1.6 Η συσχέτιση της δραστηριότητας της GPx1 στα ερυθροκύτταρα με υπόλοιπους οξειδωτικούς δείκτες μελέτης πριν την παρέμβαση.....	93
6.1.7 Σύγκριση της δραστηριότητας της GPx1 στα ερυθροκύτταρα ως προς τον χρόνο, την παρέμβαση και την αλληλεπίδρασή τους.....	94
6.1.8 Σύγκριση της δραστηριότητας της GPx1 στα ερυθροκύτταρα κατά τη διάρκεια της παρέμβασης.....	96
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	98
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	103

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η απουσία ισορροπίας ανάμεσα στα προ-οξειδωτικά και αντι-οξειδωτικά μόρια του οργανισμού ονομάζεται οξειδωτικό στρες. Οι ελεύθερες ρίζες που το επάγουν, είναι μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους. Πρόκειται για μόρια πολύ ασταθή και πολύ δραστικά καθώς προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα γειτονικά τους προκαλώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης. Στον οργανισμό, οι βιοχημικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται υπό φυσιολογικές συνθήκες, μπορούν να παράγουν ελεύθερες ρίζες είτε ως προϊόντα είτε ως παραπροϊόντα αντίδρασης. Ένα χαμηλό επίπεδο ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού, ωστόσο σε υπερβολική παραγωγή είναι επικίνδυνες και μπορούν να προκαλέσουν την καταστροφή των βιομόριων (λιπίδια, πρωτεΐνες, DNA) και να οδηγήσουν στον κυτταρικό θάνατο και σε πολλές παθολογικές καταστάσεις. Η παράλληλη ύπαρξη είτε ενδογενών είτε εξογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων και ουσιών μπορεί να συμβάλλει στο σχηματισμό λιγότερο δραστικών μορφών ριζών και στην επιδιόρθωση των επαγόμενων βλαβών.

Τα πρώτα κύτταρα που έρχονται αντιμέτωπα με το οξειδωτικό στρες είναι τα ερυθροκύτταρα. Η ανεπιτυχής αντιμετώπισή του από τα αντιοξειδωτικά συστήματα των κυττάρων αυτών έχει ως αποτέλεσμα τη πρόωρη γήρανσή τους, τη μεταβολή της δομής τους και των λειτουργιών τους καθώς και την πρόκληση βλάβης σε κύτταρα άλλων ιστών με τα οποία έρχονται σε επαφή.

Σκοπός της μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η επίδραση της κατανάλωσης ενός συμπληρώματος διατροφής που περιέχει μια ποικιλία αντιοξειδωτικών ουσιών στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης 1 στα ερυθροκύτταρα, σε υγιείς εθελοντές. Κύριος συστατικό του συμπληρώματος είναι το Gel αλόης και περιέχει επίσης ουσίες όπως εκχυλίσμα πράσινου τσαγιού, εκχυλίσμα *Polygonum cuspidatum*, καθώς και ένα μίγμα βιταμινών.

Η παρέμβαση που πραγματοποιήθηκε ήταν διπλά τυφλή και ελεγχόμενη με εικονικό σκεύασμα. Από τους 58 υγιείς εθελοντές που πήραν μέρος στη μελέτη, οι 28 κατανάλωσαν το εικονικό σκεύασμα και οι 30 κατανάλωσαν το συμπλήρωμα για 8 εβδομάδες. Οι εθελοντές χωρίστηκαν σε τυχαία συνδυασμένες ομάδες σύμφωνα με το φύλο, την ηλικία, το βάρος, το δείκτη μάζας σώματος και την αρτηριακή πίεση. Για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης 1 στα ερυθροκύτταρα πραγματοποιήθηκε *ex vivo* αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου με αναγωγικό μόριο τη γλουταθειόνη. Οι τιμές της δραστικότητας της

GPx1 κανονικοποιήθηκαν με γραμμάρια αιμοσφαιρίνης, η οποία προσδιορίστηκε με μέθοδο Drabkin.

Πριν την έναρξη της παρέμβασης, σε χρόνο 0, δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στους κλασσικούς βιοχημικούς δείκτες και στα χαρακτηριστικά των εθελοντών ανάμεσα στις δύο ομάδες παρέμβασης. Δεν υπήρχε επίσης διαφορά στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης μεταξύ των εθελοντών. Ωστόσο, η δραστικότητα του ενζύμου φαίνεται να συσχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με τα επίπεδα χοληστερόλης και της LDL-χοληστερόλης ($p=0,01$ και $p=0,04$ αντίστοιχα). Μετά το πέρας των 8 εβδομάδων, η δραστικότητα του ενζύμου φάνηκε να αυξάνεται στην ομάδα του εικονικού σκεύασματος και να μειώνεται στην ομάδα του συμπληρώματος, ωστόσο τα ευρήματα αυτά δεν παρασυσιάζουν στατιστική σημαντικότητα. Τέλος, η δραστικότητα του ενζύμου σε επίπεδο εθελοντή και στις δύο ομάδες σε όλες τις χρονικές στιγμές φάνηκε να μην παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά.

Η κατανάλωση του συμπληρώματος για 8 εβδομάδες δεν φάνηκε να επιδρά στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα υγιών εθελοντών.

SUMMARY

The imbalance between pro-oxidants and antioxidant molecules within the body is called oxidative stress. Free radicals are molecules or atoms with one or more unpaired electrons in the outer valence shell. These molecules are very unstable and very reactive as they try to extract electrons from other neighbor molecules causing chain oxidation reactions. In the body, the biochemical reactions that take place under normal conditions can produce free radicals either as products or as a reaction byproduct. A low level of free radicals is necessary to maintain normal physiological function, whereas an excessive production is dangerous and can lead to the biomolecule's destruction (lipids, proteins, DNA) and can lead to cell death or be involved in the pathophysiology of many diseases. The parallel existence of either endogenous or exogenous antioxidants systems or substances can contribute to the formation of less active radical forms and repair the damage induced by free radicals.

The first cells to cope up with oxidative stress are erythrocytes. The unsuccessful function of the antioxidant systems of these cells results in premature aging, changes in their structure and their functions, and in cells damage in other tissues.

The purpose of the study was to evaluate the effect of consumption of a dietary supplement containing a variety of antioxidants in the activity of glutathione peroxidase 1 in red blood cells in healthy volunteers. The main component of the supplement is Aloe Gel and also contains substances such as green tea extract, *Polygonum cuspidatum* extract, and a vitamin mixture.

The intervention was double-blind and placebo controlled. From the 58 healthy volunteers who took part in the study, 28 consumed a placebo and 30 the supplement for eight weeks. The volunteers were randomly divided into groups based on sex, age, weight, body mass index and blood pressure. To determine the activity of glutathione peroxidase 1 in erythrocytes, ex vivo reduction of hydrogen peroxide with a reducing molecule glutathione was performed. The amount of hemoglobin was also determined by Drabkin method.

At time 0, no differentiation was observed in classical biochemical biomarkers and volunteer's characteristics between the two groups. There was also no difference in the activity of glutathione peroxidase among volunteers. However, the enzyme activity appears to correlate inversely with serum cholesterol and LDL-C levels ($p = 0,01$ and $p = 0,04$ respectively). After 8 weeks, the enzyme activity seemed to be increased in the placebo group and decreased in the supplement group, but these findings weren't statistically significant. Finally, the comparison of the enzyme activity in all 3 possible time combinations in each volunteer in both groups wasn't also statistically significant.

The consumption of the supplement for eight weeks did not appear to affect the glutathione peroxidase activity in erythrocytes in healthy volunteers.

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
AD	Alzheimer Disease, νόσος Αλτσχάιμερ
AEE	αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο
AGEs	advanced glycation end products, τελικά προϊόντα προηγμένης γλυκοζυλίωσης
ALA	alpha lipoic acid, άλφα λιποϊκό οξύ
AOPPs	advanced oxidation protein products, προϊόντα πρωτεϊνών προχωρημένης οξείδωσης
ApoE	apolipoprotein E, απολιποπρωτεΐνη E
APP	amyloid precursor protein, πρωτεΐνη πρόδρομος του αμυλοειδούς-β
ASL	airway surface liquid, υγρό επιφάνειας αεραγωγών
ATP	Adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη
α-TP	alpha tocopherol, άλφα τοκοφερόλη
BAI score	Beck Anxiety Inventory score,
βc	β-carotene, β-καροτένιο
BCVA	best-spectacle corrected visual acuity
CAD	coronary disease, στεφανιαία νόσος
CAT	catalase, καταλάση
CBF	cerebral blood flow, εγκεφαλική ροή αίματος
CFS	chronic Fatigue Syndrome, σύνδρομο χρόνιας κόπωσης
CFTR	transmembrane conductance regulator, διαμεμβρανικός ρυθμιστής αγωγιμότητας
Co	cobalt, κοβάλτιο
CoQ	Coenzyme Q, συνένζυμο Q

CP	ceruloplasmin, σερουλοπλασμίνη
CRP	C-reactive protein, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
CuZnSOD/SOD1	copper zinc superoxide dismutase, υπεροξειδική δισμουτάση χαλκού-ψευδαργύρου
CVD	cardiovascular disease, καρδιαγγειακές ασθένειες
CYP	cytochrome P, κυτόχρωμα P
ΔΜΣ	δείκτης μάζας σώματος
DMSO	dimethyl sulfoxide, διμεθυλο-σουλφοξειδίο
DNA	Deoxyribonucleic acid, Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DPPH	1,1 diphenyl-2-picryl-hydrazyl, 1,1 διφαινύλο-2-πικρυλ-υδραζύλιο
EC	epicatechin, επικατεχίνη
ECG	epicatechin gallate, επικατεχίνη gallate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
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
FBG	free blood glucose, ελεύθερη γλυκόζη αίματος
Ferry Hb	ferryhemoglobin
FMN	flavin mononucleotide, φλάβινο-μονονουκλεοτίδιο
FRT	flash recovery time, χρόνος αποκατάστασης

FSHD Facioscapulohumeral muscular dystrophy, μυϊκή δυστροφία
 GAPDH glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεριναλδεΐδης
 GC Gas chromatography, αέρια χρωματογραφία
 GFR glomerular filtration rate, ρυθμός σπειραματικής διήθησης
 GHS glucose-induced insulin secretion, έκκριση ινσουλίνης που προκαλείται από γλυκόζη
 GPx glutathione peroxidase, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
 GSSG glutathione disulfide, δισουλφίδιο γλουταθειόνης
 GSH glutathione, γλουταθειόνη
 GTE green tea extract, εκχύλισμα πράσινου τσαγιού
 GR glutathione reductase, αναγωγή της γλουταθειόνης
 HAT hydrogen atom transfer, μεταφορά ατόμου υδρογόνου
 Hb hemoglobin, αιμοσφαιρίνη
 HbA1c Glycated hemoglobin (hemoglobin A1c), γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη
 HDL high density lipoprotein, υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
 HG high glucose, υψηλή γλυκόζη
 HOMA Homeostasis Model Assessment, μοντέλο αξιολόγησης ομοιόστασης
 4-HNE 4-hydroxynonenal, 4-υδροξυνονενάλη
 HNO₂ nitrous acid, νιτρώδες οξύ
 15-HPETE 15-υδρουπεροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ
 HPLC-HPCE Coulometric Electrode Array Detectors for Hplc
 13-HPODE 13-υδρουπεροξυδεκαοκταδιενοϊκό οξύ
 HRP Horseradish peroxidase,
 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

LIP labile Iron Pool

LOO· lipid peroxide radical, ρίζα λιποξειδικού υπεροξειδίου

LOOH hydroperoxide, υδρουπεροξειδίο

LOX lipoxygenase, λιποξυγονάση

LPO lactoperoxidase, λακτουπεροξειδάση

MAPK mitogen-activated protein kinase, πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνο ουσία

Met Hb methemoglobin, μεθαιμοσφαιρίνη

MetSox methionine sulfoximine, σουλφοξειδίο μεθειονίνης

MCP-1 monocyte chemotactic protein, χημειοτακτική πρωτεΐνη μονοκυττάρων

MDA malondialdehyde, μηλονιλοδιαδεύδη

MnSOD/SOD2 manganese superoxide dismutase, υπεροξειδική δισμουτάση μαγγανίου

MPOD Macular Pigment Ocular Densitometer

MS mass spectrometry, φασματομετρία μάζας

MtDNA mitochondrial DNA, μιτοχονδριακό DNA

MVCQD maximal voluntary contraction of the dominant quadriceps, μέγιστη εκούσια συστολή των τετρακεφάλων

MVCQND maximal voluntary contraction of the nondominant quadriceps, μέγιστη εκούσια συστολή των μη κυρίαρχων τετρακεφάλων

2-MWT two-minute walking test

NAD(P)H Nicotinamide-adenine (phosphate) dinucleotide, νικοτινάμιδο-αδένινο (φωσφορικό) δινουκλεοτίδιο

NF-κβ Nuclear factor- κβ, πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας-κβ

NFTs νευροινιδιακά συσσωματώματα

Nox NADPH oxidase, NADPH οξειδάση

8-OHdG 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανοσίνη

8-OHGua 8-hydroxyguanosine, 8-υδροξυγουανοσίνη

Oxy Hb oxidized hemoglobin, oxyhemoglobin οξειδωμένη αιμοσφαιρίνη

OxLDL oxidized low-density lipoprotein, οξειδωμένη πρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας.

P placebo

P-450 Cytochromes P-450, κυτόχρωμα 450

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, φωσφατιδυλαικανολαμίνη

PEMT phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, N-μεθυλοτρανσφεράση της φωσφατιδυλαικανολαμίνης

PGF2a prostaglandin F2a, προσταγλαδίνη

PGH2 prostaglandin H2, προσταγλανδίνη

PKC protein kinase c, πρωτεϊνική κινάση c

PMRS Plasma membrane redox system, οξειδοαναγωγικό σύστημα μεμβράνης

H2 PUFA polyunsaturated fatty acids, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα

RBC red blood cells, ερυθροκύτταρα

RNS reactive nitrogen species, ενεργές μορφές αζώτου

RO- alkoxide radical, ρίζα αλκοξειδίου

ROS reactive oxygen species, ενεργές μορφές οξυγόνου

RS- sulfide radical, θειούχος ρίζα

RST Repeated cycle sprint test

SIRT sirtuin, από-ακετυλάσες ιστονών

SCN- thiocyanate, θειοκυανιούχο ανιόν

sP-selectin, Soluble platelet selectin, διαλυτά αιμοπετάλια σελεκτίνης

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

TlimQ time endurance limit of Quadriceps, μέγιστο όριο αντοχής

TGL triacylglyceride, τριγλυκερίδια

TGF-β Transforming growth factor beta, αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β

TNF-α tumor necrosis factor α, παράγοντας νέκρωσης όγκων α

Tris tris-hydroxymethyl-aminomethane, τρι-υδροξυλαμινομεθάνιο

TXA2 thromboxane A2, θρομβοξανθίνη A2

UA uric acid, ουρικό οξύ

UCP2 uncoupling protein 2

VCAM-1 vascular adhesion molecule 1, μόριο αγγειακής κυτταρικής προσκόλλησης 1

VO2 max maximal oxygen consumption, μέγιστη ποσότητα κατανάλωσης οξυγόνου

WST-1 4-[3-(nitrophenyl)-2H-5-tetrazole]-1,3-benzene disulfonate, 4-[3-(νιτροφαινυλ)-2H-5-τετραζόλιο]-1,3-βένζολο δισουλφονικό

XNN χρόνια νεφρική νόσος

Κεφάλαιο 1^ο : Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως η κατάσταση έλλειψης ισορροπίας ανάμεσα στα προ-οξειδωτικά και αντι-οξειδωτικά μόρια. Προ-οξειδωτικά μόρια είναι εκείνα που προκαλούν και επάγουν την οξείδωση, ενώ τα αντι-οξειδωτικά είναι εκείνα που την αναστέλλουν. Το οξειδωτικό στρες προκαλείται από μια ανισορροπία στην οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου, είτε με υπερπαραγωγή των δραστικών μορίων οξυγόνου ή από δυσλειτουργία των αντιοξειδωτικών συστημάτων, με αποτέλεσμα την πρόκληση πολλαπλών παθολογικών καταστάσεων στον οργανισμό.^[1]

1.1 Ελεύθερες ρίζες

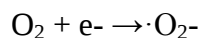
Με τον όρο ελεύθερη ρίζα περιγράφεται ένα μόριο ή άτομο που διαθέτει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα και έχει την ικανότητα ανεξάρτητης ύπαρξης στο χώρο. Οι ελεύθερες ρίζες λόγω αυτής της ηλεκτρονιακής δομής είναι πολύ ενεργά και ασταθή μόρια και έχουν την τάση να αντιδρούν εύκολα παίρνοντας ένα ηλεκτρόνιο από τα γειτονικά τους μόρια ή να γίνονται δότες ηλεκτρονίων. Τα γειτονικά αυτά μόρια μετατρέπονται ακολούθως τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες, οι οποίες αντιδρώντας στη συνέχεια με νέα μόρια θα επάγουν την παραγωγή νέων ριζών. Με αυτόν τον τρόπο διαταράσσεται η ισορροπία στο κύτταρο και ξεκινά μία αλυσιδωτή αντίδραση που έχει ως αποτέλεσμα την κυτταρική βλάβη. Ουσίες-στόχοι των δραστικών αυτών μορίων είναι διάφορα βιομόρια του οργανισμού συμπεριλαμβανομένου των πρωτεϊνών, υδατανθράκων, λιπιδίων και του DNA.

Είδη ελεύθερων ριζών

Ο όρος ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) είναι πιο γενικός και χρησιμοποιείται για την περιγραφή πολύ δραστικών μορίων. Ανάμεσα σε αυτά τα μόρια είναι και οι ελεύθερες ρίζες που περιέχουν οξυγόνο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελεύθερων ριζών είναι το μονήρες οξυγόνο ($\frac{1}{2} O_2$), το ανιόν υπεροξειδίου ($\cdot O_2^-$), η ρίζα υδροξυλίου ($HO\cdot$), η ρίζα υπεροξειδίου ($ROO\cdot$) και η ρίζα αλκοξειδίου ($RO\cdot$). Υπάρχουν, επίσης, πολύ δραστικά μόρια όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$). Αντίστοιχα, ελεύθερες ρίζες που περιέχουν άζωτο ονομάζονται ενεργές μορφές αζώτου (RNS). Το μονοξείδιο του αζώτου ($NO\cdot$) και το διοξείδιο του αζώτου ($NO_2\cdot$) είναι ελεύθερες ρίζες αυτής της μορφής. Ωστόσο, σε αυτή συγκαταλέγονται και άλλες αζωτούχες ενώσεις που είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται γρήγορα σε ελεύθερες ρίζες όπως το υπεροξυ-νιτρώδες ανιόν ($ONOO^-$) και το νιτρώδες ανιόν (NO_2^-). Τέλος, υπάρχουν δραστικά μόρια που περιέχουν σίδηρο, χαλκό και θείο.

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

Με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο δημιουργείται η ελεύθερη ρίζα του ανιόντος του υπεροξειδίου.

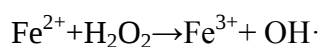


Κύρια κυτταρική πηγή παραγωγής της ρίζας αυτής στον οργανισμό είναι τα μιτοχόνδρια και παράγεται τόσο ενζυμικά όσο και μη ενζυμικά. Η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι η κύρια πηγή του ATP στο κύτταρο και ως εκ τούτου είναι απαραίτητη για τη ζωή. Το ποσοστό διαρροής ηλεκτρονίων από την αλυσίδα μεταφοράς είναι γύρω στο 1-3% και οδηγεί στο σχηματισμό των ελευθέρων ριζών υπεροξειδίου, οι οποίες έχουν εμπλακεί στην παθοφυσιολογία μιας ποικιλίας ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, το ανιόν του υπεροξειδίου παράγεται από το μοριακό οξυγόνο μέσω των παρακάτω οδών : 1) της οξείδωσης του NADPH από την οξειδάση του NADPH, 2) της οξείδωσης της ξανθίνης ή υποξανθίνης από την οξειδάση της ξανθίνης, 3) της οξείδωσης αναγωγικών ισοδυνάμων μέσω της μιτοχονδριακής μεταφοράς ηλεκτρονίων, 4) της αυτοοξείδωσης μονοαμινών όπως ντοπαμίνη, νορεπινεφρίνη και επινεφρίνη, των φλαβινών και της αιμοσφαιρίνης παρουσία ποσότητας μετάλλων μετάπτωσης, 5) της μείωσης κατά ένα ηλεκτρόνιο από το μοριακό οξυγόνο από το κυτόχρωμα P -450 και 6) της μείωσης κατά ένα ηλεκτρόνιο από τις διάφορες ισομορφές της συνθάσης του μονοξειδίου του αζώτου όταν η αργινίνη και η τετραυδροβιοπτερίνη είναι σε μικρή ποσότητα.

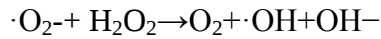
Το ανιόν του υπεροξειδίου μπορεί επίσης να απελευθερώνει σίδηρο από τις σιδηροπρωτεΐνες και μεταλλοπρωτεΐνες επιτείνοντας την οξειδωτική τους δράση και να υποστεί αυτοοξειδοαναγωγή (dismutation), είτε αυθόρμητα, είτε από ένζυμα που λέγονται υπεροξειδικές δισμουτάσες (superoxide dismutases, SOD) και να μετατραπεί σε υπεροξείδιο το υδρογόνου. Η αντίδραση αυτή αποτελεί βασική πηγή του H_2O_2 στα κύτταρα. Τέλος, συμμετέχει στις αντιδράσεις Haber -Weiss και Fenton προς παραγωγή δισθενούς σιδήρου και $\text{OH}\cdot$ αντίστοιχα.

Ρίζα υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$)

Η ρίζα υδροξυλίου είναι πολύ δραστική με αποτέλεσμα να αντιδρά με όλα τα οργανικά μόρια όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια και DNA. Ο χρόνος ημιζωής in vivo είναι πολύ μικρός με αποτέλεσμα να αντιδρά κοντά στο σημείο σχηματισμού της, όταν παράγεται. Υπό συνθήκες στρες, η περίσσεια $\cdot\text{O}_2^-$ απελευθερώνει 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

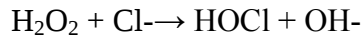


Το ανιόν υδροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$) συμμετέχει στην αντίδραση Haber-Weiss προς σχηματισμό ρίζας υδροξυλίου



Υποχλωριώδες οξύ (HOCl)

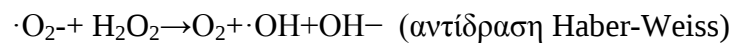
Το υποχλωριώδες οξύ παράγεται από τη δράση του ενζύμου μυελοϋπεροξειδάση, η οποία εκκρίνεται ύστερα από κατάλληλη διέγερση από τα φαγοκύτταρα και τα ουδετερόφιλα. Το ένζυμο καταλύει την παρακάτω αντίδραση



Στη συνέχεια, μπορεί να αντιδράσει είτε με O_2^- είτε Fe^{2+} και να δώσει ρίζες υδροξυλίου ($\text{OH}^\cdot$) που έχουν μεγαλύτερη οξειδωτική ικανότητα.

Υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2)

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου δεν θεωρείται ελεύθερη ρίζα αλλά ασθενής οξειδωτικός παράγοντας. Μπορεί να μετατραπεί με την αντίδραση Fenton και με την αντίδραση Haber-Weiss σε $\text{OH}^\cdot$ με ενζυμικά, παρουσία ιόντων μετάλλων (Cu^{2+} , Fe^{2+}).



Στη συνέχεια, μπορεί να διαχέεται μέσα στα οργανίδια του κυττάρου όπως τα μιτοχόνδρια.

Μονοξειδίου του αζώτου ($\text{NO}^\cdot$)

Το μονοξείδιο του αζώτου παράγεται κατά την οξείδωση της L-αργινίνης σε κιτρουλίνη με την βοήθεια του ενζύμου της συνθάσης του NO. Σε μικρές συγκεντρώσεις έχει σημαντικές βιολογικές δράσεις όπως διαστολή και αναστολή των αγγείων της συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Ωστόσο, σε μεγάλες ποσότητες μπορεί να έχει τοξική δράση, όταν αντιδρά με το O_2 ή το O_2^- και σχηματίζει ενεργές μορφές αζώτου.

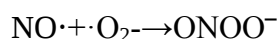


Εικόνα 1: ενζυμική παραγωγή της ρίζας του μονοξειδίου του αζώτου από L-αργινίνη

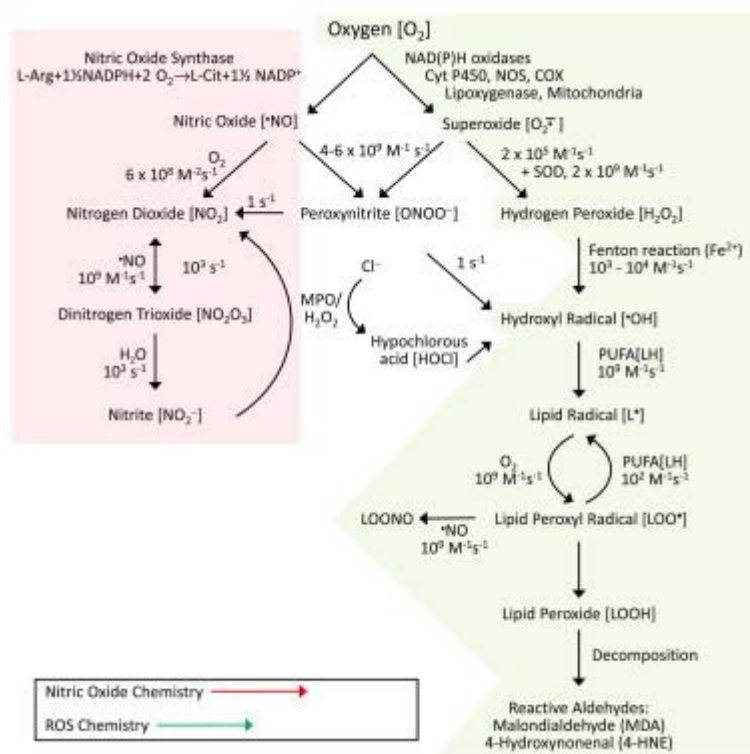
(Πηγή:Kalyanaraman B, Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms, Redox Biol. 2013 Feb 8;1:244-57. doi: 10.1016/j.redox.2013.01.014.)

Υπεροξυ-νιτρώδες οξύ (ONOO⁻)

Το υπεροξυ-νιτρώδες οξύ παράγεται από την αντίδραση του ανιόντος του υπεροξειδίου και του μονοξειδίου του αζώτου.



Η παραπάνω αντίδραση μπορεί να λάβει χώρα ανεξάρτητα από την παρουσία αντιοξειδωτικών ενζύμων. Πρόκειται για έναν ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα με μεγάλη ικανότητα διάχυσης σε διάφορα είδη μορίων όπως πρωτεΐνες και θειαλκόλες. Συμβάλλει στην παραγωγή του NO₂[·] που συμμετέχει στην έναρξη της λιποξειδικής υπεροξειδωσης και NO₂[·] που συμμετέχει σε αντιδράσεις νίτρωσης αρωματικών δακτυλίων (πχ. Νιτρο-τυροσίνη ή νιτρο-γουανοσίνη). Το N₂O₃ είναι παράγοντας νιτροζυλίωσης.



Εικόνα 2: 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 Κυτταρικές πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

Οι διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις του μεταβολισμού που πραγματοποιούνται στον οργανισμό υπό φυσιολογικές συνθήκες μπορούν να αποτελέσουν πηγή παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS). Σε μερικές αντιδράσεις αποτελούν προϊόν αντίδρασης και σε άλλες αποτελούν τα παραπροϊόντα των βιοχημικών πορειών. Παρακάτω αναφέρονται οι κυριότερες πηγές που μπορούν να συναντηθούν στον οργανισμό.

1.2.1 Αναπνευστική αλυσίδα

Η οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι η κυριότερη διαδικασία παραγωγής ATP στους αερόβιους οργανισμούς. Είναι η διαδικασία σύνθεσης (φωσφορυλίωσης) ATP που συμβαίνει όταν τα NADH και FADH₂ (που προέκυψαν από τον κύκλο του Krebs) οξειδώνονται δίνοντας ηλεκτρόνια στο O₂ με τη βοήθεια-παρεμβολή φορέων ηλεκτρονίων που ονομάζονται αναπνευστική αλυσίδα. Οι φορείς-διαμεσολαβητές της αναπνευστικής αλυσίδας είναι τα τρία ενζυμικά συμπλέγματα (αφυδρογονάση του NADH , η αφυδρογονάση του ηλεκτρικού οξέος και η κυτοχρωμική αναγωγή) και οι δύο μεταφορείς ηλεκτρονίων (ουβικινόνη Q και κυτόχρωμα c). Το μοριακό οξυγόνο στη συνέχεια θα αναχθεί σε νερό για την παραγωγή χημικής ενέργειας ATP. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η μεταφορά ηλεκτρονίων και η οξειδωτική φωσφορυλίωση πραγματοποιούνται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου.

Το μιτοχονδριακό αυτό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων θεωρείται η κύρια πηγή παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου υπό φυσιολογικές συνθήκες στον οργανισμό. Παρ' όλο που η μεταφορά ηλεκτρονίων από το νερό στο οξυγόνο μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας πραγματοποιείται σε κλειστό σύστημα, χωρίς την απελευθέρωση δραστικών ενδιάμεσων, είναι πιθανό να διαφύγουν ηλεκτρόνια. Πιθανό σημείο διαφυγής ηλεκτρονίων αποτελεί ο κύκλος της ουβικινόνης, όπου είναι το σημείο δράσης των κυτοχρωμάτων. Η ύπαρξη της ελεύθερης ημικινόνης στο εσωτερικό της μεμβράνης επιτρέπει την τυχαία μεταφορά ηλεκτρονίου σε O₂ και το σχηματισμό του O₂⁻.

Πιο συγκεκριμένα, η διαρροή ηλεκτρονίων συμβαίνει γιατί δεν μεταφέρονται και τα δύο ηλεκτρόνια των NADH και FADH₂ στην ουβικινόνη και ημικινόνη αλλά μόνο το ένα. Η διαρροή αυτή κατά την δράση της αφυδρογονάσης του NADH (γνωστό και ως σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας) και της κυτοχρωμικής αναγωγής (γνωστή και ως σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας) οδηγεί στη δημιουργία και σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και ανιόντος υπεροξειδίου (O₂⁻) Το ανιόν υπεροξειδίου μπορεί να μετατραπεί σε υπεροξείδιο υδρογόνου με τη δράση της μιτοχονδριακής δισμουτάσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου Mn-SOD. Ωστόσο και οι παραπάνω δύο ρίζες μπορούν να συμβάλλουν στο σχηματισμό της ρίζας υδροξυλίου (OH⁻) μέσω της αντίδρασης Fenton και της αντίδρασης Haber-Weiss. Τα μιτοχόνδρια ως κύρια πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών στον οργανισμό ,

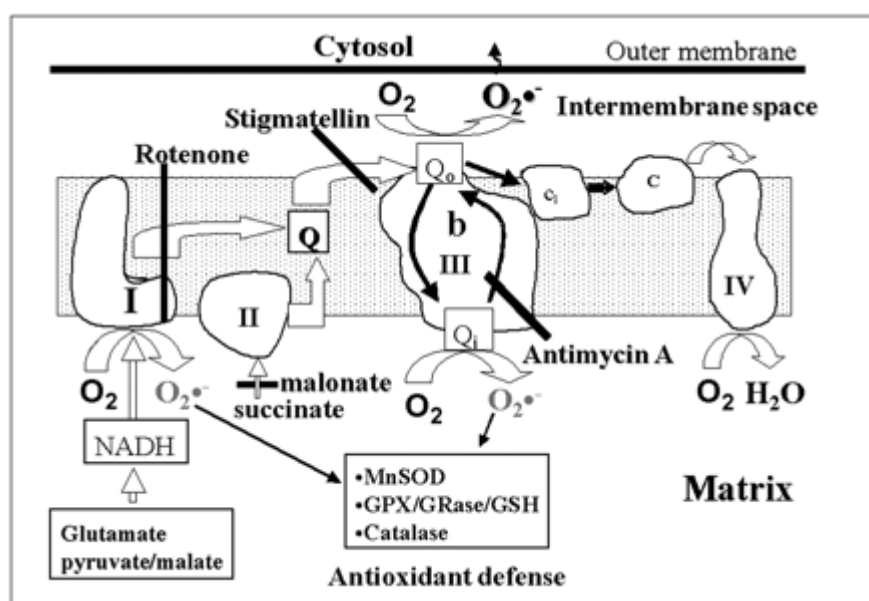
είναι πλούσια επίσης σε αντιοξειδωτικά μόρια όπως ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), δισμουτάση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (SOD) και υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx).

Σύμπλοκο I αναπνευστικής αλυσίδας

Η αφυδρογονάση του NADH που αποτελεί το σύμπλοκο I της αναπνευστικής αλυσίδας, βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη από την πλευρά της μήτρας, αποτελείται από 42 διαφορετικές πεπτιδικές αλυσίδες συμπεριλαμβανομένης μίας FMN-φλαβινο-πρωτεΐνης και έχει τουλάχιστον 6 κέντρα FeS. Οι πρωτεΐνες FeS του συμπλόκου αποτελούν πιθανό σημείο διαρροής ηλεκτρονίων. Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας της δομής του συμπλόκου αυτού, γνωρίζουμε πολύ λιγότερα πράγματα για τον ακριβή σχηματισμό του ανιόντος του υπεροξειδίου. Η οξειδωτική παραγωγή του συμπλόκου αυτού κατευθύνεται κατευθείαν στη μήτρα, η οποία έρχεται αντιμέτωπη με τα αντιοξειδωτικά μόρια της μήτρας.

Σύμπλοκο III αναπνευστικής αλυσίδας

Η αλυσίδα κυτοχρωμάτων (b, c₁ και c) που αποτελεί το σύμπλοκο III της αναπνευστικής αλυσίδας αποτελεί επίσης βασικό σημείο διαρροής ηλεκτρονίων. Έχει δύο κέντρα: το κέντρο Q_i που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη είναι προσανατολισμένο προς τη μήτρα και το κέντρο Q_o είναι προσανατολισμένο προς τον ενδιάμεσο χώρο. Το ανιόν του υπεροξειδίου (O₂⁻) που παράγεται από το κέντρο Q_i είναι πιθανό να εισέλθει στη μήτρα, ενώ το O₂⁻ που παράγεται από το κέντρο Q_o απελευθερώνεται στον ενδιάμεσο χώρο. Συνεπώς, η οξειδωτική παραγωγή από το κέντρο Q_i κατευθύνεται στη μήτρα όπως και του συμπλόκου I της αναπνευστικής αλυσίδας, όπου θα αντιμετωπιστεί από τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, ενώ η οξειδωτική παραγωγή του κέντρου Q_o κατευθύνεται στον ενδιάμεσο χώρο, όπου δεν υπάρχει αντιοξειδωτική δράση.^[5,6,7]



Εικόνα 3: Απεικόνιση της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που δείχνει τις θέσεις της παραγωγής δραστικών ειδών οξυγόνου. (πηγή: J. Biol.Chem.2003, 278:36027-36031.doi:10.1074/jbc)

1.2.2 Οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις

Αντιδράσεις οξειδασών, οξυγονασών και υπεροξειδασών

Οι οξειδάσες, οι οξυγονάσες και οι υπεροξειδάσες είναι ένζυμα που χρησιμοποιούν το οξυγόνο ως υπόστρωμα και επομένως παράγουν ROS ως προϊόντα των αντιδράσεων που καταλύουν. Πιο συγκεκριμένα, δεσμεύουν O_2 και μεταφέρουν μονήρη ηλεκτρόνια σε αυτό μέσω ενός μετάλλου. Ελεύθερες ρίζες, που είναι ενδιάμεσα αυτών των αντιδράσεων μπορούν να απελευθερωθούν τυχαία πριν ολοκληρωθεί η αναγωγή του O_2 . Τέτοια ένζυμα είναι τα εξής:

I) οξειδάση της ξανθίνης, η οποία είναι φλαβοπρωτεΐνη που περιέχει σίδηρο και μόλυβδο και καταλύει την μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και στη συνέχεια σε ουρικό οξύ με ταυτόχρονη απελευθέρωση $\cdot O_2^-$ και H_2O_2 ως παραπροϊόντα.^[9]

II) μονοαμινοξειδάση, η οποία αποικοδομεί τη ντοπαμίνη στα μιτοχόνδρια των νευρώνων και απελευθερώνει H_2O_2 .

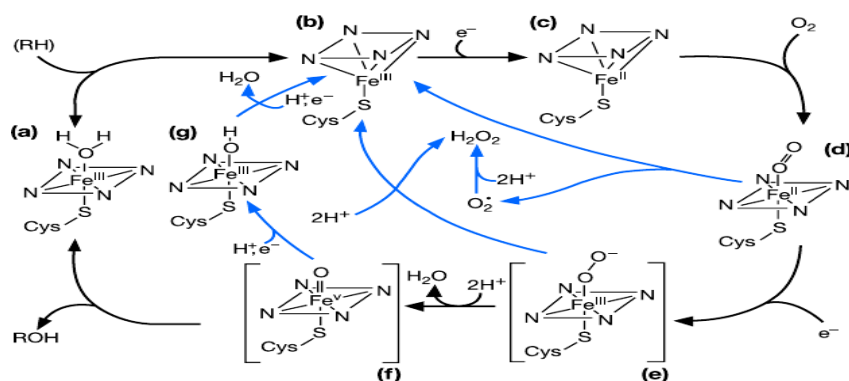
III) οξειδάση των λιπαρών οξέων, η οποία παράγει H_2O_2 κατά την οξείδωση των λιπαρών οξέων της ανθρακικής αλυσίδας.

IV) κατά τη δράση των ενζύμων κυκλοοξυγονάση και λιποξυγονάση παράγονται λιποειδικά υπεροξείδια^[11]

V) Η οξείδωση της αιμοσφαιρίνης στα ερυθροκύτταρα είναι επίσης σημαντική πηγή O_2^- . Περίπου, το 3% της αιμοσφαιρίνης οξειδώνεται από οξυαιμοσφαιρίνη ($Fe^{2+} - O_2$) σε μετ-αιμοσφαιρίνη ($Fe^{3+} - O_2^-$) που μπορεί να οδηγήσει στη διάσπαση και απελευθέρωση O_2^- .

