



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ



ΘΕΜΑ: Επίδραση της κατανάλωσης συμπληρώματος διατροφής στην αντιοξειδωτική κατάσταση φαινομενικά υγιών εθελοντών.

ΑΥΞΕΝΤΙΟΥ ΓΕΩΡΓΙΑ

ΑΜ.: 21040

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΕΛΙΣΑΒΕΤ ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ, ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΣΜΑΡΑΓΔΗ ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ

ΤΖΩΡΤΖΗΣ ΝΟΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2014

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

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

ΑΘΗΝΑ, 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5,6
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	7-9
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο - ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ, ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ.....	11
1.1 Τι είναι ελεύθερες ρίζες.....	11
1.1.1Ενεργές μορφές οξυγόνου.....	12
1.1.2Ενεργές μορφές αζώτου.....	13-14
1.2 Πηγές ενεργών μορφών στο ανθρώπινο σώμα.....	14-17
1.3 Αντιδράσεις δραστικών μορφών με βιομόρια.....	18
1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί οργανισμού	19
1.4.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα.....	19-20
1.4.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.....	20-21
Ενδογενή αντιοξειδωτικά.....	21-23
Εξωγενή διαιτητικά αντιοξειδωτικά.....	23
1.4.3 Πρωτεΐνες δέσμευσης μετάλλων.....	23
1.5 Τι είναι οξειδωτικό στρες και πως δημιουργείται.....	24
1.6 Δείκτες οξειδωτικού στρες.....	25
1.6.1Μέτρηση προϊόντων οξείδωσης μακρομορίων.....	25
Δείκτες υπεροξείδωσης λιπιδίων.....	25-26
Δείκτες οξείδωσης DNA.....	26
Δείκτες οξείδωσης πρωτεϊνών.....	27
1.6.2 Μέτρηση δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων.....	27
1.6.3 Μέτρηση ενδογενών αντιοξειδωτικών.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο - Κλινική σημασία οξειδωτικού στρες.....	29
2.1 Οξειδωτικό στρες και καρκίνος.....	29
2.2 Οξειδωτικό στρες και σακχαρώδης διαβήτης.....	29
2.3 Οξειδωτικό στρες και νευροεκφυλιστικές νόσοι.....	29
2.4 Οξειδωτικό στρες και υπέρταση.....	30

2.5	Οξειδωτικό στρες και αθηροσκλήρωση.....	30-32
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο – Διατροφή, συμπληρώματα και οξειδωτικό στρες.....	33
3.1	Εξωγενή αντιοξειδωτικά- Αντιοξειδωτικά της διατροφής.....	33-35
3.2	Συμπληρώματα διατροφής με αντιοξειδωτικές ενώσεις.....	35
	Κλινικές μελέτες με συμπληρώματα αντιοξειδωτικών.....	35-37
	Περιγραφή αντιοξειδωτικών συστατικών του συμπληρώματος.....	37-39
B.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	40
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο -ΣΚΟΠΟΣ	41
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο - ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	42-50
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ^ο - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	51-61
Γ.	ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	62-65
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66-69

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και σε χαμηλές έως μέτριες συγκεντρώσεις είναι απαραίτητες για πολλές σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Ωστόσο εάν η υπερβολική παραγωγή αυτών των δραστικών μορφών δε μπορεί να εξουδετερωθεί από την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, οι πλεονάζουσες ελεύθερες ρίζες μπορούν να βλάψουν διάφορα βιομόρια όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα. Η αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά ένζυμα και αντιοξειδωτικές ουσίες που παράγονται είτε από τον οργανισμό είτε προέρχονται από τη διατροφή. Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών του οργανισμού και οφείλεται είτε σε αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών είτε σε ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Το οξειδωτικό στρες ενοχοποιείται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων και στη διεργασία της γήρανσης.

Για τη μελέτη επιλέχθηκαν φαινομενικά υγιείς εθελοντές οι οποίοι χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες παρέμβασης (συμπλήρωμα και εικονικό σκεύασμα) ταιριασμένες ως προς το ΔΜΣ, το φύλο, την ηλικία και τις καπνιστικές συνήθειες. Στην ομάδα με το συμπλήρωμα το ηλικιακό εύρος ήταν $32,5 \pm 5,4$ και στην ομάδα με το εικονικό σκεύασμα $34,5 \pm 6,4$. Οι εθελοντές έπαιρναν το συμπλήρωμα ή το εικονικό σκεύασμα για 8 εβδομάδες. Το συμπλήρωμα περιείχε μίγμα αντιοξειδωτικών βιταμινών όπως βιταμίνη Ε, C, β-καροτένιο, ιχνοστοιχεία όπως σελήνιο και φυσικά αντιοξειδωτικά όπως ρεσβερατρόλη, πράσινο τσάι κα. Στους εθελοντές πραγματοποιήθηκαν ανθρωπομετρήσεις και αιμοληψίες συνολικά 3 φορές κατά τη διάρκεια της παρέμβασης. Επιπλέον συμπληρώθηκαν ερωτηματολόγια φυσικής δραστηριότητας και διατροφικών συνηθειών.

Βασικός σκοπός της μελέτης ήταν να αξιολογηθεί η επίδραση του συμπληρώματος στους δείκτες οξειδωτικού στρες. Για το σκοπό αυτό οι δείκτες που μετρήθηκαν ήταν η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ως βασικό αντιοξειδωτικό ένζυμο, το ουρικό οξύ ως ενδογενές αντιοξειδωτικό και η αντίσταση του ορού στην *ex vivo* οξείδωση ως δείκτης του αντιοξειδωτικού περιεχομένου του ορού.

Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα δεν έδειξαν σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δυο ομάδων στη δραστικότητα του ενζύμου GPx, στα επίπεδα του ουρικού οξέος και στην αντίσταση του ορού των εθελοντών στην *ex vivo* οξείδωση. Η μελέτη ωστόσο συνεχίζεται και όταν ολοκληρωθούν οι μετρήσεις πιθανό να βρεθούν πιο σαφή αποτελέσματα. Επιπλέον θα συμπεριληφθούν και άλλοι πιο αξιόπιστοι δείκτες οξειδωτικού στρες όπως τα ισοπροσάνια για να έχουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την επίδραση του συμπληρώματος.

Summary

Reactive oxygen species and reactive nitrogen species are products of the normal cell metabolism and are also useful in low to moderate concentration for many important biological functions. However if excess reactive oxygen species and reactive nitrogen species cannot be neutralized properly by the body's antioxidant defence, excess free radicals can damage various biomolecules, including lipids, proteins and nucleic acids. Oxidative stress is defined as imbalance between pro-oxidants and antioxidants in the body, due to increased production of free radicals or due to antioxidant mechanisms deficiency. Oxidative stress is implicated in the pathophysiology of numerous diseases and in the aging process.

This study examined apparently healthy volunteers randomly divided in two intervention groups (supplement and placebo) matched on BMI, sex, age and smoking habits (block randomization). The age range in the group who take the supplement was $32,5 \pm 5,4$ and in the group who take the placebo was $34,5 \pm 6,4$. Volunteers were taking the supplement or the placebo for 8 weeks. The supplement contained a mixture of antioxidant vitamins such as vitamin E, C, beta-carotene, trace elements such as selenium and natural antioxidants like resveratrol, green tea e.g. Anthropometry measurements and biological samples collection were performed at 3 times during the intervention (0, 4 and 8 weeks). Also volunteers completed questionnaires of physical activity and dietary habits.

The main purpose of the study was to evaluate the effect of the supplement on oxidative stress markers. For this purpose glutathione peroxidase as basic antioxidant enzyme, uric acid as endogenous antioxidant and ex vivo serum resistance to oxidation as index of serum antioxidant capacity, were measured.