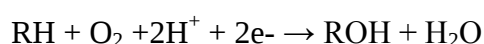
Το H_2O_2 και τα λιπιδικά υπεροξείδια παράγονται ενζυμικά από αρκετές οξειδάσες που βρίσκονται στα υπεροξυσώματα, μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Κυτόχρωμα P₄₅₀



Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση του καταλυτικού κύκλου του κυτοχρώματος P-450 (Πηγή: Richard C. Zangar, Dimitri R. Davydov, Seema Verma, Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P-450, Toxicology and Applied Pharmacology 199 316— 331, 2004)

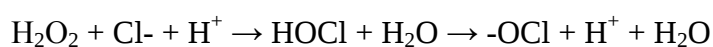
Το κυτόχρωμα P₄₅₀ είναι μια μεγάλη ομάδα ενζύμων που καταλύουν την οξείδωση υδρόφοβων οργανικών μορίων.^[7] Ωστόσο, όλες οι αντιδράσεις που εξαρτώνται από το κυτόχρωμα P₄₅₀ συναντώνται στο ήπαρ, στον γαστρεντερικό σωλήνα, στους νεφρούς και στους πνεύμονες και παράγουν σημαντικές ποσότητες ROS στον οργανισμό. Η πιο κοινή αντίδραση παραγωγής ROS 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.^[7] Υπάρχουν δύο πορείες διέλευσης των ηλεκτρονίων από το NADPH προς τα CYPs: στο ενδοπλασματικό δίκτυο (στα μικροσωμάτια) και στα μιτοχόνδρια. Στα μικροσωμάτια, τα ηλεκτρόνια εισέρχονται στο CYP μέσω της P₄₅₀ αναγωγάσης που αποτελείται από δύο συνένζυμα (FAD και FMN), ενώ η μεταφορά των ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια εξαρτάται από τη δράση της αναγωγάσης της αδρενοδοξίνης (φλαβοπρωτεΐνες) και την αδρενοδοξίνη (FeS πρωτεΐνη). Κατά τις καταλυτικές αντιδράσεις του κύκλου του CYP απελευθερώνεται σημαντική ποσότητα οξυγόνου και παράγεται ·O₂- ή H₂O₂. Οι ROS που παράγονται εξ' αιτίας του κυτοχρώματος P-450 προκαλούν υπεροξείδωση των λιπιδίων.^[8]

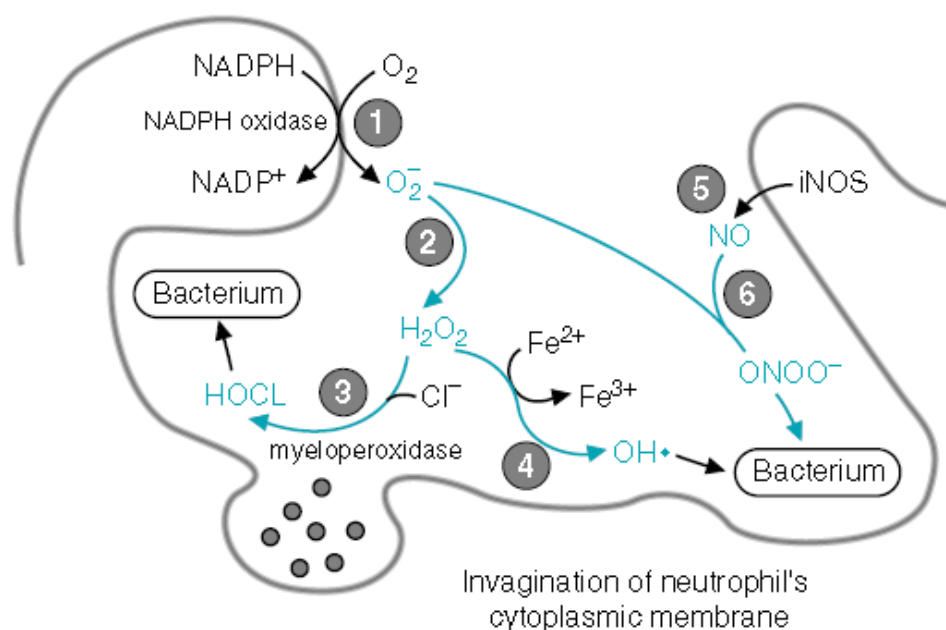
NADPH οξειδάση

Σε απόκριση μολυσματικών παραγόντων, τα φαγοκύτταρα (ουδετερόφιλα, ηωσινοφιλα, μονοκύτταρα/μακροφάγα), καταναλώνουν πολύ O₂ με μία διαδικασία που λέγεται αναπνευστική έκρηξη. Η αναπνευστική έκρηξη αποτελεί βασική πηγή O₂·-, H₂O₂, HO·, HOCl και RNOS. Σκοπός είναι η καταστροφή των μικροοργανισμών, καρκινικών κυττάρων και άλλων κυττάρων που πρέπει να απομακρυνθούν από τον οργανισμό. Η παραγωγή O₂·- γίνεται από την NADPH οξειδάση που καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο O₂ προς σχηματισμό O₂·-. Το παραγόμενο O₂·- μετατρέπεται στον διαμεμβρανικό χώρο του φαγολυσωσώματος σε H₂O₂ και άλλα ROS τα οποία καταστρέφουν βακτήρια και άλλα παθογόνα. Παράλληλα, το υποχλωριώδες οξύ παράγεται από την μυελουπεροξειδάση, ένα ένζυμο που περιέχει αίμη και βρίσκεται στα φαγοκυτταρικά κύτταρα (κυρίως ουδετερόφιλα).



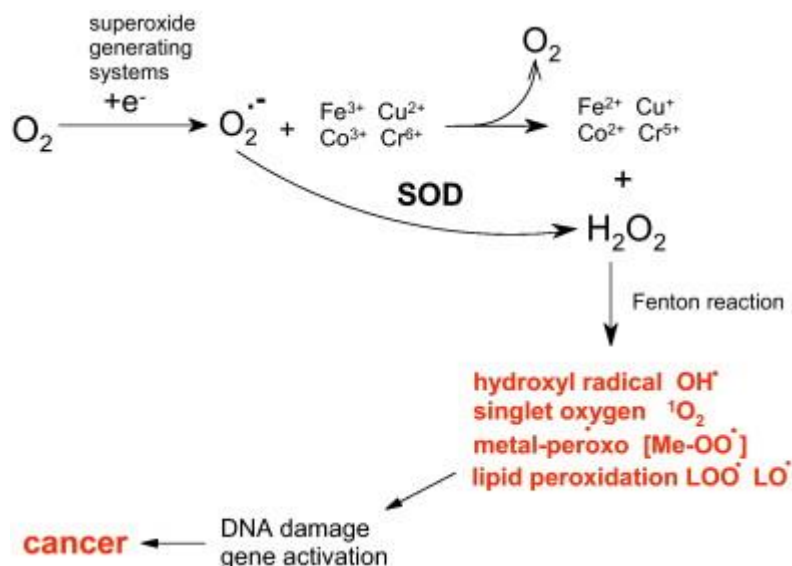
Το υποχλωριώδες οξύ είναι πολύ δραστική τοξίνη που καταστρέφει βακτήρια. Παράλληλα, οξειδώνει πολλές ομάδες που περιέχουν Fe και S, αποκαρβοξυλιώνει και απαμινώνει οξειδωτικά και διασπά πεπτιδικούς δεσμούς.

Κάτω από συνθήκες φλεγμονής υπερεκφράζονται τόσο η NADPH οξειδάση όσο και η μυελοπεροξειδάση οδηγώντας, αφενός μεν στην καταστροφή του μικροοργανισμού αλλά παράλληλα και την καταστροφή του γειτονικού ιστού.



Εικόνα 5: Απεικόνιση της δράσης της NADPH οξειδάσης κατά τη φλεγμονώδη απόκριση.

1.2.3 Προ-οξειδωτικά μέταλλα



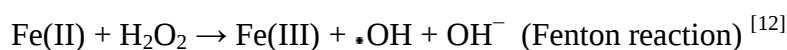
Εικόνα 6: Μονοπάτια παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου από οξειδοαναγωγικά ενεργά μέταλλα (πηγή : Toxicology, Volume 283, Issues 2–3, 10 May 2011, Pages 65–87, Advances in metal-induced oxidative stress and human disease)

Σε μια ευρεία ποικιλία βιολογικών διεργασιών στους ζωντανούς οργανισμούς η ομοιόσταση των μετάλλων, όντας καθοριστικής σημασίας για τη ζωή, διατηρείται μέσα σε αυστηρά όρια μέσω μηχανισμών ρύθμισης κατά τα στάδια της πρόσληψης, αποθήκευσης και έκκρισης.^[12] Η διαταραχή της ομοιόστασης των ιόντων μετάλλων μπορεί να οδηγήσει στην υπερπαραγωγή των ενεργών μορφών οξυγόνου όπως ιόν υπεροξειδίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου και ρίζα υδροξυλίου και έχει συνδεθεί με μια πληθώρα νοσημάτων. Μελέτες έχουν δείξει ότι μέταλλα όπως ο σίδηρος, ο χαλκός, το κάδμιο, το χρώμιο, το βανάδιο συμμετέχουν σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, όπου χάνουν ένα ηλεκτρόνιο και σχηματίζουν ρίζα, η οποία μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο και να σχηματίσει ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-) με σκοπό την αναγέννηση του μητρικού μορίου (redox recycling)^[12,15]. Η παραπάνω διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τη δυσανάλογη κατανάλωση O_2 και των κυτταρικών αναγωγικών ισοδυνάμων, η οποία τελικά θα προκαλέσει το οξειδωτικό στρες^[14,15]. Επιπλέον, μέταλλα όπως το κάδμιο, ο υδράργυρος, ο μόλυβδος και το νικέλιο μπορεί να συμβάλλουν στην καταστροφή της γλουταθειόνης και των σουλφυδρυλομάδων πρωτεϊνών.^[14] Ως δυσμενείς συνέπειες των παραπάνω καταστάσεων εμφανίζονται η αυξημένη υπεροξειδωση λιπιδίων, η βλάβη του DNA, η τροποποίηση και αλλοίωση της ομοιόστασης του ασβεστίου και των σουλφυδρυλικών ομάδων.^[12,14] Σε διαμεμβρανικό επίπεδο διάφορων σωματιδίων όπως μιτοχόνδρια, υπεροξυσώματα και μικροσώματα αντιδράσεις τύπου Fenton αποτελούν αιτία οξειδωτικής δραστηριότητας. Άλλη πηγή ROS που σχετίζεται με την ομοιόσταση των ιόντων μετάλλων είναι τα φαγοκυτταρικά κύτταρα. Επιπρόσθετα, τα μέταλλα είναι ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης αλληλεπιδρώντας με οδούς μεταγωγής σήματος που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ολική και κυτταρική ανάπτυξη. Συνεπώς, σε κατάσταση μη ομοιόστασης μπορούν να συμβάλλουν στην απορύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού ενεργοποιώντας παράγοντες μεταγραφής, στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και της κυτταρικής απόπτωσης. Τα μέταλλα επίσης συμβάλλουν σε αντιδράσεις αυτοξειδωσης επιταχύνοντας την αργές αντιδράσεις των ενεργών μορφών οξυγόνου. Οι τοξικότητες που παράγονται από τα μέταλλα μεταπτώσεως γενικά περιλαμβάνουν νευροτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα, και νεφροτοξικότητα. Οι πιθανές διαφορές στην τοξικότητα που παρουσιάζουν τα μεταλλικά ιόντα μπορούν να σχετίζονται με τις διαφορές στη διαλυτότητά τους, στην απορροφητικότητά τους, στη χημική δραστηριότητά τους, στη βιοδιαθεσιμότητά τους, στη μεταφορά τους και στα σύμπλοκα που σχηματίζουν μέσα στο σώμα.^[14]

Σίδηρος

Ο σίδηρος είναι μέταλλο ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη των κυττάρων, τη χρησιμοποίηση του οξυγόνου, διάφορες ενζυμικές δραστηριότητες και την ανταπόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος.^[12] Περίπου το 65% του σιδήρου δεσμεύεται στην αιμοσφαιρίνη, το 10% είναι συστατικό της μυοσφαιρίνης, των κυτοχρωμάτων και των ενζύμων που περιέχουν σίδηρο, και το 25% είναι συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες αποθήκευσης σιδήρου (φεριτίνη και αιμοσιδηρίνη) (Cheng και Li, 2007)^[12] Ταυτόχρονα όμως, αποτελεί έναν ιδιαίτερα επικίνδυνο και

τοξικό παράγοντα καθώς συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που οδηγούν στη δημιουργία εξαιρετικά δραστικών ελεύθερων ριζών. Έτσι, οι οργανισμοί διαθέτουν ειδικούς μηχανισμούς για τη δέσμευση του σιδήρου και την ασφαλή αποθήκευσή του. Ωστόσο, μια μικρή ποσότητα σιδήρου παραμένει «ελεύθερη» στο εσωτερικό του κυττάρου και είναι οξειδοαναγωγικά ενεργή (Labile Iron Pool, LIP) καθώς έχει τη δυνατότητα να συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Ο σίδηρος όταν σχηματίζει σύμπλοκο με 5-διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), ιστιδίνη, αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), κιτρικό οξύ και χηλικούς παράγοντες διευκολύνει τον σχηματισμό των ενεργών μορφών οξυγόνου και ενισχύει την παραγωγή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Μάλιστα, ο χηλικός σίδηρος φαίνεται να δρα ως καταλύτης στην αντίδραση Fenton διευκολύνοντας τη μετατροπή του ανιόντος του υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου σε ρίζα υδροξυλίου, η οποία συχνά αποτελεί πρωτοπόρος ουσία στην λιπιδική υπεροξειδωσή.^[12,13,14] Σε κατάσταση στρες στον οργανισμό απελευθερώνεται μεγάλη ποσότητα ανιόντος υπεροξειδίου, το οποίο αποδεσμεύει το σίδηρο από τις πρωτεΐνες και τα διάφορα ένζυμα που τον περιέχουν. Ο σίδηρος απελευθερώνεται στη δισθενή μορφή του και έπειτα μπορεί να συμμετέχει στην αντίδραση Fenton δημιουργώντας πολύ δραστικές ρίζες υδροξυλίου



Χαλκός

Οι αριθμοί οξείδωσης του χαλκού στους ζωντανούς οργανισμούς είναι Cu (II) και Cu (I). Το βασικό αυτό ιχνοστοιχείο αποτελεί συμπαράγοντα πολλών ενζύμων που εμπλέκονται στην αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, όπως κυτοχρωμική οξειδάση c, οξειδάση ασκορβικού και δισμουτάση υπεροξειδίου. Εκτός από την ενζυματική του ρόλο, ο χαλκός χρησιμοποιείται σε βιολογικά συστήματα για τη μεταφορά ηλεκτρονίων. Ο χαλκός μπορεί να επάγει οξειδωτικό στρες με δύο μηχανισμούς. Πρώτον, μπορεί να καταλύουν άμεσα το σχηματισμό των ROS μέσω Fenton αντίδραση. Δεύτερον, η έκθεση σε αυξημένα επίπεδα χαλκού μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της γλουταθειόνης, η οποία αποτελεί υπόστρωμα πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων και προστατεύει από την τοξικότητα χαλκού καθώς και το ίδιο το μέταλλο από οξείδωση. Ο χαλκός είναι, επίσης, ικανός να προκαλέσει θραύση στο δίκλωνο μόριο του DNA και οξείδωση στις βάσεις μέσω σχηματισμού ενεργών μορφών οξυγόνου.^[12]

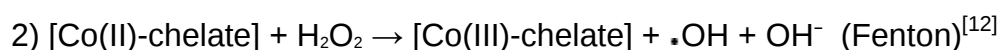
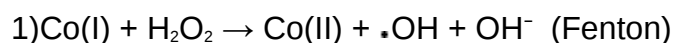
Χρώμιο

Το χρώμιο συναντάται σε διάφορες καταστάσεις οξείδωσης όπως (0) στοιχειακό μέταλλο, (III) τρισθενές χρώμιο, (VI) εξασθενές χρώμιο κ.ά. Οι επιπτώσεις στην υγεία, η τοξικότητα, ακόμη και η καρκινογένεση του χρωμίου στον οργανισμό σχετίζονται με την κατάσταση οξείδωσης του μετάλλου τη στιγμή της έκθεσης. Το τρισθενές μόριο βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στα περισσότερα φρέσκα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου και πόσιμου νερού και βοηθά στη δράση της

ινσουλίνης και τη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης. Το εξασθενές χρώμιο θεωρείται πιο τοξικό από το τρισθενές χρώμιο. Το τρισθενές χρώμιο δεν μπορεί να διαπεράσει τη κυτταρική μεμβράνη παρά μόνο μικρές ποσότητές του, διότι δεν αποτελεί υπόστρωμα του κυτταρικού συστήματος μεταφοράς ιόντων.^[12]

Κοβάλτιο

Το κοβάλτιο είναι βασικό μέταλλο για τον άνθρωπο, αφού αποτελεί μόλις το 4% της βιταμίνης B12. Το κοβάλτιο έχει φανεί από μελέτες ότι μπορεί να επέμβει στις διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA αλλά να προκαλέσει βλάβη και άμεσα στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Η συμμετοχή του στο σχηματισμό ενεργών μορφών οξυγόνου συμβάλλει στην τοξικότητά του και την καρκινογένεση που μπορεί να προκαλέσει στον οργανισμό. Το κοβάλτιο παράγει κι αυτό ROS μέσω αντίδρασης Fenton σε δύο οξειδωτικές του καταστάσεις:



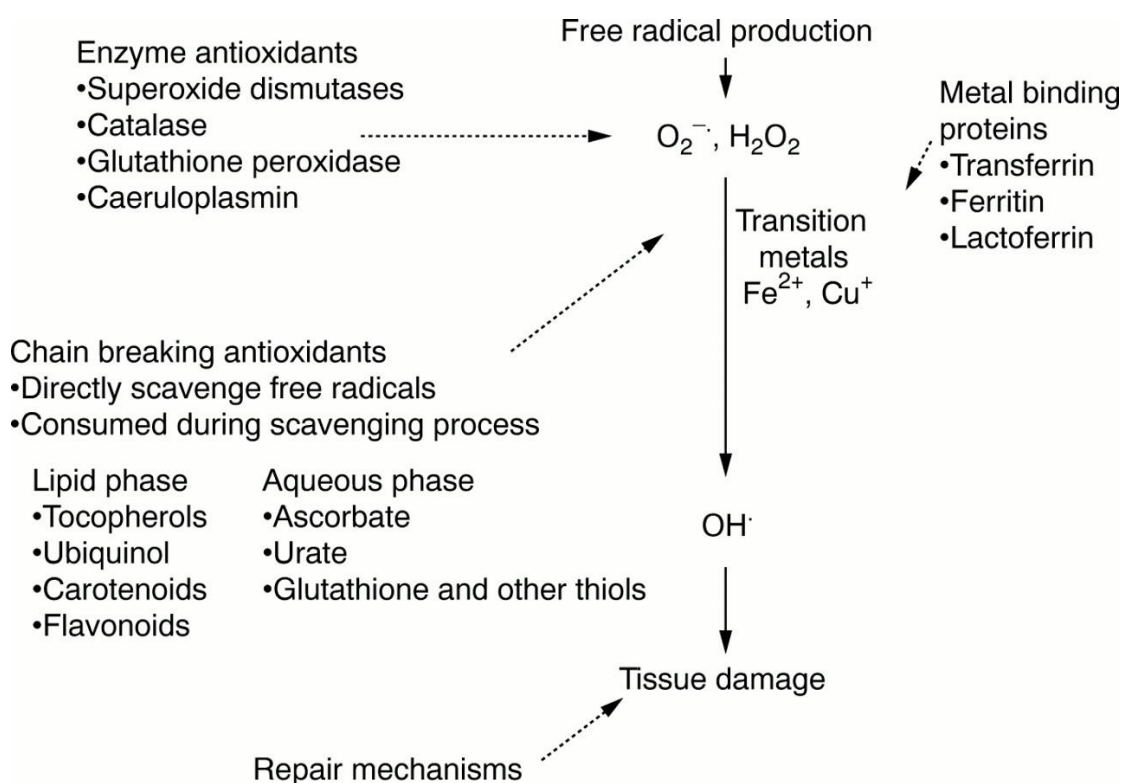
Κάδμιο

Το κάδμιο ανήκει στην ομάδα των βαρέων μετάλλων και ο πιο κοινός αριθμός οξείδωσής του είναι το +2. Σχηματίζει σύμπλοκο με τη μεταλλομεθειονίνη, το οποίο διανέμεται σε όλους τους ιστούς και τα όργανα και τελικά απορροφάται στα νεφρικά σωληνάρια. Δεν υπάρχει μηχανισμός έκκρισης του καδμίου από τον οργανισμό, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται στους ιστούς. Το κάδμιο δεν μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου άμεσα αλλά έμμεσα μπορεί να συμβάλλει στο σχηματισμό των ROS και των RNS μέσω αντικατάστασης των μετάλλων σιδήρου και χαλκού στις διάφορες κυτταροπλασματικές και διαμεμβρανικές πρωτεΐνες. (φερριτίνη, αποφερριτίνη) Με τον τρόπο αυτό, αυξάνεται η ποσότητα του ελεύθερου σιδήρου, των μερικώς χηλικών ιόντων χαλκού και σιδήρου που συμμετέχουν στην παραγωγή οξειδωτικού στρες μέσω της αντίδρασης Fenton.^[12] Η αντικατάσταση αυτή μπορεί να εξηγήσει και την αυξημένη τοξικότητα από το κάδμιο, εφόσον ο χαλκός όντας μετατοπισμένος από την κανονική του θέση πρόσδεσης, μπορεί και καταλύει τη διάσπαση υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω της αντίδρασης Fenton.

1.3 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί- αμυντικά συστήματα

Τα αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού δρουν μειώνοντας την αναγέννηση των δραστικών μορφών οξυγόνου και αντισταθμίζοντας τις βλαπτικές τους επιδράσεις. Ως αντιοξειδωτική ένωση ορίζεται οπωσδήποτε ουσία που, όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτές ενός οξειδώσιμου υποστρώματος, επιβραδύνει ή αναστέλλει την οξειδωτική βλάβη σε αυτό το υπόστρωμα.^[19] Η οξειδωτική βλάβη αναφέρεται στην επίθεση των ενεργών μορφών

οξυγόνου στα βιολογικά μόρια του οργανισμού όπως λιποειδή, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και το γενετικό υλικό. Ωστόσο, παρατηρήθηκε ότι κάποια αντιοξειδωτικά μόρια βρίσκονταν σε σημαντικά μεγαλύτερη συγκεντρώση από το οξειδωσιμο υπόστρωμα όπως η αλβουμίνη πλάσματος. Συνεπώς ο ορισμός απλοποιήθηκε ως οποιαδήποτε ουσία που επιβραδύνει, αναστέλλει ή απομακρύνει την οξειδωτική βλάβη από το μόριο-στόχο, χωρίς να ενδιαφέρει η συγκέντρωσή της με το υπόστρωμα.^[17] Τα αντιοξειδωτικά αυτά συστήματα διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: τα αντιοξειδωτικά ένζυμα, τα αντιοξειδωτικά που διασπούν τις αλυσιδωτές αντιδράσεις και τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν τα προ-οξειδωτικά μέταλλα.^[24]



Εικόνα 7: Αντιοξειδωτικές άμυνες ενάντια επιθέσεις των ελεύθερων ριζών. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα καταλύουν τη εκκαθάριση των ελεύθερων ριζών, συνήθως στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον. Οι πρωτεΐνες δέσμευσης μετάλλων μετάπτωσης εμποδίζουν την αλληλεπίδραση των μετάλλων μετάπτωσης όπως ο σίδηρος και ο χαλκός με υπεροξείδιο του υδρογόνου και το υπεροξείδιο που παράγει πολύ δραστικές ρίζες υδροξυλίου. Τα αντιοξειδωτικά που σπάνε τις αλυσιδωτές αντιδράσεις είναι ισχυροί δότες ηλεκτρονίων και αντιδρούν κατά προτίμηση με ελεύθερες ρίζες προτού καταστρέψουν σημαντικά μόρια-στόχους. (πηγή: I S Young, J V Woodside, Antioxidants in health and disease, J Clin Pathol 2001;54:176-186 doi:10.1136/jcp.54.3.176,)

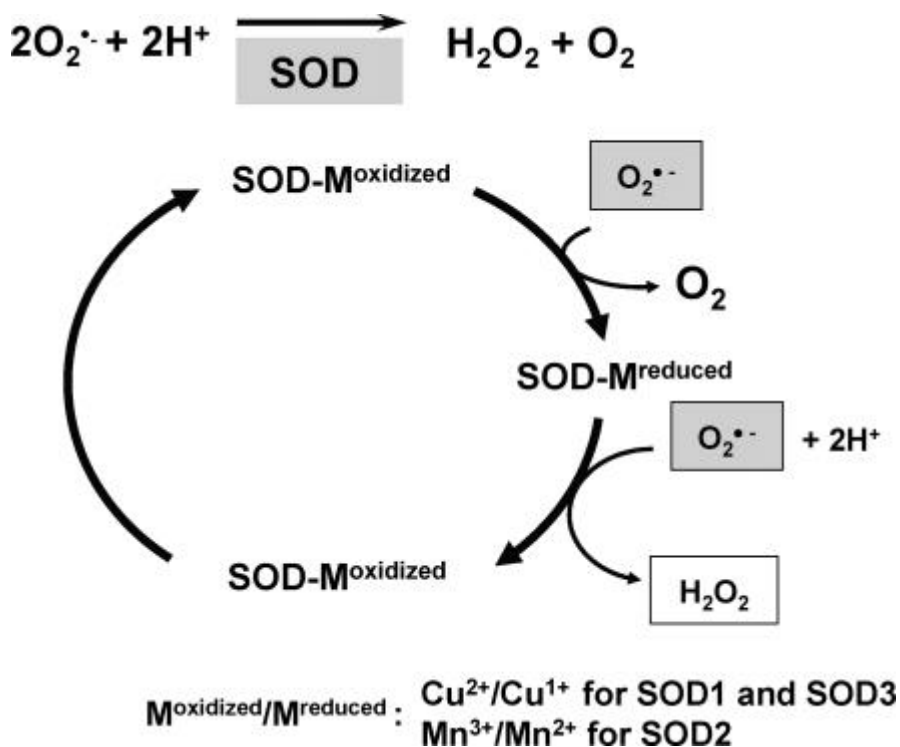
1.3.1 Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD)

Πρόκειται για μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν την αντίδραση της μετατροπής της ρίζας του υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου και οξυγόνο.



Τα ένζυμα αυτά αποτελούν την κύρια άμυνα ενάντια στο $\cdot\text{O}_2^-$ και στο ONOO^- . Στα θηλαστικά το ένζυμο βρίσκεται τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά και έχει 3 ισομορφές : η κυτταροπλασματική SOD1 ή CuZnSOD, η μιτοχονδριακή SOD2 ή MnSOD και η εξωκυττάρια SOD3 ή ecSOD. Κάθε ισομορφή έχει συγκεκριμένη υποκυτταρική τοποθεσία και διαφορετική κατανομή μες στους ιστούς, ωστόσο καταλύει την ίδια αντίδραση. Όλες οι ισομορφές είναι συνδεδεμένες με ιόντα μετάλλων στη δραστική τους θέση, τα οποία ανάγονται και επανοξειδώνονται. Μέσω αυτού του μηχανισμού επιτυγχάνεται η μετατροπή του $\cdot\text{O}_2^-$ σε H_2O_2 .^[18]



Εικόνα 7: κοινός μηχανισμός δράσης των υπεροξειδικών δισμουτασών έναντι του $\cdot\text{O}_2^-$.

(πηγή: Antioxid Redox Signal. 2011 Sep 15;15(6):1583-606. doi: 10.1089/ars.2011.3999)

CuZnSOD: είναι η κύρια ενδοκυτταρική SOD και πρόκειται για ένα ομοδιμερές ένζυμο μοριακού βάρους 32 kDa. Εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα με ένα μικρό ποσοστό να εντοπίζεται στο διάμεσο χώρο των μιτοχονδρίων.^[19,20, 21] Έχει επίσης αναφερθεί ότι είναι εντοπισμένη σε πυρήνες, λυσοσώματα και

υπεροξυσωματίδια και παρουσιάζει ευρεία κατανομή σε μία ποικιλία κυττάρων.^[20] Το γονίδιο για το ένζυμο έχει εντοπιστεί στην περιοχή 21q22.1 του χρωμοσώματος 21. Η ενζυματική δραστηριότητα του SOD1 εξαρτάται από την παρουσία του Cu και του ψευδαργύρου (Zn). Ο Zn συμμετέχει στην αναδίπλωση της πρωτεΐνης και προσφέρει σταθερότητα στο μόριο. Η δραστηριότητά της είναι ανάλογη με την ποσότητα του χαλκού (Cu) δεσμευμένη στην φυσική θέση Cu. Ο Cu δεν μπορεί να αντικατασταθεί με άλλο μέταλλο, ενώ ο Zn μπορεί να αντικατασταθεί με το κοβάλτιο και Cu, και δεν είναι απαραίτητος για την δραστηριότητα του ενζύμου σε χαμηλό pH. Για να δράσει και να εξουδετερώσει η SOD1 το $\cdot\text{O}_2^-$ απαιτείται Cu.^[20] Ο χρόνος ημίσειας ζωής της είναι 6-10 λεπτά.

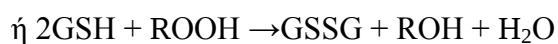
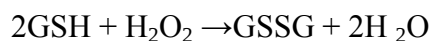
MnSOD: πρόκειται για ένα ομοτετραγενές ένζυμο μοριακού βάρους 96 kDa με ένα άτομο Mn σε καθεμία από τις υπομονάδες του που εντοπίζεται στη μιτοχονδριακή μήτρα.^[20] Η αντίδραση που καταλύεται από τη SOD2 πραγματοποιείται σε δύο στάδια με ανακύκλωση του Mn. Το Mn στη δραστική θέση χρησιμεύει για $\cdot\text{O}_2^-$ (που παράγεται από την αναπνευστική αλυσίδα) σε H_2O_2 με παρόμοιο τρόπο όπως η SOD1. Συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και κατευθύνεται προς τα μιτοχόνδρια με τη βοήθεια ενός πεπτιδίου. Ο κύριος ρόλος της στη διατήρηση της λειτουργίας των μιτοχονδρίων αποδεικνύεται από τη νεογνική θνησιμότητα ποντίκων με στοχευμένη καταστροφή του γονιδίου για τη SOD2.^[20] Η SOD2 έχει χρόνο ημίσειας ζωής 5-6 ώρες. Η πλήρης απουσία του μπορεί να προκαλέσει μυοκαρδιοπάθεια και νευροεκφυλισμό που οδηγεί σε πρόωμο θάνατο.

ecSOD: (ή αλλιώς SOD3) είναι μία τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 135 kDa με ένα άτομο Cu και ένα άτομο Zn σε κάθε υπομονάδα. Είναι η κύρια SOD στον αγγειακό εξωκυττάριο χώρο. Απαντάται κυρίως στην εξωκυτταρική μήτρα και στην κυτταρική επιφάνεια με μικρότερο κλάσμα στο πλάσμα και στα εξωκυττάρια υγρά. 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. Στο αγγειακό ιστό, SOD3 συντίθεται κυρίως από αγγειακά κύτταρα λείου μυός και των ινοβλαστών. Η σύνθεση του SOD3 από κύτταρα λείου μυός διαμορφώνεται από κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, αγγειοδραστικούς παράγοντες και οξειδωτικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αλλαγές στην δραστηριότητα του ενζύμου μπορεί να συμβεί σε αγγειακές παθήσεις.^[23] Σε τραυματισμένο ιστό και κατάσταση αθηροσκλήρωσης, η SOD3 βρίσκεται επίσης σε φλεγμονώδη κύτταρα. Εκκρίνεται και αγκυρώνεται στην εξωκυττάρια μήτρα και ενδοθηλιακή κυτταρική επιφάνεια μέσω σύνδεσης με την πρωτεογλυκάνη θειική ηπαρίνη (HSPGs), το κολλαγόνο, και τη Fibulin-5.^[20,23] In vivo είναι παρόντες και οι δύο τύποι: αυτός στην κυκλοφορία (Τύπος A) και αυτός που δεσμεύεται στους ιστούς (τύπος C). Το ενεργό κέντρο της SOD3 είναι παρόμοιο με εκείνο της SOD1 και η δραστηριότητα της εξαρτάται από τον διαθέσιμο Cu. Η SOD3 θα μπορούσε να παίζει ένα ρόλο στη ρύθμιση του αγγειακού τόνου, επειδή ο παράγοντας χαλάρωσης του ενδοθηλίου (μονοξείδιο του αζώτου ή μία στενά σχετιζόμενη ένωση) εξουδετερώνεται στο πλάσμα με τη SOD3.^[24] Η σημασία

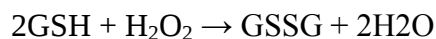
του ενζύμου στον εξωκυττάριο χώρο τονίζεται περεταίρω από το γεγονός ότι σε ποντίκια η απουσία της SOD3 οδήγησε στο θάνατο το 85% αυτών μέσα σε μόλις μια εβδομάδα από την επαγωγή της αφαίρεσης. Επίσης, οι ιστολογικές μεταβολές ήταν παρόμοιες με αυτές που παρατηρήθηκαν στο σύνδρομο αναπνευστικής δυσχέρειας, υποδηλώνοντας ότι είναι απαραίτητη για την επιβίωση. Άλλες μελέτες ποντικών αποδεικνύουν 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.^[20]

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx)

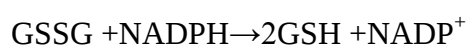
Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης καταλύουν την αντίδραση μετατροπής του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό, όπως και οργανικών υπεροξειδίων όπως υπεροξειδάσες λιπιδίων στις αντίστοιχες αλκώολες:



Είναι ένζυμο εξειδικευμένο στη γλουταθειόνη, παρέχοντας ηλεκτρόνια, μπορεί ωστόσο να λειτουργήσει και ως αναγωγικός παράγοντας σε πολλά υπεροξείδια. Απαιτεί σελήνιο για τη δράση της, καθώς το συγκεκριμένο μέταλλο περιέχεται στο ενεργό της κέντρο με τη μορφή σελήνιο-κυστείνης. Συναντάται σε διάφορες ισομορφές, που εντοπίζονται σε διάφορες κυτταρικές τοποθεσίες. Στον άνθρωπο υπάρχουν δύο μορφές του ενζύμου της υπεροξειδάσης 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 του ενζύμου και ως προς τους μηχανισμούς κατάλυσης. Η δραστηριότητα του ενζύμου εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητα της ανηγμένης γλουταθειόνης. Η GSH είναι ένα τριπεπτίδιο από κυστείνη, γλυκίνη και γλουταμινικό οξύ και απαιτείται στην ανηγμένη της μορφή για να αποδώσει αναγωγικά ισοδύναμα στην αντίδραση που καταλύει η GPx:

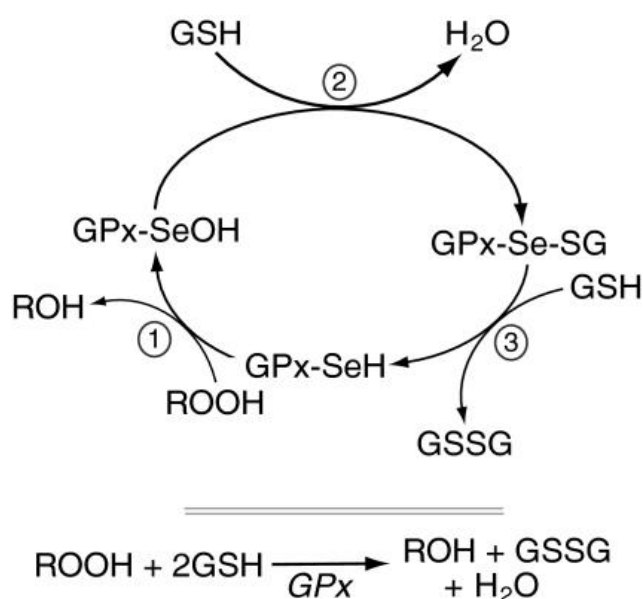


Ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη βρίσκεται συνήθως σε υψηλά επίπεδα λόγω της δράσης του ενζύμου της αναγωγάσης της γλουταθειόνης, το οποίο ανάγει την οξειδωμένη γλουταθειόνη σε γλουταθειόνη^[23,24]:



Σήμερα στα θηλαστικά είναι πιο γνωστές πλέον τέσσερις διαφορετικές Gpx (1,2,3,4), οι οποίες φέρουν όλες στην ενεργό θέση κυστείνη συνδεδεμένη με σελήνιο και

συνεπώς η δράση τους εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητά του. Τα επίπεδα κάθε ισομορφής ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο ιστού στον οποίο εκφράζονται.



Εικόνα 8:Αναγωγή της γλουταθειόνης (Πηγή: Antioxid Redox Signal. 2011 Oct 1;15(7):1957-97. doi: 10.1089/ars.2010.3586.)

Grp 1: πρόκειται για μία τετραμερή πρωτεΐνη με 4 πανομοιότυπες υπομονάδες , κάθε μία από τις οποίες περιέχει ένα κατάλοιπο σεληνοκυστεΐνης.^[26] Η Grp1 είναι ένα κυτοσολικό ένζυμο που εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και μπορεί να μεταβολίσει μόνο το υπεροξείδιο του υδρογόνου και μερικά οργανικά υδροϋπεροξείδια οξειδώνοντας τη γλουταθειόνη (GSH). Εξάιρεση αποτελούν τα υδροϋπεροξείδια των λιπαρών οξέων στα φωσfolιπίδια.^[27]

Grp 2: είναι επίσης τετραμερής πρωτεΐνη με παρόμοια δομή και εξειδίκευση στο υπόστρωμα με την Grp1. Συνεπώς, ανάγει κι εκείνη τα υπεροξείδια των λιπαρών οξέων (εκτος των φωσfolιπιδίων) και εξουδετερώνει το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Συναντάται κυρίως στα επιθηλιακά κύτταρα της γαστρεντερικής οδού.^[26,27]

Grp 3: είναι μία γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη που εκκρίνεται σε εξωκυτταρικά στο πλάσμα και στους νεφρούς. Χρησιμοποιεί ένα ευρύ φάσμα υποστρώματων όπως H₂, O₂, υδροϋπεροξείδια λιπαρών οξέων, και υδροϋπεροξείδια φωσfolιπιδίων. Το γεγονός αυτό το καθιστά ένα αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό στο πλάσμα για την προστασία των μεμβρανών.^[27,28]

Grp 4: Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στον πυρήνα διάφορων ιστών και έχει μονομερή δομή που της επιτρέπει να χρησιμοποιήσει ένα ακόμα πιο ευρύ φάσμα υποστρωμάτων.^[26] Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες ισομορφές , η Grp 4 μπορεί να εξουδετερώσει τα υδροϋπεροξείδια φωσfolιπιδίων, των λιπαρών οξέων και της χοληστερόλης που προκύπτουν από υπεροξείδωση μεμβρανών και οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών.^[26,28] Η αναστολή παραγωγής της μπορεί να οδηγήσει

σε πρώιμο κυτταρικό θάνατο και ο ρόλος της έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα σημαντικός στην ωρίμανση του σπέρματος.

Καταλάση (CAT)

Είναι μία ομοτετραμερής πρωτεΐνη με 4 υπομονάδες, κάθε μία από τις οποίες περιέχει μία ομάδα αίμης και ένα μόριο NADPH, ενώ περιέχει αιμικό σίδηρο στις ενεργές περιοχές του. Βρίσκεται στα αερόβια βακτήρια, στους μύκητες, στα κύτταρα των φυτών και των ζώων. Συναντάται στα υπεροξυσώματα, ενώ έχει βρεθεί σε μικρότερες ποσότητες στα μιτοχόνδρια, στο κυτταρόπλασμα και στα μικροσώματα. Ο κύριος τόπος δράσης της είναι τα υπεροξυσώματα, όπου παράγονται μεγάλες ποσότητες υπεροξειδίου του υδρογόνου κατά την οξείδωση μακρομορίων όπως τα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου, οπότε υπάρχει μεγάλη συγκέντρωση υποστρώματος για να δράσει η καταλάση. Πιο συγκεκριμένα, καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο σε δύο στάδια:

Καταλάση-Fe(III) + H₂O₂ → σύμπλεγμα I

Σύμπλεγμα I + H₂O₂ → Καταλάση-Fe(III) + 2 H₂O + O₂

ή

CAT

2H₂O₂ → 2 H₂O + O₂

Η σταθερά ρυθμού των αντιδράσεων είναι εξαιρετικά υψηλή (-10⁷ m / sec), υποδηλώνοντας ότι είναι σχεδόν αδύνατο να κορεστεί το ένζυμο in vivo.^[24] Η CAT προστατεύει τα κύτταρα από το H₂O₂ που παράγεται στο εσωτερικό τους.^[30] Υπάρχει σε διάφορους ιστούς αλλά το μεγαλύτερο ποσοστό βρίσκεται στο ήπαρ και τα ερυθροκύτταρα. Υψηλές συγκεντρώσεις καταλάσης περιέχονται επίσης στα ουδετερόφιλα και άλλα λευκά αιμοσφαίρια, όπου βοηθάει στην απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που προέρχεται από την αναπνευστική έκρηξη. Ωστόσο η συγγένεια του ενζύμου με το H₂O₂ είναι χαμηλή κατά συνέπεια απαιτούνται μεγάλες συγκεντρώσεις αντιδρώντος για να γίνει γρήγορα η αντίδραση.^[31]

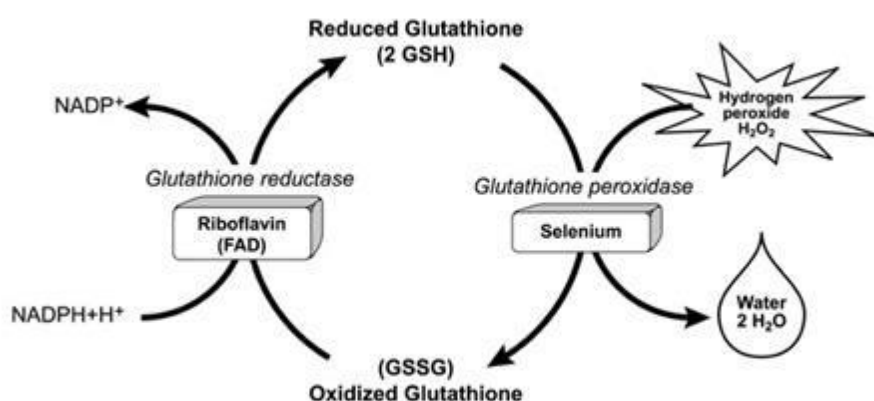
Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Η GR καταλύει τη μετατροπή της οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή (GSH) έτσι ώστε να αναγεννάτε η ανηγμένη γλουταθειόνη και να διατηρείται υψηλός ο λόγος GSH:GSSG. Είναι ένα φλαβοένζυμο με κάθε υπομονάδα να περιέχει θέσεις δέσμευσης για το NADPH και την GSSG στο FAD. Το ένζυμο είναι λειτουργικό μόνο ως ομοδιμερές αφού κάθε θέση δέσμευσης της GSSG σχηματίζεται και από τις δύο υπομονάδες. ομοδιμερής. 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 GSH, αν και το

πρωτόνιο δεν αναφέρεται συχνά ως υπόστρωμα. Η GR καταλύει την παρακάτω αντίδραση:



Τα ηλεκτρόνια του NADPH (που προέρχεται από το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών) δεν μεταφέρονται απευθείας στον δισουλφιδικό δεσμό της οξειδωμένης γλουταθειόνης αλλά το πιθανότερο είναι να μεταφέρονται από το NADPH σε ένα ισχυρά δεσμευμένο FAD (φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο), ακολούθως να μεταφέρονται στην δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ δύο καταλοίπων κυστεΐνης της υπομονάδας και να καταλήγουν στην οξειδωμένη γλουταθειόνη.^[32]



Εικόνα 9: Η οξειδοαναγωγή της γλουταθειόνης

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

1.3.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα

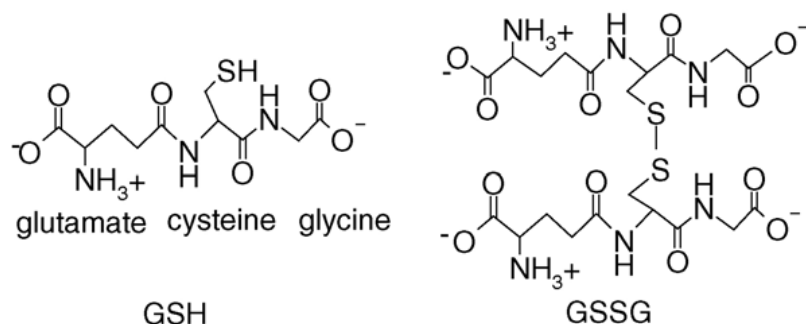
Εκτός από τα ενζυμικά συστήματα και τις πρωτεΐνες δέσμευσης μετάλλων, υπάρχει μεγάλος αριθμός μη πρωτεϊνικών ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους που συμβάλλουν με την παρουσία τους στην εκκαθάριση των ελεύθερων ριζών ή στη δέσμευση των ιόντων των μετάλλων, εμποδίζοντας τη συμμετοχή τους στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.^[11] Βάσει της προέλευσής τους μπορούν να χωριστούν σε ενδογενή και εξωγενή. Ενδογενή αντιοξειδωτικά θεωρούνται εκείνα που παράγονται από τον οργανισμό, ενώ εξωγενή εκείνα που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής.