Results revealed that no significant changes in activity of GPx enzyme, uric acid levels and serum resistance to oxidation between the two intervention groups. The study, however, goes on and on completion of the measurements likely to find more precise results. It will also include other more reliable markers of oxidative stress such as isoprostanes to have a more complete picture of the effect of the supplement.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ADP:	Adenosine diphosphate, διφωσφορική αδενοσίνη
AP-1	Activator protein-1, πρωτεΐνη ενεργοποίησης-1
ATP:	Adenosine triphosphate, τριφωσφορική αδενοσίνη
BH ₄ :	Tetrahydrobiopterin, τετραϋδροβιοπτερίνη
Ca:	Calcium, ασβέστιο
CAT:	Catalase, καταλάση
CH:	Cholesterol, χοληστερόλη
CM:	Chylomicrons, χυλομικρά
CO ₂ :	Carbon dioxide, διοξείδιο του άνθρακα
Cu:	Copper, χαλκός
8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνη
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay, ανοσοενζυμική μέθοδος προσρόφησης
eNOS:	Endothelial nitric oxide synthase, ενδοθηλιακή συνθάση οξειδίου του αζώτου
FAD:	Flavin adenine dinucleotide, φλάβινο-αδένινο δινουκλεοτίδιο
Fe:	Iron, σίδηρος
FMN:	Flavin mononucleotide, φλάβινο-μονονουκλεοτίδιο
GPx:	Glutathione peroxidase, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GSH:	Glutathione, γλουταθειόνη
GSSG:	Glutathione disulfide, δισουλφίδιο γλουταθειόνης
HCL:	Hydrochloric acid, υδροχλωρικό οξύ
HDL:	High density lipoprotein, λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
H ₂ O:	Water, νερό

HPLC:	High performance liquid chromatography, υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
ICAM:	Intracellular adhesion molecule, μόριο διακυτταρικής προσκόλλησης
IFN:	Interferon, ιντερφερόνη
IL:	Interleukin, ιντερλευκίνη
iNOS:	Inductive nitric oxide synthase, επαγόμενη συνθάση οξειδίου του αζώτου
LDL:	Low density lipoprotein, λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LO:	Lipoxygenase, λιποοξυγονάση
MDA:	Malondialdehyde, μαλονδιαλδεΐδη
Mg:	Magnesium, μαγνήσιο
Mn:	Manganese, μαγγάνιο
MPO:	Myeloperoxidase, μυελοϋπεροξειδάση
NAD(P)H:	Nicotinamide-adenine (phosphate) dinucleotide, νικοτινάμιδο-αδένινο (φωσφορικό) δινουκλεοτίδιο
NF-κB:	Nuclear factor- κB, πυρηνικός μεταγραφικός παράγοντας-κB
NOS:	Nitric oxide synthase, συνθάση οξειδίου του αζώτου
O ₂ :	Molecular oxygen, μοριακό οξυγόνο
ox-LDL:	Oxidized low density lipoprotein, οξειδωμένη χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
ox-PLPs	Oxidized phospholipids, οξειδωμένα φωσφολιποειδή
PAF	Platelet activating factor, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PLP:	Phospholipids, φωσφολιποειδή
RNS:	Reactive nitrogen species, δραστικές μορφές αζώτου
ROS:	Reactive oxygen species, δραστικές μορφές οξυγόνου
Se:	Selenium, σελήνιο

SMC:	Smooth muscle cells, λεία μυϊκά κύτταρα
SOD:	Superoxide dismutase, υπεροξειδική δισμουτάση
TBARS:	Thiobarbituric acid reactive substances, αντιδραστικές ουσίες θιοβαρβιτουρικού οξέος
TNF:	Tumor necrosis factor, παράγοντας νέκρωσης όγκων
VCAM:	Vascular adhesion molecule, μόριο αγγειακής κυτταρικής προσκόλλησης
VLDL:	Very low density lipoproteins, λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας
XO:	Xanthine oxidase, οξειδάση της ξανθίνης
Zn:	Zinc, ψευδάργυρος

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1^ο – Ελεύθερες ρίζες, αντιοξειδωτικά και οξειδωτικό στρες

1. Τι είναι ελεύθερες ρίζες

Τα ηλεκτρόνια ενός ατόμου περιστρέφονται σε τροχιακά γύρω από τον πυρήνα του ατόμου. Ένα ατομικό τροχιακό περιέχει το μέγιστο δύο ηλεκτρόνια. Τα ηλεκτρόνια αυτά βρίσκονται ως ζεύγη στα τροχιακά και το κάθε ζεύγος έχει αντι-παράλληλη στροφορμή (spin). Εάν σε ένα τροχιακό υπάρχει μόνο ένα ηλεκτρόνιο τότε καλείται ασύζευκτο ηλεκτρόνιο.

Ελεύθερη ρίζα ορίζεται ως ένα άτομο, μόριο ή ιόν το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια σε ένα τροχιακό, με δυνατότητα αυτοδύναμης ύπαρξης στο χώρο, ανεξάρτητα από την παρουσία άλλων μορίων.

Η παρουσία του ασύζευκτου ηλεκτρονίου προσδίδει στις ρίζες σημαντικού βαθμού δραστικότητα με αποτέλεσμα να μπορούν να αντιδρούν εύκολα με τα γειτονικά τους μόρια δίνοντας ή λαμβάνοντας ηλεκτρόνια από αυτά και την έναρξη με τον τρόπο αυτό αλυσιδωτών αντιδράσεων οι οποίες συνεχίζονται μέχρι την παραγωγή ενός μη δραστικού προϊόντος. Οι ελεύθερες ρίζες έχουν μικρή διάρκεια ζωής.

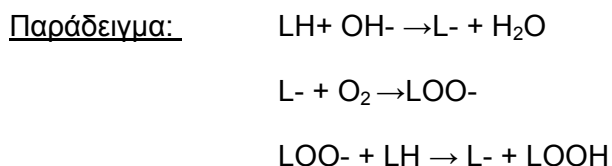
Στα βιολογικά συστήματα μπορούν να παραχθούν ποικιλία ελευθέρων ριζών με δραστικότητα ανάλογα με τη φύση του ατόμου/μορίου από το οποίο προέρχονται.

Τελευταία χρησιμοποιούνται οι όροι ενεργές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) και ενεργές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS). Οι όροι ενεργές μορφές αζώτου και ενεργές μορφές οξυγόνου δεν περιλαμβάνουν μόνο ελεύθερες ρίζες αλλά και μόρια που δεν είναι ρίζες αλλά μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε ρίζες πχ H_2O_2 . [4,19]

Όταν δύο ρίζες αντιδρούν ενώνουν τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους σχηματίζοντας ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ τους σε αντιδράσεις που είναι κινητικά γρήγορες και οι οποίες οδηγούν στο σχηματισμό μη ριζών.



Εναλλακτικά μια ρίζα μπορεί να αποσπάσει ένα υδρογόνο H από δεσμούς C-H, O-H, S-H από άλλα μόρια μη ρίζες. Η αντίδραση αυτή είναι συνηθισμένη στα βιολογικά συστήματα. Τα μόρια που εμπλέκονται σε τέτοιες αντιδράσεις αποτελούν ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους όπως αντιοξειδωτικά, συμπαράγοντες ενζύμων, λιπίδια, πρωτεΐνες, νουκλεϊνικά οξέα και σάκχαρα. Από τις αντιδράσεις αυτές παράγονται νέες ρίζες και αυτές οδηγούν σε άλλες διαδοχικές αντιδράσεις, μέχρι την παραγωγή ενός μη δραστικού προϊόντος.



Άλλα παραδείγματα ελευθέρων ριζών αποτελούν οι ενεργές μορφές θείου όπως RS- οι οποίες σχηματίζονται από αμινοξέα, και η ρίζα CCL3- η οποία σχηματίζεται κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού του τετραχλωράνθρακα στο ήπαρ από τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450.[4,7]

1.1 Ενεργές μορφές οξυγόνου

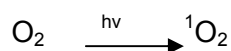
Μοριακό οξυγόνο

Το οξυγόνο αποτελεί από μόνο του διπλή ρίζα αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ζεύγη ηλεκτρονίων σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Τα ηλεκτρόνια αυτά έχουν ίδια στροφορμή (spin) και έτσι το οξυγόνο μπορεί να αντιδρά με μόνο ένα ηλεκτρόνιο κάθε φορά. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα να περιορίζεται η δραστηριότητά του.[4,19]

Μονήρες μοριακό οξυγόνο

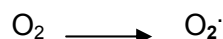
Εάν ένα από τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια του μοριακού οξυγόνου διεγερθεί και αλλάξει στροφορμή τότε σχηματίζεται το μονήρες μοριακό οξυγόνο $^1\text{O}_2$. Το μονήρες οξυγόνο διαθέτει υψηλή ενέργεια και είναι ιδιαίτερα δραστικό αφού τα ηλεκτρόνια με αντίθετο spin μπορούν να αντιδράσουν γρήγορα με άλλα ζεύγη ηλεκτρονίων.