1.3.2.1 Ενδογενή

Γλουταθειόνη (GSH)

Η GSH (γ-L-γλουτάμυλο-L-κυστεϊνογλυκίνη) είναι ένα τριπεπτίδιο από γλυκίνη, κυστεΐνη και γλουταμινικό οξύ. Αποτελεί την κυρίαρχη ενδοκυτταρική θειόλη και σε ποσοστό 85-90% εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (το υπόλοιπο 10-15% βρίσκεται

στα μιτοχόνδρια και στα υπεροξειδισώματα). Παράγεται σε όλα τα όργανα αλλά κυρίως στο ήπαρ. Εμπλέκεται σε πολύ σημαντικές βιοχημικές διαδικασίες όπως η σύνθεση προσταγλανδινών, η μεταφορά κυστεΐνης, η έκφραση γονιδίων, η παραγωγή κυτοκινών, η πρωτεόλυση, ο μεταβολισμός αρκετών κυτταρικών συστατικών και η προστασία του οργανισμού από την τοξική δράση ξеноβιοτικών ουσιών. Εκτός όμως από τις πολύ σημαντικές λειτουργίες που αναφέρθηκαν, η GSH είναι και σπουδαίο υδρόφιλο αντιοξειδωτικό. Αντιδρά με ελεύθερες ρίζες (κυρίως ρίζα υδροξυλίου, ρίζες λιπιδίων και H_2O_2) και οξειδώνεται σε GSSG , η οποία στη συνέχεια μπορεί να αναχθεί σε GSH με τη δράση της NADPH–εξαρτώμενης GR.



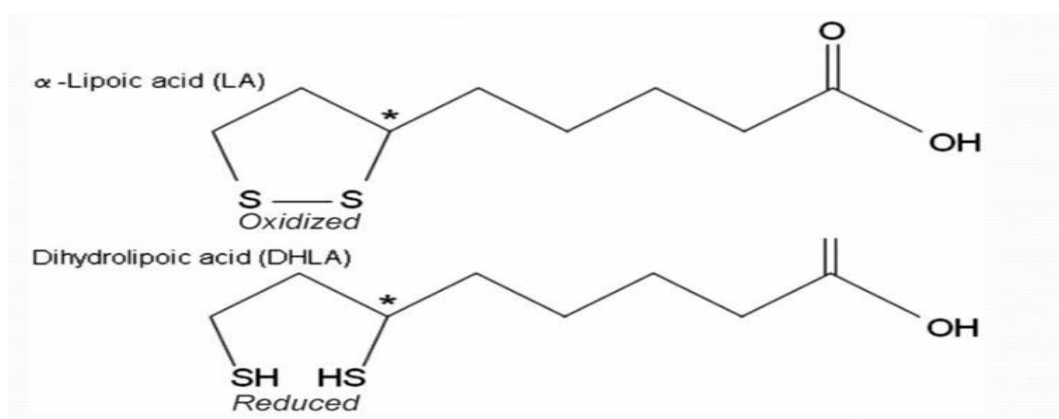
Εικόνα 10: Οι δομές της ανηγμένης και οξειδωμένης γλουταθειόνης (πηγή:) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, M. Valko a, C.J. Rhodes b, J. Moncola, M. Izakovic a, M. Mazura, Chemico-Biological Interactions 160 (2006) 1–40)

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ανηγμένη GSH αποτελεί την κύρια μορφή του μορίου με συγκέντρωση 10 έως 100 φορές μεγαλύτερη από την οξειδωμένη της μορφή. ^[3]Οι αντιοξειδωτικές ικανότητες της γλουταθειόνης συνοπτικά είναι οι εξής:

- 1) συμπαράγοντας αντιοξειδωτικών ενζύμων
- 2) αντιδρά με τις ελεύθερες ρίζες και εξουδετερώνει τις επιβλαβείς συνέπειές τους στον οργανισμό
- 3) μετατρέπει αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνες A και C στις ενεργές τους μορφές.

Εκτός από τις αντιοξειδωτικές της ιδιότητες, η GSH εμπλέκεται στο μεταβολισμό των συστατικών, στη ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών (γονιδιακή έκφραση και DNA) , στη πρωτεϊνοσύνθεση, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την απόπτωση.^[34]

Α-λιποϊκό οξύ (ALA)



Εικόνα 11: Οι δομές του α-λιποϊκού οξέος και διυδρολιποϊκού οξέος

Το ALA είναι μία ένωση θειόλης που συντίθεται στα μιτοχόνδρια. Πρόκειται για ένα μόριο τόσο υδατοδιαλυτό όσο και λιποδιαλυτό με αποτέλεσμα να κατανέμεται στις κυτταρικές μεμβράνες αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Διαιτητικές πηγές του ALA αποτελούν κυρίως το κρέας, η καρδιά, τα νεφρά, το ήπαρ. Σε μικρότερο ποσοστό βρίσκεται και στα φρούτα και στα λαχανικά.^[37] Το ALA που προσλαμβάνεται μέσω της διατροφής, μετατρέπεται σε διυδρολιποϊκό οξύ (DHLA). Τόσο το ALA όσο και το DHLA αποτελούν ισχυρά αντιοξειδωτικά. Ο μηχανισμός δράσης τους αφορά την αδρανοποίηση αρκετών ROS, την αναγέννηση αρκετών ενδογενών και εξωγενών αντιοξειδωτικών μορίων όπως βιταμίνες E και C και η GSH^[36] και την επιδιόρθωση οξειδωμένων πρωτεϊνών.^[19]

Μελατονίνη

Η μελατονίνη ή 5-μεθοξυ –ακετυλοτρυπταμίνη είναι νευρο-ορμόνη και συντίθεται στην υπόφυση από το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Ο ρόλος της είναι να ρυθμίζει τις εποχιακές επιδράσεις στην αναπαραγωγική λειτουργία, στον μεταβολισμό και στο σωματικό βάρος. Αποτελεί επίσης εξαιρετικό αντιοξειδωτικό αφού αδρανοποιεί αρκετές ελεύθερες ρίζες (ROS και NOS) και ενεργοποιεί αντιοξειδωτικό ένζυμο (SOD, CAT, GR, GSH-PX). Διαφέρει ως προς τα υπόλοιπα αντιοξειδωτικά στο ότι δεν μπορεί να αναγεννηθεί αφού κατά την αντίδρασή της με μια ελεύθερη ρίζα παράγονται σταθερά προϊόντα.^[38] Δεν εμφανίζει προ-οξειδωτικές ιδιότητες και διαχέεται μέσω των μεμβρανών και να περνάει τον εγκεφαλονωτιαίο φραγμό.^[11]

Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών, ενώ προκύπτει και από την ξανθίνη ή την υποξανθίνη με την δράση της οξειδάσης της ξανθίνης. Θεωρείται ένας ισχυρός εκκαθαριστής των ενεργών μορφών οξυγόνου στο πλάσμα μόνο σε υδρόφιλο περιβάλλον. Τα επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό του ανθρώπου είναι δέκα φορές μεγαλύτερα σε σχέση με αυτά των υπολοίπων ζωικών ειδών, κάτι που αποδεικνύει ότι κατά την εξέλιξη έλαβε χώρα μια σημαντική αύξηση

του επιπέδου του ουρικού οξέος στον άνθρωπο ακριβώς λόγω της αντιοξειδωτικής του ικανότητας.^[41] Πιο συγκεκριμένα, μπορεί να εξουδετερώσει τη ρίζα υδροξυλίου, τα προϊόντα οξείδωσης της αίμης και υπεροξειδία.^[11] Ως αντιοξειδωτικό, είναι τόσο σημαντικό όσο είναι και το ασκορβικό οξύ. Με παρουσία ασκορβικού οξέος είναι ικανό να παρεμποδίζει την υπεροξείδωση των λιπιδίων. Οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις του έχουν παίξει σημαντικό ρόλο στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ιδιαίτερα σε παθολογικές καταστάσεις όπως νόσος Πάρκινσον, σκλήρυνση κατά πλάκα και οξύ εγκεφαλικό επεισόδιο.^[41] Ωστόσο, σύμφωνα με τη θεωρία του οξειδοαναγωγικού παράδοξου του ουρικού οξέος, αυτό σε αντιδράσεις με οξειδωτικά μόρια συμβάλλει στην παραγωγή νέων ριζών, οι οποίες θα προκαλέσουν αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης

Χολερυθρίνη(BR)

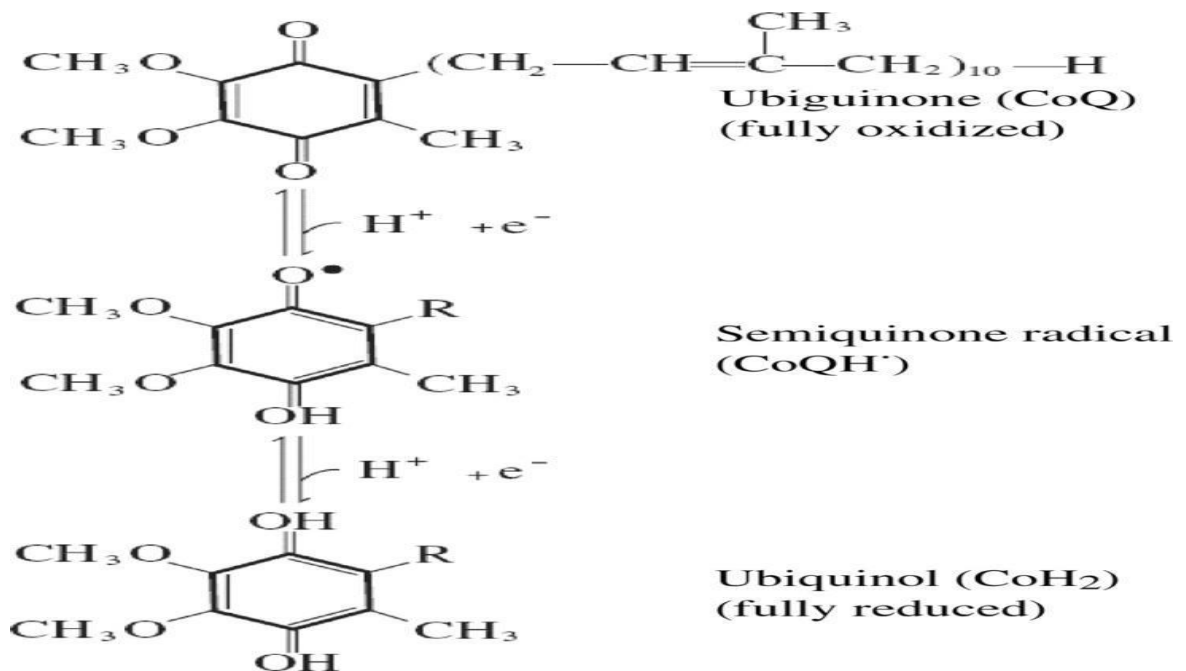
Η χολερυθρίνη αποτελείται από μία ανοικτή αλυσίδα τεσσάρων πυρολικών δακτυλίων και είναι προϊόν καταβολισμού της αίμης. Ο δακτύλιος της πορφυρίνης που προκύπτει από την αποδόμηση των γερασμένων ερυθροκυττάρων, μεταβολίζεται σε χολοπρασίνη και ακολούθως σε χολερυθρίνη. Το ένζυμο που καταλύει αυτή την αντίδραση λέγεται αναγωγάση της χολοπρασίνης (biliverdin reductase). Η χολοπρασίνη είναι προϊόν του καταβολισμού της αίμης και αποτελεί μία πράσινη τετραπυρολική χολοχρωστική. Η αναγωγάση της χολοπρασίνης αφαιρεί το διπλό δεσμό μεταξύ του δεύτερου και του τρίτου πυρρολικού δακτυλίου. Στη συνέχεια η χολερυθρίνη οξειδώνεται και μετατρέπεται ξανά σε χολοπράσινη.^[45,46] Η χολερυθρίνη που δεν είναι διαλυτή στο νερό παρά μόνο στα λιπίδια (λιποδιαλυτή) λέγεται έμμεσος, η οποία κυκλοφορεί στο αίμα συνδεδεμένη με λευκωματίνη και δεν μπορεί να αποβληθεί από τα ούρα. Όταν προσλαμβάνεται από τα ηπατοκύτταρα συνδέεται με γλυκουρονικό οξύ και μετατρέπεται στην άμεσο μορφή της (υδατοδιαλυτή). Η BR θεωρείται δυνητικά κυτταροτοξική με αποτέλεσμα να πρέπει να αποβληθεί. Ωστόσο, σε μικρές ποσότητες in vitro μπορεί να εμποδίσει την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται από ένα ευρύ φάσμα ενεργών μορφών οξυγόνου.^[43,45] Ο ρόλος της ως αντιοξειδωτικό στα κύτταρα φαίνεται να σχετίζεται με την αέναη κυκλική διαδικασία χολοπρασίνης-χολερυθρίνης. Όταν η χολερυθρίνη αντιδρά με ενεργές ρίζες οξυγόνου παράγει χολοπρασίνη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται πάλι σε χολερυθρίνη με τη βοήθεια της NADPH/ αναγωγάση της χολοπρασίνης.^[45] Επιπλέον, μέσω αυτού του μηχανισμού η BR φαίνεται να μπορεί να αποτρέψει την οξείδωση τόσο των πρωτεϊνών όσο και των λιποειδών.^[11] Η χολερυθρίνη έχει ιδιαίτερα ισχυρή αντιοξειδωτική δράση απέναντι στις ρίζες υπεροξυλίου και προστατεύει τα κύτταρα από τοξικά επίπεδα του H₂O₂.

1.3.2.2 Εξωγενή

Συνένζυμο Q10 (CoQ)

Το συνένζυμο Q10 ή ουβικινόνη είναι μία λιποδιαλυτή βενζοκινόνη με μία πλευρική αλυσίδα 10 ισοπrenoειδών μονάδων και συντίθεται ενδογενώς στο

σώμα από φαινυλαλανίνη και μεβαλονικό οξύ.^[47] Συμμετέχει στην αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια, όπου αποτελεί δεξαμενή ηλεκτρονίων, τα οποία και τα προμηθεύεται από διάφορους δότες (NADH, ηλεκτρικό οξύ, 3-φωσφορική γλυκερόλη) και τα μεταφέρει στο σύμπλοκο των κυτοχρωμάτων. Ωστόσο, μπορεί να βρίσκεται και σε άλλες κυτταρικές μεμβράνες. Το CoQ αποτελεί ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό και εστιάζει στην παρεμπόδιση της οξείδωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων.^[32] Μελέτες έχουν δείξει ότι είναι περισσότερο αντιοξειδωτικό από τη βιταμίνη E και είναι σε θέση να αναστείλει την προ-οξειδωτική της δραστηριότητα.



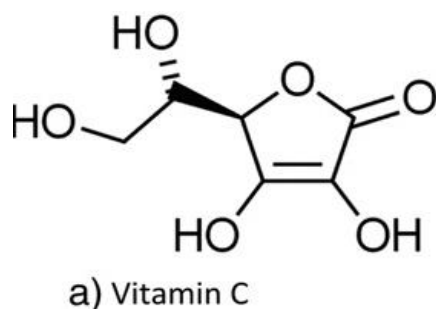
Εικόνα 12: Οξειδοαναγωγή του συνενζύμου Q (Πηγή: Q J Med 2004; 97:537–548)

Πρόσφατες παρεμβατικές έρευνες στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 δείχνουν ότι τα συμπληρώματα CoQ μπορούν να βελτιώσουν τη μη φυσιολογική λειτουργία του ενδοθηλίου στις αρτηρίες και την αρτηριακή πίεση και η υπεργλυκαιμία.^[47] Η διατήρηση των λειτουργικών επιπέδων CoQ10 σε κυτταρικές μεμβράνες είτε με συμπληρώματα διατροφής ή με τη βελτίωση της ενδογενούς σύνθεσής του μπορεί να είναι μια βασική στρατηγική για την ενίσχυση της υγείας κατά τη γήρανση.^[48] Επίσης, η χορήγηση συμπληρώματος CoQ10 φαίνεται ικανή να αναστείλει την οξείδωση της LDL χοληστερόλης πιο αποτελεσματικά σε σύγκριση με άλλα αντιοξειδωτικά.^[49]

Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)

Η βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ αποτελεί το πιο διαδεδομένο αντιοξειδωτικό, όμως δεν συντίθεται ενδογενώς και πρέπει να λαμβάνεται μέσω της τροφής και δρα ως συμπαράγοντας στη σύνθεση μιας σειράς ενζύμων που εμπλέκονται στο κύκλο της καρνιτίνης, του κολλαγόνου (παίζει τον ρόλο του συμπαράγοντα των υδροξυλασών

λυσίνης και προλίνης)^[24] και νευροδιαβιβαστών όπως η ντοπαμίνη, η νορεπινεφρίνη και η σεροτονίνη.^[51] Πρόκειται για υδρόφιλο αντιοξειδωτικό με ισχυρή αναγωγική δύναμη και απομακρύνει τις ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου είτε άμεσα, παρέχοντας ηλεκτρόνια (δότες) είτε έμμεσα, ανάγοντας τα ιόντα σιδήρου και χαλκού.^[11] Εξουδετερώνει κυρίως την υδροξυλική ρίζα, το υπεροξειδίο και τα υπεροξειδία των λιπιδίων. Κατά την αντίδραση του με τις ρίζες παράγεται διυδροασκορβικό οξύ (DHA) που με την δράση της ρεδοκτάσης του διυδροασκορβικού οξέος αναγεννά το ασκορβικό οξύ, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις υφίσταται μη αναστρέψιμο άνοιγμα του δακτυλίου και καταστροφή. Επίσης, έχει την ικανότητα να αναγεννά την α-τοκοφερόλη από τις ρίζες α-τοκοφερόλης των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών με την συνεργική δράση της GSH-PX.



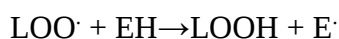
Εικόνα 13: Δομή ασκορβικού οξέος (πηγή: Mircea Oroian a, Isabel Escriche, Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis, 20 April 2015)

Η ημερήσια πρόσληψη της βιταμίνης C θα πρέπει να είναι μεταξύ 25 και 45 mg / ημέρα ανάλογα με την ηλικία., σύμφωνα με τον EFSA (European Food Safety Authority)^[50] Παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην λειτουργία της συνθάσης νιτρικού οξέος (eNOS) στο ενδοθήλιο προσφέροντας αρτηριακή ελαστικότητα και καλύτερη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης. Μπορεί να αναστέλλει την οξείδωση της LDL και να αυξήσει την αντίστασή της στην οξείδωση.^[51]

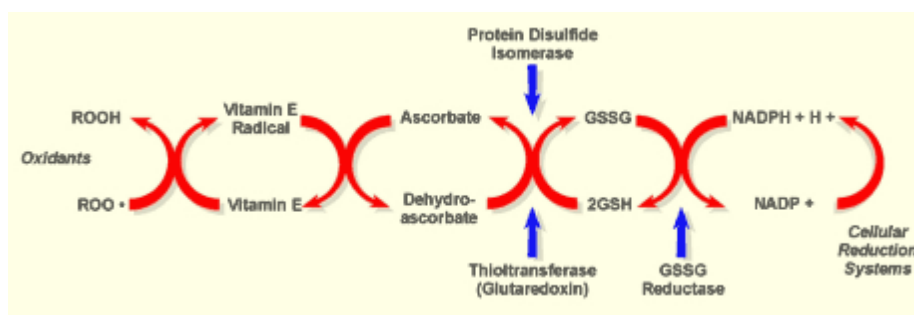
Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E αποτελεί μια οικογένεια αντιοξειδωτικών που περιλαμβάνει 8 ισομερή που ονομάζονται τοκοφερόλες, οι οποίες διαφέρουν ως προς το βαθμό βιολογικής δραστηριότητας, με πιο δραστήρια την α-τοκοφερόλη.^[24] Τα 8 ισομερή είναι τα εξής: α, β, γ και δ κατηγορίες τοκοφερολών και τοκοτριενολών^[50], οι οποίες συντίθενται στα φυτά από ομογεντισικό οξύ. Οι α- και γ-τοκοφερόλες είναι οι δύο κύριες μορφές της βιταμίνης. Η βιταμίνη E θεωρείται ισχυρό φυσικό αντιοξειδωτικό, καθώς εκκαθαρίζει τις νέες ελεύθερες ρίζες και τερματίζει τις αλυσιδωτές οξειδωτικές αντιδράσεις. Η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης οφείλεται στην υδροξυλοομάδα του αρωματικού της δακτυλίου. Είναι λιπόφιλο αντιοξειδωτικό καθώς προστατεύει τα πολυακόρεστα που περιέχονται στα φωσφολιποειδή των μεμβρανών και των

λιποπρωτεϊκών του πλάσματος από οξείδωση. Εντοπίζεται μέσα ή κοντά στις κυτταρικές μεμβράνες και μπορεί να αντιδράσει με τις ρίζες υπεροξειδίου (LOO·) πριν αυτές αλληλεπιδράσουν με τις κυτταρικές μεμβράνες ή άλλα συστατικά μεμβρανών. Με αυτό τον τρόπο τερματίζει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις μετάδοσης. Παρ'όλα αυτά, είναι λιγότερο αποτελεσματική στον τερματισμό της υπεροξειδάσης που παράγει ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου ή αλκοξειδίου. Λόγω της δραστηριότητας του φαινολικού υδρογόνου στον 6^ο άνθρακα της υδροξυλικής ομάδας και της ικανότητας του συστήματος του χρωμανολικού δακτυλίου να σταθεροποιεί ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, μπορεί να παρέχει ένα άτομο υδρογόνου για την αναγωγή των μη λιποειδικων ριζών υπεροξειδίου:



Η παραπάνω διαδικασία αναφέρεται ως εκκαθάριση ελευθέρων ριζών. Ο τερματισμός των αντιδράσεων επιτυγχάνεται όταν δύο ελεύθερες ρίζες συνδυάζονται για να σχηματίσουν ένα μόριο, το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα και δεν μπορεί να συνεχίσει την αντίδραση. Στο στάδιο του τερματισμού η βιταμίνη E θα πρέπει να αναγεννηθεί για να επαναχρησιμοποιηθεί. Η αναγέννηση απαιτεί βιταμίνη C, ανηγμένη γλουταθειόνη (GSH), NADPH, ουμπικινόνη και διϋδρολιπικό οξύ, μεταξύ άλλων.^[52] 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 άλλες ρίζες τοκοφερόλης σχηματίζοντας διμερή τοκοφερολών, να αναχθούν προς τοκοφερόλη από άλλα αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη C.^[53]



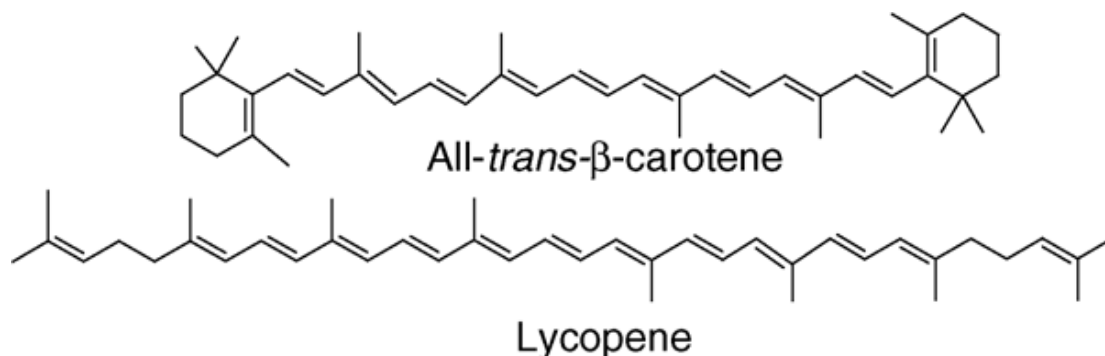
Εικόνα 14: Η αντιοξειδωτική δράση και αναγέννηση της βιταμίνης E

(πηγή: 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)

Βιταμίνη A

Ο όρος βιταμίνη A αναφέρεται σε μία ομάδα συστατικών με τη βιολογική δράση της trans ρετινόλης, τα ρετινοειδή. Τα ρετινοειδή έχουν παρόμοιες δομές και περιλαμβάνουν τη ρετινόλη, τη ρετινάλη, το ρετινοϊκό οξύ και ο ρετινυλικός εστέρας, καθώς και σύνθετα ανάλογα. Τα καροτενοειδή της προβιταμίνης A αντιπροσωπεύουν μια ομάδα μορίων που είναι πρόδρομες ενώσεις της βιταμίνης A. Ανάμεσα στα 600

καροτενοειδή, λιγότερα από 10% αυτών μπορούν να μετατραπούν σε ρετινόλη και να εμφανίσουν τη δράση της βιταμίνης Α. Τρία διαιτητικά καροτενοειδή της προβιταμίνης Α είναι το α-καροτένιο, το β-καροτένιο και η β-κρυπτοξανθίνη. Άλλα μόρια που δεν είναι πρόδρομα της βιταμίνης Α αλλά έχουν φυσιολογική σημασία στο σώμα είναι η λουτεΐνη και το λυκοπένιο. Όλα αυτά μαζί αποτελούν τα κύρια καρετονοειδή που απαντώνται στο πλάσμα του ανθρώπου. Τόσο τα ρετινοειδή όσο και τα καρετονοειδή βρίσκονται στα τρόφιμα. Η βιταμίνη Α βρίσκεται στο συκώτι, σε γαλακτοκομικά προϊόντα (πλήρες γάλα, τυρί, γιαούρτι, βούτυρο), στα ψάρια και στα ηπατέλαια και ιχθυέλαια, ενώ τα καρετονοειδή κυρίως στα φρούτα και στα λαχανικά.



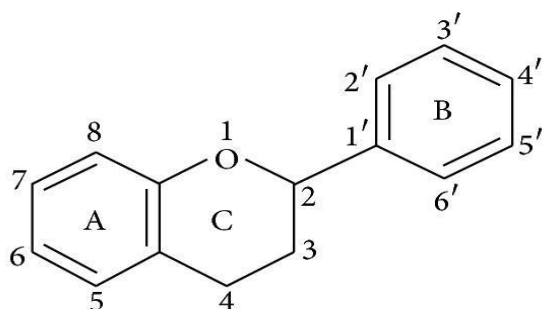
Εικόνα 15: Δομή καροτενοειδών (πηγή: M. Valko et al. / Chemico-Biological Interactions 160 (2006) 1–40)

Τα καροτενοειδή που είναι πρόδρομα μόρια της βιταμίνης Α, μετατρέπονται σε βιταμίνη Α (εστέρες ρετινόλης) στον εντερικό βλεννογόνο. Στα εντεροκύτταρα, τόσο τα δύο καροτενοειδή όσο και οι εστέρες ρετινόλης ενσωματώνονται σε χυλομικρά και εκκρίνονται στη λέμφο για τη μεταφορά τους στην αίμα.^[54] Μετά τη πρόσληψή τους μέσω της τροφής, τα καρετονοειδή απελευθερώνονται και ενσωματώνονται σε μικύλλια, τα οποία 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. Οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) είναι ο κύριος φορέας του β-καροτενίου στο πλάσμα. Σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις, τα καροτενοειδή μπορούν να προστατεύσουν τα λιπίδια από υπεροξειδική βλάβη.^[19]

Τα καροτενοειδή είναι παρόντα στο εσωτερικό των μεμβρανών των κυττάρων, καθώς και στις λιποπρωτεΐνες. Δομικά, διαθέτουν ένα εκτενές σύστημα (συνήα εννέα ή περισσότερων) συζευγμένων διπλών δεσμών και προκαλούν απενεργοποίηση του μονήρους μοριακού οξυγόνου (O₂) και των ελεύθερων ριζών.^[56] Γενικά έχουν προταθεί 3 μηχανισμοί για την αντίδραση των καροτενοειδών με τις ελεύθερες ρίζες · α) προσθήκη ρίζας, β) απόσπαση ενός ατόμου από το καροτενοειδές, γ) αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα καροτενοειδούς με αντιοξειδωτική δράση είναι το β-καροτένιο που αντιδρά κυρίως με υπεροξείδιο, υδροξυλική ρίζα και με ρίζα υπεροξυλίου^[19]. Ωστόσο, τα καροτενοειδή μπορούν να εμφανίσουν και προ-οξειδωτικό χαρακτήρα, ανάλογα τη συγκέντρωσή τους. (πχ σε πολύ υψηλές πιέσεις οξυγόνου.

Φλαβονοειδή

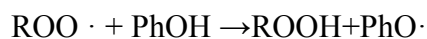
Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στα φυτά και αποτελούν μέρος της διατροφής του ανθρώπου (φρούτα, λαχανικά, κρασί, τσάι).^[19] Χημικώς βασίζονται σε ένα σκελετό δεκαπέντε ατόμων άνθρακα που αποτελούνται από δύο βενζολικούς δακτυλίους (Α και Β) συνδεδεμένους μέσω ενός ετεροκυκλικού δακτυλίου πυρανίου



Εικόνα 16: Δομή 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 Α και Β. Είναι ενώσεις με ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία εκδηλώνεται είτε με τον τερματισμό

αντιδράσεων ελευθέρων ριζών ως δότες ηλεκτρονίων είτε με την δέσμευση μετάλλων που έχουν καταλυτικές ιδιότητες και καταλύουν οξειδωτικές διαδικασίες όπως η υπεροξείδωση των λιπιδίων είτε με την ικανότητά τους να αναστέλλουν τα οξειδωτικά ένζυμα. Τα φλαβονοειδή παρέχουν ένα άτομο υδρογόνου στις ρίζες παράγοντας έτσι ρίζες που είναι σχετικά σταθερές και έτσι δεν ξεκινούν μια νέα σειρά αντιδράσεων ριζών ή αντιδρούν με άλλες ρίζες τερματίζοντας μια αλυσίδα αντιδράσεων οξειδωτικών διαδικασιών.^[57]

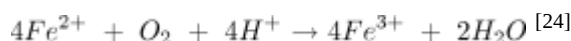


Η αντιοξειδωτική τους δράση εξαρτάται από τη διάταξη των λειτουργικών ομάδων. Συγκεκριμένα η διαμόρφωση, η υποκατάσταση, και ο συνολικός αριθμός των ομάδων υδροξυλίου επηρεάζουν ουσιαστικά τους διάφορους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Η διαμόρφωση του υδροξυλίου του δακτυλίου Β είναι ο πιο 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. Ωστόσο, υπό ορισμένες συνθήκες, π.χ. υψηλή συγκέντρωση φαινολικών αντιοξειδωτικών, η παρουσία οξειδοαναγωγικών

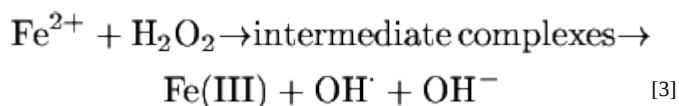
δραστικών μετάλλων (Χαλκός, σίδηρος) και ένα υψηλό pH, τα φλαβονοειδή μπορούν να συμπεριφέρονται ως προ-οξειδωτικά μόρια.

1.3.3 Πρωτεΐνες δέσμευσης μετάλλων

Οι πρωτεΐνες δέσμευσης και μεταφοράς ιόντων που αποτελούν κομμάτι των αντιοξειδωτικών συστημάτων του οργανισμού δεσμεύουν ιόντα μετάλλων, εμποδίζοντας τη συμμετοχή τους στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που θα οδηγήσουν στην παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου και την πρόκληση οξειδωτικού στρες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων πρωτεϊνών είναι η φερριτίνη, η τρανσφερίνη, η αλβουμίνη, η σερουλοπλασμίνη και οι μεταλλοθειονίνες. Η φερριτίνη και η τρανσφερίνη προσδένουν το σίδηρο στη μορφή Fe^{3+} που είναι πιο ασφαλής σε σχέση με τη δισθενή μορφή του όσον αφορά τη δημιουργία ROS. Τα ιόντα χαλκού (Cu^{2+}) δεσμεύονται κυρίως από τη σερουλοπλασμίνη. Με το συγκεκριμένο μηχανισμό, η συγκέντρωση του ελεύθερου σιδήρου και χαλκού διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα στο αίμα, της τάξης των 10^{-23} και 10^{-18} mol/l, αντίστοιχα μειώνοντας τη μεταλλο-καταλυόμενη παραγωγή ρίζας υδροξυλίου $OH^{\cdot}$.^[58,59] Η σερουλοπλασμίνη μπορεί επίσης να καταλύσει τη μετατροπή του μοριακού οξυγόνου σε νερό με μεταφορά $4 e^-$ στο ενεργό της κέντρο οξειδώνοντας τα ιόντα δισθενούς σιδήρου στη λιγότερο δραστική τους μορφή Fe^{3+} σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Ο δισθενής σίδηρος είναι αυτός που θα αντιδράσει γρήγορα με το υπεροξείδιο του υδρογόνου προς σχηματισμό της τοξικής ρίζας υδροξυλίου. Η αντίδραση αυτή ονομάζεται αντίδραση Fenton:



Η αλβουμίνη μπορεί επίσης να δεσμεύσει ιόντα χαλκού και σιδήρου, ενώ οι μεταλλοθειονίνες δεσμεύουν ένα ευρύ φάσμα μετάλλων.^[11]

Φερριτίνη

Ο σίδηρος είναι ένα στοιχείο άφθονο στη φύση με μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη των κυττάρων καθώς συνδέεται με ποικίλα ένζυμα και πρωτεϊνικούς φορείς οξυγόνου που εμπλέκονται σε θεμελιώδεις κυτταρικές διαδικασίες και αποτελεί συστατικό της αίμης. Ταυτόχρονα, το μέταλλο αυτό μπορεί να αποβεί τοξικό λόγω της συμμετοχής του στην καταλυτική παραγωγή επιβλαβών δραστικών μορφών οξυγόνου.

Συγκεκριμένα, ο ελεύθερος σίδηρος έχει την ικανότητα να συμμετέχει στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών οξυγόνου μέσω της αντίδρασης Fenton. Η φερριτίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της διαθεσιμότητά του και στη διατήρηση της ισορροπίας του ενδοκυτταρικά. 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 (Θ και L). Η υπομονάδα Η πιστεύεται ότι παίζει ένα ρόλο στη γρήγορη οξειδωση του σιδήρου σε τρισθενή, για την εναπόθεσή του εντός του πυρήνα. Η L υπομονάδα διευκολύνει την αποθηκευσή του.^[60,61]

Αλβουμίνη

Η αλβουμίνη είναι η πλέον ευρέως κυκλοφορούσα πρωτεΐνη στο πλάσμα και συντίθεται κυρίως στο ήπαρ. 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. Δομικά, αποτελείται από 585 αμινοξέα και περιέχει 35 σημαντικά κατάλοιπα κυστεΐνης τα οποία, εκτός από την Cys-34, σχηματίζουν δισουλφιδικές γέφυρες συμβάλλοντας στη διαμόρφωση της ολικής τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης. Η Cys-34 είναι η μόνη που δεν εμπλέκεται στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών λόγω της αφθονίας της στο πλάσμα, καθώς 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 OH- από το H₂O₂.^[62]

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 μεταφέροντας τον και ταυτόχρονα εμποδίζοντας τον να ασκήσει την οξειδωτική του δράση.^[63]

Σερουλοπλασμίνη (CP)

Η σερουλοπλασμίνη (CP) ανήκει στις α-2 σφαιρίνες και είναι μία πρωτεΐνη άφθονη στο πλάσμα που μεταφέρει περίπου το 95% του συνολικού χαλκού στον ορό. Συντίθεται κυρίως στο ήπαρ, αλλά εκφράζεται και από άλλου κυτταρικούς τύπους όπως αστροκύτταρα, κύτταρα Sertoli και μονοκύτταρα. Παίζει σημαντικό ρόλο στη μεταφορά χαλκού και την άμυνα του οργανισμού έναντι των ROS, ιδιαίτερα στην οξείδωση του Fe²⁺ σε Fe³⁺ μέσω της αναστολής της αντίδρασης Fenton. Αυτή η αντίδραση είναι επίσης απαραίτητη για την κινητοποίηση και την απελευθέρωση του σιδήρου από τα κύτταρα για να προσληφθεί από την κυκλοφορούσα πρωτεΐνη μεταφοράς του σιδήρου τρανσφερρίνης. Είναι επίσης σημαντική στον έλεγχο της οξείδωσης των λιπιδίων των μεμβρανών, καθώς αναστέλλει την οξείδωση των λιπιδίων, των φωσφολιπιδίων, των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και των μικροσωμικών μεμβρανών και προστατεύει από την οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών και του DNA.^[64]

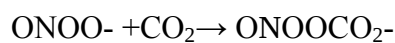
1.4 Επιδράσεις ελευθέρων ριζών

Πρωτεΐνες

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αρκετών ερευνών, η υδροξυλική ρίζα (κυρίως) και το O₂- αντιδρούν με πρωτεΐνες αποσπώντας ένα άτομο H, σχηματίζοντας έτσι άλλες ρίζες που κάτω από αερόβιες συνθήκες αντιδρούν με το dioxygen για να προκύψουν υπεροξειδικές ρίζες (peroxyl radicals) που μετατρέπονται σε αλκυλιωμένη μορφή ύστερα από αντίδραση με την πρωτονιωμένη μορφή του υπεροξειδίου. Οι υδροξυλικές ρίζες επιδρούν βλαβερά στις πρωτεΐνες είτε παράγονται ύστερα από επίδραση ιονίζουσας ακτινοβολίας είτε παράγονται in vivo μέσω της αντίδρασης Fenton. Η οξείδωση των πρωτεϊνών λόγω ROS οδηγεί στον σχηματισμό ορισμένων ενδο ή δια-πρωτεϊνικών σταυρο-συνδέσεων με τους εξής τρόπους : α) προσθήκη λυσίνης στην αμινική περιοχή των καρβονυλοομάδων των οξειδωμένων πρωτεϊνών, β) οξείδωση των σουλφυδρικών ομάδων των κυστεϊνικών καταλοίπων σχηματίζοντας σταυροσυνδέσμους τύπου S-S, γ) οξείδωση των καταλοίπων τυροσίνης σχηματίζοντας σταυροσυνδέσμους τύπου tyr - tyr. Τα κατάλοιπα κυστεΐνης και μεθειονίνης των πρωτεϊνών είναι εν μέρει επιδεκτικά σε οξείδωση από ROS . Συγκεκριμένα, τα κατάλοιπα της κυστεΐνης σχηματίζουν ενδο ή διά - πρωτεϊνικούς σταυροσυνδέσμους που επιδιορθώνονται με αντιδράσεις ανταλλαγής δισουλφιδίου και οι οποίες καταλύονται από θειολοτρανσφεράσες, ενώ τα κατάλοιπα μεθειονίνης με την οξείδωση τους σχηματίζουν μίγμα R και S ισομερών του σουλφοξειδίου της μεθειονίνης σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση



Οξείδωση των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει από το ONOO- που προκύπτει ύστερα από αντίδραση του NO με το 2·'. Το ONOO- μπορεί να νιτροσυλιώσει τα κατάλοιπα κυστεΐνης, τυροσίνης, τρυπτοφάνης και μεθειονίνης. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή μπορεί να ανασταλλεί ύστερα από αντίδραση του ONOO- με CO₂ σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση :

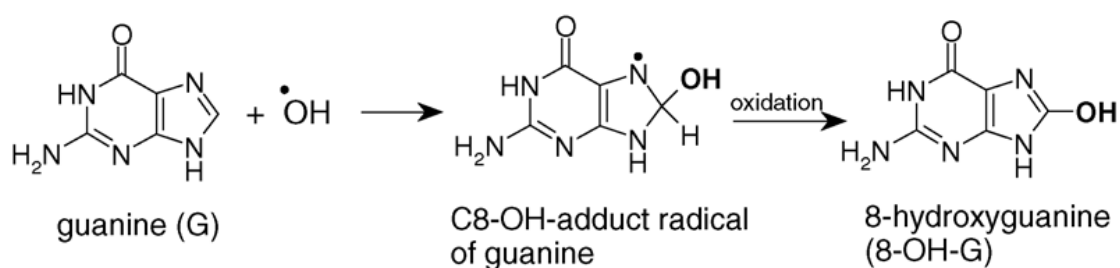


Η οξείδωση των πρωτεϊνών λόγω ROS θεωρείται σημαντική αιτία γήρανσης και πρόκλησης διαφόρων ασθενειών. εμπλοκή της οξείδωσης των πρωτεϊνών στην γήρανση πιστεύεται ότι οφείλεται στην συσσώρευση των οξειδωμένων μορφών των πρωτεϊνών που με τη σειρά της μπορεί να οφείλεται α) σε αύξηση των επιπέδων ROS και RNS του οργανισμού, β) σε μείωση της ικανότητας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών, γ) σε μείωση της ικανότητας του οργανισμού να αποικοδομεί οξειδωμένες πρωτεΐνες, δ) σε μειωμένες συγκεντρώσεις πρωτεασών, ε) σε αυξημένες συγκεντρώσεις αναστολέων των πρωτεασών. Η εκτίμηση της οφειλόμενης σε ROS οξείδωσης των πρωτεϊνών γίνεται με ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνικών καρβονυλοομάδων.^[19]

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.^[65]

Βλάβες στο πυρηνικό και στο μιτοχονδριακό DNA

Η οξείδωση του DNA και του RNA συμβαίνει κυρίως από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και κυρίως από ρίζα υδροξυλίου. Το RNA θεωρητικά οξειδώνεται πιο εύκολα δεδομένου ότι βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και είναι μονόκλωνο. Ο χρόνος ημιζωής της ρίζας υδροξυλίου είναι μικρός με αποτέλεσμα μόνο αυτές που παράγονται στην περιοχή του DNA να μπορούν να δράσουν σε αυτό. Η μη ειδική δέσμευση ιόντων Fe^{2+} στο DNA προκαλεί την τοπική παραγωγή αυτών των ριζών. Και οι τέσσερις βάσεις του DNA είναι δυνατό να υποστούν οξείδωση.^[11] Οι ROS τροποποιούν το DNA ποικιλοτρόπως προκαλώντας σπασίματα στον έναν ή και στους δύο κλώνους, τροποποίηση των πουρινών και των πυριμιδινών ή τροποποίηση της δεσοξυριβόζης που μπορούν να σημάνουν μη έναρξη της μεταγραφής του DNA, μη επιδιόρθωση των λαθών που γίνονται κατά την αντιγραφή του DNA και εμφάνιση γενετικής αστάθειας. Η ρίζα με τις πιο βλαβερές επιδράσεις στο DNA είναι η υδροξυλική αφού μπορεί να διασπά διπλούς δεσμούς των βάσεων αποσπώντας ένα άτομο από την μεθυλοομάδα της θυμίνης και από καθένα από τα 5 άτομα άνθρακα της δεσοξυριβόζης έχοντας ως συνέπεια την παραγωγή αλλυλικών ριζών της θυμίνης και των σακχάρων που προκύπτουν από αντιδράσεις απόσπασης. Περαιτέρω αντιδράσεις των ριζών των βάσεων και των σακχάρων συνεπάγονται παραγωγή τροποποιημένων βάσεων και σακχάρων με τις αναμενόμενες δυσμενείς συνέπειες για το DNA. Η υδροξυλική ρίζα αντιδρά επίσης με την γουανίνη σχηματίζοντας την 8-υδροξυγουανίνη (8- OH-G) που αποτελεί μεταλλαξογόνο προϊόν της οξείδωσης του DNA αλλά και καλό δείκτη του οξειδωτικού στρες. Σημαντικές βλάβες στο DNA προκαλούνται όχι μόνο από τις ROS αλλά και από τις RNS με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα οξείδια του αζώτου αλλά και το υπεροξυνιτρικό που ανχιδρώντας με την γουανίνη σχηματίζει την 8- νιτρογουανίνη που προκαλεί μεταπτώσεις GOAT.