Η διεγερμένη αυτή μορφή του οξυγόνου μπορεί να παραχθεί από διάφορες μεταβολικές οδούς όπως για παράδειγμα κατά την υπεροξειδωση των λιποειδών των μεμβρανών, καθώς και μέσω φωτοχημικών αντιδράσεων όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:[19]



Ανιόν υπεροξειδίου

Το ανιόν υπεροξειδίου σχηματίζεται με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο, το οποίο παραμένει με την προσθήκη αυτή με μόνο ένα ηλεκτρόνιο ασύζευκτο.[19]



Στον οργανισμό παράγεται ιδιαίτερα στα λευκά αιμοσφαίρια γιατί χρησιμεύει στην καταστροφή των βακτηρίων, των ιών και των μυκήτων. Ωστόσο η παρουσία αυτών των ριζών μπορεί να γίνει επιβλαβής για τον οργανισμό γιατί το ανιόν υπεροξειδίου αποτελεί ρίζα με μεγάλη οξειδωτική ικανότητα καθώς και δυνητικό υποκινητή για την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή άλλων μορφών οξυγόνου όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το ανιόν υπεροξειδίου μπορεί επίσης να αντιδρά με οξείδιο του αζώτου παράγοντας έτσι πολλά είδη ενεργού αζώτου όπως για παράδειγμα το υπεροξυνιτρώδες. [4]

Το ανιόν υπεροξειδίου δεν είναι λιποδιαλυτό μόριο και έτσι δεν διαχέεται μακριά από το χώρο παραγωγής του. [19]

Υπεροξείδιο υδρογόνου

Το υπεροξειδίο του υδρογόνου δεν είναι ρίζα αλλά θεωρείται ενεργή μορφή οξυγόνου. Έχει μικρή οξειδωτική ικανότητα αλλά μπορεί να μετατρέπεται σε μια πολύ δραστική ρίζα τη ρίζα υδροξυλίου με τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss μη ενζυμικά παρουσία ιόντων μετάλλων (Cu^+ , Fe^{2+}). Μπορεί να διαχέεται εύκολα διαμέσου των μεμβρανών των κυττάρων και να μετατρέπεται σε ρίζα υδροξυλίου μέσα στα διάφορα οργανίδια εντός του κυττάρου προκαλώντας βλάβες. [4,19]

Αντίδραση Haber-Weiss



Αντίδραση Fenton



Ρίζα υδροξυλίου

Η ρίζα υδροξυλίου είναι μια από τις πιο ισχυρές ρίζες η οποία μπορεί να επιτεθεί σε όλα τα μόρια του σώματος όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιποειδή και DNA. Οι ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου έχουν πολύ μικρό χρόνο ημιζωής (10^{-9}s) και γι' αυτό όταν παράγονται δρουν κοντά στο χώρο σχηματισμού τους αποσπώντας γρήγορα ηλεκτρόνια από τα γύρω μόρια. [58]

Οι ρίζες υδροξυλίου παράγονται από τις αντιδράσεις Fenton και Haber-Weiss μη ενζυμικά παρουσία ιόντων μετάλλων (Cu^+ , Fe^{2+}) όπως αναφέρθηκε πιο πάνω καθώς και όταν το σώμα εκτίθεται στις ακτίνες γ, δηλαδή σε χαμηλού μήκους ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Οι ακτίνες αυτές διασπούν το νερό στο σώμα για να σχηματίσουν ρίζες υδροξυλίου: [19]



Άλλες ενεργές μορφές οξυγόνου

Ρίζες υπεροξειδίου $\text{ROO}\cdot$ και Ρίζες αλκοξειδίου $\text{RO}\cdot$

Η απλούστερη ρίζα υπεροξειδίου είναι η $\text{HOO}\cdot$, η οποία αποτελεί πρωτονιομένη μορφή του ανιόντος του υπεροξειδίου και καλείται ρίζα υδροϋπεροξειδίου. Η ρίζα υδροϋπεροξειδίου είναι υπεύθυνη για την έναρξη της υπεροξειδωσης των λιπιδίων.

Οι ρίζες υπεροξειδίου $\text{ROO}\cdot$ και οι ρίζες αλκοξειδίου $\text{RO}\cdot$ σχηματίζονται κατά την αντίδραση των ριζών $\text{OH}\cdot$ και $\text{O}_2\cdot$ με οργανικά μόρια και κυρίως λιποειδή. [8,58]

1.2 Ενεργές μορφές αζώτου

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

Το NO είναι ένα μικρό μόριο με μικρή οξειδωτική ικανότητα και μεγάλη ικανότητα διάχυσης. Συντίθεται κατά την αντίδραση οξείδωσης της L- αργινίνης προς κίτρουλλίνη, που καταλύεται από το ένζυμο συνθετάση του NO (NOS).

Αποτελεί σημαντικό μόριο μεταγωγής σήματος σε μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διεργασιών όπως η νευρομεταβίβαση, η χαλάρωση των αγγείων και συμμετέχει επίσης στην ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να μετατραπεί σε άλλες ενεργές μορφές αζώτου αντιδρώντας με το οξυγόνο ή το ανιόν υπεροξειδίου και να γίνει έτσι τοξικό για τα κύτταρα. [4]

Υπεροξυ- νιτρώδες ανιόν (ONOO⁻)

Αποτελεί την πιο δραστική ρίζα αζώτου. Είναι ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας και μπορεί να διαχέεται εύκολα διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών και να αντιδρά με βιομόρια όπως πρωτεΐνες και θειαλκοόλες, καταστρέφοντας ή τροποποιώντας τη λειτουργία τους, καθώς και με το CO₂ παράγοντας ασταθή προϊόντα (bonomini). Παράγεται από την αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου με το οξυγόνο ή το ανιόν υπεροξειδίου. Μπορεί να μετατρέπεται σε άλλες ενεργές μορφές αζώτου όπως NO₂⁻ και NO₂⁺. [4,58]

ΠΙΝΑΚΑΣ 1- Ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου

ROS	ΟΝΟΜΑ	RNS	ΟΝΟΜΑ
O ₂	Οξυγόνο	NO [·]	Μονοξείδιο του αζώτου
O ₂ ⁻	Ανιόν υπεροξειδίου	ONOO ⁻	Υπεροξυ-νιτρώδες ανιόν
HO ⁻	Ρίζα υδροξυλίου	HONO ₂	Υπεροξυνιτρώδες οξύ
H ₂ O ₂	Υπεροξείδιο του υδρογόνου	NO ₂ ⁺	Ιόν νιτρονίου
RO [·]	Ρίζα αλκοξειδίου	NO ₂ ⁻	Νιτρώδες
ROO [·]	Ρίζα υπεροξειδίου	N ₂ O ₃	Τριοξείδιο του αζώτου
HOCL	Υποχλωριώδες οξύ	NO ₂ [·]	Ρίζα διοξειδίου του αζώτου

1.2 Πηγές ενεργών μορφών στο ανθρώπινο σώμα

Ποικιλία ενεργών μορφών σχηματίζονται καθημερινά στο ανθρώπινο σώμα, οι οποίες προέρχονται από το εξωτερικό περιβάλλον (εξωγενείς πηγές) είτε παράγονται από διάφορες αντιδράσεις ενζυμικές ή μη μέσα στο σώμα (ενδογενείς πηγές). Εξωγενείς πηγές αποτελούν διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η έκθεση σε αιθαλομίχλη, χημικά, φάρμακα, όζον και ακτινοβολία. Οι ενδογενείς πηγές μπορεί να είναι ενδοκυττάριας ή εξοκυττάριας και αποτελούν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα ή πραγματοποιούνται μη ενζυμικά παρουσία προ-οξειδωτικών μετάλλων καθώς και η διαφυγή ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα. Σε κάποιες από αυτές τις αντιδράσεις οι ενεργές μορφές αποτελούν το κύριο προϊόν της αντίδρασης ενώ σε άλλες αποτελούν παραπροϊόντα των βιοχημικών αντιδράσεων. Μερικά από τα σημαντικότερα

ένζυμα είναι τα μικροσωματικά ένζυμα του κυτοχρώματος P450, η οξειδάση της ξανθίνης, η μυελοϋπεροξειδάση, η λιπooξυγονάση, NAD(P)H και η οξειδάση και συνθετάση NO. [4,19,55]

Αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων- Μιτοχόνδρια

Στην αναπνευστική αλυσίδα τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται με τελικό αποδέκτη το οξυγόνο για την παραγωγή ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε κλειστό κύκλωμα χωρίς την απελευθέρωση δραστικών ενδιάμεσων. Ωστόσο είναι πιθανό να διαφύγουν ηλεκτρόνια και το οξυγόνο να αναχθεί κατά ένα ηλεκτρόνιο προς O_2^- , και γι' αυτό η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων αποτελεί κύρια πηγή ενδοκυττάρων ROS. [4] Από πειράματα που έχουν γίνει σε απομονωμένα μιτοχόνδρια, εκτιμάται ότι υπάρχει διαρροή περίπου 2-3%. Η διαρροή ηλεκτρονίων μπορεί να γίνει κατά τον κύκλο της ουβικινόνης σύμπλοκο III)όπου η ύπαρξη της ελεύθερης ημικινόνης στο εσωτερικό της μεμβράνης επιτρέπει την τυχαία μεταφορά του ηλεκτρονίου στο O_2 και το σχηματισμό O_2^- , καθώς και στο σύμπλοκο I (NADH αφυδρογονάση). Η παραγωγή ROS επηρεάζεται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση στο μιτοχόνδριο. [55,51]

Τα επίπεδα O_2^- στο μιτοχόνδριο εξαρτώνται από τη δραστηριότητα του ενζύμου Mn-SOD (ένζυμο στη μήτρα του μιτοχονδρίου που μετατρέπει O_2^- σε H_2O_2 και O_2). [55]

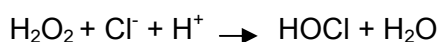
Φαγοκυττάρωση- Αναπνευστική έκρηξη

Κατά τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης ξένων ουσιών, βακτηρίων ή ιών, τα ενεργοποιημένα λευκά αιμοσφαίρια (μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, μακροφάγα) καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες οξυγόνου για την παραγωγή O_2^- μέσω του ενζύμου οξειδάση του NADPH. Οι ρίζες O_2^- είναι απαραίτητες στα κύτταρα αυτά για την παραγωγή άλλων τοξικών ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου πχ H_2O_2 και ONOO- για την καταστροφή των ξένων βακτηρίων ή άλλων οργανισμών. Επιπλέον οι ρίζες O_2^- που παράγονται από τα ουδετερόφιλα αυξάνουν την ανοσολογική απόκριση, δρώντας ως χημειοπροσελκυστές άλλων ουδετερόφιλων. [51,55]

Η μαζική παραγωγή των αντιμικροβιακών και ογκοκτόνων ROS σε ένα φλεγμονώδες περιβάλλον, παρουσία οξυγόνου ονομάζεται "αναπνευστική έκρηξη" και παίζει σημαντικό ρόλο άμυνας κατά των παθογόνων μικροοργανισμών. [4]

NADPH οξειδάση: Βρίσκεται στη μεμβράνη των φαγοκυττάρων και καταλύει το σχηματισμό O_2^- από O_2 , χρησιμοποιώντας ηλεκτρόνια που προέρχονται από το NADPH. Ανήκει στην οικογένεια ενζύμων NOX. Είναι γνωστή ως NOX 2 ή NADPH οξειδάση φαγοκυττάρων και αποτελεί πρωτεϊνικό σύμπλοκο που περιέχει μόρια αίμης. [18]

Μυελοϋπεροξειδάση (MPO): Η MPO είναι μέλος της οικογένειας των αίμο- υπεροξειδάσων και εκφράζεται σε ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα. Βρίσκεται στα κοκκία των φαγοκυττάρων, απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και καταλύει την παραγωγή HOCl από H_2O_2 σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η μυελοϋπεροξειδάση είναι το μοναδικό ανθρώπινο ένζυμο που είναι γνωστό για την παραγωγή HOCl, και ως εκ τούτου χλωριωμένα βιομόρια όπως η 3- χλωροτυροσίνη

αποτελούν ειδικούς δείκτες των αντιδράσεων οξειδωσης που καταλύονται από το ένζυμο. Το HOCl αποτελεί ένα από τα ισχυρότερα οξειδωτικά και ισχυρό αντιμικροβιακό παράγοντα. [54]

Εκτός από HOCl, το σύστημα μυελοϋπεροξειδάσης /H₂O₂/Cl μπορεί να δημιουργήσει μια σειρά από δευτερεύοντα οξειδωτικά, που μπορούν να συμμετέχουν σε οξειδωτικές αντιδράσεις με τελικό αποτέλεσμα υπεροξειδωση λιποειδών και οξείδωση της LDL, σχηματισμό προηγμένων τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης και παραγωγή προϊόντων νίτρωσης. [52]

Οξειδάση της ξανθίνης (XO)

Μια άλλη βασική πηγή ενδοκυττάρων ROS είναι η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης, η οποία καταλύει την τελική αντίδραση αποικοδόμησης πουρινών σε δύο βήματα, μετατρέποντας την υποξανθίνη σε ξανθίνη και την ξανθίνη τελικά σε ουρικό οξύ. Η οξειδοαναγωγή της ξανθίνης είναι μια σιδηρο-θειο-μολυβδαίνο φλαβοπρωτεΐνη και υπάρχει κυρίως στο πλάσμα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Υφίσταται κυρίως στα κύτταρα ως αφυδρογονάση όπου λαμβάνει τα ηλεκτρόνια του υποστρώματος ανάγοντας το NAD⁺ σε NADH. Κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών καταστάσεων, η αφυδρογονάση της ξανθίνης μπορεί να μετατραπεί στην οξειδάση από μια μη αναστρέψιμη πρωτεολυτική επίθεση ή από αναστρέψιμη οξείδωση ομάδων θειόλης στο μόριό της. Ένα άλλο σήμα για το σχηματισμό της οξειδάσης της ξανθίνης είναι η ταλαντούμενη διατμητική τάση, μια κατάσταση που συναντάται συχνά σε θέσεις επιρρεπείς στο σχηματισμό αθηροσκληρωτικής βλάβης. [51] Η οξειδάση της ξανθίνης μεταφέρει ηλεκτρόνια από το οξυγόνο στα μόρια του υποστρώματος δημιουργώντας O₂^{•-} και H₂O₂.

Ωστόσο, δεν είναι απαραίτητη η μετατροπή του ενζύμου σε οξειδάση για την παραγωγή ROS γιατί φαίνεται ότι το ένζυμο εμφανίζει μερική δραστηριότητα αφυδρογονάσης και μερική δραστηριότητα οξειδάσης υπό συνθήκες στις οποίες η αναλογία NADH / NAD⁺ είναι αυξημένη, όπως στην υποξαιμία. [55]

NOS - Συνθάσες του NO

Οι συνθάσες NO είναι μια οικογένεια ενζύμων που καταλύουν την οξείδωση της L-αργινίνης και σε L-κιτρουλλίνη με ταυτόχρονη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου. Υπάρχουν 3 ισομορφές ενζύμων NOS οι οποίες είναι η νευρωνική (nNOS), η ενδοθηλιακή (eNOS) και η επαγόμενη (iNOS).

Τα μέχρι τώρα επιστημονικά δεδομένα ενοχοποιούν για την παραγωγή ενεργών μορφών οξυγόνου την ισομορφή eNOS. Η μορφή αυτή αποτελεί ένα ομοδιμερές μόριο, με κάθε μονομερές να αποτελείται από μία περιοχή αναγωγής (με θέσεις πρόσδεσης για NAD(P)H, FAD, FMN) και μία περιοχή οξειδάσης (με θέσεις πρόσδεσης για τετραϋδροβιοπτερίνη BH₄, L-αργινίνη, ψευδάργυρο και αίμη). [4]

Η τετραϋδροβιοπτερίνη BH₄ αποτελεί συμπαράγοντα του ενζύμου, η οποία δεσμεύεται κοντά στο μόριο της αίμης και μεταφέρει ηλεκτρόνια σε ένα γουανιδινο-άζωτο της L-αργινίνης, μετατρέποντάς το σε μονοξείδιο του αζώτου (NO). Απουσία του συμπαράγοντα (BH₄) ή του υποστρώματος (L-αργινίνη) οδηγεί σε οξείδωση του μοριακού οξυγόνου προς O₂^{•-} και H₂O₂ από το ένζυμο. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται NOS αποσύνδεση (NOS uncoupling). Το

φαινόμενο της αποσύνδεσης της eNOS στο ενδοθήλιο μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες και δυσλειτουργία του ενδοθηλίου μέσω 3 μηχανισμών: [54]

A) Η παραγωγή NO μειώνεται, επιτρέποντας έτσι σε άλλες ενεργές μορφές που θα αντιδρούσαν κανονικά με το NO να επιτεθούν σε άλλα κύτταρα στόχους.