Εικόνα 17: Αντίδραση της υδροξυλικής ρίζας με την γουανίνη από την οποία προκύπτει 8-υδροξυγουανίνη (πηγή: M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress - induced cancer, Chemico- Biological interactions, 1-40, 2006)

Σημαντικές τροποποιήσεις υφίσταται επίσης και το μιτοχονδριακό DNA, το οποίο είναι περισσότερο ευαίσθητο απέναντι στη δράση των ελευθέρων ριζών. Οι πιθανοί

λόγοι είναι οι εξής : α) τα μιτοχόνδρια αποτελούν κύρια πηγή ελευθέρων ριζών και συνεπώς το DNA τους εκτίθεται σε μεγαλύτερες ποσότητες ελευθέρων ριζών σε σχέση με το πυρηνικό, β) τα μιτοχόνδρια δεν διαθέτουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA στον βαθμό που τους διαθέτει ο πυρήνας, γ) το μιτοχονδριακό DNA δεν προστατεύεται από ιστόνες, δ) τα μιτοχόνδρια αποτελούν συχνό στόχο πολλών ξеноβιοτικών καρκινογόνων ουσιών. Η αξιολόγηση της οξειδωτικής βλάβης στο DNA γίνεται με διάφορες τεχνικές με πιο διαδεδομένη αυτήν που περιλαμβάνει ενζυμική αποικοδόμηση του DNA ώστε τα οξειδωμένα προϊόντα του να μελετηθούν κατ' όπιν με HPLC (High Performance Liquid Chromatography) και ηλεκτροχημική ανίχνευση.^[19] Το DNA είναι ίσως ο πιο σημαντικός 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.^[68]

Υπεροξείδωση των λιπιδίων

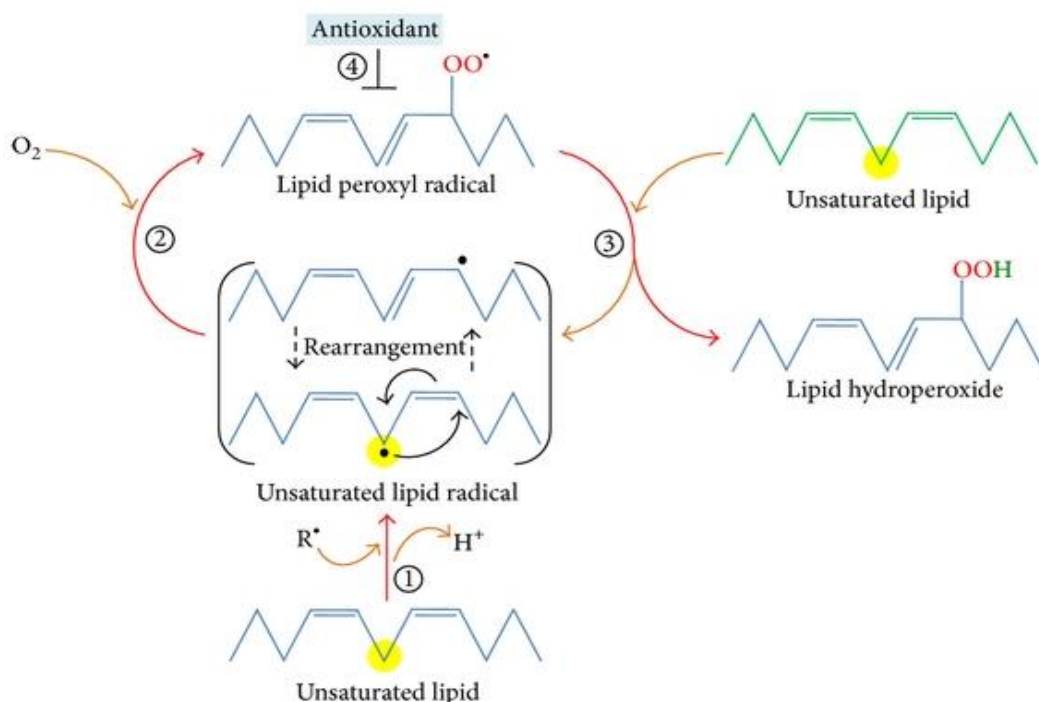
Η υπεροξείδωση των λιπιδίων είναι μια αλυσιδωτή αντίδραση που ξεκινά από μια ελεύθερη ρίζα και κατά την οποία μια ρίζα μπορεί να επάγει την οξείδωση μεγάλου αριθμού λιπιδιακών μορίων, κυρίως φωσφολιπιδίων που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA). Τα μονοακόρεστα και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα δεν συμμετέχουν συνήθως στην υπεροξείδωση, παρά μόνο κάτω από πολύ έντονες συνθήκες. Η υπεροξείδωση (αυτοοξείδωση) των λιπιδίων διακρίνεται σε 3 στάδια : έναρξη, διάδοση και τερματισμός.

Στάδιο έναρξης: Στην έναρξη, παράγεται (ασταθής) λιπιδιακή ρίζα ύστερα από αντίδραση μιας ελεύθερης ρίζας με ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ PUFA. Πιο συγκεκριμένα, τα προ-οξειδωτικά επιτίθενται στα λιπίδια αυτά που περιέχουν διπλό δεσμό άνθρακα, προκαλώντας αφαίρεση υδρογόνου από μια ομάδα μεθυλενίου αφήνοντας ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στον άνθρακα ($\cdot\text{CH}$).

Στάδιο διάδοσης: 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 ασταθής λιπιδιακή ρίζα αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο σχηματίζοντας ρίζα λιποειδικού υπεροξειδίου. ($\text{LOO}\cdot$) Στη συνέχεια, αντιδρά με ένα άλλο λιπαρό οξύ αποσπώντας του ένα άτομο και σχηματίζοντας υδρουπεροξείδιο (LOOH) που είναι το πρώτο σχετικά σταθερό προϊόν της σειράς των αντιδράσεων της υπεροξείδωσης των λιπιδίων.

Στάδιο Τερματισμού: Σε αυτό το στάδιο γίνονται αντιδράσεις, οι οποίες δίνουν σταθερά μη δραστικά προϊόντα με αποτέλεσμα να επιβραδύνεται και να τελειώνει η (αυτ)οξείδωση. Το κατεξοχήν μόριο που τερματίζει τις αλυσιδωτές αντιδράσεις είναι η Βιταμίνη Ε. Ο τερματισμός της υπεροξείδωσης των λιπιδίων συμβαίνει με αντίδραση μεταξύ δύο ριζών. Πιο συγκεκριμένα, αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη Ε δίνουν ένα άτομο υδρογόνου στη ρίζα λιποειδικού υπεροξειδίου ($\text{LOO}\cdot$) και

σχηματίζει μια ρίζα βιταμίνης E που αντιδρά με μία άλλη $\text{LOO}^\bullet$ προς παραγωγή μη ριζικών προϊόντων.



Εικόνα 18: Απεικόνιση των τριών σταδίων της λιποξειδωτικής υπεροξειδωσις (πηγή: Oxid Med Cell Longev. 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438. Epub 2014 May 8)

Η υπεροξειδωσις των λιπιδίων δεν εμπλέκεται μόνο στην καταστροφή των μεμβρανικών λιπιδίων αλλά με παραπέρα διάσπαση των λιπιδιακών υπεροξειδίων μπορεί να παράγει τοξικές ενώσεις που είναι συνήθως αλδεϋδες. Ανάμεσα στις πολλές διαφορετικές αλδεϋδες που μπορούν να σχηματιστούν ως δευτερογενή προϊόντα κατά την υπεροξειδωσις των λιπιδίων είναι η μηλονική αλδεϋδη (MDA), η προπανάλη, η εξανάλη, και η 4-υδροξυονενάλη (4-HNE). Η MDA φαίνεται να είναι το πιο μεταλλαξογόνο προϊόν της υπεροξειδωσις των λιπιδίων, ενώ η 4-HNE είναι το πιο τοξική. Εκτός από αλδεϋδες μπορεί να παραχθεί πεντάνιο και αιθάνιο, κατά την οξειδωσις των ω -3 και ω -6 λιπαρών οξέων.

MDA: Σχηματίζεται με ενζυμικές ή μη ενζυμικές διαδικασίες. Παράγεται *in vivo* από ενζυμικές διαδικασίες κατά τη διάρκεια της βιοσύνθεσης της θρομβοξανής A_2 (TXA_2). Η TXA_2 είναι μεταβολίτης του αραχιδονικού οξέος (AA) που σχηματίζεται με τη δράση της συνθάσης της θρομβοξανής A_2 , στην προσταγλανδίνη H_2 (PGH_2), η οποία έχει προηγουμένως δημιουργεί 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. 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 προσπαθούν πιο ενεργό περιβάλλον για τη συμπίνωσή 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 ι 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.^[69]

4-HNE: Παράγεται επίσης με ενζυμικά 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 μικροφάγα, 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-υδρουπεροξυδεκαοκταδιενοϊκό οξύ (13-HPODE) από την οξείδωση του LA με την 15-LOX-1 και το 15 υδρουπεροξυεικοσατετραενοϊκό οξύ (15-HPETE) που παράγεται από την οξείδωση του AA με την 15-LOX-2. 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. 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 των 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.^[69]

Στη περίπτωση με των λιπαρών οξέων με περισσότερους από δύο διπλούς δεσμούς, η εκκίνηση και η εξέλιξη της αντίδρασης γίνεται πιο γρήγορα και εύκολα! Αν οι διπλοί δεσμοί είναι περισσότεροι των δύο, τότε μπορεί να υπάρξουν υδρο-υπεροξειδία με συζυγείς διπλούς δεσμούς. Στην περίπτωση των κορεσμένων λιπαρών οξέων, το υδρο-υπεροξειδίο σχηματίζεται συνήθως στο β-άνθρακα του εστέρα (ή του καρβοξυλίου) και στη συνέχεια γίνεται κετο-ομάδα καταλήγοντας σε ένα β-κετοξύ.

Τα πρωτοσηματιζόμενα προϊόντα των αντιδράσεων δεν αλλάζουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες της λιπαρής ύλης. Στη συνέχεια όμως αλλάζουν κυρίως από τις σχηματιζόμενες αλδεύδες και τα οξέα. Στα τελικά στάδια της οξειδωσης, σχηματίζονται πολυμερή που επιδρούν στην υφή, στη γεύση, στο χρώμα κ.ά της λιπαρής ύλης. Επιπρόσθετα, πολλά από τα πολυμερή αυτά είναι τοξικά. Τα πολυμερή, εκτός από την αντίδραση τύπου Diels-Alder, μπορούν να σχημαριστούν με απλούς δεσμούς C-C μεταξύ δύο ή περισσότερων μορίων ή με δεσμούς C-O ή O-O όπου το οξυγόνο ανήκει στο υπεροξείδιο.^[11]

Τέλος, η χοληστερόλη αποτελεί επίσης στόχο των ελεύθερων ριζών και η οξειδωσή της δημιουργεί διάφορες οξυ-στερόλες, ανάλογα με το βαθμό της οξειδωσης. Η εκτεταμένη οξειδωση των λιποειδών των μεμβρανών μπορεί να επηρεάσει τη ρευστότητά τους, τη διαπερατότητά τους και γενικά να προκαλέσει τη δυσλειτουργία τους.^[11]

1.5 Μέθοδοι προσδιορισμού οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να εκτιμηθεί με μέτρηση: α) ελευθέρων ριζών, β) των βλαβών σε λιπίδια, πρωτεΐνες ή και DNA, γ) της αντιοξειδωτικής ενζυμικής δραστηριότητας.

Άμεση ανίχνευση των ελεύθερων ριζών

Η παραγωγή των ROS μπορεί να ανιχνευθεί και να προσδιοριστεί με άμεσες μεθόδους. Η τεχνική του συντονισμού περιστροφής των ηλεκτρονίων(electron spin Resonance, ESR) είναι μία άμεση φασματοσκοπική μέθοδος που επιτρέπει την άμεση μέτρηση των ROS σύμφωνα με τις παραμαγνητικές ιδιότητές τους. Οι μετρήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν in vitro, in vivo ή ex vivo. . Η ESR χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τεχνική του spin trapping, όπου ένα μόριο-παγίδα αφήνεται να αντιδράσει με μια ρίζα ώστε να παραχθεί ένα σταθερότερο και μετρήσιμο προϊόν.

Προσδιορισμός οξειδωτικής βλάβης στα λιπίδια

Κατά την υπεροξείδωση των λιπαρών οξέων ή των λιποειδικών μεμβρανών δημιουργείται ένα ευρύ φάσμα πρωτογενών προϊόντων οξειδωσης όπως τα συζευγμένα διένια και τα λιπιδικά υδροϋπεροξείδια, και δευτερογενών προϊόντων οξειδωσης, όπως η μαλονδιαλδεϋδη (MDA), τα F2-ισοπροστάνια, το πεντάνιο, το αιθάνιο ή το εξάνιο. Η μέτρηση των συζευγμένων διενίων ανιχνεύει τη μοριακή αναδιοργάνωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της αρχικής φάσης της λιπιδικής υπεροξείδωσης. Τα λιπιδικά υδροϋπεροξείδια είναι ένας ακόμη δείκτης της αρχικής αντίδρασης των ελευθέρων ριζών.^[70] Η MDA είναι ένα δευτερογενές προϊόν οξειδωσης και παράγεται κατά την αυτοοξειδωση των λιπαρών οξέων με 3 ή 4 διπλούς δεσμούς. Αυτή η ουσία προσδιορίζεται κατά την αντίδραση της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ, που παράγει τις δραστικές ουσίες του θειοβαρβιτουρικού οξέος (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 ανιχνευτεί και τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) που θεωρείται πιο ακριβής από αυτή του TBA. Το TBA γενικά αντιδρά με μια σειρά από οξειδωμένα λιπίδια (κορεσμένα και ακόρεστα), αλδεϋδες, σακχαρόζη και ουρία, για να σχηματίσει διάφορες έγχρωμες ουσίες (TBARS) και γι' αυτό αποτελεί τη πιο κοινή μέθοδο για τον προσδιορισμό των προϊόντων οξείδωσης των λιποειδών.^[71]

Τα ισοπροστάνια ανήκουν στην οικογένεια των εικοσανοειδών και εμφανίζονται αυξημένα λόγω οξειδωτικού στρες στο πλάσμα, στους ιστούς και στα ούρα. Ο *in vivo* προσδιορισμός των F2- ισοπροστανίων, τα οποία παράγονται μη ενζυμικά μέσω της υπεροξείδωσης των φωσφολιπιδίων των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών από τη ρίζα οξυγόνου, είναι μια ακόμη μέθοδος προσδιορισμού της ενδογενούς λιπιδικής υπεροξείδωσης και οξειδωτικής βλάβης. Η ανίχνευσή τους μπορεί να πραγματοποιηθεί με την ανοσοενζυμική μέθοδο προσρόφησης (ELISA) καθώς και με αέρια χρωματογραφία (GC).^[72]

Προσδιορισμός οξειδωτικής βλάβης στο DNA

Οι ROS επάγουν πολλούς τύπους DNA βλάβης όπως σπάσιμο κλώνων, τροποποιήσεις βάσεων και σταυροδιασυνδέσεις DNA-πρωτεΐνης. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση των DNA τροποποιήσεων. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος δείκτης είναι το νουκλεοτίδιο 8-OHdG, που παράγεται κατά την οξείδωση της γουανίνης από τις ελεύθερες ρίζες.^[74] 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.^[75]

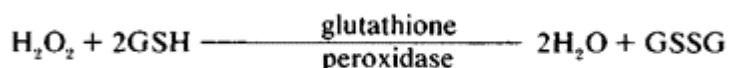
Προσδιορισμός οξειδωτικής βλάβης στις πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες οξειδώνονται είτε με απ' ευθείας επίθεση ROS είτε με έμμεση δράση από την υπεροξειδάση των λιπιδίων. Ως αποτέλεσμα, ρίζες καρβονυλίου εισέρχονται στις πρωτεΐνες με άμεση οξείδωση των αμινοξέων ή με έμμεση προσκόλληση μέρους καρβονυλίου. Με αυτόν τον τρόπο μεταβάλλεται η δομή στο χώρο των πρωτεϊνών και η λειτουργικότητά τους. Έτσι, η μέτρηση του σχηματισμού καρβονυλίων είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος προσδιορισμού της πρωτεϊνικής βλάβης. Οι ολικές πρωτεΐνες συχνά μετριοούνται, με σκοπό ο λόγος των καρβονυλίων προς τις πρωτεΐνες να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης πρωτεϊνικής οξείδωσης. Μερικές μέθοδοι που

χρησιμοποιούνται για ανίχνευση καρβονυλομάδων στις πρωτεΐνες είναι η φασματοφωτομετρία, η ELISA και η ηλεκτροφόρηση με Western blot.^[74] Ακόμη, ο προσδιορισμός των οξειδωμένων αμινοξέων αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο μέτρησης των οξειδωμένων πρωτεϊνών.

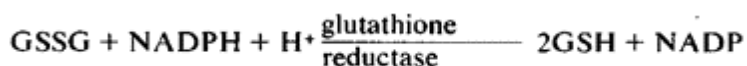
Μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων που εμπλέκονται στο οξειδωτικό στρες

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 19: η οξείδωση της γλουταθειόνης

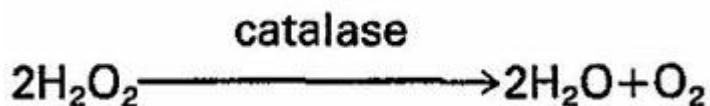
Ακολούθως, η οξειδωμένη GSSG θα αναχθεί με τη βοήθεια της GR. Το NADPH ταυτόχρονα θα οξειδωθεί σε NADP⁺ μεταβάλλοντας την απορρόφηση στα 340nm.



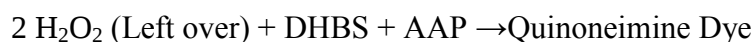
Εικόνα 20: αναγωγή της γλουταθειόνης

Ο αριθμός των μορίων GSH που οξειδώθηκαν με τη δράση της GPx υπολογίζεται έμμεσα από τη μέτρηση της απορρόφησης του καταναλισκόμενου NADPH.^[77]

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 ανάλογο 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 αζιδίου νατρίου. Το υπόλοιπο του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο μίγμα της αντίδρασης διευκολύνει την αντίδραση σύζευξης των χρωμοφώρων DHBS και AAP σε συνδυασμό με έναν καταλύτη HRP. Το προϊόν σύζευξης της κινονεμινικής χρήσης μετράται στα 520nm, που συσχετίζεται με την ποσότητα του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παραμένει στο μίγμα της αντίδρασης.^[78]



HRP



Δραστικότητα SOD: Η SOD καταλύει τη μετατροπή του $\cdot\text{O}_2^-$ σε H_2O_2 . Η δραστικότητά της προσδιορίζεται με τη χρήση του υδροδιαλυτού άλατος 4-[3-(νιτροφαινυλ)-2H-5-τετραζόλιο+1,3- βενζολο δισουλφονικού (WST-1). Η μέθοδος στηρίζεται στην παραγωγή του προϊόντος formazan έπειτα από σύνδεση του WST-1 με το $\cdot\text{O}_2^-$ και τη μετέπειτα αναγωγή του. Ο ρυθμός αναγωγής σχετίζεται γραμμικά με τη δραστικότητα 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 δραστικότητα της SOD προσδιορίζεται με τη μέτρηση της μείωσης εμφάνισης χρώματος στα 450nm.^[76]

Μέτρηση επιπέδων αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά που δρουν κατά την διάρκεια των αντιδράσεων των ROS θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την έμμεση εκτίμηση του οξειδωτικού στρες. Μία προσέγγιση είναι να μετρηθούν μεμονωμένα αντιοξειδωτικά όπως ουρικό οξύ, τοκοφερόλη, ασκορβικό οξύ) στο αίμα, στο πλάσμα και στους ιστούς. Ωστόσο, μια τέτοια διαδικασία θα ήταν χρονοβόρα, δαπανηρή, απαιτητική, δεν μπορούσε να ανιχνεύσει τις συνεργιστικές επιδράσεις μεταξύ των αντιοξειδωτικών, καθώς και την επίδραση των αντιοξειδωτικών ενώσεων που πιθανόν να μη γνωρίζουμε.^[81] Συνεπώς λόγω του μεγάλου πλήθους αντιοξειδωτικών στα ανθρώπινα υγρά και ιστούς, έχουν αναπτυχθεί πολλοί μέθοδοι προσδιορισμού και μέτρησης της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας. (TAC) ενός βιολογικού δείγματος, στο πλάσμα και στα βιολογικά υγρά. Η χρήση ενός προοξειδωτικού με σκοπό να ποσοτικοποιήσουμε την ικανότητα απορρόφησης της ρίζας οξυγόνου είναι μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές. Ωστόσο, οι συσχετίσεις μεταξύ των in vivo και των in vitro αποτελεσμάτων δεν είναι γνωστές.^[80] Δεν υπάρχουν επίσης τιμές αναφοράς για τα βέλτιστα επίπεδα των αντιοξειδωτικών στα ούρα, στο αίμα, σε ενδοκυττάριο επίπεδο. Επιπρόσθετα, 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.^[81]

Κεφάλαιο 2ο : ΕΡΥΘΡΟΚΥΤΤΑΡΑ

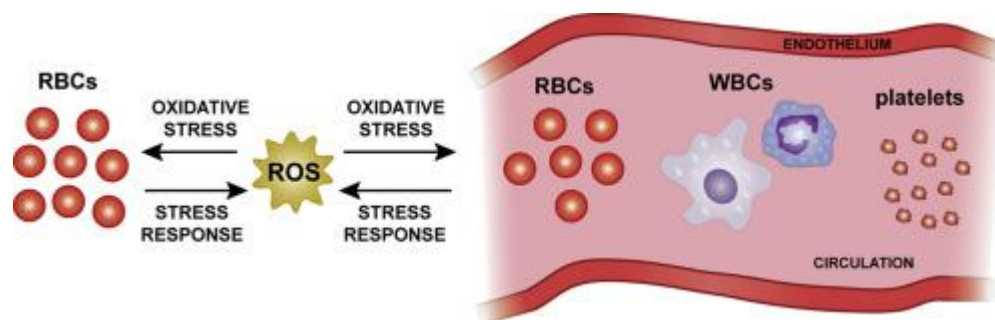
2.1 Ορισμός και λειτουργία των ερυθροκυττάρων (RBC)

Τα ερυθροκύτταρα ή ερυθρά αιμοσφαίρια (RBC) παράγονται στον μυελό των οστών ως ποερυθροβλάστες, η οποία μετά από προοδευτική ωρίμανση και διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις μετατρέπεται σε ώριμα ερυθροκύτταρα. Το κύτταρο αυτό κατά την εξέλιξή του εμπλουτίζεται με αιμοσφαιρίνη (Hb) , ενώ στα τελευταία στάδια ο πυρήνας αρχίζει να μικραίνει σε μέγεθος και τελικά αποβάλλεται. Τα νέα ερυθροκύτταρα στο μυελό των οστών περιέχουν εντούτοις λίγα ριβοσώματα και ονομάζονται δικτυοερυθροκύτταρα, καθώς παρουσιάζουν μία δικτυωτή μορφή. Σε 2-3 μέρες χάνουν αυτό το δίκτυο και μεταπίπτουν σε κοινά ερυθροκύτταρα. Συνεπώς, τα ερυθροκύτταρα είναι απύρηνα κύτταρα, χωρίς ριβοσώματα και μιτοχόνδρια με

αποτέλεσμα να μην μπορούν να παράγουν RNA, ATP και να συνθέτουν πρωτεΐνες. Έτσι η επιβίωσή τους στηρίζεται στην ενέργεια που προέρχεται από την οξειδωτική φωσφορυλίωση της γλυκόζης. Είναι κύτταρα με σχήμα αμφίκοιλου δίσκου, το οποίο τους επιτρέπει να περάσουν εύκολα μέσα από τα τριχοειδή.^[109] Σε αυτό βοηθάει και η ευλυγισία της κυτταρικής τους μεμβράνης. Τα RBCs έχουν διάμετρο $\sim 7 \mu\text{m}$, πάχος $\sim 2 \mu\text{m}$, και μια μεμβράνη επιφάνεια πλάσματος $\sim 160 \mu\text{m}^2$. Το σχήμα τους και το μικρό τους μέγεθος τους προσδίδουν μια υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο, έτσι ώστε το O_2 και το CO_2 να διαχέονται γρήγορα προς και από το εσωτερικό του κυττάρου. Τα ερυθροκύτταρα είναι το πιο άφθονο συστατικό του αίματος, και 1 μL ανθρώπινου αίματος περιέχει $\sim 4\text{-}5$ εκατομμύρια RBC. Ο χρόνος ημίσειας ζωής του ανθρώπινων ερυθροκυττάρων κυμαίνεται από 100 ημέρες έως 120 ημέρες. Διάφοροι υποδοχείς, πρωτεΐνες, και λειτουργικές ομάδες επί της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων παρέχουν θέσεις για αντισώματα δέσμησης, ειδικούς συνδέτες, και φαρμακευτικές ουσίες.^[108] Η βασική λειτουργία των RBC είναι η μεταφορά του O_2 , από τους πνεύμονες στους ιστούς και του CO_2 , από τα κύτταρα όπου παράγεται προς τους πνεύμονες, καθώς και η ρύθμιση του PH. Το O_2 και σε μικρότερο ποσοστό το CO_2 συνδέονται με την αιμοσφαιρίνη που περιέχεται στα ερυθροκύτταρα. Η αιμοσφαιρίνη είναι μια πρωτεΐνη σφαιρικού σχήματος που αποτελείται από την αίμη και τη σφαιρίνη. Τη σφαιρίνη αποτελούν τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, ενώ η αίμη περιέχει σίδηρο (Fe). Ο σίδηρος της αίμης είναι αυτός που δεσμεύει το O_2 . Οι κύριες λειτουργίες της αιμοσφαιρίνης είναι η μεταφορά του O_2 , η συμβολή στη μεταφορά του CO_2 , καθώς και η συμβολή στη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας του αίματος.^[110]

Φυσιολογικά, τα ερυθροκύτταρα εξέρχονται από τα αρτηρίδια των σπληνικών πολφών και μέσω μικρών πόρων εισέρχονται στους κόλπους του σπλήνα, όπου τα γερασμένα ερυθροκύτταρα συλλέγονται και καταστρέφονται (αιμόλυση). Τα μακροφάγα του σπλήνα, του ήπατος, του μυελού των οστών κλπ παγιδεύουν και καταστρέφουν τα κυτταρικά τμήματα. Η αίμη που απελευθερώνεται κατά την αιμόλυση μεταβολίζεται σε χολερυθρίνη, ενώ ο περιεχόμενος σε αυτή σίδηρος ανακυκλώνεται.^[110]

2.2 Ο ρόλος των ερυθροκυττάρων στο οξειδωτικό στρες



Εικόνα 21: Οξειδωτικό στρες στα ερυθροκύτταρα (πηγή: 3) S. Voskou, M. Aslan, P. Fanis, M. Phylactides, M. Kleanthous, Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease, Redox Biology 6 (2015) 226–239)

Ο κύριος λειτουργικός ρόλος των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs) είναι η μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς παρέχοντας σε όλα τα κύτταρα το απαιτούμενο οξυγόνο. Στην κυκλοφορία, τα RBCs εκτίθενται συνεχώς τόσο σε ενδογενείς όσο και εξωγενείς πηγές ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), που μπορούν να βλάψουν τα RBCs και την λειτουργία τους. Για να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση αυτών των ROS και του προκύπτον οξειδωτικού στρες, τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν ένα εκτεταμένο αντιοξειδωτικό σύστημα που περιλαμβάνει τόσο μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά χαμηλού μοριακού βάρους, όπως η γλουταθειόνη και ασκορβικό οξύ και ενζυμικά αντιοξειδωτικά, συμπεριλαμβανομένων υπεροξειδική δισμουτάση, καταλάση, υπεροξειδάση γλουταθειόνης.^[1] Το μεγαλύτερο μέρος των ROS που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα εντός του πλάσματος εξουδετερώνεται από τα κυτοσολικά αντιοξειδωτικά των RBCs. Για παράδειγμα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου που προστίθεται στα RBCs αντιδρά ταχέως με καταλάση και μετατρέπεται σε οξυγόνο, χωρίς οξείδωση της αιμοσφαιρίνης (Hb). Επιπλέον, τα ενδογενή ROS παράγονται συνεχώς από την αργή αυτοοξείδωση της Hb, η οποία παράγει μεθαιμοσφαιρίνη (που δεν μπορεί πλέον να μεταφέρει οξυγόνο) και δισμουτάση προς σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ωστόσο, η ικανότητα του αντιοξειδωτικού συστήματος για την εξουδετέρωση του ενδογενούς ROS είναι περιορισμένη καθώς το αίμα ρέει μέσα από την μικροκυκλοφορία και η Hb γίνεται μερικώς οξυγονωμένη. Μερική οξυγόνωση καταλήγει σε μεταβολή της διαμόρφωσης της Hb με ορισμένες μοναδικές ιδιότητες. Έτσι, υπάρχει μια δραματική αύξηση στο ρυθμό της Hb αυτο-οξείδωσης. Ταυτόχρονα η αύξηση της συγγένειας της μερικώς οξυγονωμένης Hb για τη μεμβράνη των RBCs περιορίζει την αποτελεσματικότητα του αντιοξειδωτικού της συστήματος. Η αυτοοξείδωση της Hb μπορεί επίσης να αντιδράσει με τα λιπίδια της μεμβράνης και τις πρωτεΐνες που παράγουν υπεροξειδωση λιπιδίων και τροποποιημένες πρωτεΐνες μεμβράνης με άμεση επίδραση στη δομή της. Το οξειδωτικό στρες έχει επίδραση και σε κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες. Η σπεκτρίνη είναι ένας σημαντικός στόχος των ROS και η οξείδωσή της έχει σαν αποτέλεσμα την διατάραξη της αλληλεπίδρασης της με άλλες πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, όπως η ακτίνη ή με πρωτεΐνες που γεφυρώνουν τη μεμβράνη και τον κυτταρικό σκελετό. Αυτό οδηγεί σε διαταραχή της σταθερότητάς της με τη μεμβράνης και επομένως αυξημένη ευθραυστότητα.[3] Αυτή η δεξαμενή των παραγόμενων ROS στα RBCs έχει δείχθει ότι προκαλεί (1) ζημία της μεμβράνης των RBCs, μείωση της ροής τους μέσω της μικροκυκλοφορίας και (2) κατά την μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς, η επαφή τους με κύτταρα ιστών έχει ως αποτέλεσμα τη βλάβη αυτών των ιστών που επάγει φλεγμονή. Τα RBCs περιέχουν επίσης NADH οξειδάσες, οι οποίες αποτελούν ενδογενή πηγή παραγωγής ROS. Η NADH οξειδάση των RBCs και οι πιθανές φυσιολογικές συνέπειες της μελετήθηκαν για πρώτη φορά στη δρεπανοκυτταρική νόσο. Ωστόσο, ορισμένες μορφές της NADH οξειδάσης ανιχνεύθηκαν επίσης σε φυσιολογικά RBCs. Μία από τις ισομορφές της

NADH οξειδάσης στα RBCs βρίσκεται στη μεμβράνη. Η πιθανή επίδραση αυτής της ισομορφής της NADH οξειδάσης πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω κατά τη διάρκεια της κυτταρικής γήρανσης σε φυσιολογικά ερυθρά αιμοσφαίρια.^[1] Το οξειδωτικό στρες φαίνεται επίσης να μπορεί να αναστέλλει την Ca-ATPάση, η οποία είναι υπεύθυνη για τον περιορισμό της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης ασβεστίου με αποτέλεσμα την ενίσχυση του Ca ενδοκυτταρικά. Στη συνέχεια, αυτή η μεταβολή ενεργοποιεί τους διαύλους Gardos που επάγουν διαρροή καλίου επηρεάζοντας την κατιοντική ομοιόσταση των RBC με αποτέλεσμα τη συρρίκνωση του κυττάρου και τη ακαμψία του κυττάρου. Συνεπώς, πρόκειται για μία διαδικασία επαγόμενη από το οξειδωτικό στρες που οδηγεί στη πρόωρη γήρανση των RBCs.^[1,2]

2.2.1 Πηγές οξειδωτικού στρες στα ερυθροκύτταρα

Οξειδωτική μετουσίωση αιμοσφαιρίνης: Αν και οξυγονωμένη αιμοσφαιρίνη θεωρείται ένα σχετικά σταθερό μόριο, μπορεί φυσιολογικά να αυτό-οξειδώνεται σε μεθαιμοσφαιρίνη [Hb (FeIII)] σε ρυθμό ~ 0,5-3% ανά ημέρα. Η αυτο-οξείδωσης της είναι πιο έντονη κάτω από υποξικές συνθήκες (π.χ. στη μικροκυκλοφορία) και για ασταθείς αιμοσφαιρίνες (Hb) όπως δρεπανοκυτταρική αιμοσφαιρίνη (HbS) ή ελεύθερες αλυσίδες α-σφαιρίνης και είναι σχεδόν εξ ολοκλήρου υπεύθυνη για την παραγωγή ROS εντός των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBCs). Στη δρεπανοκυτταρική αναιμία (SCD) και τη β-θαλασσαιμία στα ερυθρά αιμοσφαίρια, η αυτοοξείδωσης της Hb είναι πιο έντονη.^[113] Τα ιόντα υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγονται από την αυτο-οξείδωσης της αιμοσφαιρίνης μετατρέπονται γρήγορα σε υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂) είτε με αυθόρμητες ή ενζυμικές (υπεροξειδική δισμουτάση) αντιδράσεις αυτοοξειδοαναγωγής

Το H₂O₂ μπορεί να αντιδράσει είτε με την οξυγονωμένη (oxyHb) είτε με τη οξειδωμένη (MetHb) αιμοσφαιρίνη με αποτέλεσμα την αυξημένη διάσπαση της αίμης. Έχει παρατηρηθεί ότι η αίμη έχει χαμηλότερη συγγένεια για MetHb από oxyHb, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη διάσπαση της αίμης. Μελέτες in vitro έχουν δείξει ότι το H₂O₂ μπορεί να αντιδράσει με ελεύθερη αίμη με επακόλουθη αποδόμηση αίμης και την απελευθέρωση σιδήρου. Επιπλέον, η αντίδραση του ferryHb με H₂O₂ έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μέσα στο θύλακα αίμης, η οποία προωθεί την υποβάθμιση αίμης και την επακόλουθη απελευθέρωση των προϊόντων αποικοδόμησης αίμης και σιδήρου [Fe (III)].

Αίμη και σίδηρος ως οξειδωτικά μόρια: Ο σίδηρος, είτε σε ελεύθερη μορφή ή συνδεδεμένος με αίμη και Hb, μπορεί να δράσει ως ένα αντιδραστήριο Fenton στον κύκλο Haber-Weiss, κατά τον οποίο παράγει την εξαιρετικά αντιδραστική ρίζα υδροξυλίου (•OH). Οι χηλικές ενώσεις του σιδήρου έχουν αποδειχθεί ότι μειώνουν την υπεροξείδωση των λιπιδίων των μεμβρανών των RBCs, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παραγωγή ROS και οι οξειδωτικές βλάβες εξαρτώνται εν μέρει από σίδηρο.

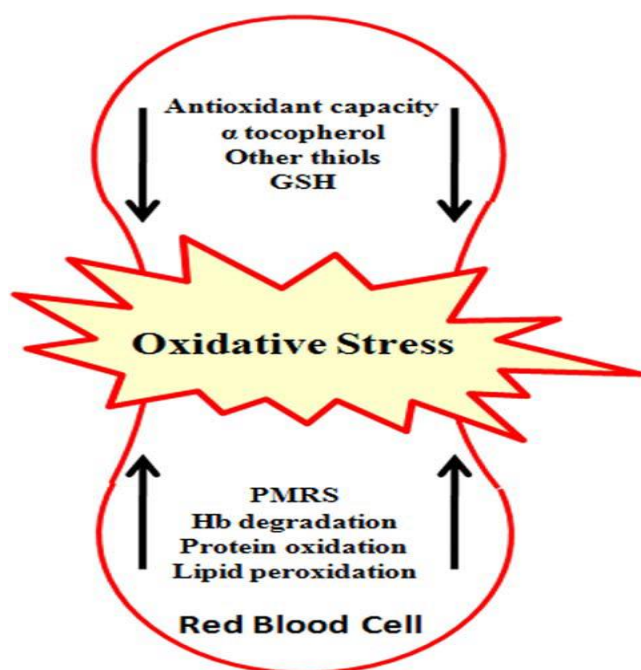
Η αίμη είναι ένα υδρόφοβο μόριο που μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα λιπίδια της μεμβράνης και τις πρωτεΐνες προς παραγωγή ROS. Η αίμη έχει τη δυνατότητα να

ενεργοποιεί τον NF-κB, να προωθεί μια προφλεγμονώδη επίδραση με σύνδεση με υποδοχείς, ένζυμα και παράγοντες μεταγραφής και να μεταβάλλει τη λειτουργία των κυττάρων, του μεταβολισμού και γονιδιακή έκφραση. Επιπλέον, μπορεί να προκαλέσει την οξειδωτική μετουσίωση του DNA, να ενεργοποιήσει κασπάσες και καθεψίνες, να βλάψει τη μιτοχονδριακή λειτουργία και να επηρεάσει τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η γλουταθειόνη αναγωγάση.

Ενζυμική παραγωγή ROS: Η NADH οξειδάση έχει φάνει να συμβάλλει στην παραγωγή ROS. Η δραστηριότητά της ρυθμίζεται από PKC, Rac ΟΤΡάσης και σηματοδότηση Ca^{2+} μέσα στα RBCs, και αυξάνεται με TGFβ1 και endothelin1 κυτοκίνες.

Σχηματισμός haemichrom, οξείδωση πρωτεΐνης ζώνης 3 (band-3) και γήρανση: Ασταθείς αιμοσφαιρίνες τείνουν να αυτό-οξειδώνονται, μετουσιώνονται και καθιζάνουν ως haemichromes. Haemichromes είναι δομές που αποτελούνται από όλα τα ενδιάμεσα προϊόντα της οξειδωτικής μετουσίωσης της αιμοσφαιρίνης, ξεκινώντας από metHb μέχρι την πλήρη αποσύνδεση και την απελευθέρωση της αίμης και σιδήρου. Τα μόρια αυτά έχουν μια υψηλή συγγένεια για την κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης της ζώνης 3 και μεσολαβούν στις οξειδωτικές διασυνδέσεις μέσω δεσμών δισουλφιδίου. Με την οξείδωσή της, ενεργοποιούνται οι κινάσες τυροσίνης από το οξειδωτικό στρες και φωσφορυλιώνουν την κυτταροπλασματική περιοχή της πρωτεΐνης της ζώνης 3. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον κατακερματισμό και την αποσύνδεση της πρωτεΐνης της ζώνης 3 από κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες μέσω διακοπής δέσμευσης με αγκυρίνη. Μια λειτουργία της είναι να δεσμεύει γλυκολυτικά ένζυμα και να τα οργανώνει επί της μεμβράνης ρυθμίζοντας έτσι τη ροή της γλυκόζης μεταξύ γλυκόλυσης και της πορείας των φωσφορικών πεντοζών. Συνεπώς, η μετατόπιση του γλυκολυτικών ενζύμων από οξειδωμένη band-3 έχει ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της γλυκόλυσης και τη μειωμένη παραγωγή NADPH από το μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών. Η NADPH είναι ένας σημαντικός παράγοντας μείωσης της GSH και της υπεροξειδάσης προσφέροντας έτσι προστασία έναντι του οξειδωτικού στρες. Κατά συνέπεια, η μείωση των επιπέδων του NADPH μειώνει την αντιοξειδωτική ικανότητα των ερυθροκυττάρων και περαιτέρω επιδεινώνει το οξειδωτικό στρες.

2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού του οξειδωτικού στρες στα ερυθροκύτταρα



Εικόνα 22: Μεταβολές στα ερυθρά κύτταρα του αίματος κατά τη διάρκεια της κατάστασης του οξειδωτικού στρες. (πηγή: Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011 Jun; 155(2):131–136. DOI 10.5507/bp.2011.027 ,K. B. Pandey, S. I. Rizvi)

Οξείδωση αιμοσφαιρίνης

Η αιμοσφαιρίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη στα ερυθρά αιμοσφαίρια και αποτελεί περίπου το 90% του ξηρού βάρους των ερυθροκυττάρων. Παρά το αποτελεσματικό αντιοξειδωτικό σύστημα των RBCs, ο δισθενής σίδηρος της αιμοσφαιρίνης είναι εκτεθειμένος συνεχώς σε υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου με αποτέλεσμα η αιμοσφαιρίνη να υποβάλλεται σε αργή οξείδωση σε μεθαιμοσφαιρίνη (metHb). Η MetHb δεν είναι σε θέση να δεσμεύει ή να μεταφέρει οξυγόνο. Υπό κανονικές συνθήκες, το επίπεδο της metHb στα RBCs διατηρείται σε λιγότερο από 1% της συνολικής αιμοσφαιρίνης. Ωστόσο, σε συνθήκες υψηλής πίεσης, αυξάνει πολλές φορές. Η οξείδωση της αιμοσφαιρίνης επίσης προκαλεί το σχηματισμό δισουλφιδικών διασταυρούμενων δεσμών μεταξύ γειτονικών αλυσίδων σφαιρίνης, τελικά στρέβλωση της κύριας δομής της αιμοσφαιρίνης η οποία οδηγεί στα ορατά ιζήματα γνωστά ως φορείς Heinz. Σε περιορισμένη οξειδωτική προσβολή, το σύνολο της δεσμευμένης στη μεμβράνη μετουσιωμένης πρωτεΐνης μπορεί να αποκοπεί από τα δικτυοενδοθηλιακά μακροφάγα αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό οξείδωσης, τελικά, το αποτέλεσμα είναι η αιμόλυση των ερυθροκυττάρων. Στην υπεργλυκαιμική κατάσταση, υπάρχει οξειδωτική σύνδεση της γλυκόζης με την αιμοσφαιρίνη προς σχηματισμό γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c). Το επίπεδο HbA1c είναι ένας δείκτης της στενής σχέσης μεταξύ της οξείδωσης των πρωτεϊνών και της γλυκοζυλίωσης στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.^[114]

Οξείδωση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

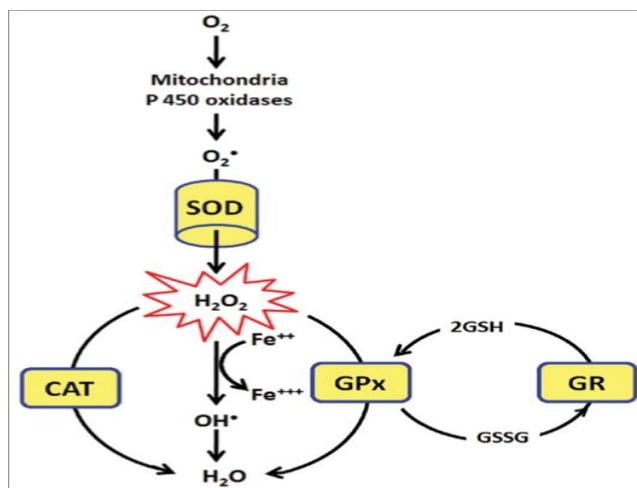
Ο κυτταροσκελετός, μέρος της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων αποτελείται από μια πληθώρα πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων σπεκτρίνης, αγκυρίνης, ακτίνης, και πρωτεΐνη 4.1, σχηματίζοντας ένα πλέγμα κάτω από τη λιπιδική μεμβρανική διπλοστοιβάδα. Η σπεκτρίνη και η ακτίνη είναι οι δύο κύριες δομικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν ένα μεμβρανικό κυτταροσκελετικό πλέγμα υπεύθυνο για τις ιδιότητες της μεμβράνης των ερυθροκυττάρων. Ο κυτταροσκελετός των ερυθροκυττάρων δεσμεύεται στη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων μέσω υψηλής συγγένειας αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών και πρωτεΐνης-λιπιδίου. Τα ROS μπορούν να οδηγήσουν σε οξείδωση των καταλοίπων αμινοξέων των πλευρικών αλυσίδων με αποτέλεσμα το σχηματισμό cross-δεσμών μεταξύ πρωτεϊνών και την οξείδωση της ραχοκοκαλιάς της πρωτεΐνης, τα οποία οδηγούν στο κατακερματισμό πρωτεΐνης και παραγωγή πολλών προϊόντων οξείδωσής της. Η οξειδωτική επίθεση επί του σκελετού του πολυπεπτιδίου ενεργοποιείται από τη ρίζα $\bullet\text{OH}^-$, με άντληση ενός άτομου α-υδρογόνου αμινοξέος προς σχηματισμό ρίζας που περιέχει άνθρακα. Από την άλλη πλευρά, η παραγωγή αλκοξυλικών ριζών μπορεί να συμβάλλει στη διάσπαση των πεπτιδικών δεσμών, αν και η διάσπαση δεσμών πεπτιδίου μπορεί επίσης να εμφανιστεί ως αποτέλεσμα της επίθεσης των ROS στις γλουταμυλο-, ασπαρτυλο-, και προλυλο- πλευρικές αλυσίδες. Τα κατάλοιπα κυστεΐνης και η μεθειονίνης είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα αμινοξέα στην οξείδωση από σχεδόν όλες τις μορφές των ROS. Ωστόσο, η άμεση οξείδωση των καταλοίπων λυσίνης, αργινίνης, προλίνης και θρεονίνης μπορεί επίσης να δημιουργήσει παράγωγα καρβονυλίου. Τα καρβονύλια θεωρούνται κοινά δείκτες βλάβης οξείδωσης πρωτεϊνών σε οξειδωτικές καταστάσεις κρίσης, λόγω της σταθερότητάς τους και πρώιμου σχηματισμού τους. Αν και τα ROS βλάπτουν όλους τους τύπους των κυτταρικών συστατικών, η βλάβη στις πρωτεΐνες είναι το πιο επιβλαβές. Η οξείδωση των καταλοίπων αμινοξέων στις ενεργές θέσεις του ενζύμου μπορεί να οδηγήσει στην αδρανοποίησή τους. Για το λόγο αυτό, οι δομικές πρωτεϊνικές αλλαγές θεωρούνται εκ των προτέρων υπαίτιοι παθολογικών επιπλοκών. Τροποποιήσεις των πρωτεϊνών στα RBCs έχουν βρεθεί σε γήρανση, το διαβήτη και έναν αριθμό νευροεκφυλιστικών καταστάσεων.^[114]

Λιπίδια μεμβράνης

Η μεμβράνη πλάσματος των RBCs είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι ευαίσθητα στην οξείδωση. Η μεμβράνη αυτή αποτελείται από δύο κύρια συστατικά: τον κυτταροσκελετό και μία λιπιδική διπλοστοιβάδα. Τα φωσφολιπίδια διασπείρονται ασύμμετρα στην διπλή στιβάδα, ενώ η χοληστερόλη κατανέμεται ομοιόμορφα. Η παρουσία της χοληστερόλης επιτρέπει την ευελιξία και παρέχει σταθερότητα στη μεμβράνη. Η κυτταρική μεμβράνη περιέχει πρωτεΐνες και γλυκοπρωτεΐνες ενσωματωμένες στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Η μεμβράνη των RBCs αποτελείται από 60% φωσφολιπίδια, κυρίως φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, σφιγγομυελίνη και φωσφατιδυλοσερίνη. Τα μη στεροειδή χοληστερόλη αντιπροσωπεύουν περίπου το 30% των λιπιδίων των RBCs,

και το υπόλοιπο 10% είναι γλυκολιπίδια. Τα λιπίδια θεωρούνται ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της δομής και του σχήματος των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Ακόμη και ελάχιστες αλλαγές στην περιοχή της επιφάνειας μπορεί να οδηγήσει σε μορφολογικές και λειτουργικές ανωμαλίες. Η ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης είναι επίσης σημαντική για σωστή λειτουργία των ερυθροκυττάρων. Η επίθεση των ROS προκαλεί την υπεροξειδωση των λιπιδίων και το σχηματισμό μίας σειράς ανεπιθύμητων προϊόντων. Η μηλονική αλδεΐδη είναι το κύριο προϊόν οξείδωσης των λιπιδίων, το οποίο χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση του οξειδωτικού στρες στα λιπίδια. Η μέτρηση των δραστικών ουσιών του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS), είναι επίσης μία χρήσιμη παράμετρος για την αξιολόγηση της έκτασης της λιπιδίων υπεροξειδωσης. Κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες και σε πολλές παθολογικές εκδηλώσεις, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα των TBARS. Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε από Altuntas et al., έδειξε ότι σε ασθενείς με σχιζοφρένεια υπάρχει οξείδωση λιπιδίων λόγω αυξημένων επιπέδων MDA.^[114]

Αντιοξειδωτικά μη ενζυμικά συστήματα



Εικόνα 25: Ενζυμική άμυνα κατά του οξειδωτικού στρες στα ερυθροκύτταρα (πηγή: πηγή: Rizvi et al. 2009)

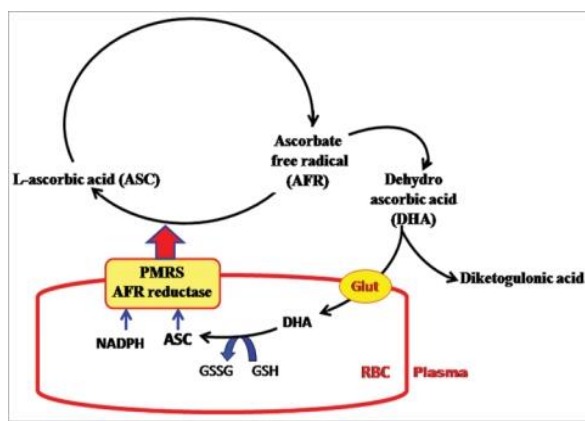
Υψηλά επίπεδα κυτταροπλασματικών αντιοξειδωτικών μη-ενζυματικών βρίσκονται στα ερυθρά αιμοσφαίρια, λειτουργούν εναντίον των ROS με σκοπό την προστασία των RBCs από τα επιβλαβή αποτελέσματα του οξειδωτικού στρες. Η γλουταθειόνη (GSH), το ασκορβικό οξύ (ASC), η α-τοκοφερόλη και άλλες θειόλες είναι τα κύρια ενδογενή μη-ενζυμικά αντιοξειδωτικά. Η α-τοκοφερόλη χρησιμεύει ως ισχυρός εκκαθαριστής της ρίζας υπεροξυλίου για την προστασία των PUFA που υπάρχουν στο RBC μεμβρανών κατά την υπεροξειδωση. Μειωμένα επίπεδα α-τοκοφερόλης έχουν αναφερθεί σε πολλές κλινικές καταστάσεις που περιλαμβάνουν οξειδωτική στρες. Το ASC είναι το κύριο κυτταρικό αντιοξειδωτικό που προστατεύει τη μεμβράνη και άλλα υδρόφοβα διαμερίσματα από οξειδωτικές βλάβες με αναγέννηση του αντιοξειδωτικού με τη μορφή της α-τοκοφερόλης. Μειωμένα επίπεδα του ASC και μείωση στην α-τοκοφερόλη έχουν αναφερθεί σε διαβητικά καθώς και σε άτομα με

υδρωπικία . Η GSH στα ερυθροκύτταρα βοηθάει στη διατήρηση της μορφής και δομής της αιμοσφαιρίνης σε υψηλότερες συγκεντρώσεις. Η υπεροξειδωση της μεμβράνης ερυθροκυττάρων είναι γνωστό ότι προκαλεί βλάβη στην ακεραιότητα της μεμβράνης. Η μειωμένη GSH διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην συντήρηση ομάδων θειόλης στη μεμβράνη. Η GSH λειτουργεί επίσης ως συμπαράγοντας σε πολλά αντιοξειδωτικά ένζυμα. Υπό οξειδωτικές συνθήκες, η GSH αντιστρεπτά οξειδώνεται σε δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG), το οποίο μπορεί να διαπέρασει τη κυτταρική μεμβράνη των RBCs λόγω της καταστροφής της από το οξειδωτικό στρες. Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να είναι υπεύθυνος για τα μειωμένα επίπεδα των ερυθρών σε GSH κατά το οξειδωτικό στρες. Η αντιοξειδωτική δράση της GSH βασίζεται στην πυρηνοφιλικότητα της ομάδας θειόλης και στην υψηλή ταχύτητα αντίδρασης με τα ROS . Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα με χαμηλά επίπεδα GSH είναι πιο ευαίσθητα στις επιδράσεις της ακτινοβολίας και του άγχους από τα κύτταρα με φυσιολογικά επίπεδα της GSH.^[114] Πολύ χαμηλά επίπεδα της GSH έχουν αναφερθεί σε έναν αριθμό παθολογικών καταστάσεων, όπως στην ασθένεια Parkinson, στη νόσο του ήπατος, στην κυστική ίνωση, στη δρεπανοκυτταρική αναιμία, στο AIDS, στον καρκίνο, στην καρδιακή προσβολή, στο εγκεφαλικό επεισόδιο, στο διαβήτη και στη γήρανση.^[115]

Αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα

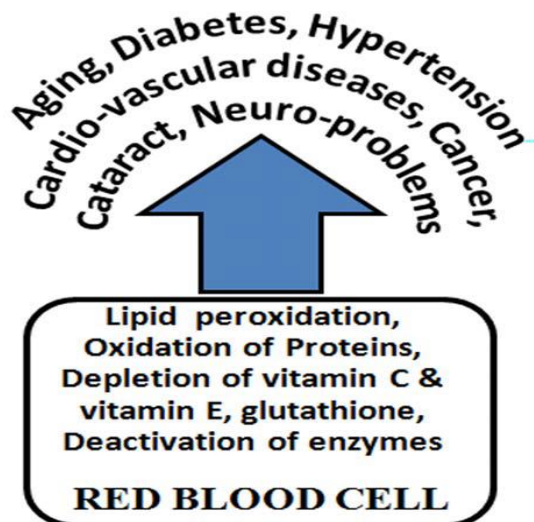
Τα ερυθροκύτταρα διαθέτουν αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα που εξουδετερώνουν μετατρέποντας τα δραστικά οξειδωτικά μόρια σε λιγότερο οξειδωτικά. Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR) και η καταλάση (CAT) είναι μερικά από τα κύρια συστήματα ενδογενούς ενζυμικής άμυνας σε όλα τα αερόβια κύτταρα. Η προστατευτική τους δράση αφορά την καταπολέμηση των ριζών υπεροξειδίου και του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η υπεροξειδική δισμουτάση στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και καταλύει την μετατροπή του υπεροξειδίου του οξυγόνου ($\bullet O_2$) σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Το H_2O_2 εάν και δεν αποτελεί ρίζα, μετά το σχηματισμό του, μετατρέπεται γρήγορα σε ρίζα υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton. Η καταλάση σπάει το H_2O_2 σε νερό και μοριακό οξυγόνο. Ωστόσο οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης μετατρέπουν το H_2O_2 σε νερό με οξείδωση δύο μόριων γλουταθειόνης σε GSSG. Η CAT υπερισχύει των ισομορφών της GPx λόγω της ικανότητάς της να υποβαθμίσει το H_2O_2 , χωρίς την κατανάλωση των κυτταρικών αναγωγικών ισοδυνάμων (NADPH). Συνεπώς πρόκειται για ένα πιο ενεργειακά οικονομικό και αποδοτικό τρόπο απομάκρυνσης του H_2O_2 . Μεταβολές στη δραστηριότητα αυτών των αντιοξειδωτικών ενζύμων έχουν τεκμηριωθεί κατά την οξειδωτική κατάσταση στρες, που τα καθιστά αξιόπιστους δείκτες του οξειδωτικού στρες. Στη γήρανση έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στη δράση των GPx, SOD και CAT.^[114]

Οξειδοαναγωγικό σύστημα πλασματικής μεμβράνης



Εικόνα 24: Ανακύκλωση του ασκορβικού οξέος μεταξύ ερυθροκυττάρων και πλάσματος (πηγή: Rizvi et al. 2009)

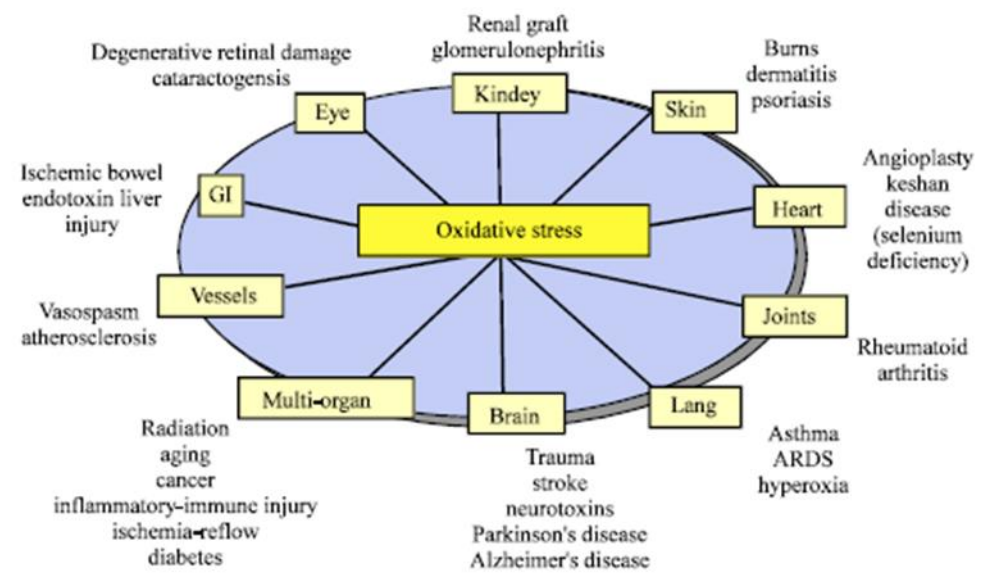
Τα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των ερυθρών διαθέτουν ένα οξειδοαναγωγικό σύστημα μεμβράνης (PMRS) που μεταφέρει ηλεκτρόνια από ενδοκυτταρικά υποστρώματα σε εξωκυτταρικούς αποδέκτες ηλεκτρονίων που μπορεί να είναι NADH και / ή βιταμίνη C. Ανάμεσα στις ζωτικές λειτουργίες του PMRS είναι η διατήρηση της ομοιόστασης και η ανακύκλωση του ασκορβικού οξέος. Το ασκορβικό οξύ είναι ένα πρωτογενές αντιοξειδωτικό στο σώμα και ο ανθρώπινος οργανισμός δεν είναι σε θέση να το συνθέσει λόγω της έλλειψης του λειτουργικού ενζύμου, L-γουλονολακτόνης οξειδάσης. Έχει αναφερθεί ότι PMRS είναι ένας αντισταθμιστικός / προστατευτικός μηχανισμός που λειτουργεί για να διατηρήσει τα επίπεδα του ασκορβικού στο πλάσμα και ως εκ τούτου να ελαχιστοποιήσει την οξειδωσή του αλλά και να κρατήσει σε χαμηλά επίπεδα το επαγόμενο οξειδωτικό στρες. Μεταβολές στο οξειδοαναγωγικό σύστημα PMRS έχουν βρεθεί στα ερυθρά αιμοσφαίρια κατά τη διάρκεια της κατάστασης του οξειδωτικού στρες. Η δραστηριότητα του PMRS έχει αποδειχθεί ότι είναι αυξημένη σε RBCs ασθενών με διαβητική νευροπάθεια, διαβήτη τύπου 2 και κατά τη διάρκεια της γήρανσης στον άνθρωπο.^[114]



Εικόνα 25: Η οξείδωση των βιομορίων με επακόλουθη απενεργοποίηση των ενζύμων στα ερυθρά αιμοσφαίρια με αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφόρων ανθρώπινων ασθενειών. (πηγή: Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2011 Jun; 155(2):131–136. DOI 10.5507/bp.2011.027 ,K. B. Pandey, S. I. Rizvi)

Κεφάλαιο 3ο : ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΝΟΣΟΙ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ

3.1 Νόσοι



Εικόνα 19: Οξειδωτικό στρες και νόσοι (πηγή: Galli et al.,2005)

Νόσος Alzheimer (AD)

Η νόσος Alzheimer είναι μία νευροεκφυλιστική διαταραχή σχετιζόμενη με την ηλικία και αποτελεί την πιο κοινή μορφή άνοιας. Χαρακτηρίζεται από προοδευτική έκπτωση των γνωστικών ικανοτήτων όπως η μνήμη, η συμπεριφορά και η διάθεση.

Παθολογικά της ευρήμα αποτελούν η απώλεια συνάψεων, η παρουσία αμυλοειδών-β πλακών (SPS, εξωκυττάρια εναποθέσεις αμυλοειδούς-β) και η αύξηση στα ενδοκυττάρια νευροϊνιδιακά συσσωματώματα (NFTs). Κύριο συστατικό των πλακών είναι το αμυλοειδές-β πεπτίδιο (Αβ) που προέρχεται από την πρωτεολυτική διάσπαση του πρόδρομου αμυλοειδούς-β πρωτεΐνης (APP). Η νόσος AD χαρακτηρίζεται επίσης από υψηλό οξειδωτικό στρες λόγω αυξημένης παραγωγής ROS και RNS και απώλειας της λειτουργικότητας των αντιοξειδωτικών ενζυμικών συστημάτων του οργανισμού.^[83] Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι το μόριο μεθειονίνης στην 35η θέση του πεπτιδίου Αβ είναι αυτό που μπορεί να προκαλέσει οξείδωση και νευροτοξικότητα, μέσω απώλειας 2 e- και σχηματισμού σουλφοξειδίου μεθειονίνης (MetSOx), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας της πρωτεΐνης ή του μηχανισμού κυτταρικής άμυνας.^[82]

Σύμφωνα με μελέτες, υπάρχει μία πληθώρα παραγόντων που αιτιολογούν την ευπάθεια των ατόμων με AD στο οξειδωτικό στρες. Αρχικά, η γήρανση γενικά συνοδεύεται από μια γενικευμένη αύξηση της οξειδωτικής βλάβης, ίσως λόγω της φθίνουσας δραστηριότητας των αντιοξειδωτικών συστημάτων άμυνας. Αυτό μπορεί να αντιπροσωπεύει μια ιδιαίτερη ευπάθεια των μακροβιότερων κυττάρων, τους νευρώνες του ΚΝΣ, που οδηγεί σε μειωμένο απόθεμα και τη λειτουργία. Ο εγκέφαλος χρησιμοποιεί κυρίως γλυκόζη και οξυγόνο για την παραγωγή ενέργειας και, ως εκ τούτου, δημιουργεί ROS σε αφθονία. Ο εγκέφαλος περιέχει μία σχετικά υψηλή συγκέντρωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που είναι πιο ευάλωτα σε οξειδωτική βλάβη και έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση διαφόρων αλδεϋδών όπως MDA και 4-υδροξυ-2-εννεανάλη (HNE). Το πεπτίδιο Αβ, το οποίο προτείνεται από πολλές έρευνες να είναι ένας πιθανός παράγοντας εκκίνησης της AD, έχει βρεθεί ότι αυξάνει το οξειδωτικό στρες μέσω παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου. Επιπλέον, το οξειδωτικό στρες μπορεί να αλληλεπιδράσει με φλεγμονή και να παράγει ROS. Συνεπώς το οξειδωτικό στρες είναι ένα πρώιμο χαρακτηριστικό της παθολογίας της νόσου^[84] και μπορεί να εκδηλωθεί με βλάβη στις πρωτεΐνες, στα λιπίδια και στα νουκλεϊκά οξέα (πυρηνικό και μιτοχονδριακό DNA) καθώς και του RNA. Η Απολιποπρωτεΐνη Ε (ApoE) (αντίστοιχη πρωτεΐνη, ApoE4), ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για την AD, συνδέεται επίσης με οξειδωτική βλάβη *in vitro*. Στον υπόκαμπο ατόμων υγιών ή με AD που είχαν αυτό το αλληλόμορφο παρατηρήθηκε χαμηλότερη δράση αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως της CAT, GPX και αυξημένα επίπεδα TBARS.^[86]

Καρδιαγγειακά (CVD)

Τα CVDs είναι μια κατηγορία παθολογικών καταστάσεων που περιλαμβάνουν την καρδιά ή τα αιμοφόρα αγγεία (αρτηρίες, τριχοειδή αγγεία, και φλέβες). Αναφέρονται σε οποιαδήποτε ασθένεια που επηρεάζει το καρδιαγγειακό σύστημα, κυρίως καρδιακές παθήσεις, αγγειακές παθήσεις του εγκεφάλου και των νεφρών, και περιφερική αρτηριακή νόσο. Τα στοιχεία που δημοσιεύθηκαν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) τον Σεπτέμβριο του 2012 ορίζουν CVDs ως την κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως: περισσότεροι άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο από

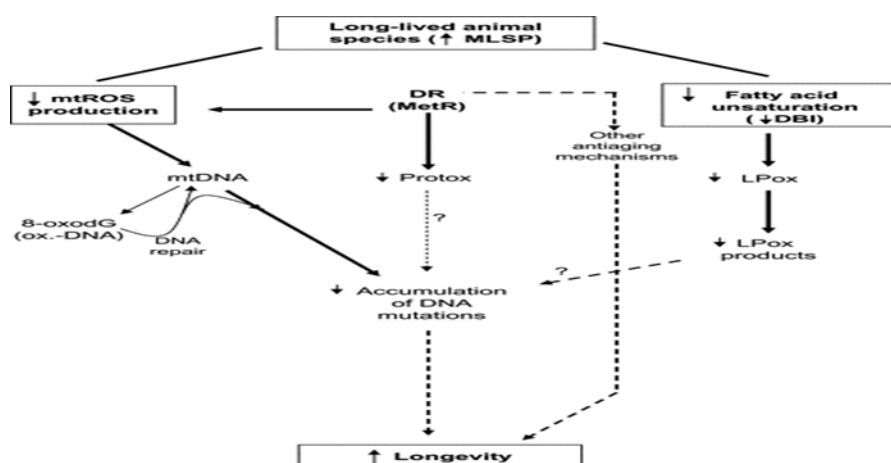
καρδιαγγειακά νοσήματα, παρά από οποιαδήποτε άλλη αιτία.^[88] Οι ελεύθερες ρίζες σε συνδυασμό με την επαγόμενη φλεγμονή φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της αθηρωματικής νόσου σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης, στη μη φυσιολογική λειτουργία των αιμοπεταλίων και στη δυσλειτουργία του καρδιακού ενδοθηλίου. Η αθηροσκλήρωση είναι η πιο κοινή παθολογική διαδικασία που οδηγεί σε CVD. Η αυξημένη παραγωγή ROS στο αγγειακό τοίχωμα και η μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου (NO) οδηγούν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αρχή της αθηρογένεσης. Τα ROS και τα RNS που παράγονται από το ενδοθήλιο προκαλούν οξειδωτική τροποποίηση της LDL (λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας).^[87] Κατά την οξείδωση της LDL παράγονται οξειδωμένα φωσφολιποειδή και ο παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF), μόρια τα οποία έχουν ισχυρή φλεγμονώδη δράση. Τα μόρια της LDL συκκρατούνται 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. 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.^[87,89,90] Το ανιόν του υπεροξειδίου είναι μια σημαντική πηγή οξειδωτικού στρες, έχει άμεσες επιπτώσεις, και περιορίζει τη βιολογική δράση του NO. Η υπερβολική αγγειακή παραγωγή υπεροξειδίου οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και σε μεγαλύτερη σχηματισμό θρόμβου.^[92]

Καρκίνος

Η ανάπτυξη του καρκίνου είναι μία περίπλοκη διαδικασία, στην οποία εμπλέκονται τόσο κυτταρικές όσο και μοριακές αλλαγές μέσω της μεσολάβησης ποικίλων ενδογενών και εξωγενών διεγέρσεων. Η κύρια οξειδωτική βλάβη της καρκινογένεσης είναι αυτή του DNA. Η έναρξη της νόσου και η εξέλιξή της συνδέονται με χρωμοσωμικές ανωμαλίες και ενεργοποίηση ογκογονιδίων που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Μια κοινή μορφή της βλάβης είναι ο σχηματισμός υδροξυλικών βάσεων DNA. Αυτός ο σχηματισμός προϊόντος παρεμβαίνει στην κανονική ανάπτυξη των κυττάρων προκαλώντας γενετικές μεταλλάξεις και στην αλλαγή της κανονικής μεταγραφής του γονιδίου, αλλά προκαλεί και αλλαγές στη δομή του ίδιου του μορίου.^[93] Εκτός από το ρόλο των οξειδωτικών στην επαγωγή μεταλλάξεων, είναι προφανές ότι ROS μεσολαβούν στην κυτταρική σηματοδότηση μονοπατιών που εμπλέκονται στην κυτταρική ανάπτυξη ρυθμιστικών πορειών και κατά συνέπεια στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Ο μηχανισμός της ρύθμισης κυτταρικής ανάπτυξης είναι πολύ περίπλοκος και ως εκ τούτου ο ρόλος των ROS σε αυτό εξαρτάται από τον τύπο και τη συγκέντρωση της συγκεκριμένης ρίζας που εμπλέκεται. Τα υψηλά επίπεδα παραγωγής ROS και η συσσώρευση τους μπορούν να οδηγήσουν σε

τοξικότητα και κυτταρικό θάνατο, μετατρέποντας κάποια καρκινικά κύτταρα σε πιθανούς στόχους για απόπτωση, ενώ τα χαμηλά επίπεδα των ROS μπορούν να σηματοδοτήσουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων Η ενεργοποίηση της μεταγραφής παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων MAP-κινάσης / AP-1 και NP-οδών B έχει άμεση επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την απόπτωση. Έτσι βλάβες στο DNA, οι διάφορες μεταλλάξεις και το μεταλλαγμένο γονίδιο έκφρασης είναι όλοι οι βασικοί παράμετροι στη διαδικασία της καρκινογένεσης.^[19,94]

Γήρανση



Εικόνα 20: Γήρανση και οξειδωτικό στρες. Στο παραπάνω σχήμα απεικονίζονται οι κύριοι μηχανισμοί του οξειδωτικού στρες που οδηγούν στη γήρανση. (πηγή: Gustavo Barja, Chapter One – The Mitochondrial Free Radical Theory of Aging, Progress in Molecular Biology and Translational Science, Volume 127, 2014, Pages 1–27, The Mitochondrion in Aging and Disease)

Η γήρανση χαρακτηρίζεται από μια προοδευτική έκπτωση της φυσιολογικής λειτουργίας και από την αυξημένη ευαισθησία σε ασθένειες και θάνατο. Η θεωρία πάνω στην οποία βασίζεται ο μηχανισμός της γήρανσης είναι η ' free radical theory of aging '. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, η γήρανση και οι συναφείς ασθένειες της είναι αποτέλεσμα της δράσης ελευθέρων ριζών που προκαλούν βλάβες στα κυτταρικά μακρομόρια και της αδυναμίας αντιστάθμισης αυτών των αλλαγών από το ενδογενές αντι-οξειδωτικό αμυντικό σύστημα.^[95] Το 1950, ο Harman, αρχικά 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, υποθέσε 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. Η θεωρία αυτή αποδυναμώθηκε το 1969 όταν ανακαλύφθηκε η ύπαρξη του ενζύμου της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD)^[95] αλλά άνοιξε το δρόμο για την ανάπτυξη άλλων

ιδεών και διαμόρφωση άλλων θεωριών, από τις οποίες οι επικρατέστερες είναι οι εξής: η εξελικτική θεωρία της ανταγωνιστικής πλειοτροπίας, η θεωρία της σωματικής μετάλλαξης στη γήρανση του πληθυσμού και η μιτοχονδριακή θεωρία της γήρανσης του πληθυσμού .

Μιτοχονδριακή θεωρία της γήρανσης: Τα μιτοχόνδρια του DNA είναι παραγωγοί αλλά παράλληλα και στόχος των ελεύθερων ριζών. Σύμφωνα με τη θεωρία, το οξειδωτικό στρες επιτίθεται στα μιτοχόνδρια με αποτέλεσμα την αυξημένη οξειδωτική βλάβη. Κατά συνέπεια, κατεστραμμένα μιτοχόνδρια σταδιακά γίνονται λιγότερο αποτελεσματικά, χάνοντας τη λειτουργική ακεραιότητά τους και απελευθερώνοντας περισσότερα μόρια οξυγόνου, αυξάνοντας την οξειδωτική βλάβη στα μιτοχόνδρια.^[95] Η μιτοχονδριακή αυτή βλάβη του DNA, προτείνεται να οδηγήσει στην προοδευτική συσσώρευση μεταλλάξεων κατά την διάρκεια της ζωής, με αποτέλεσμα η δυσλειτουργία του μιτοχονδριακού συστήματος ενέργειας και ως εκ τούτου την παραγωγή ακόμη περισσότερο ROS. Ένα εκθετικά αυξανόμενο ποσοστό της παραγωγής ROS αναμένεται να οδηγήσει τελικά σε καταστροφικές και μη αναστρέψιμες βλάβες στο ίδιο το κύτταρο. Αυτό μπορεί απλά να θέσει σε κίνδυνο την λειτουργία των εξειδικευμένων τύπων κυττάρων.^[97]

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 πεθαίνουν από γηρατειά καθώς γίνονται τροφή για άλλους, αποικίζονται από παράσιτα, ή δεν επιβιώνουν από τον ανταγωνισμό. Ως εκ τούτου, η διατήρηση ακραίων σωματικών κυττάρων δεν έχει ιδιαίτερο νόημα. Η τοξικότητα της αναπνευστικής έκρηξης για παράδειγμα δεν μπορεί εύκολα να εξαλειφτεί 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.^[98]

η θεωρία της σωματικής μετάλλαξης στη γήρανση του πληθυσμού: Η θεωρία αυτή υποστηρίζει ότι η συσσώρευση των μεταλλάξεων του DNA είναι υπεύθυνη για την εκφυλιστική γήρανση. Πριν από μερικά χρόνια με την ανακάλυψη ότι η ικανότητα επιδιόρθωσης του DNA συσχετίζεται με τη διάρκεια ζωής συγκεκριμένων ειδών, γεγονός που έχει επιβεβαιωθεί πρόσφατα, άρχισε να υποστηρίζεται η παραπάνω θεωρία. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι η επιδιόρθωση του DNA είναι απαραίτητη αλλά όχι επαρκής για τη μακροζωία. Έχει αποδειχθεί σε πολυάριθμες μελέτες με προκαρυωτικά κύτταρα, ζυμομύκητες και κύτταρα θηλαστικών, ότι οι οξειδωτικές

ουσίες είναι μεταλλαξιόνες 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.^[98]

Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ)

Οι επιπλοκές του ΣΔ είναι αποτέλεσμα της χρόνιας υπεργλυκαιμίας και πιθανώς των αυξημένων ελεύθερων λιπαρών οξέων (ΕΛΟ). Το οξειδωτικό στρες διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην ανάπτυξη των διαβητικών επιπλοκών, αφ' ενός λόγω των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) και αφετέρου λόγω της μειωμένης αποδόμησής τους από το αντιοξειδωτικό αμυντικό μηχανισμό του κυττάρου. Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της υπεργλυκαιμίας, της παραγωγής των μιτοχονδριακών ROS (κυρίως το •O₂-), του οξειδωτικού στρες και των διαβητικών επιπλοκών. Διάφοροι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παραγωγή των ROS στα κύτταρα είναι ο σχηματισμός τους μέσω του ενζύμου NAD(P)H οξειδάσης, μέσω της αναπνευστικής αλύσου στα μιτοχόνδρια, της οξειδάσης της ξανθίνης, της οδού του αραχιδονικού οξέος (λιποξυγενάση και κυκλοξυγενάση), του NO και τα μικροσωματικά ένζυμα.^[3] Στον ΣΔ2, η ενεργοποίηση των οδών του πυρηνικού παράγοντα NF-κB, των οδών του p38 MAPK και JKN/SAPK κινασών από τα ROS (παραγωγή H₂O₂), σε συνδυασμό με την εκτροπή του μεταβολισμού της γλυκόζης κατά τη γλυκόλυση (παραγωγή τελικών παραγόντων μη ενζυματικής γλυκοζυλίωσης (AGEs), ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (PKC), της οδού της εξοζαμίνης και της σερβιτόλης), από την υπεργλυκαιμία και πιθανώς από τα ΕΛΟ, συμβάλλουν αφενός στην ανάπτυξη της ινσουλινοαντίστασης (ενεργοποίηση κινασών σερίνης/ θρεονίνης που φωσφορυλιώνουν αρκετούς στόχους-μόρια, όπως τις πρωτεΐνες του IRS, με αποτέλεσμα να μειώνεται η από την ινσουλίνη φωσφορυλίωση της τυροσίνης)^[103] και αφετέρου στην απευθείας καταστροφή των ενδοθηλιακών κυττάρων και των β-κυττάρων του παγκρέατος. Κατά τη μη ενζυματική γλυκοζυλίωση η γλυκόζη αντιδρά με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών του πλάσματος ή του αγγειακού τοιχώματος και παράγονται χημικώς αναστρέψιμα γλυκοζυλιωμένα παράγωγα (βάσεις Schiff), τα οποία αργότερα σχηματίζουν πιο σταθερά προϊόντα (προϊόντα Amadori). Η αλληλεπίδραση των AGEs με τους υποδοχείς (RAGEs) των ενδοθηλιακών κυττάρων δραστηριοποιεί το μεταγραφικό πυρηνικό παράγοντα NF-κB και τροποποιεί τη λειτουργία ενδοκυττάρων πρωτεϊνών και πρωτεϊνών του εξωκυττάρου συνδετικού ιστού, με συνέπεια να επάγεται η παραγωγή EPO και οξειδωτικού στρες.^[102] Τα β-κύτταρα του παγκρέατος θεωρούνται ευαίσθητα στα ROS επειδή εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως καταλάση της υπεροξειδικής δισμουτάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης.^[99] Αναστολή της έκκρισης της ινσουλίνης και της οξείδωσης της γλυκόζης συμβαίνει όταν τα νησίδα εκτίθενται σε προϊόντα από την υπεροξείδωση των λιπιδίων.^[100]

Δερματικές παθήσεις

Το δέρμα ως το μεγαλύτερο ανθρώπινο όργανο διαδραματίζει καίριο ρόλο στο σώμα προστατεύοντας τον οργανισμό από χημικούς και φυσικούς βλαβερούς παράγοντες. Οι διάφορες εξωγενείς πηγές περιλαμβάνουν: ατμοσφαιρικούς ρύπους (π.χ., καυσαέρια των αυτοκινήτων, καθώς και τα φυσικά δηλητηριώδη αέρια (π.χ., το όζον και υψηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου), επιδράσεις των ιοντιζουσών και μη ιοντιζουσών ακτινοβολίες εισβολή παθογόνων βακτηρίων, ιών και, διάφορα εξωγενείς χημικές ουσίες και τοξίνες. Το δέρμα μπορεί επίσης να αντιμετωπίσει οξειδωτικό στρες που προκαλείται από φυσικές βλάβες, όπως εγκαύματα και πληγές. Οι ενδογενείς πηγές περιλαμβάνουν τα ένζυμα τα οποία μπορούν έμμεσα να παραγάγουν ROS όπως οξειδάση της ξανθίνης, συνθάση νιτρικού οξειδίου κ.ά. Τα ενεργοποιημένα λευκά αιμοσφαίρια όπως τα ουδετερόφιλα μπορούν επίσης να χρησιμεύσουν ως μείζονα συμβολή των ROS. Αυτά τα κύτταρα μπορούν να έλκονται από τα κατεστραμμένα σημεία στο δέρμα και ύστερα από ενεργοποίησή τους, υφίστανται αναπνευστική έκρηξη η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση των ROS, καθώς και την παραγωγή των πρωτεϊνών και άλλων ενώσεων, οι οποίες μπορούν να δράσουν συνεργικά για να προκαλέσουν οξειδωτική βλάβη στον ιστό του δέρματος (φλεγμονώδης διεργασία). Τα ROS/ RNS που αντιμετωπίζει κυρίως το δέρμα είναι η ρίζα υπεροξειδίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το υποχλωριώδες οξύ, η ρίζα υδροξυλίου, η ρίζα νιτρικού οξειδίου, και το μονήρες οξυγόνο.^[105] 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 εξοκυντάριας 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 ομάδεςθειόλης, μπορούν να τροποποιήσουν την δραστηριότητα αυξητικών παραγόντων, να αναστείλουν φωσφατάσες, να ενεργοποιήσουν πρωτεϊνικές κινάσες, να ενεργοποιήσουν ή να

αναστείλουν μεταγραφικούς παράγοντες. Αυτές οι μεταβολές ρυθμίζουν την έκφραση ενός γονιδίου ή επάγουν απόπτωση.^[106]

Η πρόληψη ή ακόμη και η θεραπεία τέτοιων χρόνιων ασθενειών έχει μελετηθεί σε κλινικές δοκιμές με την χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων. Παρακάτω παρουσιάζονται κλινικές δοκιμές αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων σε υγιή πληθυσμό, σε ασθενείς και σε ερυθροκύτταρα.