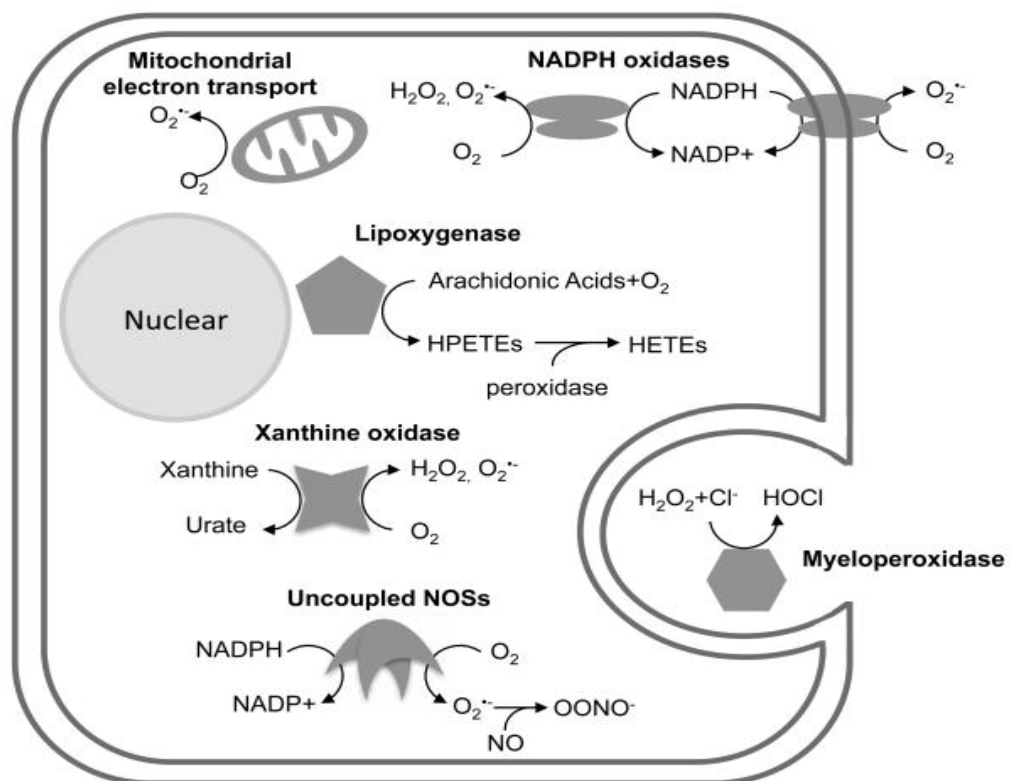
B) Με την παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ συμβάλλοντας σε αύξηση οξειδωτικού στρες.

Γ) Είναι πιθανό να συμβεί μερική αποσύνδεση του ενζύμου με αποτέλεσμα την παραγωγή NO και $O_2^{\cdot -}$ ταυτόχρονα με αποτέλεσμα τη δραματική αύξηση του οξειδωτικού στρες.

Λιποξυγονάσες- LO

Ένα άλλο σημαντικό σύστημα παραγωγής ενεργών μορφών οξυγόνου στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελούν οι λιποξυγονάσες. Οι LO είναι διοξυγονάσες που περιέχουν σίδηρο και καταλύουν την στερεοειδική ενσωμάτωση μοριακού οξυγόνου σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Αποτέλεσμα της οξείδωσης είναι η δημιουργία βιολογικώς δραστικών λιπιδίων όπως προσταγλανδινών, θρομβοξανών και λευκοτριενίων τα οποία συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις αντιδράσεις και μπορούν να αυξήσουν την αγγειακή διαπερατότητα. Κατά τη διάρκεια βιοσύνθεσης λευκοτριενίων παράγονται ενεργές μορφές οξυγόνου. [4]

Ορισμένες ισομορφές λιποοξυγονάσης πιστεύεται ότι προωθούν την αθηροσκλήρωση με την παραγωγή ROS και οξειδωτικά τροποποιημένων λιπιδίων, όπως οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (ox-LDL). [7]



ΣΧΗΜΑ 1. Πηγές ROS, NOS στα κύτταρα

1.3 Αντιδράσεις ελευθέρων ριζών με βιομόρια

Μόλις σχηματιστούν οι ελεύθερες ρίζες επιτίθενται σε μακρομόρια του οργανισμού προκαλώντας αλυσιδωτές αντιδράσεις οι οποίες είναι καταστροφικές για το κύτταρο και τον οργανισμό. Ενοχοποιούνται για την οξειδωτική βλάβη του DNA, των πρωτεϊνών, και για την υπεροξειδωση των λιπιδίων των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών. [4]

Υπεροξειδωση λιπιδίων:

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που βρίσκονται στα φωσφολιποειδή των κυτταρικών μεμβρανών αλλά και η χοληστερόλη, αποτελούν στόχο των ROS και των RNS. Η διαδικασία υπεροξειδωσης των λιπιδίων αποτελείται από τρία στάδια: την έναρξη, τη διάδοση και τον τερματισμό. Οι ρίζες που ξεκινούν αυτές τις αντιδράσεις περιλαμβάνουν τη ρίζα υδροξυλίου, τη ρίζα αλκοξειδίου και υπεροξειδίου. [4] Οι ρίζες υπεροξειδίου που παράγονται, μόλις σχηματιστούν μετατρέπονται μέσω μιας διεργασίας κυκλοποίησης σε ενδο-υπεροξειδία ενώ τελικά προϊόντα της υπεροξειδωσης είναι η μαλονδιαλδεϋδη (MDA) και η 4-υδροξυ-2-νονενάλη (HNE). Η MDA έχει μεταλλαξιογόνο δράση στα κύτταρα των βακτηρίων και των θηλαστικών και είναι καρκινογόνος για τους επίμυες. Η HNE έχει ήπια μεταλλαξιογόνο δράση αλλά φαίνεται να είναι το κύριο τοξικό προϊόντος της υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Η εκτεταμένη οξείδωση λιπιδίων της μεμβράνης μπορεί να επηρεάσει τη ρευστότητα, τη διαπερατότητα και τη λειτουργικότητα της μεμβράνης. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων σχετίζεται με καρκίνο, αθηροσκλήρωση και φλεγμονή. [59]

Οξείδωση πρωτεϊνών:

Οι ελεύθερες ρίζες οξειδώνουν αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας σε διάσπαση πεπτιδικών δεσμών ή αλλαγές στη δομή τους με καταστροφικές συνέπειες για τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Η οξείδωση της πρωτεΐνης εξαρτάται από το είδος των αμινοξέων που περιέχουν. Τα πιο ευάλωτα αμινοξέα στην οξείδωση είναι κυρίως αυτά που περιέχουν θειούχες ομάδες και ακόρεστους δεσμούς (πχ κυστεΐνη, μεθειονίνη). Κατά την οξείδωση παράγονται πρωτεϊνικά καρβονύλια με πολλούς διαφορετικούς μηχανισμούς και η συγκέντρωσή τους αποτελεί μέτρο της οξείδωσης των πρωτεϊνών από τις ελεύθερες ρίζες. [4,19]

Οξείδωση νουκλεϊνικών οξέων: Τα νουκλεϊνικά οξέα DNA και RNA οξειδώνονται κυρίως με τη ρίζα υδροξυλίου αλλά και από άλλες ρίζες οξυγόνου και αζώτου. Η οξείδωση γενετικού υλικού από ρίζες υδροξυλίου συμβαίνει κυρίως μετά από μη ειδική δέσμευση ιόντων Fe^{2+} στο DNA, η οποία προκαλεί την τοπική παραγωγή των ριζών αυτών. Η ρίζα υδροξυλίου μπορεί να αντιδράσει με όλα τα συστατικά του DNA, προκαλεί βλάβες στις βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης αλλά και στο σκελετό δεοξυριβόζης. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από εκατό προϊόντα οξείδωσης του DNA όπως για παράδειγμα η 8-υδροξυγουανίνη. Η 8-υδροξυγουανίνη παράγεται κατά την οξείδωση γουανίνης και αποτελεί δείκτη της οξείδωσης του DNA. Η μόνιμη τροποποίηση του γενετικού υλικού από την οξειδωτική βλάβη μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλαξιογένεση, καρκινογένεση και σε γήρανση. [4,59]

1.4 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί οργανισμού

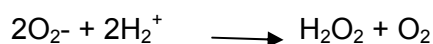
Η συνεχής έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών έχει οδηγήσει τους οργανισμούς στην ανάπτυξη διάφορων προστατευτικών μηχανισμών. Το ανθρώπινο σώμα έχει αναπτύξει κάποια φυσικά συστήματα άμυνας όπως οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί ώστε να μειώνει την επιβλαβή δράση της συνεχούς παραγωγής ελευθέρων ριζών. Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, στην κυτταρική μεμβράνη, και στον εξωκυτταρικό χώρο, και μπορούν να ταξινομηθούν ως ακολούθως. [39]

1.4.1 Ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα

Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα καταλύουν τη διάσπαση των παραγόμενων ελευθέρων ριζών στο ενδοκυττάριο περιβάλλον. Τα κυριότερα περιλαμβάνουν τις δισμουτάσες του υπεροξειδίου, την καταλάση και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. [4]