3.2 Κλινικές μελέτες χορήγησης αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων

Το οξειδωτικό στρες θεωρείται γενικά ως συνέπεια της ανισορροπίας μεταξύ των προ-οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ουσιών, η οποία συχνά οδηγεί σε οξείδωση των βιομορίων και αλυσιδωτές αντιδράσεις που προκαλούν παθολογικές καταστάσεις στον οργανισμό. Ωστόσο, υπάρχουν διαφορετικές ουσίες που μπορούν να δράσουν ως αντιοξειδωτικά. Τα αντιοξειδωτικά είναι τεχνητές ή φυσικές ουσίες που μπορούν να αποτρέψουν ή να καθυστερήσουν μερικούς τύπους της βλάβης των κυττάρων. Τα πιο γνωστά από αυτά είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, το β-καροτένιο, και άλλα συναφή καροτενοειδή, μαζί με το σελήνιο, μαγγάνιο, λυκοπένιο, λουτεΐνη, ζεαξανθίνη κ.ά. Δίαιτες υψηλές σε λαχανικά και φρούτα είναι καλές πηγές αντιοξειδωτικών. 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. Πολλές μελέτες έχουν αναφέρει μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των αντιοξειδωτικών και των διάφορων ασθενειών, κυρίως των καρδιαγγειακών παθήσεων, αλλά επίσης του διαβήτη και νευρολογικών διαταραχών. Έτσι τα αντιοξειδωτικά συμπληρώματα έχουν προταθεί ως μια αποτελεσματική προληπτική και θεραπευτική παρέμβαση για τη γήρανση που σχετίζεται με παθολογίες. Ωστόσο, η θεραπευτική αυτή προσέγγιση απέτυχε πολλές φορές να αποδείξει τα οφέλη της σε επίπεδο κλινικών δοκιμών. Η αλληλεπίδραση τόσο των ενδογενών όσο και των εξωγενών αντιοξειδωτικών σε σχέση με το οξειδοαναγωγικό σύστημα είναι πολύ σύνθετη και αντιπροσωπεύει ένα θέμα που είναι ακόμα υπό συζήτηση. 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 σε υγιείς

αντιοξειδωτικό	Άλλοι παράμετροι	Πληθυσμός	Διάρκεια δοκιμής	Αποτελέσματα	πηγή
(natural-source) Βιταμίνη E (600 IU)		39.876 υγιείς αμερικανίδες (45 ετών)	Μέρα παρά μέρα, για 10 χρόνια	1)δεν επηρέασε τη συνολική θνησιμότητα και μειωμένη καρδιαγγειακή θνησιμότητα σε	[116]

		τουλάχιστον)		υγιείς γυναίκες. 2)σημαντική μείωση 24%σε συνολική καρδιαγγειακή θνησιμότητα.	
Ρεσβερατρόλη (500mg)		60 υγιείς ενήλικες (18-30 ετών)	28 μέρες	1) ↓επίπεδα κόπωσης (και τις 28 μέρες) 2) ↑ ΔΑΠ και ευεργετική επίδραση στο 3-Back πριν τη θεραπεία(28 ^η μέρα) 3) Διαφοροποίηση των παραμέτρων CBF από την 1 ^η μέρα. 4) Τα επίπεδα των μεταβολιτών της ρεσβερατρόλης ήταν αυξημένα κατά την 28 ^η μέρα πριν και μετά τη θεραπεία.	[118]
Βιταμίνη E (55mg α- τοκοφερόλη)	Λιγνάνες σουσαμιού (10mg)	Υγιείς ενήλικες που αισθάνονται καθημερινή κόπωση	8 εβδομάδες	1)Μη στατιστικά σημαντική ↓ επιπέδων κόπωσης,κατάσταση ύπνου ανάμεσα στις δύο ομάδες 2) υποομομάδα: άτομα >40 ετών στατικά σημαντική ↓επιπέδων κόπωσης και ↓ οξειδωσης της LDL-CHOL	[117]
Trans- ρεσβερατρόλη (250mg)	Υψηλής έντασης άσκηση	Υγιείς ηλικιωμένοι άντρες , σωματικά αδρανείς	Κάθε μέρα, για 8 εβδομάδες	1)Στην ομάδα της ρεσβερατρόλης: ↓αγγειοδιασταλτική προστακυκλίνη, ↑μυική συνθάση θρομβοξάνης και κατάργησε επίσης τις θετικές επιδράσεις της άσκησης στην LDL- CHOL, δείκτης TC/HDL-CHOL και συγκεντρώσεις TGL στο αίμα 2) VCAM-1 αμετάβλητη 3)Η προπόνηση βελτιώνει αποτελεσματικά πολλές καρδιαγγειακές παραμέτρους υγείας,η ταυτόχρονη συμπλήρωση ρεσβερατρόλη μπορεί να αμβλύνει αυτές τις επιδράσεις.	[119]
Κουρκουμίνη (90 mg)	Περπάτημα ή τρέξιμο στο 65% του V2max ή στο διάδρομο για 60 λεπτά	Ενήλικες άντρες (3 γκρουπ: control, before excercise , before and after excercise)	2 h πριν την άσκηση και αμέσως μετά την άσκηση	Η κουρκουμίνη μπορεί να μετριάσει την συγκέντρωση των ενεργών μορφών οξυγόνου που παράγονται κατά τη διάρκεια της άσκησης, μέσω της ενίσχυσης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του αίματος.	[120]
Βιταμίνη C		42 μαθητές	Κάθε μέρα, για	↓ επίπεδα άγχους, ↑ακαδημαϊκή	[121]

(500 mg)		δευτεροβάθμιας εκπαίδευσης	14 ημέρες	απόδοση (μια δίαιτα πλούσια σε βιτ. C)	
20 mg Z ή “multi” condition 26 mg Z + 8 mg L + 190 mg mixed n-s fatty acids/day	Όχι αλλαγή στις διατροφικές τους συνήθειες	Υγιείς ενήλικες (18-32 ετών)	Κάθε μέρα, μαζί με γεύμα	↑ MPOD, ↑οπτική ταχύτητα και επεξεργασία, μεταβάλουν άμεσα την εγκεφαλική λειτουργία, πιθανόν σε όλη τη διάρκεια της ζωής	[122]
14 vitamins & 9 minerals		Υγιείς με ↓ κατανάλωση φρούτων και λαχανικών	8 εβδομάδες (12 χάπια την ημέρα)	↑ φυλλικού οξέος ορού, αντίσταση στην καταστροφή του DNA και στην οξείδωση της LDL μη στατιστικά σημαντική βελτίωση δραστηριότητας SOD/GPx/CAT	[123]
Soy isoflavones (100mg)	Ανθρακικό ασβέστιο (500mg)	Εμμηνοπαυσιακές γυναίκες	12 μήνες (κάθε μέρα)	↓MDA	[124]
Lycopene (6,5, 15, 30 mg)	Δίαιτα ↓ σε lycopene 2εβδομάδες πριν την έναρξη	≥40y υγιείς ενήλικες	Κάθε μέρα, για 8 εβδομάδες	↑ επιπέδων lycopene σε όλες τις ομάδες, ↓8-OHdG Μη στατιστικά σημαντική ↓ επιπέδων MDA/HNE	[125]
α-τοκοφερόλη(50 mg), beta-carotene (20 mg)		Άντρες καπνιστές (50-69 ετών)	Κάθε μέρα, για 5-8 χρόνια (μ.ο: 6 χρόνια)	1)Στην ομάδα της α-τοκοφερόλης: ↓ περιστατικών καρκίνου του προστάτη και ποσοστού θνησιμότητας, ενώ στην ομάδα του β-καροτενίου: ↑περιστατικών καρκίνου προστάτη και θνησιμότητας σε σύγκριση με το placebo γκρουπ 2) καμία επίδραση στο χρονικό διάστημα μεταξύ διάγνωσης και θανάτου	[126]
Ρεσβερατρόλη (200mg)		Υπέρβαροι	Κάθε μέρα, για 26 εβδομάδες	↓TNF-α/IL-6	[127]
Quercetin (50, 100, 150 mg)		Υγιείς ενήλικες	Κάθε μέρα, για 2 εβδομάδες	↑ επιπέδων quercetin σε όλες τις ομάδες, μη στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδα οξειδωμένης LDL/TAC/TNF-α/ουρικού οξέος/ vitamin E	[128]
Οργανικό σελήνιο(200 μg) και coenzyme Q10 (plus 200 mg)		437 ηλικιωμένοι	Κάθε μέρα, για 48 μήνες και με follow-up 2,5 χρόνια	↓ CRP(δείκτης φλεγμονής) και ↓sP-selectin (δείκτης αθηροσκλήρωσης) στα 4 χρόνια ,↓ καρδιαγγειακή θνησιμότητα	[129]
Soy isoflavones (100mg)	Ανθρακικό ασβέστιο (500mg)	190 Εμμηνοπαυσιακές γυναίκες	Κάθε μέρα, για 6 μήνες	↓ MDA και μη στατιστικά σημαντική ↓ [NO], VCAM-1 (δείκτες της αγγειακής ενδοθηλιακής λειτουργίας)	[130]

		(47-60 ετών)			
Βιταμίνη E (400 mg) Με σελήνιο (225 microg) και Βιταμίνες συμπλέγαμτος B (4,5 g)		Άντρες με υπογονιμότη ατ	Κάθε μέρα , για 3 μήνες	ομάδα βιταμ E με σελήνιο: ↓ MDA και ↑ κινητικότητα και βιωσιμότητα σπέρματος	[131]
βιταμίνη E (400 IU)+ βιταμίνη C (1g/daily)		Άντρες εργάτες εκτεθειμένοι σε μόλυβδο (73 µg of lead/dl στο αίμα)	Κάθε μέρα, για 1 χρόνο	Όχι ↓ [Pb] , ↓ λιπιδική υπεροξείδωση στα ερυθροκύτταρα, ↓TAC , ↓ SOD, CAT (χαλάρωση αντιοξειδωτικού συστήματος)	[132]
ALA (1200 mg)		Υπέρβαροι και παχύσαρκοι ενήλικες	Κάθε μέρα, για 8 εβδομάδες	καμία σημαντική διαφορά σε HOMA, OxLDL ή 8-ισο-PGF2a μεταξύ δύο ομάδες μετά από παρέμβαση 8 εβδομάδων	[134]
Lutein (12mg)	Εκχύλισμα πράσινου τσαγιού (200mg) Δίαιτα ↓ σε ανοιχτό- χρωμα φρούτα και λαχανικά 2 εβδομάδες πριν την έναρξη	(50–70 ετών) υγιείς ενήλικες	Κάθε μέρα, για 112 μέρες	↑ επιπέδων lutein/ολικών καροτενοειδών/ασκορβικού οξέος στις ομάδες lutein και lutein + green tea από την 4η εβδομάδα Μη στατιστική ↑TAC ή ↓MDA/ F2-isoprostane	[135]
vitamin E (400 IU) ή β- carotene (15 mg)	6ωρη έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία	Υγιείς ενήλικες	Κάθε μέρα, για 8 εβδομάδες	↑ vitamin E στο πλάσμα και στο δέρμα ↑ β-carotene μόνο στο πλάσμα ↓MDA στο δέρμα της ομάδας με vitamin E	[136]
Vitamine C (2 g)		Υγιείς άντρες ενήλικες με χαμηλά επίπεδα βιταμίνης C	Κάθε μέρα	↑ βιταμίνης C πλάσματος , ↓ 10% T.CHOL, μη στατιστική μεταβολή του TC/HDL Τα επίπεδα του αντιγόνου νεργοποιητή πλασμινογόνου ιστού αντιστρόφως ανάλογη προς τα επίπεδα βιταμίνης C.	[137]
vitamin C (500 mg) vitamin E (400 IU)	Άσκηση για τα πόδια	Υγιείς ενήλικες	Κάθε μέρα, για 29 ημέρες	↑ ασκορβικού οξέος και τοκοφερόλης ορού Τα επίπεδα F2-isoprostane δεν	[138]

				παρουσίασαν ↑ μετά την άσκηση	
Vitamine E(200 IU)& C (150 mg), μετά το γεύμα	Αντισυλληπτικά (0.03 mg ethinylestradiol και 0.15 mg levonorgestrel 21 days on and 7 days off)	υγιείς γυναίκες (18-40 ετών)	Κάθε μέρα,για 1 μήνα	Στατιστικά σημαντική ↑GPx ,GR activity και ↓MDA πλάσματος στην ομάδα με παράλληλη λήψη των βιταμινών C και E. ↑ MDA και ↓ GPx ,GR activity στην ομάδα με τη λήψη μόνο των αντισυλληπτικών	[163]

Σύμφωνα με τις παραπάνω έρευνες : η χορήγηση βιταμίνης E οδήγησε στην αύξηση της συγκέντρωσής της στο πλάσμα των εθελοντών ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις με κατανάλωση 400mg τουλάχιστον, παρατηρήθηκε και μείωση της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Τα συμπληρώματα βιταμίνης C προκάλεσαν την αύξηση του ασκορβικού οξέος πλάσματος. Σε μελέτη με μαθητές οδήγησε στην μείωση των επιπέδων στρες και αύξησης της ακαδημαϊκής απόδοσης, γι' αυτό το λόγο και ενθαρρύνεται η υιοθέτηση μίας διατροφής πλούσιας σε βιταμίνη C. Η χορήγηση καροτενοειδών σε εθελοντές με χαμηλή πρόσληψη οδήγησε στην αύξηση της συγκέντρωσής τους στο πλάσμα, που συνοδεύτηκε από μείωση δεικτών λιπιδικής υπεροξειδωσης (όπως MDA) και καταστροφής του DNA. Η χρήση φλαβονοειδών (πολυφαινόλες, κουρκουμίνη, ρεσβερατρόλη κ.ά) οδήγησε κυρίως σε μείωση δεικτών φλεγμονής. Ωστόσο σε μελέτες χορήγησης ρεσβερατρούλης για καρδιαγγειακά επεισόδια έδειξε να υποβαθμίζει τις θετικές επιδράσεις της άσκησης. Ένας άλλος εκπρόσωπος της ομάδας των φλαβονοειδών , η κουρκουμίνη έδειξε να συμβάλλει στην ενίσχυση της δράσης των αντιοξειδωτικών συστημάτων και τη μείωση της συγκέντρωσης των ενεργών μορφών οξυγόνου. Στις μελέτες χορήγησης μετάλλων αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις τους στο πλάσμα. Επιπλέον, το σελήνιο συνεργιστικά με άλλα αντιοξειδωτικά σε έρευνες φαίνεται ικανό να επηρεάζει δείκτες φλεγμονής, αθηροσκλήρωσης και λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Πίνακας 2: Χορήγηση αντιοξειδωτικών σε ασθενείς

αντιοξειδωτικό	Άλλοι παράμετροι	Πληθυσμό	Διάρκεια δοκιμής	αποτελέσματα	πηγή
Βιταμίνη C (500 mg) βιταμίνη E (400 mg), γλυκονικός ψευδάργυρος (25 mg), σεληνομεθειονίνη (200 μg)		Ενήλικες με μυϊκή δυστροφία (FSD)	Μία φορά/ημέρα για 17 εβδομάδες	1)στατιστικώς σημαντική βελτίωση MVCQ και TlimQ των τετρακεφάλων με την ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας	[139]
Βιταμίνη E (400 IU κάψουλες ,από το στόμα)	Υπογλυκαιμικά φάρμακα (glibenclamide-	Ενήλικες με διαβητική νευροπάθεια	3 μήνες	↓ επιπέδων σακχάρου,↑ αντιοξειδωτική	[140]

	5 mg or metformin-500 mg) και δισκία pregabalin (Preganerve, 45 mg, oral, το βράδυ)			ικανότητα οργανισμού με ↑νευρικής αγωγιμότητας με: 1) ↓πόνου αλλά όχι ↑ποιότητα ζωής 2)↑αποτελεσματικότητας σε ασθενείς >50 ετών	
Συνένζυμο Q10 (300 mg)	Αγωγή με στατίνες	Ενήλικες με στεφανιαία νόσο (CAD)	Κάθε μέρα για 12 εβδομάδες	↑Q10, vitamin E, δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων και ↓φλεγμονή (TNF-a, IL-6)	[141]
βιταμίνη E (α-τοκοφερόλη 1200IU)		Ενήλικες με στεφανιαία νόσο (CAD)	κάθε μέρα, για 2 χρόνια	↑α-τοκοφερόλη , ↓δείκτες οξειδωτικού στρες και φλεγμονής (F (2) –isoprostanes ούρων, TNF-a, ανιόν υπεροξειδίου) , καμία μεταβολή στη καρωτιδική IMT	[142]
Βιταμίνη C (500 mg)		Ενήλικες υπέρταστοι, διαβητικοί παχύσαρκοι	2 φορές/ημέρα	Στατιστικά σημαντική ↓CRP, IL-6, FBG στις 8 εβδομάδες και μη στατικά σημαντικές αλλαγές στην TCκαι TG	[143]
Κουρκουμίνη (1g)		30 Παχύσαρκοι ενήλικες	Κάθε μέρα, για 30 ημέρες	Στην ομάδα με την κουρκουμίνη:Mean BAI score↓ και καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στο BDI score	[144]
Κουρκουμίνη (1g)		Παχύσαρκοι ενήλικες	Κάθε μέρα, για 30 ημέρες	↓serum TGL,καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή στο ΔΜΣ, στο σωματικό λίπος και στο λιπιδαιμικό προφίλ (TC, HDL, LDL,CRP)	[145]
Λουτεΐνη [10 mg, 20 mg, συνδυασμός λουτεΐνης (10 mg) και		112 ασθενείς με εκφύλιση της ωχράς κηλίδας	2 χρόνια	↑ επίπεδα λουτεΐνης στο πλάσμα, ↑ MPOD, μη στατιστικά σημαντικές	[146]

ζεαξανθίνης (10 mg)]		(AMD).		μεταβολές σε BCVA και FRT, 10 mg ενδεδειγμένη μακροπρόθεσμη δοσολογία για την έγκαιρη θεραπεία της AMD.	
α-τοκοφερόλη (400 IU), ALA (100 mg)		Παιδιά με σύνδρομο Down (7-15 ετών)	Κάθε μέρα, για 4 μήνες	↑8OHdG στα αγόρια, μη στατιστικά σημαντική συσχέτιση ηλικίας και παραγόντων οξειδωτικού στρες, ↓8OHdG στην ομάδα της α-τοκοφερόλης, μη στατιστικά σημαντική ↓TBARS	[147]
ALA (600 mg)		58 άντρες με χρόνιο τραυματισμό του νωτιαίου μυελού (SCI).	12 εβδομάδες	Μη στατιστικά σημαντική ↓CRP, IL-6 Στατιστικά σημαντική ↓επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, αρτηριακής πίεσης, σωματικού βάρους, περιφέρειας μέσης, διαιτητικής πρόσληψης (CHO, FAT, Kcal, Pro)	[148]
ALA (1200 mg)		Ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα (20-50 ετών)	Κάθε μέρα, για 8 εβδομάδες	Μη στατιστικά σημαντικές μεταβολές σε hs-CRP, TNF-α, IL-6 και MMP-3	[149]
Πικολινικό χρώμιο (200 μg)		64 γυναίκες με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS)	8 εβδομάδες	Στατιστικά σημαντική ↓ TGL, LDL-CHOL, TC και ↑ ινσουλινοευαισθησία (QUICKI), ↓ ινσουλίνη ορού, στο μοντέλο αξιολόγησης της λειτουργίας των β-κυττάρων παγκρέατος και αντίστασης στην ινσουλίνη	[150]
ALA (600 mg), vitamin E (400 IU), ALA and		85 ασθενείς σε αιμοκάθαρσ	Κάθε μέρα, για 2 μήνες	ομάδα με ALA και vitamin E: μη στατιστικά	[151]

vitamin E, and placebo.		η		σημαντική ↓MDA σε όλα τα παρεμβατικά γκρουπ: μη στατιστική ↓ CRP και ↓ καταάστασης υποσιτισμού Ομάδα με vitamin E: ↓ IL-6	
vitamin C (266.7 mg), vitamin E (300 IU), vitamin C+E (300 IU+266.7 mg)		170 άτομα με διαβήτη τύπου 2	3 κάψουλες την ημέρα, για 3 μήνες	↓ υπέρταση, βελτίωση της δράσης της ινσουλίνης , της δραστηριότητας της GSH και ↑ SOD	[152]
14 vitamins & 14 minerals		Γυναίκες αναπαραγωγική ηλικίας με CFS	Κάθε μέρα, για 2 μήνες	Βελτίωση δραστηριότητας SOD	[153]
vitamin A (10000IU) vitamin E (400mg) vitamin C (600mg)		Ασθενείς σε MEΘ	Μέχρι να βγουν από τη MEΘ	↓MDA	[154]
Vitamin C (500 ή 1000 mg)		84 ενήλικες με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2	Κάθε μέρα, για 6 εβδομάδες	Στην ομάδα των 1000 mg : σημαντική στατικά ↓ FBS, TG, LDL, HbA1c και ινσουλίνη πλάσματος	[155]

Πίνακας 3: χορήγηση αντιοξειδωτικών στα ερυθροκύτταρα

αντιοξειδωτικό	Άλλοι παράμετροι	Πληθυσμός	Διάρκεια δοκιμής	αποτελέσματα	πηγή
1.Σίδηρος (είτε μέσω αρτηριακής εξωσωματικής κυκλοφορίας είτε μέσω φλεβικής κυκλοφορίας) (100mg)		20 ασθενείς σε αιμοδιάλυση , μη καπνιστές, επίπεδα φερριτίνης < 500 ng/ml, όχι θεραπεία με σίδηρο	3mid-week HD συνεδρίες	Καμία στατιστική μεταβολή στη δραστηριότητα των SOD, CAT και στις 3 ομάδες ↓ TAC σε 45min σε όλες τις ομάδες (p<0,05), όχι στατιστικά σημαντική πτώση των επιπέδων TAC στις ομάδες στα 270min.	[164]

				↑Gpx activity και στις δύο ομάδες χορήγησης σιδήρου χωρίς στατιστική σημαντικότητα σε χρόνο T2 (45 min). ↑Gpx activity στην ομάδα της φλεβικής οδού χορήγησης σε χρόνο T3 (270 min) (p=0,01)	
2.ρύζι εμπλουτισμένο με σελήνιο(1.64±0.28 μg/g) (80 g)		20 υγιείς γυναίκες (2 ομάδες των 10)	20 ημέρες (διπλά τυφλή μελέτη)	Ομάδα συμπληρώματος μετά τις 20 ημέρες: ↑ Gpx activity, ↑[Se] (pvalue 0,01 και 0,03) (στις 5 μέρες δεν παρατηρήθηκε μεταβολή) Στην ομάδα του Placebo δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή μετά τις 20 ημέρες. Μετά από 10 ημέρες αποχή από το συμπλήρωμα: τα επίπεδα του σεληνίου και του ενζύμου επανέρχονται στα αρχικά. Δεν είναι τοξικό.	[156]
3.χυμός τομάτας (καρετονοειδή: λυκοπένιο) (330 ml)	3 24-ωρες ανακλήσεις (2 καθημερινές μέρες και μία του σαββατοκύριακου) κατά τη διάρκεια της μελέτης	64 υπέρβαρες ή παχύσαρκες φοιτήτριες (20-30 ετών) (2 ομάδες : νερό και συμπλήρωμα)	Κάθε μέρα, για 20 ημέρες	Ομάδα παρέμβασης συνολικού πληθυσμού αλλά και σε επίπεδο υπέρβαρων ατόμων μετά τις 20 ημέρες: ↑TACπλάσμα (p = 0.03), ↑ SODερυθροκύτταρα (p = 0.01), ↑CATερυθροκύτταρα (p = 0.02) and ↑GPxερυθροκύτταρα	[157]

				($p = 0.01$) και ↓MDAορού ($p = 0.01$) Καμία μεταβολή σε κανένα οξειδωτικό δείκτη σε ομάδα παρέμβασης σε επίπεδο παχύσαρκων ατόμων	
4. κόκκινο κρασί 2 ποτήρια/ημέρα (25 cl)	Ασπιρίνη κατά την έναρξη της παρέμβασης Ίδια επίπεδα φυσικής δραστηριότητας, φαρμακευτικής αγωγής και εφαρμογή διατροφής μεσογειακού τύπου κατά την διάρκεια της μελέτης	39 Ασθενείς με επεισόδια εμφράγματος μυοκαρδίου και ισχαιμία της καρδιολογικής κλινικής νοσοκομείου Γαλλίας (~65 ετών, 32 άντρες και 7 γυναίκες) σε 2 ομάδες: κρασιού και νερού	>3 μήνες	Στις 14 και 20 ημέρες στην ομάδα συμπληρώματος: ↓T.CHOL, ↓LDL- CHOL (pvalue 0,04 και 0,01) Στις 14 ημέρες: (με χρώση ερυθροκυττάρων MC540) Βελτίωση ρευστότητας μεμβράνηςκαι ↓λιπιδικής πυκνότητα μεμβράνης (↑ οργάνωση λιπιδίων) (-36%) και ↑ TAC (3%) (τεστ αιμοδιάλυσης) Μη στατιστική διαφορά σε [πολυφαινόλες] στις 2 ομάδες στο τέλος της παρέμβασης Η διαίτα δυτικού τύπου σε συνδυασμό με την κατανάλωση του κρασιού επιφέρει τα παραπάνω αποτελέσματα.	[158]
5.NucleVital®Q10 Complex (Norwegian salmon oil: omega-3 acids (225 mg;		66 υγιείς γυναίκες (35–55 ετών)	12 εβδομάδες	Καμία μεταβολή σε βιοχημικούς δείκτες ↑TAC (25%) , μικρή ↑SOD _{RBCs} (λόγω ↑PUFA), σταθερή GPx _{RBCs} , ↓MDA _{RBCs}	[165]

including 75 mg of eicosapentaenoic acid and 75 mg of docosahexaenoic acid), ubiquinone (50 mg) astaxanthin (2.5 mg), lycopene (7.5 mg), lutein palmitate (5 mg), zeaxanthin palmitate (1 mg), L-selenomethionine (55 mg), cholecalciferol (5 µg) and α-tocopherol (7.5 mg) (6 κάψουλες / ημέρα)				, σταθερά MDA _{plasma} και επίπεδα της 8-OHdG, ↑SIRT1,2 (ρυθμιστές φλεγμονής και γήρανσης), ↑BDNF, ↑τελομεράση (δείκτης γήρανσης κυττάρων) αλλά σταθερό το μήκος της ↑ βιταμίνης D (~29 ng/mL)	
6. green tea extract (GTE, 980 mg polyphenols) (2 κάψουλες/ ημέρα)	2 κυκλικά επαναλαμβανόμενα sprint tests (RST: 4 × 15 s, με 1 λεπτό ανάπαυση) μετά τη χορήγηση	σε δρομείς κατά τη διάρκεια της προπαρασκευαστικής φάσης (2 ομάδες: GTE και P)	Κάθε μέρα, για 4 εβδομάδες	1)ομάδα με GTE : ↑ πολυφαινόλες, ↑ TAC (σε κατάσταση ηρεμίας) και ↓ MDA, ↓ SOD (υστέρα από RST), μη στατιστικά σημαντική διαφορά στην απόδοση των RST μετά τη λήψη GTE 2) μετά από RST: ↑ UA, AL, και CK (και στις 2 ομάδες) Καμία μεταβολή στη GPx ↓SOD (στα 5min μεταπροπονητικά και 24h ανάρρωσης στην ομάδα GTE), ενώ ↑SOD (5min μεταπροπονητικά) και ↓ SOD (24 h ανάρρωσης στην ομάδα P)	[133]
7. Ρεσβερατρόλη (100 mg/ημέρα) 1	Διατροφή: ↓λιπαρά τρόφιμα, αποφυγή	60 υγιείς άντρες πυροσβέστες	για 3 μήνες	Σε ομάδα με ρεσβερατρόλη (μετά	[166]

κάψουλα το πρωί	αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων και προϊόντων σταφυλιού (2800Kcal/ημέρα) FFQ και 3ήμερο ημερολόγιο καταγραφής Τεστ 4 ασκήσεων σε σειρά: έλξεις μέχρι το πηγούνι σε μονόζυγο, κοιλιακοί με ανασήκωση πλάτης, τεστ ταχύτητας στα 50m, αερόβιο τρέξιμο για 12min			την άσκηση): ↓ IL-6 και TNF-α, μικρή ↑ Glu (όχι ↑ απόδοση) Καμία μεταβολή σε ηπατικούς δείκτες, T.CHOL, LDL/HDL, IL-1β, θειόλες πλάσματος, 8OHdG, 8-ισοπροστάνια, SOD, CAT, GR όχι στατιστική διαφορά των επιπέδων της LDL-CHOL(μετα την άσκηση) ↑ CK,UA μετά την άσκηση ανεξαρτήτως συμπληρώματος Στατιστική ↓GPx RBCs (πριν και μετά την άσκηση σε ομάδα συμπληρώματος)	
8. Biostimine (Aloe arborescens) Αμπούλα (1 ml)/ημέρα	Διατροφή σύμφωνα με RDA μακροσυστατικών	18 Άντρες κωπηλάτες (προπαρασκευαστική περίοδος)	Για 4 εβδομάδες,	Αμετάβλητη GPx activity, ↑SOD μετά την άσκηση στις 2 ομάδες, ↑TBARS (control group), IL-6 μετά την άσκηση Ομάδα με συμπλήρωμα αλόης μετά την άσκηση ↑TAC_{plasma} (p < 0,0017)	[167]

Κεφάλαιο 4ο : ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

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 σε φαινομενικά υγιείς εθελοντές. Γι' αυτό το σκοπό α) πραγματοποιήθηκε διπλά τυφλή κλινική παρέμβαση σε υγιείς εθελοντές που κατανάλωναν είτε το συμπλήρωμα είτε

το εικονικό σκεύασμα και προσδιορίστηκε η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης Gpx1 στα ερυθροκύτταρα των εθελοντών στις 0, 4, και 8 εβδομάδες, β) έγινε προσδιορισμός της περιεχόμενης αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων των εθελοντών με τη μέθοδο Drabkin.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 5ο : ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 Σχεδιασμός κλινικής μελέτης

5.1.1 Περιγραφή σχεδιασμού

Για το παρόν πρωτόκολλο επιλέχθηκαν φαινομενικά υγιείς εθελοντές και των δύο φύλων, καπνιστές και μη καπνιστές, ηλικίας ≥ 22 , με BMI > 23 kg/m². Επιπροσθέτως οι εθελοντές δεν θα έπρεπε να λαμβάνουν φαρμακευτική αγωγή ή συμπληρώματα διατροφής. Χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες: σε αυτή των εθελοντών μαρτύρων και της ομάδας της παρέμβασης και λάμβαναν μεταγενεματικά, είτε το συμπλήρωμα Mind Master (MM) (80mL/ημέρα), είτε το εικονικό σκεύασμα Placebo (P)(80mL/ημέρα) για 8 εβδομάδες.

Από τους εθελοντές ζητήθηκε να αποφύγουν τη λήψη οποιουδήποτε αντιφλεγμονώδους ή αναλγητικού φαρμάκου ή λοιπών ιατρικών σκευασμάτων και συμπληρωμάτων διατροφής κατά τη διάρκεια της συμμετοχής τους στην έρευνα. Επιπλέον, δόθηκαν οδηγίες για τη διατήρηση των διατροφικών τους συνηθειών και του σωματικού βάρους 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.

Οι εθελοντές επισκέφτηκαν το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο τρεις χρονικές στιγμές: την χρονική στιγμή 0 (πριν την παρέμβαση), έπειτα από 4 εβδομάδες και σε 8 εβδομάδες λήψης σκευάσματος. Σε κάθε επίσκεψη ζητήθηκε από τους εθελοντές να υποβληθούν 12ωρη νηστεία και να φέρουν μαζί τους δείγμα από πρωινό ούρα σε στείρο ουροσυλλέκτη που τους παρείχαμε. Στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο πραγματοποιήθηκαν: λήψη αίματος, ανθρωπομετρικές μετρήσεις (βάρος, ύψος,) 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.

Για την διασφάλιση ότι οι εθελοντές δεν μετέβαλλαν τις διατροφικές τους συνήθειες 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.

5.1.2 συστατικά του συμπληρώματος

Το συμπλήρωμα Mind Master που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη περιείχε τα εξής 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), συντηρητικά (σορβικό κάλιο, βενζοϊκό νάτριο), φυσικό άρωμα, γλυκαντική ουσία (στεβιογλυκοζίδες), συνένζυμο Q10, ασκορβικό οξύ, χολίνη, σεληνιώδες νάτριο.

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%

Πίνακας : Διατροφική ανάλυση του συμπληρώματος διατροφής

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

5.1.3 Παραλαβή ερυθροκυττάρων

Στην μελέτη πραγματοποιήθηκε παραλαβή δειγμάτων ούρων, πλάσματος, ορού, λευκοκυττάρων και ερυθροκυττάρων. Ωστόσο το πειραματικό κομμάτι της παρούσας πτυχιακής εργασίας αφορά την παρέμβαση στα ερυθροκύτταρα, η διαδικασία παραλαβής των οποίων θα περιγραφεί αναλυτικότερα στη συνέχεια.

Συνεπώς για την παραλαβή των ερυθροκυττάρων ακολουθείται η εξής διαδικασία: Στο vacutainer που περιέχει EDTA έπειτα από την παραλαβή του πλάσματος προτίθενται φυσιολογικός ορός. Γίνεται φυγοκέντρηση στα 200 g για 15 min ώστε να απομακρυνθούν τα λευκά. Προστίθενται 2 φορές 4 ml φυσιολογικού ορού και γίνεται

φυγοκέντρωση στα 1500 g για 10 min. Τα δείγματα κατανέμεται σε eppendorfs και φυλάσσονται στους -80°C.

5.2 Προσδιορισμός δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης Gpx1 σε ερυθροκύτταρα

Όργανα

- Φωτόμετρο ELISA (Biotek, PowerWaveXS2)
- Φυγόκεντρος υψηλής ταχύτητας (1000 στροφές/λεπτό)

Αναλώσιμα

- Tips (άσπρα, κίτρινα, μπλε)
- Αυτόματες πιπέτες
- Πλακίδια 96 θέσεων (απλά)

Στερεά αντιδραστήρια/Διαλύτες

- Sodium phosphate monobasic, $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid, Tetrasodium Salt) (Sigma, E6511)
- Sodium Azide (Sigma, S-2002)
- β - Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced Form (β -NADPH), Tetrasodium Salt (N1630, MW 833,35), 25mg
- Glutathione Reductase (Sigma, G-3664)
- GSH (Sigma, G-4251)
- H_2O_2 30% (Sigma, H-1009)

Διαλύματα

- Διάλυμα Drabkin D5941. Ανασύσταση ενός vial of the Drabkin's Reagent σε 1000 mL απεσταγμένο νερό. Προσθήκη 0,5 mL από το διάλυμα 30% Brij L23 Solution, (B4184). Ανάδευση καλή και φιλτράρισμα εάν έχει αδιάλυτα κομμάτια.
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50mM με EDTA 0,4 mM, Sodium Azide 1 mM pH 0,7 (PBS/ EDTA/Sodium azide): 3,45 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (S5) και 0,08325 g EDTA (E1), 0,032 g NaN_3 σε 500 mL απεσταγμένο νερό. Ρύθμιση pH με NaOH 1 M
- Αγωγάση της γλουταθειόνης: 219 U/mg protein, 3.1 mg protein/ ml (τελική συγκέντρωση στο μίγμα της αντίδρασης 1,17 U/ml ,δες πίνακα)
- Διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης 200 mM (GSH): 0,0615 g σε 1 mL απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα H_2O_2 0.0084% (H_2O_2): 1,12 μL διαλύματος H_2O_2 από το stock διάλυμα (30%) και 3999 μL απεσταγμένο νερό. Παρασκευάζεται αμέσως πριν το assay.

Αναλυτική πορεία:

(Δύο μέρες πριν από την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας παρασκευάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50mM με EDTA 0,4 mM, Sodium Azide 1 mM pH 0,7. Στην αρχή, ζυγίστηκαν οι ποσότητες καθενός αντιδραστήριου και τοποθετήθηκαν σε ογκομετρική φιάλη. Στη συνέχεια προστέθηκε απιονισμένο H₂O στη φιάλη μέχρι όγκο <500 mL και πραγματοποιήθηκε ανάδευση έως την εξάλειψη μικρών σωματιδίων. Το PH του διαλύματος που παρασκευάστηκε, ήταν 5,09. Για τη ρύθμιση του PH του διαλύματος σε PH 7,0 χρησιμοποιήθηκαν 2 διαλύματα buffer PH 7 και 10 (απαιτείται ένα εύρος PH όσο πιο κοντά στο επιθυμητό), καθώς απαιτείται βάση (NaNO₃) για να γίνει ένα σχετικά όξινο διάλυμα βασικό. Τέλος για τον έλεγχο του τελικού όγκου του διαλύματος, αυτό τοποθετήθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 500mL και ακολούθησε συμπλήρωση του όγκου με απιονισμένο H₂O μέχρι τη σχισμή. Το ρυθμιστικό διάλυμα αποθηκεύτηκε στο ψυγείο.)