Δισμουτάσες υπεροξειδίου- Superoxide Dismutase-SOD

Αποτελούν το σημαντικότερο ενζυμικό σύστημα του οργανισμού κατά του ανιόντος υπεροξειδίου. Καταλύουν την εξουδετέρωση του ανιόντος υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου όπως φαίνεται στην ακόλουθη αντίδραση:

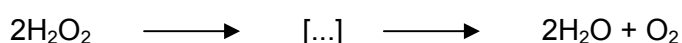


Στο ενεργό κέντρο το ένζυμο περιέχει ένα οξειδοαναγωγικό μέταλλο. Η SOD καταστρέφει άμεσα και με υψηλή ταχύτητα αντίδρασης ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου με διαδοχική οξείδωση και αναγωγή του μετάλλου. Υπάρχουν διάφορες ισομορφές του ενζύμου οι οποίες παρουσιάζουν παρόμοιες λειτουργίες αλλά διαφέρουν κυρίως ως προς τη φύση του μετάλλου στο ενεργό κέντρο, τη σύνθεση των αμινοξέων, τους συμπ παράγοντες, τον αριθμό υπομονάδων και ως προς τη θέση τους στο κύτταρο. [7]

Στον άνθρωπο απαντούν τρεις μορφές SOD, η μιτοχονδριακή Mn-SOD, η κυτταροπλασματική CuZn-SOD και η εξωκυττάρια SOD. Η CuZn-SOD φέρει στο ενεργό κέντρο ιόντα χαλκού και ψευδάργυρου και απαντάται κυρίως στο κυτταρόπλασμα αλλά και στο διάμεσο χώρο των μιτοχονδρίων. Η Mn-SOD αποτελεί ένα ομοτετραμερές το οποίο περιέχει από ένα άτομο μαγγανίου στο ενεργό κέντρο κάθε υπομονάδας. Βρίσκεται στη θεμέλια ουσία των μιτοχονδρίων και απομακρύνει τις ρίζες O_2^- που σχηματίζονται στη θεμέλια ουσία αλλά και στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Η εξωκυττάρια SOD είναι μια τετραμερής γλυκοπρωτεΐνη, η οποία φέρει χαλκό και ψευδάργυρο στο ενεργό κέντρο και έχει υψηλή συγγένεια για ορισμένες γλυκοζάμινογλυκάνες όπως η ηπαρίνη. Η σύνθεσή της ρυθμίζεται από κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες και προοξειδωτικά μόρια και όχι από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου. [19,51]

Καταλάση-CAT

Η καταλάση είναι ένα ενδοκυττάριο αντιοξειδωτικό ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται εντός του κυττάρου. Καταλύει την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο σε δύο στάδια. Η αντίδραση είναι η εξής:



Το ένζυμο ενδοκυτταρικά εντοπίζεται στα υπεροξυσωμάτια και σε μικρότερο βαθμό στα μικροσωμάτια και στο κυτταρόπλασμα. Βρίσκεται σε πολλούς ιστούς/κύτταρα αλλά κυρίως στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα και εξαρτάται από τον αιμικό σίδηρο. [7]

Η CAT είναι πολύ αποτελεσματική σε υψηλού επιπέδου οξειδωτικό στρες, δηλαδή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις H_2O_2 . Το ένζυμο είναι ιδιαίτερα σημαντικό σε περιπτώσεις χαμηλής περιεκτικότητας του κυττάρου σε γλουταθειόνη ή σε μειωμένη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ανοχής στο οξειδωτικό στρες και στην προσαρμοστική απόκριση των κυττάρων σε αυτό. [4]

Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης- GPxs

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης καταλύουν την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και των οργανικών υπεροξειδίων στις αντίστοιχες αλκοόλες, χρησιμοποιώντας ως αναγωγική ουσία τη γλουταθειόνη σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Η γλουταθειόνη λειτουργεί ως υπόστρωμα για την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και κατά την αντίδραση οξειδώνεται σε GSSG. Κάθε δύο μόρια γλουταθειόνης παρέχουν ένα υδρογόνο από τη δισουλφοδρυλική τους ομάδα για την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου ή του οργανικού υπεροξειδίου και έπειτα ενώνονται σχηματίζοντας ένα δισουλφιδικό δεσμό. Η οξειδωμένη γλουταθειόνη στη συνέχεια ανάγεται με τη δράση του ενζύμου αναγωγάσης της γλουταθειόνης σε γλουταθειόνη ως εξής: [5]



Στον άνθρωπο υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές ισομορφές του ενζύμου (GPxs 1-4), οι οποίες εντοπίζονται σε διαφορετικές κυτταρικές τοποθεσίες αλλά όλες φέρουν στο ενεργό κέντρο κυστεΐνη συνδεδεμένη με σελήνιο. [4] Το σελήνιο είναι απαραίτητος συμπάράγοντας για τη δράση του ενζύμου γι' αυτό και η δράση του εξαρτάται από την επάρκεια της τροφής στο σελήνιο. [7]

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια όλων των κυττάρων, καθώς και στο πλάσμα. Αν και η αναγωγή του H_2O_2 γίνεται και από την καταλάση, τα σχετικά επίπεδα GPxs και καταλάσης διαφέρουν από ιστό σε ιστό. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι ο εγκέφαλος έχει πολύ χαμηλά επίπεδα δραστηριότητας καταλάσης και υψηλά επίπεδα δραστηριότητας GPxs, ενώ το ήπαρ έχει υψηλά επίπεδα και των δύο ενζύμων. [19]

1.4.2 Μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά

Τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά μπορούν να εξουδετερώσουν αλυσιδωτές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις όπως για παράδειγμα την αλυσιδωτή αντίδραση υπεροξειδωσής των λιπιδίων. Στις αντιδράσεις που συμμετέχουν μπορούν να λάβουν ηλεκτρόνιο από μια ρίζα ή να δώσουν ηλεκτρόνια για τον σχηματισμό ενός σταθερού παραπροϊόντος. Τα ίδια οξειδώνονται και σχηματίζεται η αντιοξειδωτική ρίζα η οποία μπορεί να αναγεννηθεί ή να αντικατασταθεί. Η αντιοξειδωτική ρίζα είναι σχετικά αδρανής και δεν αντιδρά με άλλα μόρια. Αποτελούν μικρά μόρια τα οποία μπορεί είτε να παράγονται στον οργανισμό (ενδογενή

αντιοξειδωτικά) είτε να προσλαμβάνονται από τη διατροφή (εξωγενή αντιοξειδωτικά). Επιπλέον μπορούν να είναι είτε υδροδιαλυτά πχ βιταμίνη C, GSH, είτε λιποδιαλυτά πχ βιταμίνη E, καροτενοειδή. [4]

Ενδογενή αντιοξειδωτικά

- Γλουταθειόνη

Η γλουταθειόνη είναι ένα τριπεπτίδιο και αποτελεί την κύρια αντιοξειδωτική θειόλη και κύριο ρυθμιστή της ενδοκυττάριας οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Συντίθεται στο κυτταρόπλασμα από τα ένζυμα συνθετάση του διπεπτιδίου γ-γλουταμυλ-κυστεΐνη και συνθετάση γλουταθειόνης, και αποτελείται από τα αμινοξέα L- γλουταμινικό, L- κυστεΐνη και γλυκίνη. [40]

Απαντά είτε στην ανηγμένη της μορφή ως GSH είτε στην οξειδωμένη GSSG. Συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αναστρέψιμης οξείδωσης της ενεργού θειόλης της. Ο λόγος GSH/GSSG αποτελεί αξιόπιστο μέτρο του οξειδωτικού stress ενός οργανισμού.

Η γλουταθειόνη δρα ως συνένζυμο πολυάριθμων ενζύμων που συμμετέχουν στην προστασία του κυττάρου όπως υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, τρανσφεράσες της γλουταθειόνης κ.α. Δεσμεύει άμεσα τη ρίζα υδροξυλίου και το μονήρες οξυγόνο και εξουδετερώνει το υπεροξείδιο του υδρογόνου και οργανικά υπεροξειδία με την καταλυτική δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Παρουσιάζει επίσης την ικανότητα να επαναφέρει στην ενεργό τους μορφή σημαντικές αντιοξειδωτικές ουσίες όπως η βιταμίνη C και η βιταμίνη E άμεσα ή έμμεσα. [4,19]

- Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ αποτελεί προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών και σημαντικό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό στα βιολογικά υγρά του σώματος (πχ πλάσμα) αλλά και εντός των κυττάρων. Ενεργεί ως δότης ηλεκτρονίων σε άλλες ουσίες με αποτέλεσμα την αναγωγή τους. Μπορεί να εκκαθαρίσει ελεύθερες ρίζες όπως η ρίζα υδροξυλίου, το μονήρες οξυγόνο, προϊόντα οξείδωσης της αίμης και υπεροξειδία όπως το υπεροξυ-νιτρώδες ανιόν (ONOO^-). Προστατεύει πρωτεΐνες από νίτρωση και μπορεί να δεσμεύει μεταβατικά μέταλλα όπως ο σίδηρος και ο χαλκός εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή ριζών υδροξυλίου μέσω της αντίδρασης Fenton. [4,40] Το ουρικό οξύ μπορεί να εξουδετερώνει το υπεροξυ-νιτρώδες ανιόν, το οποίο σχηματίζεται από την αντίδραση του NO με τη ρίζα υπεροξειδίου, αντίδραση που λαμβάνει χώρα κυρίως στο αγγειακό ενδοθήλιο. Το υπεροξυ-νιτρώδες ανιόν (ONOO^-) είναι ικανό να επάγει τον κυτταρικό θάνατο ή την ανώμαλη λειτουργία των κυττάρων συμβάλλοντας έτσι σε διάφορες μορφές καρδιαγγειακών παθήσεων. Σε μελέτες in vitro παρατηρήθηκε αποκατάσταση των μειωμένων επιπέδων NO σε καλλιέργειες με υπεροξυ-νιτρώδες, όταν σε αυτές προστέθηκε ουρικό οξύ. Έτσι φαίνεται ότι αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος συνδέονται με ευνοϊκή απόκριση στο οξειδωτικό στρες σε άτομα με αθηροσκλήρωση ή καρδιαγγειακές παθήσεις. [43] Επιπλέον πειραματικά στοιχεία δείχνουν ότι η υπερουριχαιμία μπορεί να είναι ένας αντισταθμιστικός μηχανισμός για την αντιμετώπιση της οξειδωτικής βλάβης που σχετίζεται με την αθηροσκλήρωση και τη γήρανση στον άνθρωπο. [35]

- A-Λιποϊκό οξύ

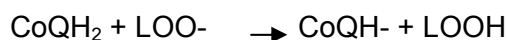
Είναι ένα φυσικό συστατικό το οποίο λειτουργεί ως κυτταρικό αντιοξειδωτικό. Αναφέρεται και ως θειοκτικό οξύ και λαμβάνεται είτε από τη διατροφή μέσω ποικιλίας τροφίμων είτε παράγεται ενδογενώς από τον οργανισμό. Λειτουργεί ως συμπαράγοντας του συγκροτήματος της α- αφυδρογονάσης. Το διϋδρολιποϊκό οξύ, η ανηγμένη μορφή του λιποϊκού οξέος δρα στο σώμα ως αναγωγικός παράγοντας απαλείφοντας ελεύθερες ρίζες όπως η ρίζα υδροξυλίου από το περιβάλλον. Το λιποϊκό οξύ που λαμβάνεται μέσω της διατροφής ή εκείνο που παράγεται ενδογενώς ανάγεται στα κύτταρα σε διϋδρολιποϊκό οξύ από την αναγωγή της γλουταθειόνης, την αφυδρογονάση του διϋδρολιπαμιδίου ή από την αναγωγή της θειορεδοξίνης. Το διϋδρολιποϊκό οξύ δρα σε υδρόφιλο αλλά και σε λιπόφιλο περιβάλλον και έτσι εντοπίζεται και στην κυτταρική μεμβράνη αλλά και στο κυτταρόπλασμα. Οι αντιοξειδωτικές του λειτουργίες εκτός από την απομάκρυνση ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν και την αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E και η γλουταθειόνη, και σχηματισμό χηλικών συμπλόκων με μέταλλα όπως ο χαλκός και ο σίδηρος. [4,59]

- Χολερυθρίνη

Είναι το τελικό προϊόντος του καταβολισμού της αίμης. Η χολερυθρίνη είναι ένας ισχυρός αναγωγικός παράγοντας και φυσικό αντιοξειδωτικό. Βρίσκεται κυρίως σε εξωκυτάρια υγρά συνδεδεμένη με αλβουμίνη. Στο εσωτερικό των κυττάρων η χολερυθρίνη βρίσκεται κατά κύριο λόγο σε μεμβράνες και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις γιατί υψηλότερες συγκεντρώσεις είναι τοξικές για τα κύτταρα. Μπορεί να αποτρέψει την οξείδωση πρωτεϊνών και λιπιδίων και να απομακρύνει ρίζες υπεροξυλίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. [40,51]

- Συνένζυμο Q - Ουβικινόνη

Η ουβικινόνη είναι ένα μικρό μόριο το οποίο συντίθεται στα κύτταρα και μεταφέρει ηλεκτρόνια στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Έχει αποδειχθεί ότι παρέχει υδρογόνα για την εξουδετέρωση υπεροξειδικών ριζών και επομένως αποτελεί μόριο με αντιοξειδωτικές ικανότητες. Είναι παρούσα σε μικρές ποσότητες στις λιποπρωτεΐνες και χρησιμοποιείται για την εξουδετέρωση λιποειδικών υπεροξειδίων.



Η ρίζα $\text{CoQH}\cdot$ μπορεί να αναγεννηθεί σε CoQH_2 διαμέσου της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. [4]

- Μέταλλα

Πολλά από τα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα διαθέτουν ως συμπαράγοντες ή προσθετικές ομάδες στο ενεργό κέντρο τους μέταλλα και ιχνοστοιχεία όπως ο χαλκός, το σελήνιο, ο σίδηρος και το μαγγάνιο, ο ψευδάργυρος. Επομένως αποτελούν αναπόσπαστο τμήμα της αντιοξειδωτικής δράσης των ενζύμων και συμμετέχουν έτσι στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Εντούτοις μερικά από αυτά (Cu, Fe) αποτελούν ισχυρά οξειδωτικά και για το λόγο αυτό βρίσκονται δεσμευμένα σε ειδικές πρωτεΐνες παραμένοντας ανενεργά. [51]

- Μελατονίνη

Η μελατονίνη είναι μια νευροορμόνη που παράγεται από την υπόφυση με σημαντικές βιολογικές λειτουργίες και αντιοξειδωτικές ικανότητες. Μπορεί να δρα ως εκκαθαριστής ελευθέρων ριζών και να αντιδρά με ROS και NOS. Δεν εμφανίζει προοξειδωτικές ιδιότητες και επιπλέον μπορεί να διαχέεται μέσω των μεμβρανών και να διαπερνά τον εγκεφαλονωτιαίο φραγμό. [4]

Εξωγενή - Διαιτητικά αντιοξειδωτικά (βλ. Κεφ. 3)

Τα εξωγενή αντιοξειδωτικά που προέρχονται μέσω της διατροφής του ανθρώπου θα αναλυθούν στο κεφάλαιο 3.