- 1) Σε σηματοδοτημένα eppendorfs τοποθετούνται 400μl νερό και 100μl RBC (αραίωση ερυθροκυττάρων 1:5) και ακολουθεί ανάδευση με Vortex.
- 2) Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται τα δείγματα για 15 λεπτά σε θερμοκρασία ρυθμισμένη στους 4°C με 10000 rpm. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, παραλαμβάνονται 400 μL του υπερκείμενου και τοποθετούνται σε ένα καινούριο σηματοδοτημένο eppendorf . Πραγματοποιείται καλή ανάδευση και τοποθέτηση 100μL/ eppendorf.
- 3) Σε ένα eppendorf που περιέχει ακριβώς 100 μl προστίθενται 400 μL διάλυμα Drabkin και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της Gpx1. Τα υπόλοιπα eppendorf των 100 μl αποθηκεύονται στους -80° C. Σε ένα άλλο σηματοδοτημένο (τυφλό- blanc) eppendorf A τοποθετούνται 100μL νερό και 400μL διάλυμα Drabkin.

Αντίδραση

Glutathione Peroxidase



Glutathione Reductase



Αναλυτική πορεία:

- 4) Παρασκευάζονται τα διαλύματα της GR και του H₂O₂, λίγο πριν το assay.
- 5) Ακολούθως, παρασκευάζεται το μίγμα αντίδρασης σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

PBS/ Sodium azide	8340Ml
GR	15 μL
GSH	50 μL
NADPH	100 μL

Ανάδευση του NADPH με ήπια ανακίνηση και ρύθμιση pH αν είναι ανάγκη στο 7,0. Το διάλυμα διατηρείται στους 25 ° C.

- 6) Η προσθήκη των παρακάτω διαλυμάτων στα πηγαδάκια των plates και η διεξαγωγή του assay γίνονται με βάση των παρακάτω πίνακα:

Σειρά προσθήκης		Blank	Sample
3 ^ο	Μίγμα αντίδρασης	180 μ L	180 μ L
1 ^ο	Διαλύτης διαλύματος Gpx (PBS/EDTA/Sodium azide)	30 μ L	-
2 ^ο	Διάλυμα GPx	20 μ L (eppendorf A)	20 μ L
		Ανάμιξη με το tip και παραμονή 1 λεπτό σε Θδωμ.	
4 ^ο	Διάλυμα H ₂ O ₂	25 μ L	25 μ L
		Μέτρηση A στα 340 nm για 6 min ανά (μέθοδος GPX LFστο Elisa reader)	

Αρχικά προστίθεται στα πηγαδάκια του plate 30 μ L διαλύτης διαλύματος Gpx (PBS/EDTA/Sodium azide) με την πολυκάναλη πιπέτα, στη συνέχεια 20 μ L από το διάλυμα GPx ενώ στο πηγαδάκι του τυφλού 20 μ L από το eppendorf A. Τέλος προστίθενται 180 μ L από το μίγμα αντίδρασης κάνοντας καλή ανάμιξη με το tip και παραμένει το plate σε Θδωμ για ένα λεπτό. Έπειτα προστίθενται 25 μ L διάλυμα H₂O₂ και το plate τοποθετείται στο φωτόμετρο Elisa reader, το οποίο θα πραγματοποιήσει μέτρηση απορρόφησης (κινητική) στα 340 nm για 6 min. Η μέτρηση αυτή πραγματοποιείται κάθε φορά για 8 πηγαδάκια στο plate. Κάθε δεύτερη σειρά από πηγαδάκια μετράτε εκ νέου τυφλό δείγμα και η μέτρηση για κάθε δείγμα είναι διπλή.

- 7) Κατασκευάζεται γράφημα απορρόφησης – χρόνου και μέσω της εξίσωσης καταγράφεται η κλίση κάθε γραμμής. Στη συνέχεια μέσω του τύπου υπολογισμού της δραστηριότητας της Gpx (βλέπε παρακάτω) υπολογίζεται η δραστηριότητα σε Units/ mL παρασκευάσματος.
- 8) Τέλος επειδή οι μετρήσεις είναι διπλές, λαμβάνεται ο μέσος όρος και η μέση τυπική απόκλιση (SD) των τιμών δραστηριότητας για κάθε δείγμα.

Υπολογισμός δραστηριότητας

$$\text{Units/ mL παρασκευάσματος} = \frac{(\Delta A/\text{min, sample} - \Delta A/\text{min, blank}) \times 2 \times 0,255 \times df}{4,60 \times 0,02}$$

Όπου:

2: Τα 2 μ moles της GSH που παράγονται για κάθε μ mole NADPH που οξειδώνεται

0,255: Ο τελικός όγκος του assay σε mL

df: Ο συντελεστής αραίωσης αν το δείγμα της GPx αραιωθεί

4,60: ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του NADPH στα 340 nm και για όγκο 0,255 mL (μήκος οπτικής διαδρομής: 0,74 cm)

0,05: Ο όγκος του διαλύματος της GPx που χρησιμοποιείται στο assay

Η παραπάνω πειραματική διαδικασία πραγματοποιείται κάθε φορά για 6 εθελοντές και για τη διεξαγωγή ακριβέστερων μετρήσεων της δραστηριότητας της GPx1 στα ερυθροκύτταρα των εθελοντών πραγματοποιούνται διπλές μετρήσεις. Τα δείγματα με το περιεχόμενο διάλυμα Drabkin που χρησιμοποιούνται στη φωτομέτρηση για τον προσδιορισμό του ενζύμου, αποθηκεύονται στους -20° C για να χρησιμοποιηθούν μετά στον προσδιορισμό της αιμοσφαιρίνης με τη μέθοδο Drabkin.

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της GPx μέσω φωτομέτρησης 20μL δείγματος ερυθροκυττάρων, προήχθη μία πρόδρομη κινητική με ποσότητες των 5, 10, 20 και 30μL δείγματος. Συγκρίνοντας έπειτα τις κλίσεις των γραμμών των γραφημάτων απορρόφησης – χρόνου για κάθε από τα παραπάνω δείγματα, διαπιστώνεται ότι τα 20μL είναι μια καλή ποσότητα Lysate ερυθροκυττάρων για τον προσδιορισμό της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, αφού δεν παρατηρείται πολύ υψηλή δράση του ενζύμου και γρήγορη κατανάλωση του NADPH.

5.3 Προσδιορισμός της αιμοσφαιρίνης με τη μέθοδο Drabkin

Όργανα

- Φωτόμετρο ELISA (Biotek, PowerWaveXS2)

Διαλύματα

- Διάλυμα Drabkin D5941. Ανασύσταση ενός vial of the Drabkin's Reagent σε 1000 mL απεσταγμένο νερό. Προσθήκη 0,5 mL από το διάλυμα 30% Brij L23 Solution, (B4184). Ανάδευση καλή και φιλτράρισμα εάν έχει αδιάλυτα κομμάτια.
- Διάλυμα αποθήκευσης Cyanmethemoglobin Standard Solution 180 mg/ml
- Διάλυμα εργασίας Cyanmethemoglobin Standard: αραίωση της κυανομεθαιμοσφαιρίνης παίρνοντας 40μl από το διάλυμα αποθήκευσης και αραιώνοντας το σε 10 ml διάλυμα Drabkin δημιουργώντας μία συγκέντρωση 0,72 mg/ml (ή μg/μl)

Αρχή μεθόδου

Το διάλυμα Drabkin αντιδρά με όλες τις μορφές αιμοσφαιρίνης εκτός της σουλφοαιμοσφαιρίνης, που είναι μία χρωστική ουσία η οποία φυσιολογικά συμβαίνει μόνο σε απειροελάχιστες συγκεντρώσεις στο αίμα. Έτσι η μέθοδος αυτή βασίζεται στην οξείδωση της αιμοσφαιρίνης στα παράγωγά της (εκτός της

σουλφοαιμοσφαιρίνης) σε μεθαιμοσφαιρίνη (ο σίδηρος της αίμης έχει οξειδωθεί σε τρισθενή μορφή) με παρουσία αλκαλικού σιδηροκυανιούχου καλίου. Η μεθαιμοσφαιρίνη αντιδρά με το σιδηροκυανιούχο κάλιο και παράγει κυανομεθαιμοσφαιρίνη, η οποία μετριέται σε μέγιστη απορρόφηση στα 450 nm. Η απορρόφηση αυτή είναι ανάλογη με την ολική συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης.

Αναλυτική πορεία:

- 1) Ζυγίζω 180 mg Cyanmethemoglobin και το τοποθετώ σε 1 mL διάλυμα Drabkin
- 2) Αραιώνω το διάλυμα αποθήκευσης παίρνοντας 40μL από το διάλυμα αποθήκευσης και αραιώνοντάς το σε 10 mL διάλυμα Drabkin. (αφαιρούμε από το διάλυμα Drabkin 40 L και προσθέτουμε 40 μL από το διάλυμα αποθήκευσης.)
- 3) Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης αναφοράς(T, Σ1, Σ2 ,Σ3) ,σε διαφορετικούς πλαστικούς σωλήνες προστίθενται οι πιο κάτω ποσότητες :

	Αραιωμένη κυανομεθαιμοσφαιρίνη (μl)	Διάλυμα Drabkin(μl)
T	-	1000
Σ1	333	667
Σ2	667	333
Σ3	1000	-

- 4) Στα σωληνάκια των δειγμάτων τοποθετούνται 1625 μl διάλυμα Drabkin και 75 μl υπερκειμένου που δημιουργήθηκε στην προηγούμενη διαδικασία (από τα erppendorf που χρησιμοποιήσαμε για τον προσδιορισμό της GPx). Ο συνολικός όγκος των σηματοδοτημένων σωληνών θα πρέπει να είναι 1700 μl διαλύματος Drabkin και υπερκειμένου.
- 5) Όλα τα σωληνάκια παραμένουν για 30 λεπτά σε Θδωμ. και σε σκοτεινό μέρος.
- 6) Ύστερα 200 μl από τα παραπάνω δείγματα σε πλακίδιο 96 θέσεων και πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm.
- 7) Κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς με τους μέσους όρους των τιμών τριών σημείων συγκέντρωσης πρότυπου διαλύματος αιμοσφαιρίνης και τυφλού (T, Σ1, Σ2, Σ3) και μέσω της εξίσωσης προσδιορίζεται στο αρχικό δείγμα των ερυθροκυττάρων η συγκέντρωση mg/mL αιμοσφαιρίνης.
- 8) Για τον τελικό προσδιορισμό της δραστηρότητας του ενζύμου πάρθηκε ο λόγος των μέσων τιμών της δραστηρότητας GPx προς την αιμοσφαιρίνη για κάθε εθελοντή σε όλες τις χρονικές στιγμές. Η δραστηρότητα εκφράστηκε σε U/g Hb.

Κεφάλαιο 6ο : ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Κλινική παρέμβαση σε υγιείς εθελοντές

6.1.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών στην αρχή της παρέμβασης (χρονική στιγμή: εβδομάδα 0)

Στη παρούσα μελέτη στρατολογήθηκαν συνολικά 62 εθελοντές, 58 από τους οποίους ολοκλήρωσαν τη μελέτη, 28 στην ομάδα του placebo και 30 στην ομάδα του συμπλήρωματος. Τα χαρακτηριστικά των εθελοντών παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Πίνακας 1 : Χαρακτηριστικά εθελοντών

	Placebo	MM συμπλήρωμα	P value
Ηλικία (έτη)	32,9 ± 5,6	34,9 ± 5,8	0,2
Φύλο (0=άντρας, 1=γυναίκα)	♂ 64,3% ♀ 35,7%	♂ 73,3% ♀ 26,7%	-
Συστολική πίεση (mmHg)	126,9 ± 10,2	122,7 ± 10,5	0,1
Διαστολική πίεση (mmHg)	78,5 ± 8,8	74,5 ± 8,5	0,08
Βάρος (kg)	78,7 ± 15,1	80,9 ± 9,8	0,5
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m²)	26,6 ± 2,9	27,0 ± 2,0	0,5

Σύμφωνα με τη στατιστική επεξεργασία (p value < 0,05), δεν υπάρχει σημαντική διαφορά ως προς τα χαρακτηριστικά των εθελοντών μεταξύ των δύο ομάδων παρέμβασης. Ο πληθυσμός της μελέτης χαρακτηρίζεται ως υπέρβαρος λόγω του αυξημένου δείκτη μάζας σώματος (BMI : 26,6-27,0 kg/m²) και από ελαφρώς αυξημένη συστολική αρτηριακή πίεση (126,9 / 122,7 mmHg).

Πίνακας 2: υποκυτταρικοί πληθυσμοί των εθελοντών πριν την παρέμβαση (χρονική στιγμή: εβδομάδα 0)

	Placebo	MM συμπλήρωμα	P value*
Λευκά αιμοσφαίρια (K/μL)	5,7 ± 1,4	6,2 ± 1,3	0,2

Λεμφοκύτταρα (K/μL)	1,8 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,6	0,07
Μονοκύτταρα (K/μL)	0,4 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,3
Κοκκιοκύτταρα (K/μL)	3,5 $\pm$ 1,2	3,7 $\pm$ 1,0	0,5
Αιμοσφαιρίνη (g/dL)	14,6 $\pm$ 2,7	15,1 $\pm$ 1,3	0,4
Ερυθρά αιμοσφαίρια (M/μL)	4,4 $\pm$ 1,4	4,5 $\pm$ 1,3	0,7
Αιματοκρίτης (%)	40,9 $\pm$ 4,2	40,3 $\pm$ 4,0	0,6
Αριθμός αιμοπεταλίων (K/μL)	224,0 $\pm$ 59,1	240,6 $\pm$ 32,4	0,2
*Independent t-test			

Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά (p value <0,05) μεταξύ των αιματολογικών στοιχείων των δύο ομάδων εθελοντών πριν την έναρξη της παρέμβασης. Συνεπώς οι δύο ομάδες έχουν παρόμοια χαρακτηριστικά υποκυτταρικών πληθυσμών.

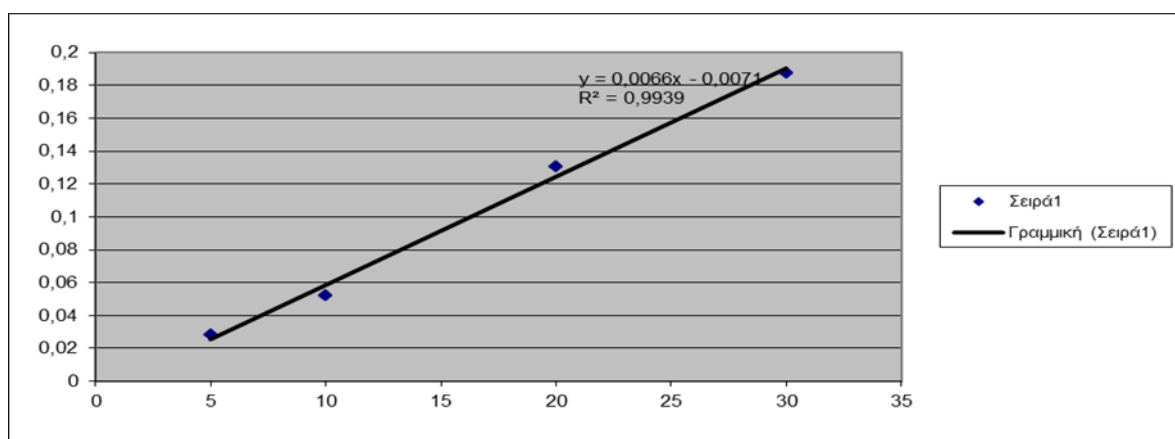
Πίνακας 3: Βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών πριν την παρέμβαση (χρονική στιγμή : εβδομάδα 0)

	Placebo	MM συμπλήρωμα	P value
γλυκόζη (mg/dL)	95,6 $\pm$ 10,0	101,2 $\pm$ 12,8	0,07
χοληστερόλη (mg/dL)	187,6 $\pm$ 43,0	201,0 $\pm$ 42,3	0,2
HDL-χοληστερόλη (mg/dL)	49,3 $\pm$ 14,2	46,2 $\pm$ 15,7	0,4
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	73,0 $\pm$ 38,7	92,0 $\pm$ 64,8	0,2
LDL-χοληστερόλη (mg/dL)	123,8 $\pm$ 43,6	138,2 $\pm$ 45,6	0,2
Ουρικό οξύ (mg/dL)	4,7 $\pm$ 1,2	4,6 $\pm$ 1,1	0,6

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ($p \text{ value} < 0,05$) μεταξύ των βιοχημικών χαρακτηριστικών των δύο ομάδων πριν την έναρξη της παρέμβασης. Συνεπώς, όλοι οι εθελοντές παρουσιάζουν παρόμοιο βιοχημικό προφίλ.

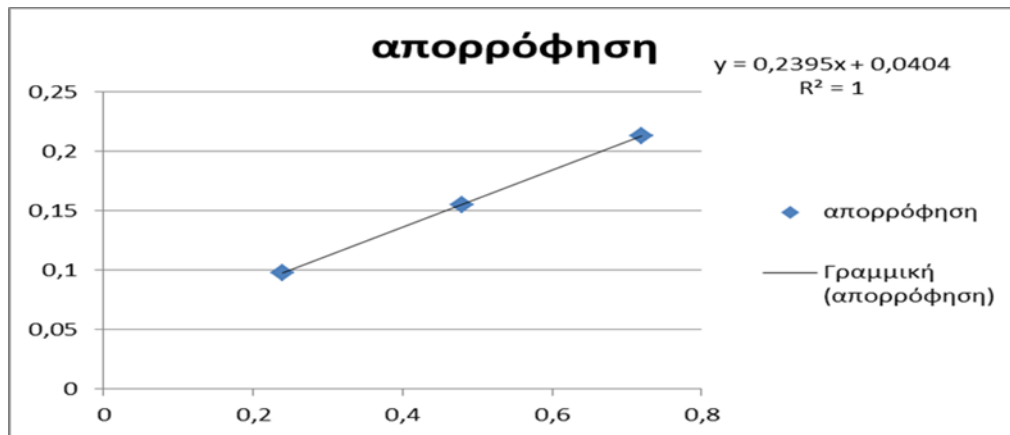
6.1.2 Σχέση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης με τη ποσότητα του ομογενοποιήματος των ερυθροκυττάρων και κανονικοποίηση δείγματος με γραμμάρια αιμοσφαιρίνης αρχικού δείγματος ερυθροκυττάρων

Στη παρούσα πειραματική διαδικασία, μετρήθηκε η δραστηριότητα της GPx σε ποσότητα ομογενοποιήματος ερυθροκυττάρων 5μL, 10μL, 20μL και 30μL. Στο παρακάτω γράφημα αποτυπώνεται η σχέση της δραστηριότητας του ενζύμου με τις διάφορες ποσότητες του ομογενοποιήματος των ερυθροκυττάρων.



Γράφημα 1: σχέση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης και της ποσότητας ομογενοποιήματος ερυθροκυττάρων

Από το παραπάνω γράφημα φαίνεται να υπάρχει αναλογική σχέση μεταξύ της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της ποσότητας του ομογενοποιήματος ερυθροκυττάρων, αφού όσο αυξάνεται η ποσότητα του ομογενοποιήματος τόσο αυξάνεται και η δραστηριότητα του ενζύμου και αντίστροφα.



Γράφημα 2: Πρότυπη καμπύλη αιμοσφαιρίνης

Με βάση την πρότυπη καμπύλη, υπολογίζεται η αιμοσφαίρινη των ερυθροκυττάρων κάθε εθελοντή στο αρχικό δείγμα των ερυθροκυττάρων. Εφόσον, επιλέχθηκε η ποσότητα των 20μL ομογενοποιημένου ερυθροκυττάρων, στη συνέχεια, κανονικοποιήθηκαν τα αποτελέσματα της δραστηριότητας της GPx ως προς τα γραμμάρια της περιοχόμενης αιμοσφαιρίνης και εκφράστηκαν σε U/g Hb.

6.1.3 Κατανομή δειγμάτων μελέτη

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of GPx_RedCells_0 is normal with mean 21,173 and standard deviation 9,19.	One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	,195	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of GPx_RedCells_1 is normal with mean 20,782 and standard deviation 8,63.	One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	,738	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of GPx_RedCells_2 is normal with mean 20,989 and standard deviation 9,22.	One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test	,657	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Εικόνα 26: Kolmogorow Smirnov Test

Σύμφωνα με το παραπάνω τεστ αποδεικνύεται ότι τα δείγματα της υπόθεσης της μελέτης ακολουθούν κανονική κατανομή και στις 3 χρονικές στιγμές (εβδομάδες: 0, 4, 8) με στατιστική σημαντικότητα (p value $> 0,05$). Συνεπώς, οι τιμές των δειγμάτων εκφράστηκαν σε $\text{mean} \pm \text{SD}$ (standard deviation).

6.1.4 Δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης πριν την παρέμβαση

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι τιμές της δραστικότητας της GPx πριν την έναρξη της παρέμβασης στην εβδομάδα 0 τόσο στην ομάδα του συμπληρώματος όσο και στην ομάδα του Placebo.

Πίνακας 4: Η δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα πριν την έναρξη της παρέμβασης (χρονική στιγμή: εβδομάδα 0)

	Placebo	MM συμπλήρωμα	P value
υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) (U/g)	21,2±10,3	21,2±8,2	1,0

Παρατηρείται μη στατικά σημαντική διαφορά στη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα και των δύο ομάδων πριν από την έναρξη της παρέμβασης. (χρονική στιγμή: εβδομάδα 0)

6.1.5 Συσχετίση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα με τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης πριν την παρέμβαση

Εφόσον το δείγμα της μελέτης ακολουθεί κανονική κατανομή, για να μελετηθούν οι σχέσεις συσχέτισης της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα και των χαρακτηριστικών των εθελοντών όλης της μελέτης (n=58), θα χρησιμοποιηθεί το τεστ του Pearson με στατιστική σημαντικότητα p value < 0,05.

Πίνακας 5 : Συσχέτιση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα με τα χαρακτηριστικά, τους υποκυτταρικούς πληθυσμούς και τα βιοχημικά στοιχεία των εθελοντών (χρονική στιγμή: εβδομάδα 0)

	Δραστικότητα της Gpx	
	P value	Pearson Correlation
Ηλικία (έτη)	0,1	0,221
Δείκτης μάζας σώματος (kg/m²)	0,1	-0,213

Γλυκόζη (mg/dL)	0,3	-0,151
χοληστερόλη(mg/dL)	0,01	-0,314*
HDL-χοληστερόλη (mg/dL)	0,7	-0,048
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	0,7	-0,048
LDL-χοληστερόλη (mg/dL)	0,04	-0,264*
Ουρικό οξύ (mg/dL)	0,7	-,045
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).		

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρείται η θετική ανάλογη (θετικό πρόσημο) συσχέτιση της ηλικίας με την δραστικότητα της Gpx. Όσο αυξάνεται η ηλικία τόσο αυξάνεται και η δραστικότητα του συγκεκριμένου ενζύμου και αντίστροφα. Όλοι οι υπόλοιποι παράγοντες σχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα (αρνητικό πρόσημο) με την δραστικότητα της Gpx. (τα διάφορα είδη της χοληστερόλης, η γλυκόζη, το ουρικό οξύ, τα τριγλυκερίδια και ο δείκτης μάζας σώματος) Όσο αυξάνονται τα επίπεδα τους τόσο μειώνεται η δραστικότητα του ενζύμου. Ωστόσο τα παραπάνω ευρήματα δεν παρουσιάζουν στατιστική σημαντικότητα ($p \text{ value} < 0,05$). Εξαίρεση αποτελεί η συσχέτιση της χοληστερόλης και της LDL-χοληστερόλης με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης αντίστοιχα που είναι αντιστρόφως ανάλογη με στατιστική σημαντικότητα $p \text{ value} : 0,01 < 0,05$ και $p \text{ value} : 0,04 < 0,05$ αντίστοιχα.

6.1.6 Συσχέτιση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα με τους υπόλοιπους οξειδωτικούς δείκτες της μελέτης πριν την παρέμβαση

Για να συσχετιστεί η δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης με τους υπόλοιπους αντιοξειδωτικούς δείκτες στο συνολικό πληθυσμό της μελέτης ($n=58$) πριν την παρέμβαση (χρονική στιγμή : εβδομάδα 0), χρησιμοποιούνται τα τεστ συσχέτισης Pearson και Spearman με στατιστική σημαντικότητα $p \text{ value} < 0,05$. Για μεγέθη που έχουν κανονική κατανομή ακολουθείται το μοντέλο του Pearson, ενώ για τα μη κανονικά μεγέθη το μοντέλο του Spearman.

Πίνακας 6 : Συσχέτιση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα με τους άλλους οξειδωτικούς δείκτες της μελέτης (χρονική στιγμή: εβδομάδα 0)

	Δραστικότητα της Gpx	
	P value	Pearson Correlation
oxLDL-χοληστερόλη	0,7	-0,047

(mg/dL)*		
Ισοπροστανία (ng/mmol)#	0,6	-0,073
TBARS (μM)*	0,5	-0,087
Δραστικότητα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης ορού (U/mL)*	0,5	-0,115
8-υδροξυ-2- δεοξυγουανοσίνη (μg/mmol)#	0,5	-0,091
ex vivo αντίσταση του ορού στην οξείδωση-lagtime (min)*	0,4	-0,126
Δραστικότητα υπεροξειδικής δισμουτάσης λευκοκυττάρων (U/mg)#	0,3	0,154
* κατά pearson (κανονικά μεγέθη) # κατά spearman (μη κανονικά μεγέθη)		

Όλοι οι οξειδωτικοί δείκτες εκτός της υπεροξειδικής δισμουτάσης στα λευκοκύτταρα συσχετίζονται αντιστρόφως ανάλογα με τη δραστικότητα της GPx στα ερυθροκύτταρα. Όσο αυξάνονται τα επίπεδα των οξειδωτικών δεικτών τόσο μειώνεται η δραστικότητα της GPx. Ωστόσο κανένα από τα παραπάνω ευρήματα δεν παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα (p value <0,05).

6.1.7 Σύγκριση της δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης των ερυθροκυττάρων ως προς το χρόνο παρέμβασης, την παρέμβαση και την αλληλεπίδραση αυτών των δύο παραγόντων

Για την αξιολόγηση και σύγκριση της δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα ως προς το χρόνο της παρέμβασης, την ίδια την παρέμβαση αλλά και την αλληλεπίδρασή τους χρησιμοποιείται το repeated measures ANOVA TEST με στατιστική σημαντικότητα p value < 0,05.

Συμβολισμοί:

Χρόνος παρέμβασης →time

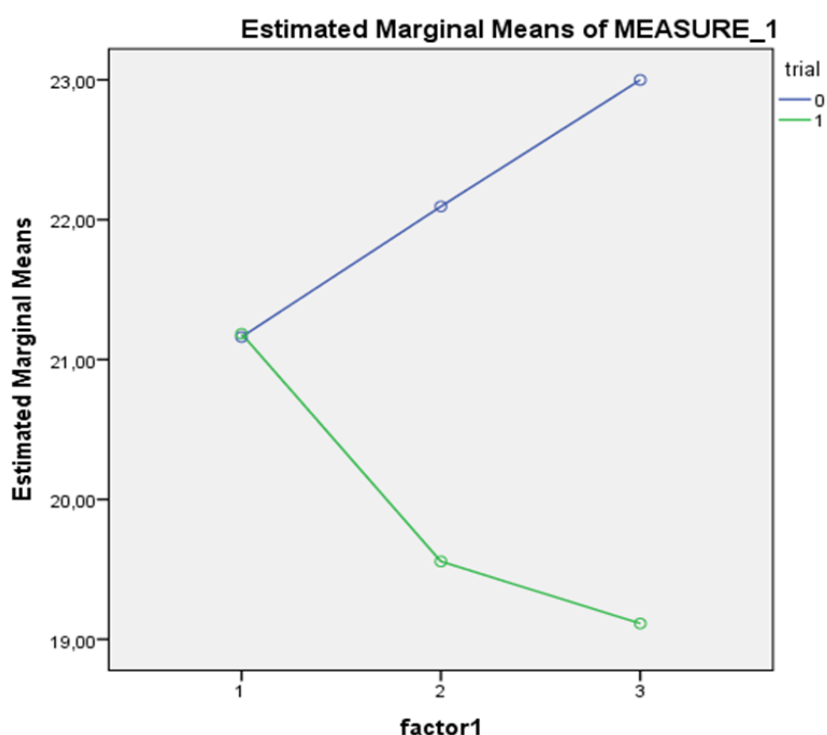
παρέμβαση→ trial

αλληλεπίδραση χρόνου παρέμβασης με παρέμβαση → time * trial

πίνακας 7: σύγκριση της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης των ερυθροκυττάρων ως προς το χρόνο της παρέμβασης, την ίδια την παρέμβαση αλλά και την αλληλεπίδρασή τους.

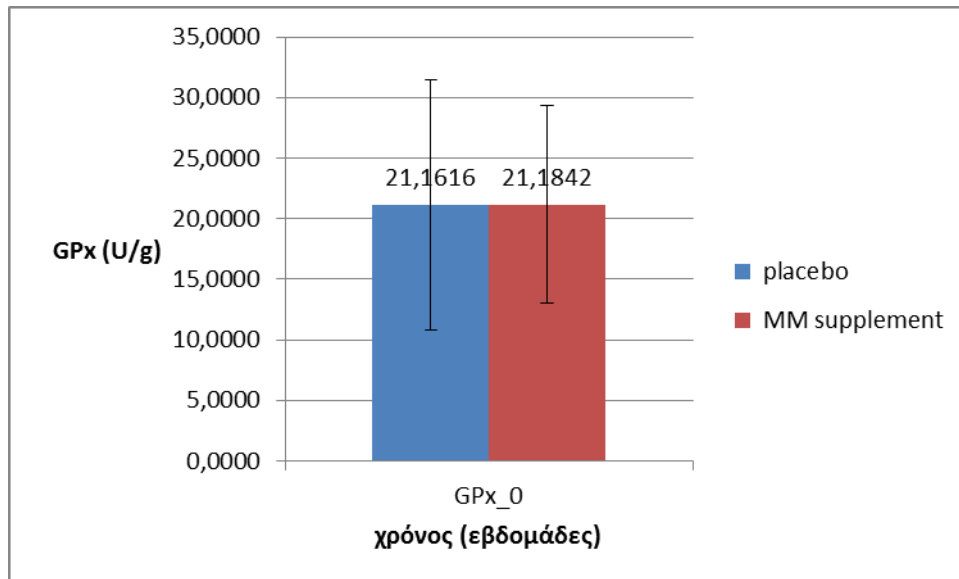
	P value
Time	0,835
Trial	0,334
time * trial	0,057

Από τον παραπάνω πίνακα φάνηκε ότι δεν υπάρχει στατιστική σημαντική διαφορά στη δραστηριότητα της GPx στα ερυθροκύτταρα ως προς το χρόνο της παρέμβασης, την ίδια την παρέμβαση ή την αλληλεπίδρασή τους. Ωστόσο το p value (0,057) της αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων φαίνεται να είναι κοντά στο κατώφλι. Το γεγονός αυτό φαίνεται να συνεπάγεται από το διαφορετικό μοτίβο της δραστηριότητας του ενζύμου που παρουσιάζεται στην κάθε παρέμβαση. Πιο συγκεκριμένα, στην ομάδα του placebo φαίνεται να αυξάνεται η δραστηριότητα του ενζύμου, ενώ στην ομάδα του MM συμπληρώματος φαίνεται να μειώνεται.

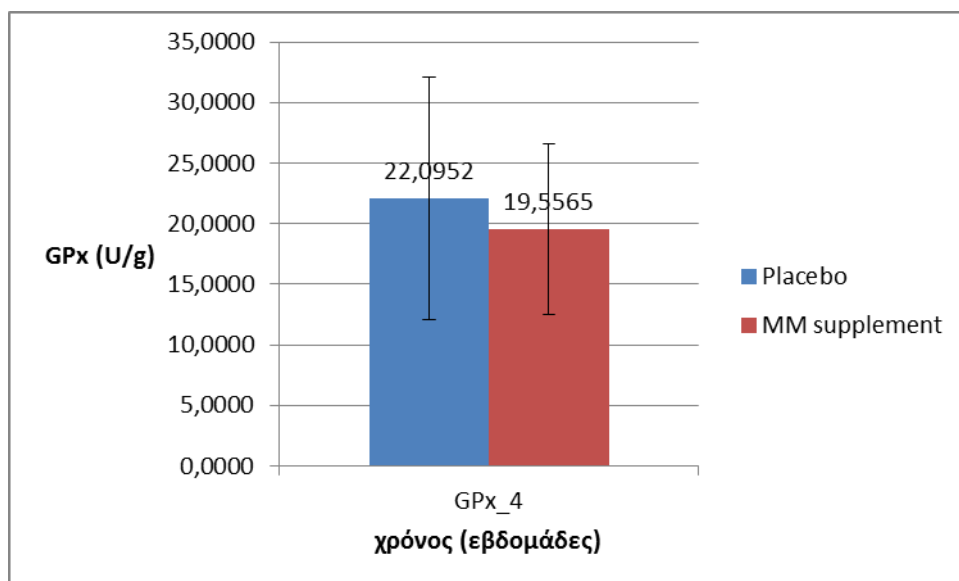


Εικόνα 27 : σύγκριση της δραστηριότητας της Gpx ανάμεσα στις δύο ομάδες παρέμβασης κατά την διάρκεια 0,4 και 8 εβδομάδων.

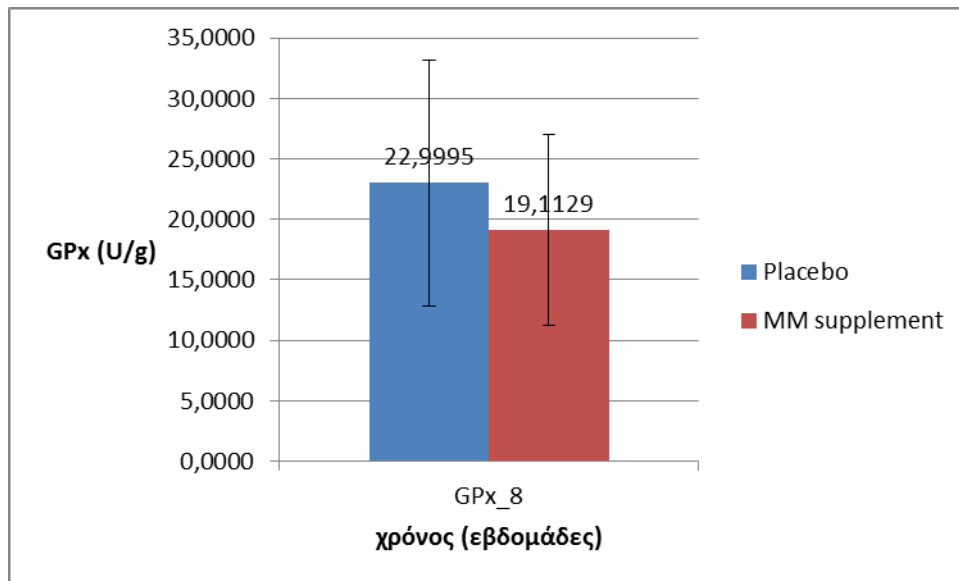
6.1.8 Σύγκριση της δραστηρότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης των ερυθροκυττάρων κατά την διάρκεια της παρέμβασης



Γράφημα 2: Δραστηρότητα της Gpx κατά τη χρονική στιγμή 0 και στις δύο ομάδες



Γράφημα 3: Δραστηρότητα της Gpx κατά τη χρονική στιγμή 4 εβδομάδες και στις δύο ομάδες



Γράφημα 4: Δραστικότητα της Gpx κατά τη χρονική στιγμή 8 εβδομάδες και στις δύο ομάδες

Στα παραπάνω διαγράμματα απεικονίζεται η μεταβολή της δραστικότητας της Gpx σε κάθε χρονική στιγμή για κάθε ομάδα παρέμβασης. Στην ομάδα του MM συμπληρώματος φαίνεται η δραστικότητα του ενζύμου να μειώνεται με αργό ρυθμό, ενώ στην ομάδα του Placebo να αυξάνεται με αργό ρυθμό με το πέρασμα των εβδομάδων. Ωστόσο, σε συνδυασμό με τα παραπάνω, φαίνεται αυτά τα ευρήματα να μην είναι στατιστικά σημαντικά. (ptime, ptrial, ptrial*time).

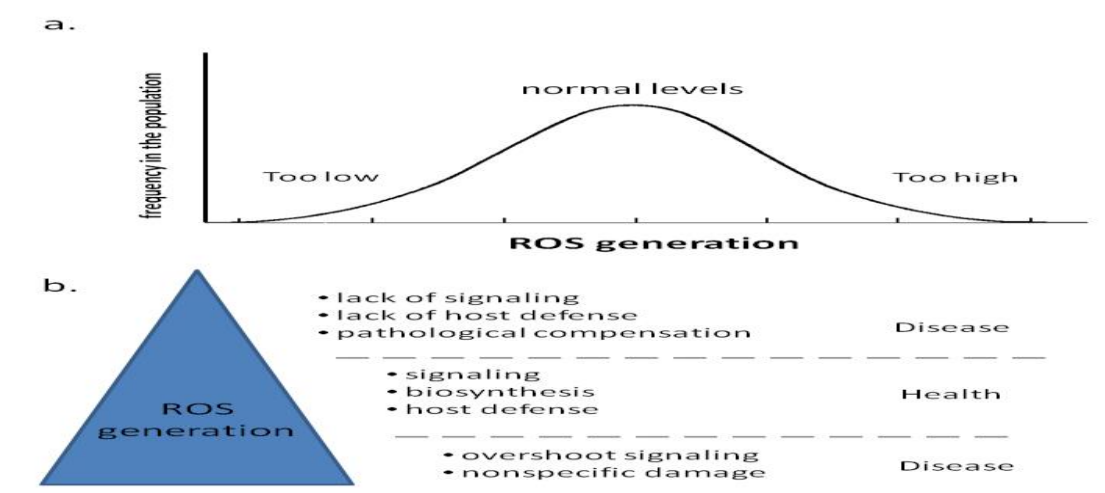
Η σύγκριση της δραστικότητας του ενζύμου για κάθε εθελοντή κατά τις 0,4 και 8 εβδομάδες τόσο στην ομάδα του placebo όσο και του MM συμπληρώματος, αξιολογήθηκε με βάση το τεστ ANOVA paired t-tests με στατιστική σημαντικότητα $p \text{ value} < 0,05$. Κατά αυτόν τον τρόπο συγκρίθηκε η δραστικότητα της GPx και στις δύο ομάδες σε 3 συνδυασμούς χρονικών στιγμών: 0-4 εβδομάδες, 4-8 εβδομάδες και 0-8 εβδομάδες. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται πως κανένας από τους παραπάνω συνδυασμούς δεν παρουσιάζει στατιστική σημαντικότητα ($p \text{ value} < 0,05$) τόσο στην ομάδα του Placebo όσο και στην ομάδα του MM συμπληρώματος.

Πίνακας 8: Σύγκριση της δραστικότητας της Gpx σε όλες τις χρονικές στιγμές σε κάθε ομάδα παρέμβασης

	P value *	
	Placebo	MM συμπλήρωμα
GPx_RBC_0- GPx_RBC_1	0,1	0,2
GPx_RBC_1- GPx_RBC_2	0,2	0,5
GPx_RBC_0- GPx_RBC_2	0,1	0,1
*p value <0,05		

Κεφάλαιο 7^ο : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γνωστό ότι οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια με πολύπλευρο ρόλο και συμβάλλουν τόσο στη διατήρηση της φυσιολογικής λειτουργίας και στην προώθηση της υγείας του οργανισμού όσο και στην γένεση και διαίωνιση παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο.^[161] Πράγματι, οι χαμηλές προς ενδιάμεσες συγκεντρώσεις των ROS εμπλέκονται σε πολλές ζωτικές φυσιολογικές διεργασίες. Στο κυτταρικό επίπεδο, τα ROS ρυθμίζουν την ανάπτυξη, την απόπτωση, και τη σηματοδότηση. Σε επίπεδο συστημάτων συμβάλλουν σε πολύπλοκες λειτουργίες όπως η ρύθμιση της πίεσης του αίματος, η γνωστική λειτουργία και η λειτουργία του ανοσοποιητικού. Τα ROS επιτρέπουν επίσης την απόκριση σε διέγερση του αυξητικού παράγοντα και την παραγωγή της φλεγμονώδους απόκρισης εξουδετερώνοντας άμεσα τα διάφορα παθογόνα. Αντίθετα, η παρατεταμένη έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις ROS μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη των βιομορίων του οργανισμού και να συμβάλλει σε ένα ευρύ φάσμα παθολογικών καταστάσεων που είναι κύριες αιτίες θανάτου. Η βιολογική εξειδίκευση των ROS καθορίζεται από την ποσότητα, τη διάρκεια, και τον τόπο παραγωγής τους.^[161]



Εικόνα 27: Ο βαθμός του οξειδωτικού στρες και οι επιδράσεις του (πηγή: Antioxidants (Basel). 2015 Dec; 4(4): 719–736.)

Ένα από τα κύτταρα στόχους των ROS είναι και τα ερυθροκύτταρα, τα οποία λόγω της βασικής τους λειτουργίας που αφορά τη μεταφορά του O_2 και του παραγόμενου CO_2 , είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις οξειδωτικές βλάβες που οφείλονται στην υψηλή κυτταρική συγκέντρωση του οξυγόνου και αιμοσφαιρίνης, προαγωγοί της οξειδωτικής διαδικασίας. Τα ερυθροκύτταρα είναι ένα από τα πρώτα κύτταρα που πρόκειται να επηρεαστούν από τις επαγομένες από το οξειδωτικό στρες δυσμενείς συνθήκες. Γι' αυτό, διαθέτουν ένα πλούσιο και ισχυρά οργανωμένο αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα, το οποίο ρυθμίζει σημαντικά τα επίπεδα στρες στον οργανισμό,

καθώς το πλάσμα που είναι σχετικά φτωχό σε αντιοξειδωτική (κυρίως ενζυμική) δραστηριότητα δεν μπορεί να αντιμετωπίσει αποτελεσματικά την οξειδωτική επίθεση των ROS. Ως μεταφοράς οξυγόνου, τα ερυθρά αιμοσφαίρια πρέπει να συνεχίσουν να εκτελούν αυτό το βασικό καθήκον ενώ εκτίθενται σε ένα ευρύ φάσμα αγγειακών κυκλωμάτων και σε μια ποικιλία ξеноβιοτικών ουσιών σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Στο εργαστήριο, ερυθρά αιμοσφαίρια αποτελούν ένα αξιόπιστο μοντέλο για τη μελέτη του οξειδωτικού στρες, καθώς πολλοί παράμετροί τους επηρεάζονται αρνητικά από το αυξημένο οξειδωτικό στρες με επιβλαβείς σημαντικές συνέπειες στα ίδια τα κύτταρα. Στην ομάδα των παραμέτρων ανήκουν η μεμβράνη, τα λιπίδια, οι πρωτεΐνες, τα ιόντα και έμνζυμα.^[114]

Ωστόσο, η φυσική ανθρώπινη αντιοξειδωτική άμυνα δεν είναι πάντα επαρκής για να διατηρηθεί η σωστή ισορροπία ROS. Σε επιδημιολογικές μελέτες, η υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών που είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά, φαίνεται να συμβάλλει στην προώθηση της υγείας. Μάλιστα, ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας προτείνει μια ημερήσια πρόσληψη τουλάχιστον 400 g/ημέρα φρούτων και λαχανικών.^[162] Άλλες πηγές αντιοξειδωτικών ουσιών είναι τα ψάρια και το ελαιόλαδο. Η αντικατάσταση των θερμιδικά πυκνών, θρεπτικά φτωχών, πλούσιων σε κορεσμένα λιπαρά οξέα και επεξεργασμένων τροφίμων από τα θερμιδικά φτωχά και θρεπτικά πυκνά φρούτα, λαχανικά και όσπρια θα οδηγήσει σε υψηλή πρόσληψη φυτοθρεπτικών συστατικών συμπεριλαμβανομένων των βιταμινών, τα φλαβονοειδή και άλλων αντιοξειδωτικών και στη διατήρηση ενός υγιούς σωματικού βάρους^[162,163] Τέτοια πρότυπα διατροφής είναι η Μεσογειακή διατροφή και η κατανάλωση κόκκινου κρασιού καθώς και η παραδοσιακή Οκινάουα διατροφή στην Ασία.^[167] Ως εκ τούτου στρατηγικές χορήγησης αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων έχουν δοκιμαστεί σε ανθρώπους, με την υπόθεση ότι θα οδηγήσουν στην εκκαθάριση των ROS και συνεπώς στην πρόσληψη ή και στη θεραπεία ασθενειών επαγόμενων από τα ROS.^[160,161] Τα αποτελέσματα τέτοιων μελετών είναι διφορούμενα και περιορισμένα ως προς τις ευεργετικές τους επιδράσεις στην υγεία.^[160,161] Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται στα χαρακτηριστικά των ασθενών της εκάστοτε μελέτης, να σχετίζονται με τη δοσολογία και την διάρκεια της χορήγησης. Επιπλέον, θα πρέπει να εξεταστεί η συνεργιστική δράση των αντιοξειδωτικών ουσιών ή η αλληλεπίδραση με άλλα εξωγενή τρόφιμα με στόχο τη διατήρηση της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας. Ορισμένες αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν επίσης να εκφράσουν προ-οξειδωτικό δυναμικό, ανάλογα με τα επίπεδα τους.^[160]

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση ενός συμπληρώματος διατροφής που περιέχει μίγμα αντιοξειδωτικών ουσιών στη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης (GPx1) στα ερυθροκύτταρα υγιών εθελοντών. Σύμφωνα με την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, υπάρχουν μελέτες που έχουν μετρήσει και αξιολογήσει οξειδωτικούς δείκτες στα ερυθροκύτταρα με τη χορήγηση συμπληρώματος αντιοξειδωτικών είτε σε υγιείς είτε σε ασθενείς.

Στην παρούσα μελέτη χορηγήθηκε ένα μίγμα αντιοξειδωτικών βιταμινών, ιχνοστοιχείων και φυσικών αντιοξειδωτικών συστατικών σε φαινομενικά υγιείς

εθελοντές για διάστημα 8 εβδομάδων. Σκοπός της ήταν να εξεταστεί η πιθανή επίδραση του συμπληρώματος αυτού στη δραστικότητα δεικτών οξειδωτικού στρες. Έτσι πραγματοποιήθηκε παραλαβή δείγματος ούρων, πλάσματος, ορού, λευκοκυττάρων και ερυθροκυττάρων. Συγκεκριμένα, μετρήθηκαν: ουρικό οξύ ορού, LDL-χοληστερόλη ορού, ισοπροστανίνα-F₂ ούρων, 8OHdG ούρων, GPx 3 ορού, SOD ορού, Log Time ορού και GPx1 ερυθροκυττάρων. Το συμπλήρωμα φάνηκε να παρουσιάζει αντιοξειδωτικές ικανότητες μειώνοντας στατιστικά σημαντικά τη δραστικότητα της SOD ορού και την ποσότητα της 8OHdG ούρων στις 4 εβδομάδες, καθώς και της ποσότητας των ισοπροστανίων-F₂ ούρων στην ομάδα του συμπληρώματος. Ωστόσο, στην περίπτωση των ισοπροστανίων-F₂ φάνηκε και μία άυξησή τους στην ομάδα του εικονικού φαρμάκου. Η παρούσα πτυχιακή αφορά την παρέμβαση στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα.

Οι δύο ομάδες παρέμβασης δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τα ανθρωπομετρικά και τα βιοχημικά χαρακτηριστικά στην αρχή της μελέτης. Ο πληθυσμός της χαρακτηρίζεται ως υπέρβαρος λόγω της αυξημένης τιμής του δείκτη μάζας σώματος. 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 και στο σωματικό βάρος. Ωστόσο, τα επίπεδα της χοληστερόλης και της LDL-χοληστερόλης συσχετίστηκαν αντιστρόφως ανάλογα με τη δραστικότητα της GPx. Η συγκεκριμένη συσχέτιση επιβεβαιώνεται από μελέτες τόσο σε κουνέλια^[168] όσο και σε παιδιά με υπερχοληστρεολαιμία, όπου η δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων των ερυθροκυττάρων είναι μειωμένη, συμπεριλαμβανομένου και της GPx. Κύριο εύρημα της μελέτης στα παιδιά^[169] είναι η αύξηση της δραστηριότητας της GPx όταν η περιεκτικότητα της διατροφής σε λιπαρά (ιδιαίτερα κορεσμένα) μειώνεται. Η GPx ως εκκαθαριστής των ROS (υπεροξείδιο του υδρογόνου) συμβάλλει στην ενζυμική απομάκρυνση των ενδιάμεσων προϊόντων υπεροξειδωσής των λιπιδίων της μεμβράνης, με αποτέλεσμα την επιβραδύνση της διαδικασίας της αθηρογένεσης.

Όσον αφορά τη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης επίσης δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση πριν την έναρξη της παρέμβασης και στις δύο ομάδες. Μετρήθηκε σε δείγμα ερυθροκυττάρων και εκφράστηκε σε U/g Hb μετά τον προσδιορισμό της περιέχουσας αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων με τη μέθοδο Drabkin. Ο προσδιορισμός της δραστικότητας βασίστηκε στην ικανότητα οξείδωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και την κατανάλωση/οξείδωση του NADPH από την αναγωγή της γλουταθειόνης με επαναφορά της γλουταθειόνης στην αρχική ανηγμένη της μορφή. Η κατανάλωση του NADPH ποσοτικοποιήθηκε μέσω μιας συνεχούς καταγραφής της μείωσης της απορρόφησης στα 340 nm για 6 λεπτά. Πρόκειται για μια μέθοδο προσδιορισμού της δραστικότητας του συγκεκριμένου ενζύμου που χρησιμοποιείται από την πλειοψηφία των μελετών στη βιβλιογραφία. Ωστόσο σε μελέτη χορήγησης συμπληρώματος σιδήρου σε ασθενείς σε αιμοδιάλυση^[164], η τάξη των τιμών της δραστικότητας του

ενζύμου δεν είναι συγκρίσιμη. Πιθανή εξήγηση είναι ο διαφορετικός πληθυσμός της μελέτης. (υγιής V.s ασθενής πληθυσμός)

Η δραστηριότητα του ενζύμου φάνηκε να μην μεταβάλλεται στατιστικά σημαντικά ως προς τον χρόνο και ως προς την παρέμβαση και στις δύο ομάδες. Ωστόσο, η αλληλεπίδραση της παρέμβασης και του χρόνου φάνηκε να επηρεάζει οριακά στατικά τη δραστηριότητα, καθώς παρατηρήθηκε αύξησή της στην ομάδα του Placebo και μικρή μείωσή της στην ομάδα του συμπληρώματος. (p value= 0,057, οριακά μη στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα). Σε επίπεδο ομάδας επίσης δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση της δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της παρέμβασης. (πραγματοποιήθηκε συνδυασμός όλων των χρονικών στιγμών). Συνεπώς, το κύριο εύρημα της παρούσας μελέτης είναι ότι η χορήγηση του συμπληρώματος δεν φαίνεται να επιδρά στα ερυθροκυττάρια υγιών εθελοντών στη δραστηριότητα της GPx, η οποία και αποτελεί κύρια άμυνα ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Παρόμοιο εύρημα είχε και μελετη χορήγησης επίσης συμπληρώματος μίγματος αντιοξειδωτικών (κυρίως ιχθυελαίων) σε υγιείς γυναίκες.^{165]} Είναι γεγονός πως η αποτελεσματικότητα της συνεργιστικής δράσης πολλών αντιοξειδωτικών ουσιών έχει αποδειχθεί σε σύγκριση με τη δράση μεμονομένων σε πληθώρα μελετών. Ωστόσο, στην παρούσα περίπτωση, μία πιθανή εξήγηση του αποτελέσματος μπορεί να συνδέεται με το MedDiet score που αντανάκλα το βαθμό προσκόλλησης στη Μεσογειακή δίαιτα που είναι ιδιαίτερα πλούσια σε αντιοξειδωτικά και συνεπώς σκιαγραφεί την ποιότητα διατροφής των εθελοντών. Στην παρούσα μελέτη οι εθελοντές παρουσιάζουν μέτριο βαθμό προσκόλλησης (MedDiet score 28) σύμφωνα από την επεξεργασία των ερωτηματολογίων συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (και στις τρεις χρονικές στιγμές της παρέμβασης). Η ευεργετική αντιοξειδωτική επίδραση της Μεσογειακής διατροφής έχει εδραιωθεί μέσα από μελέτες (φαίνεται ακόμα και σε μελέτη με ασθενείς με επεισόδια εμφράγματος μυοκαρδίου, στους οποίους χορηγήθηκε συμπλήρωμα ρεσβερατρόλης^[158]) Συνεπώς, οι εθελοντές διαθέτουν ήδη ένα σχετικά καλό υπόβαθρο αντιοξειδωτικής άμυνας με αποτέλεσμα η χορήγηση επιπλέον αντιοξειδωτικών μέσω συμπληρώματος να μην συμβάλλει σε περαιτέρω βελτίωση. Μια άλλη πιθανή θεωρία ίσως υποστηρίζει ότι τα ερυθροκύτταρα ως πρώτης γραμμής κύτταρα αντιστάθμισης του οξειδωτικού στρες, πιθανώς να διαθέτουν ένα ισχυρά οργανωμένο αντιοξειδωτικό αμυντικό μηχανισμό. Συμπερασματικά, η χορήγηση συμπληρωμάτων σε επίπεδο υγιών ατόμων να μην παρουσιάζει εντυπωσιακά αποτελέσματα.

Επιπρόσθετα, μελέτες^[133,167] σε υγιείς ενήλικες όπου εμπλέκεται και ο ρόλος της άσκησης που είναι προαγωγός του οξειδωτικού στρες, η δραστηριότητα της GPx των ερυθροκυττάρων παραμένει παλι αμετάβλητη, αφού ο οργανισμός φυσικά προσαρμόζεται στην μεταβολή της ισορροπίας των προ-οξειδωτικών και αντι-οξειδωτικών λόγω άσκησης. Συγκεκριμένα, ενισχύει ακόμη περισσότερο την αντιοξειδωτική άμυνά του και κυρίως των αντιοξειδωτικών ενζύμων ως απάντηση στην αύξηση των προϊόντων υπεροξειδωσης των λιπιδίων που έχει παρατηρηθεί κατά την άσκηση. Με αποτέλεσμα, η χορήγηση συμπληρώματος αντιοξειδωτικών να μην

μπορεί να ασκήσει κάποια ορατή και ουσιώδη ευεργετική δράση. Αντίθετα αποτελέσματα ωστόσο παρουσίασε μελέτη χορήγησης συμπληρώματος ρεσβερατρόλης σε υγιείς άντρες που υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες φυσικής δραστηριότητας, όπου η δραστηριότητα του ενζύμου στην ομάδα χορήγησης τόσο πριν όσο μετά την άσκηση φάνηκε μειωμένη.^[166]

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ευεργετική επίδραση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων στα ερυθροκύτταρα σε παθολογικούς πληθυσμούς. Παρεμβάσεις χορήγησης καρετονοειδών^[157] και σιδήρου^[164] σε ασθενή πληθυσμό δείχνουν να αυξάνουν την δραστηριότητα του συγκεκριμένου ενζύμου βελτιώνοντας την αντιοξειδωτική κατάσταση των εθελοντών της ομάδας παρέμβασης του συμπληρώματος.

Τέλος, μελέτη που εξετάζει την επίδραση συμπληρώματος αλόης^[167], η οποία και είναι το κύριο συστατικό (36%) του συμπληρώματος της παρούσας μελέτης, φαίνεται να παρουσιάζει παρόμοια αποτελέσματα ως προς την δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα ερυθροκύτταρα υγιών εθελοντών.

Συμπερασματικά, εάν και στην παρούσα μελέτη δεν φάνηκε κάποια επίδραση του αντιοξειδωτικού συμπληρώματος στη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, περαιτέρω παρεμβάσεις θα ήταν καλό να γίνουν λαμβάνοντας υπόψη και άλλους δείκτες οξειδωτικού στρες στα ερυθροκύτταρα καθώς. Επιπρόσθετα, η χορήγηση αντιοξειδωτικού συμπληρώματος ίσως είχε ουσιαστικό όφελος για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η εξαγωγή μιας τέτοιας μελέτης σε ασθενή πληθυσμό ή σε πληθυσμό χαμηλού βαθμού προσκόλλησης στη μεσογειακή διατροφή, εφόσον η βιβλιογραφία έχει δείξει ευεργετικά οφέλη αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων στην αντιοξειδωτική κατάσταση των ασθενών με καλύτερη έκβαση νόσου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sonia Gandhi et al, Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, Volume 2012 (2012), Article ID 428010, 11 pages
2. Kalyanaraman B, Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms, Redox Biol. 2013 Feb 8;1:244-57. doi: 10.1016/j.redox.2013.01.014.
3. Halliwell Barry and Gutteridge John M.C., Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life, Plant Physiol. 2006 Jun; 141(2): 312–322. (Free radicals in biology and chemistry, Oxford Science Publications, 1998.)
4. Cadenas, K.J.A. Davies, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, Free Rad. Biol. Med. 29, 222-230, 2000.
5. Muller, F. L., Liu, Y., & Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. Journal of Biological Chemistry, 279, 49064-49073
6. Qun Chen et al, Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria, The Journal of Biological Chemistry, Volume 278, No.38, Issue of September 19, pp 36027-36031, 2003, USA
7. Bae YS et al, Regulation of Reactive Oxygen Species Generation in Cell Signaling- Mol Cells. 2011 Dec 31; 32(6): 491–509.
8. Zangar RC et al, Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450 : Toxicology and Applied Pharmacology 199 (2004) 316 – 33
9. Jarasch, E.D., et al., Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium. Cell, 1981. 25(1): p. 67-82.
10. Michael Schrader et al, Peroxisomes and oxidative stress, Volume 1763, Issue 12, December 2006, Pages 1755–1766
11. Κωνσταντίνος Α. Δημόπουλος, Σμαράγδη Αντωνοπούλου, Βασική Βιοχημεία 2η έκδοση, Αθήνα 2009,
12. Klaudia Jomova et al, Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, Toxicology, Volume 283, Issues 2–3, 10 May 2011, Pages 65–87
13. Halliwell B, Gutteridge JM, Oxygen Radicals and Antioxidants-Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease,) Methods in Enzymology, Volume 186, 1990, Pages 1–85, Oxygen Radicals in Biological Systems Part B

14. Stohs SJ, Bagchi D., Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radic Biol Med.* 1995 Feb;18(2):321-36.
15. G. M. Cohen and M. d'Arcy Doherty, Free radical mediated cell toxicity by redox cycling chemicals, *Br J Cancer Suppl.* 1987 Jun; 8: 46–52.
16. M. Valko , H. Morris and M.T.D. Cronin, Metals, Toxicity and Oxidative Stress, *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12, 1161-1208 1161
17. B. Halliwell, Biochemistry of oxidative stress, *HalliwellBiochemical Society Transactions* Nov 01, 2007, 35 (5):1147-1150
18. Tohru Fukai and Masuko Ushio-Fukai, Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases, *Antioxidants & Redox Signaling.* August 2011, 15(6): 1583-1606.
19. Valko M1, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem Biol Interact.* 2006 Mar 10;160(1):1-40. Epub 2006 Jan 23
20. 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.
21. 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
22. Anne-Frances Miller, Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills, , doi:10.1016/j.cbpa.2004.02.011
23. Roland Stocker, John F. Keaney Jr, Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis, *Physiological Reviews* Published 1 October 2004 Vol. 84 no. 4, 1381-1478
24. I S Young, J V Woodside, Antioxidants in health and disease, *J Clin Pathol* 2001;54:176-186
25. , Edith Lubos, Joseph Loscalzo, and Diane E Handy, Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities, *Antioxidants & Redox Signaling.* August 2011, 15(7): 1957-1997
26. Arthur, J.R., The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci*, 2000. 57(13-14): p. 1825-35.
27. 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.

28. Yamamoto, Y., et al., Plasma glutathione peroxidase reduces phosphatidylcholine hydroperoxide. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. 193(1): p. 133-8.
29. 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.
30. , José M. Matés and Francisca Sánchez-Jiménez, antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes, *Frontiers in Bioscience* 4, d339-345, March 15, 1999
31. Halliwell B, Antioxidants in human health and disease, *Annu Rev Nutr*. 1996;16:33-50.
32. Lubert Stryer, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2η έκδοση, 1997
33. S. M. Deneke, B. L. Fanburg, Regulation of cellular glutathione, *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* Published 1 October 1989 Vol. 257 no. 4, L163-L173 DOI
34. Aquilano, K., S. Baldelli, and M.R. Ciriolo, Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol*, 2014. 5: p. 196.
35. Guoyao Wu, Yun-Zhong Fang, Sheng Yang, Joanne R. Lupton, Nancy D. Turner, Glutathione metabolism and its implications for health, *American Society for Nutritional Sciences*, 2004
36. 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.
37. 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.
38. Αθανάσιος Σμοκοδίτης, Φυσιολογία, Εκδόσεις αδελφών Κυριακίδη, 4η έκδοση, 2004.
39. Hardeland, Rüdiger; Pandi-Perumal, S.R.; Cardinali, Daniel P. (2006). "Melatonin". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (3): 313–316.
40. Hardeland R (July 2005). "Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance". *Endocrine* 27 (2): 119–30.
41. Yuri Y. Sautin and Richard J. Johnson, Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2008 June ; 27(6): 608–619.

42. Bruce N. Ames, Richard Cathcart et al, Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: A hypothesis, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, Vol. 78, No. 11, pp. 6858-6862, November 1981, *Biochemistry*
43. R Stocker, Y Yamamoto, AF McDonagh, AN Glazer, BN Ames, Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance, *Science* 27 Feb 1987: Vol. 235, Issue 4792, pp. 1043-1046
44. Libor Vitek, The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases, *Front. Pharmacol.*, 03 April 2012
45. Antony F. McDonagh, The biliverdin–bilirubin antioxidant cycle of cellular protection: Missing a wheel, *Free Radical Biology & Medicine* 49 (2010) 814–820
46. Thomas W. Sedlak, Solomon H. Snyder, Bilirubin Benefits: Cellular Protection by a Biliverdin Reductase Antioxidant Cycle, *Pediatrics* June 2004, VOLUME 113 / ISSUE 6
47. G.T. Chew and G.F. Watts, Coenzyme Q10 and diabetic endotheliopathy: oxidative stress and the ‘recoupling hypothesis, *Q J Med* 2004; 97:537–548 doi:10.1093/qjmed/hch089
48. Coenzyme Q10 Therapy, *Mol Syndromol*. 2014 Jul; 5(3-4): 187–197. Published online 2014 Mar 13. doi: 10.1159/000360101
49. R Stocker, 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 Mar 1; 88(5): 1646–1650.
50. Mircea Oroian a, Isabel Escriche, Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis, 20 April 2015
51. Fiona E. Harrison 1, Gene L. Bowman 2 and Maria Cristina Polidor, Ascorbic Acid and the Brain: Rationale for the Use against Cognitive Decline, *Nutrients* 2014, 6, 1752-1781
52. Sareen S. Gropper, Jack L. Smith, James L. Groff, Λάμπρος Συντώσης, Διατροφή και Μεταβολισμός 2 , Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης
53. 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
54. 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.

55. Niki, E., et al., Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr*, 1995. 62(6 Suppl): p. 1322S-1326S.
56. 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.
57. Kumar, S. and A.K. Pandey, Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*, 2013. 2013: p. 162750.
58. Benzie IF, Evolution of antioxidant defence mechanisms, *Eur J Nutr* 39 : 53–61 (2000).
59. Pisoschi AM, Pop A, The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress, *Eur J Med Chem*. 2015 Jun 5;97:55-74., Epub 2015 Apr 22.
60. Dario Finazzi, Paolo Arosio, Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration, , *Arch Toxicol* (2014) 88:1787–1802 DOI 10.1007/s00204-014-1329-0
61. Orino, K., et al., Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J*, 2001. 357(Pt 1): p. 241-7.
62. 8) 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.
63. 9) 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.
64. Shukla N et al, ‘‘ Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor?’’ , *Atherosclerosis* 187 (2006) 238–250, Epub 2006 Jan10.
65. Vitor Costa, Alexandre Quintanilha and Pedro Moradas-Ferreira, Protein Oxidation, Repair Mechanisms and Proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*, *IUBMB Life*, 59(4 – 5): 293 – 298, April –May 2007
66. Barbara S. Berlett and Earl R. Stadtman, Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress, From the Laboratory of Biochemistry, NHLBI, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892
67. Isabella Dalle-Donnea, Ranieri Rossi, Daniela Giustarinib, Aldo Milzani, Roberto Colombo, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clinica Chimica Acta* 329 (2003) 23 – 38
68. 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.

69. Antonio Ayala, Mario F. Muñoz, and Sandro Argüelle, Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2014 (2014), Article ID 360438
70. Dalle-Donne I1, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A, Biomarkers of oxidative damage in human disease, *Clin Chem*. 2006 Apr;52(4):601-23. Epub 2006 Feb 16.
71. 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.
72. OxiSelect™ 8-iso-Prostaglandin F2 ELISA Kit.
73. Denis M. Callewaert, The impact of isoprostone metabolism on the assessment of oxidative stress, *oxford biomedical research* 2007
74. Halliwell B, Gutteridge I DGE J. Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, Oxford, UK, 2007
75. Lin, H.S., et al., A high-throughput and sensitive methodology for the quantification of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: measurement with gas chromatography-96 mass spectrometry after single solid-phase extraction. *Biochem J*, 2004. 380(Pt 2): p. 541-8.
76. 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
77. 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.
78. OxiSelect™ Catalase Activity Assay Kit, Colorimetric
79. McCord, J.M., Analysis of superoxide dismutase activity. *Curr Protoc Toxicol*, 2001. Chapter 7: p. Unit7 3.
80. Somogyia et al., Antioxidant measurements. *Physiol Meas* 2007, 28:R41–R55
81. 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.
82. D. Allan Butterfield, Aaron M. Swomley and Rukhsana Sultana, Amyloid β -Peptide (1–42)-Induced Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Importance in Disease Pathogenesis and Progression, *Antioxid Redox Signal*. 2013 Sep 10; 19(8): 823–835

83. Xinglong Wang,^a Wenzhang Wang,^a Li Li,^a George Perry,^b Hyoung-gon Lee,^a and Xiongwei Zhu, Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease, Published online 2013 Nov
84. Douglas Galasko and Thomas J Montine, Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease, *Biomark Med.* 2010 Feb; 4(1): 27–36
85. 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
86. George Perry et al, Oxidative Damage Is the Earliest Event in Alzheimer Disease, Vol. 60, No. 8 Copyright q 2001 by the American Association of Neuropathologists August, 2001
87. Teodora Vichova and Zuzana Motovska, Oxidative stress: Predictive marker for coronary artery disease, *Exp Clin Cardiol.* 2013 Spring; 18(2): e88–e91
88. Elena De Marchi, Federica Baldassari, Angela Bononi, Mariusz R. Wieckowski, and Paolo Pinton, Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases and Obesity: Role of p66Shc and Protein Kinase C, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2013 (2013), Article ID 564961, 11 pages
89. Hawa N. Sitia, b, Y. Kamisaha, J. Kamsiaha, The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease, *Vascular Pharmacology*, Volume 71, August 2015, Pages 40–56
90. Galle, J., et al., Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis*, 2006. 185(2): p. 219-26.
91. Junzhen Wu, Shijin Xia, Bill Kalionis, Wenbin Wan, and Tao Sun, The Role of Oxidative Stress and Inflammation in Cardiovascular Aging, *BioMed Research International* Volume 2014 (2014), Article ID 615312, 13 pages
92. Fredric J. Pashkow, Oxidative Stress and Inflammation in Heart Disease: Do Antioxidants Have a Role in Treatment and/or Prevention?, *International Journal of Inflammation*, Volume 2011 (2011), Article ID 514623, 9 page
93. Krishna Sree V, Oxidative Stress and Antioxidant- The Link to Cancer, *nutrition*-2-1050
94. Burdon, R.H., Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med*, 1995. 18(4): p. 775-94.
95. Carmelina Gemma, Jennifer Vila, Adam Bachstetter, and Paula C. Bickford, Chapter 15Oxidative Stress and the Aging Brain: From Theory to Prevention, *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*

96. Gustavo Barja, Chapter One – The Mitochondrial Free Radical Theory of Aging, Progress in Molecular Biology and Translational Science, Volume 127, 2014, Pages 1–27, The Mitochondrion in Aging and Disease
97. Elena Rugarlia, Aleksandra Trifunovic, Is mitochondrial free radical theory of aging getting old? , Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics Volume 1847, Issue 11, November 2015, Pages 1345–1346
98. Beckman, K.B. and B.N. Ames, The free radical theory of aging matures. Physiol Rev, 1998. 78(2): p. 547-81
99. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. Diabetes 1997; 46: 1733-1742
100. Miwa I, Ichimura N, Sugiura M, Hamada Y, Taniguchi S., Inhibition of glucose-induced insulin secretion by 4-hydroxy-2-nonenal and other lipid peroxidation products. Endocrinology 2000; 141: 2767-2772.
101. Ceriello. New Insights on Oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a “Causal” Antioxidant Therapy Diabetes Care 2003; 26: 1589-1596
102. Evans JL, Goldfine ID, Maddux B, Grodsky GM. Are Oxidative Stress-Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction? Diabetes 2003; 52: 1-8.
103. Birnbaum MJ, Turning down insulin signaling. J Clin Invest 2001; 108: 655-659
104. Ullah Asmata, Khan Abada, Khan Ismai, Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review, Saudi Pharmaceutical Journal, Available online 21 March 2015
105. R. Kohen, Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress -New approaches for their evaluation, Biomed & Pharmacother 1999 ; 53 : 181-92
106. R. T. Narendhirakannan and M. Angeline Christie Hannah, Oxidative Stress and Skin Cancer: An Overview, Indian J Clin Biochem. 2013 Apr; 28(2): 110–115. Published online 2012 Nov 23.
107. 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.
108. Peipei Xu, Ruju Wang, Xiaohui Wang, Jian Ouyang, Recent advancements in erythrocytes, platelets, and albumin as delivery systems, Published 17 May 2016 Volume 2016:9 Pages 2873—2884
109. Rafaela Mendonça, Angélica A. A. Silveira, Nicola Conran, Red cell DAMPs and inflammation, Inflamm. Res. DOI 10.1007/s00011-016-0955-9
110. Stefan Silbernagl, Agmemnon Despopoulos, Εγχειρίδιο Φυσιολογίας, 2010

111. Joy G. Mohanty, Enika Nagababu and Joseph M. Rifkind, Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging, *Front. Physiol.*, 28 February 2014 |<http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2014.00084>
112. Ameya Sinha¹, Trang T. T. Chu, Ming Dao^{2,3} & Rajesh Chandramohanadas, Single-cell evaluation of red blood cell bio-mechanical and nano-structural alterations upon chemically induced oxidative stress, 7 May 2015
113. S. Voskou, M. Aslan, P. Fanis, M. Phylactides, M. Kleanthous, Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease, *Redox Biology* 6 (2015) 226–239
114. Kanti Bhooshan Pandey, Syed Ibrahim Rizvi, Biomarkers of oxidative stress in red blood cells, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011 Jun; 155(2):131–136. DOI 10.5507/bp.2011.027
115. Kanti Bhooshan Pandey and Syed Ibrahim Rizvi, Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans, *Oxid Med Cell Longev.* 2010 Jan-Feb; 3(1): 2–12
116. Lee IM et al, Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial, *JAMA.* 2005 Jul 6;294(1):56-65.
117. Daisuke Takemoto, Yoko Yasutake, Namino Tomimori, Yoshiko Ono, Hiroshi Shibata & Junichi Hayashi, Sesame Lignans and Vitamin E Supplementation Improve Subjective Statuses and Anti-Oxidative Capacity in Healthy Humans With Feelings of Daily Fatigue, *Global Journal of Health Science*; Vol. 7, No. 6; 2015 ISSN 1916-9736 E-ISSN 1916-9744, Published by Canadian Center of Science and Education
118. Emma L. Wightman et al, The effects of chronic trans-resveratrol supplementation on aspects of cognitive function, mood, sleep, health and cerebral blood flow in healthy, young humans, *British Journal of Nutrition* (2015), 114, 1427–1437
119. Gliemann L et al, Resveratrol blunts the positive effects of exercise training on cardiovascular health in aged men, *J Physiol.* 2013 Oct 15;591(20):5047-59. doi: 10.1113/jphysiol.2013.258061. Epub 2013 Jul 22.
120. M. Takahashi¹, K. Suzuki¹, et al, Effects of Curcumin Supplementation on Exercise-Induced Oxidative Stress in Humans, *Int J Sports Med* 2014; 35(06): 469-475, DOI: 10.1055/s-0033-1357185
121. de Oliveira et al, Effects of Oral Vitamin C Supplementation on Anxiety in Students: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial, *Pak J Biol Sci.* 2015 Jan;18(1):11-8.

- 122.Emily R. Boviera, Billy R. Hammond, A randomized placebo-controlled study on the effects of lutein and zeaxanthin on visual processing speed in young healthy subjects, doi:10.1016/j.abb.2014.11.012, Volume 572, 15 April 2015, Pages 54–57
- 123.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.
- 124.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.
- 125.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.
- 126.Heinonen OP et al, Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial, *J Natl Cancer Inst*. 1998 Mar 18;90(6):440-6.
- 127.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.
- 128.Egert, S., et al., Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *J Nutr*, 2008. 138(9): p. 1615-21.
- 129.Urban Alehagen et al, Levels of sP-selectin and hs-CRP Decrease with Dietary Intervention with Selenium and Coenzyme Q10 Combined: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial, September 16 2015, doi.org/10.1371/journal.pone.0137680
- 130.Pusparini, Yenny, Hidayat A, Effect of soy isoflavone supplementation on endothelial dysfunction and oxidative stress in equol-producing postmenopausal women, *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015;15(1):71-9.
- 131.Keskes-Ammar L et al, Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men, *Arch Androl*. 2003 Mar-Apr;49(2):83-94.
- 132.Rendón-Ramírez AL et al, Effect of vitamin E and C supplementation on oxidative damage and total antioxidant capacity in lead-exposed workers, *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014 Jan;37(1):45-54. doi: 10.1016/j.etap.2013.10.016. Epub 2013 Nov 13.

133. Ewa Jówko et al, The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced oxidative stress parameters in male sprinters, *European Journal of Nutrition* , August 2015, Volume 54, Issue 5, pp 783–791
134. Weili Yan et al, Effect of oral ALA supplementation on oxidative stress and insulin sensitivity among overweight/obese adults: A double-blinded, randomized, controlled, cross-over intervention trial, *International Journal of Cardiology*, Volume 167, Issue 2, 31 July 2013, Pages 602–603, doi:10.1016/j.ijcard.2012.09.232
135. 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.
136. 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.
137. Geoffrey H Tofler et al, The Effect of Vitamin C Supplementation on Coagulability and Lipid Levels in Healthy Male Subjects, October 1, 2000 Volume 100, Issue 1, Pages 35–41
138. 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.
139. Emilie Passerieux et al ,Effects of vitamin C, vitamin E, zinc gluconate, and selenomethionine supplementation on muscle function and oxidative stress biomarkers in patients with facioscapulohumeral dystrophy: A double-blind randomized controlled clinical trial, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 81, April 2015, Pages 158–169
140. Muhasaparur Ganesan Rajanandha, Sourabh Koseya, Giridharan Prathiksha, Assessment of antioxidant supplementation on the neuropathic pain score and quality of life in diabetic neuropathy patients – A randomized controlled study, doi:10.1016/j.pharep.2013.08.003
141. Lee et al 2013, Effects of coenzyme Q10 supplementation (300 mg/day) on antioxidation and anti-inflammation in coronary artery disease patients during statins therapy: a randomized, placebo-controlled trial, *Nutrition Journal* 2013
142. Devaraj et al, Effect of high-dose alpha-tocopherol supplementation on biomarkers of oxidative stress and inflammation and carotid atherosclerosis in patients with coronary artery disease, *Am J Clin Nutr*. 2007 Nov;86(5):1392-8.
143. Mohammed S Ellulu, et al, Effect of vitamin C on inflammation and metabolic markers in hypertensive and/or diabetic obese adults: a randomized controlled

- trial, *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 3405–3412, Published online 2015 Jul 1. doi: 10.2147/DDDT.S83144
- 144.Habibollah et al, An investigation of the effects of curcumin on anxiety and depression in obese individuals: A randomized controlled trial, *Chinese Journal of Integrative Medicine*, May 2015, Volume 21, Issue 5, pp 332-338
 - 145.Mohammadi A et al, Effects of supplementation with curcuminoids on dyslipidemia in obese patients: a randomized crossover trial, *Phytother Res.* 2013 Mar;27(3):374-9. doi: 10.1002/ptr.4715. Epub 2012 May 21.
 - 146.Huang YM et al, Effect of supplemental lutein and zeaxanthin on serum, macular pigmentation, and visual performance in patients with early age-related macular degeneration, *Biomed Res Int.* 2015;2015:564738. doi: 10.1155/2015/564738. Epub 2015 Mar 1.
 - 147.Mustafa Nachvak S et al, α -Tocopherol supplementation reduces biomarkers of oxidative stress in children with Down syndrome: a randomized controlled trial, *Eur J Clin Nutr.* 2014 Oct;68(10):1119-23. doi: 10.1038/ejcn.2014.97. Epub 2014 Jun 18.
 - 148.Mohammadi et al, The effect of alpha-lipoic acid (ALA) supplementation on cardiovascular risk factors in men with chronic spinal cord injury: a clinical trial, *Spinal Cord* 53, 621-624 (August 2015) | doi:10.1038/sc.2015.35,
 - 149.Mirtaheri E et al, Effects of Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Inflammatory Biomarkers and Matrix Metalloproteinase-3 in Rheumatoid Arthritis Patients, *J Am Coll Nutr.* 2015;34(4):310-7. doi: 10.1080/07315724.2014.910740. Epub 2015 Mar 9.
 - 150.Jamilian M, Asemi Z, Chromium Supplementation and the Effects on Metabolic Status in Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial, *Ann Nutr Metab.* 2015;67(1):42-8
 - 151.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 Nov;7(6):461-7.
 - 152.Zahra Rafighi et al, Association of Dietary Vitamin C and E Intake and Antioxidant Enzymes in Type 2 Diabetes Mellitus Patients, *Global Journal of Health Science*; Vol. 5, No. 3; 2013
 - 153.Maric, D., et al., Multivitamin mineral supplementation in patients with chronic fatigue syndrome. *Med Sci Monit*, 2014. 20: p. 47-53.
 - 154.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.

155. Afkhami-Ardekani M et al, Effect of vitamin C on blood glucose, serum lipids & serum insulin in type 2 diabetes patients, *Indian J Med Res.* 2007 Nov;126(5):471-4.
156. Giacosa A et al, Selenium fortification of an Italian rice cultivar via foliar fertilization with sodium selenate and its effects on human serum selenium levels and on erythrocyte glutathione peroxidase activity, *Nutrients.* 2014 Mar 24;6(3):1251-61. doi: 10.3390/nu6031251.
157. Ghavipour M et al, Tomato juice consumption improves blood antioxidative biomarkers in overweight and obese females, *Clin Nutr.* 2015 Oct;34(5):805-9. doi: 10.1016/j.clnu.2014.10.012. Epub 2014 Nov 8.
158. Jean-Pierre Rifler et al, A moderate red wine intake improves blood lipid parameters and erythrocytes membrane fluidity in post myocardial infarct patients, 31 OCT 2011, doi: 10.1002/mnfr.201100336
159. Fatemeh Zal et al, Effect of vitamin E and C supplements on lipid peroxidation and GSH-dependent antioxidant enzyme status in the blood of women consuming oral contraceptives, *Contraception*, Volume 86, Issue 1, July 2012, Pages 62–66
160. Chatzianagnostou K et al, The Mediterranean Lifestyle as a Non-Pharmacological and Natural Antioxidant for Healthy Aging, *Antioxidants (Basel).* 2015 Nov 12;4(4):719-36. doi: 10.3390/antiox4040719.
161. Katharine Brieger et al, Reactive oxygen species: from health to disease, *Swiss Med Wkly.* 2012;142:w13659
162. B. Poljsak, Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress, Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Volume 2011, Article ID 194586, 15 pages, doi:10.1155/2011/194586
163. 165. Serena Dato et al, Exploring the Role of Genetic Variability and Lifestyle in Oxidative Stress Response for Healthy Aging and Longevity, *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14(8), 16443-16472; doi:10.3390/ijms140816443
164. Dogaru CB et al, Venous versus arterial iron administration in haemodialysis. Influence on erythrocytes antioxidant parameters, *Journal of Medicine and Life* Vol. 8, Special Issue, 2015, pp.69-73
165. Aneta Balcerczyk et al, Enhanced Antioxidant Capacity and Anti-Ageing Biomarkers after Diet Micronutrient Supplementation, *Molecules* 2014, 19, 14794-14808; doi:10.3390/molecules190914794
166. R.C.S. Macedo et al, Effects of chronic resveratrol supplementation in military firefighters undergo a physical fitness test – A placebo-controlled, double blind study, *Chemico-Biological Interactions*, Volume 227, 5 February 2015, Pages 89–95

167. Piotr Basta, Łucja Pilaczynska-Szczesniak, Donata Woitas-Slubowska, and Anna Skarpanska-Stejnborn, Influence of Aloe Arborescens Mill. Extract on Selected Parameters of Pro-oxidant-Antioxidant, Equilibrium and Cytokine Synthesis in Rowers, *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 2013, 23, 388 -398
168. Mohammadi M et al, Effects of High Cholesterol Diet and Parallel Chronic Exercise on Erythrocyte Primary Antioxidant Enzymes and Plasma total Antioxidant Capacity In Dutch Rabbits, *Int J Endocrinol Metab* 2006; 4: 30-40
169. Codoñer-Franch P et al, Influence of dietary lipids on the erythrocyte antioxidant status of hypercholesterolaemic children, *Eur J Pediatr*. 2009 Mar;168(3):321-7. doi: 10.1007/s00431-008-0762-6. Epub 2008 Jun 12.