1.4.3 Πρωτεΐνες δέσμευσης μετάλλων

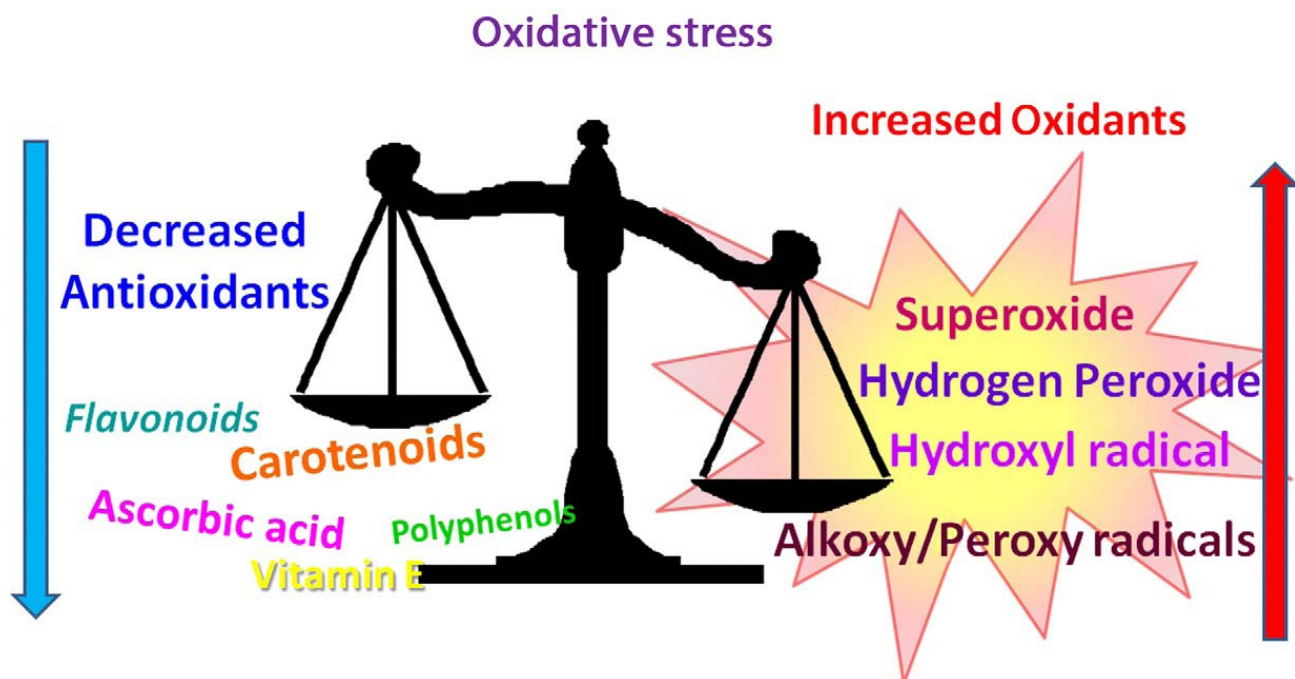
Όπως έχει αναφερθεί μέταλλα όπως ο χαλκός και ο σίδηρος παρόλο που αποτελούν απαραίτητα συστατικά για τη σύνθεση αντιοξειδωτικών ενζύμων μπορούν να συμμετέχουν σε αντιδράσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών με αποτέλεσμα την οξειδωτική βλάβη λιποπρωτεϊνών και άλλων συστατικών των κυττάρων προκαλώντας κυτταρική βλάβη. Για το λόγο αυτό βρίσκονται συνδεδεμένα με πρωτεΐνες και δεν κυκλοφορούν ελεύθερα ως ιόντα. Πρωτεΐνες δέσμευσης χαλκού και σιδήρου είναι για παράδειγμα η φερριτίνη η οποία δεσμεύει το σίδηρο, η σερουλοπλασμίνη η οποία δεσμεύει το χαλκό, η τρανσφερίνη και η αλβουμίνη η οποία δεσμεύει σίδηρο και χαλκό, οι οποίες αποτελούν μέρος του αντιοξειδωτικού συστήματος άμυνας του οργανισμού. [4] Οι μεταλλοθειονίνες είναι μια ομάδα πρωτεϊνών πλούσιων σε κατάλοιπα κυστεΐνης οι οποίες έχουν την ιδιότητα να συνδέουν διαφορετικά ιόντα μετάλλων. Έχουν ιδιαίτερη σημασία στην αντιμετώπιση της τοξικότητας των μετάλλων όπως ο χαλκός. [19]

1.5 Τι είναι οξειδωτικό στρες και πως δημιουργείται

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού με δράσεις ευεργετικές ή βλαπτικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς. Οι ευεργετικές τους δράσεις παρατηρούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και περιλαμβάνουν τη συμμετοχή τους στην άμυνα του οργανισμού για την καταπολέμηση των παθογόνων μικροοργανισμών από τα φαγοκύτταρα, στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στην μεταγωγή σήματος, στην έκφραση γονιδίων, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή και στην απόπτωση. Οι βλαπτικές δράσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου και αζώτου, παρατηρούνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις και είναι γνωστές ως οξειδωτικό στρες. [4,19]

Οξειδωτικό στρες ορίζεται ως η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προ-οξειδωτικών και αντι-οξειδωτικών μορίων υπέρ των προ-οξειδωτικών που οδηγεί σε βλάβη. (Bonomini) Το οξειδωτικό στρες συμβαίνει στα βιολογικά συστήματα όταν υπάρχει υπερπαραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου/αζώτου ή σε ανεπάρκεια ή αυξημένη απώλεια ενζυμικών ή μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών. [19]

Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων όπως η νόσος Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον, καρκίνος, άσθμα, αρτηριοσκλήρωση, νευροεκφυλιστική νόσος, υπέρταση, διαβήτης, ρευματοειδής αρθρίτιδα, γλαύκωμα καθώς και στη διεργασία της γήρανσης μεταξύ άλλων. [39]



ΣΧΗΜΑ 2. Η ανισορροπία αντιοξειδωτικών/προοξειδωτικών οδηγεί σε ανάπτυξη οξειδωτικού στρες

1.6 Δείκτες οξειδωτικού στρες

Κατά την υπεροξειδωση των λιπιδίων, την οξειδωτική βλάβη στο DNA και στις πρωτεΐνες παράγεται ποικιλία υποβαθμισμένων προϊόντων τα οποία χρησιμοποιούνται ως δείκτες για την εκτίμηση της οξειδωτικής βλάβης αλλά και του βαθμού προστασίας που παρέχουν τα αντιοξειδωτικά. [4] Ως δείκτης οξειδωτικού στρες επομένως ορίζεται ένα βιολογικό μόριο του οποίου η χημική δομή έχει τροποποιηθεί από δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου. Η μέτρηση των δεικτών αυτών μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη παθολογικών καταστάσεων αλλά και στο σχεδιασμό παρεμβάσεων ανάλογα με το στάδιο της οξειδωτικής βλάβης. [11]

Επιπρόσθετα τα αντιοξειδωτικά συστατικά στο αίμα όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, το β-καροτένιο και η γλουταθειόνη, καθώς και η ενεργότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων πχ SOD, μπορούν να μετρηθούν άμεσα για τον υπολογισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας του αίματος.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι μέτρησης των δεικτών οξειδωτικού στρες, των αντιοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών ενζύμων που εφαρμόζονται κυρίως στον ορό, το πλάσμα και τα ούρα. Οι κυριότεροι δείκτες περιγράφονται παρακάτω. [4]

1.6.1 Μέτρηση προϊόντων οξείδωσης μακρομορίων

Δείκτες υπεροξειδωσης λιποειδών:

➤ TBARS

Αποτελούν την παλαιότερη αλλά και την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τη μέτρηση του τελικού προϊόντος της υπεροξειδωσης των λιποειδών, μαλονδιαλδεΐδης (MDA). Σύμφωνα με τη μέθοδο η MDA σχηματίζει σύμπλοκο με δύο μόρια θειοβαρβιτουρικού οξέος και η ένωση αυτή απορροφά στα 532-535nm. Λαμβάνεται βιολογικό δείγμα το οποίο περιλαμβάνει θειοβαρβιτουρικό, τριχλωροοξικό και υδροχλωρικό οξύ, και έπειτα θερμαίνεται στους 50 °C για 20 λεπτά. Στη συνέχεια αφού κρυώσει μετράται η απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο και οι τιμές απορρόφησης είναι ανάλογες της συγκέντρωσης MDA. Ένα από τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι στο δείγμα υπάρχουν συστατικά τα οποία μπορούν και αυτά να αντιδράσουν με το αντιδραστήριο όπως για παράδειγμα άλλες αλδεΐδες, και έτσι να οδηγήσουν σε υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης σε MDA. [4]

➤ Προσδιορισμός MDA με HPLC

Επειδή η μέτρηση της MDA με τα TBARS δεν είναι τόσο ακριβής χρησιμοποιούνται πιο ευαίσθητες μέθοδοι όπως η HPLC, όπου μπορεί να γίνει διαχωρισμός της MDA από τα υπόλοιπα συστατικά με αποτέλεσμα πιο ακριβής μετρήσεις για τη συγκέντρωση της MDA. [11]

➤ F2-ισοπροστάνιο

Τα ισοπροστάνια παράγονται από τη μη ενζυματική οξείδωση του αραχιδονικού οξέος από ROS. Το αραχιδονικό οξύ έχει 4 διπλούς δεσμούς και έτσι ανάλογα με το που προστίθεται το μόριο του οξυγόνου από τις ROS στο αραχιδονικό σχηματίζονται πολλές σειρές

ισοπροστανίων όπου η κάθε σειρά μπορεί να έχει 16 στερεοϊσομερή. Συνολικά σχηματίζονται 64 ισομερή ισοπροστανίων από την οξείδωση του αραχιδονικού οξέος.

Από τα ισοπροστάνια το F2-ισοπροστάνιο χρησιμοποιείται συνήθως ως δείκτης οξειδωτικού στρες *in vivo*. Μπορεί να μετρηθεί είτε από δείγμα ούρων είτε από πλάσμα μέσω 3 μεθόδων, ELISA, αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοφωτομετρία μάζας και με υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματοφωτομετρία μάζας. Από αυτές η μέθοδος ELISA θεωρείται η λιγότερο ευαίσθητη και ειδική. [4,16]

➤ Συζυγή διένια

Η αποδιάταξη των διπλών δεσμών στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα από την λιπιδειδική ρίζα οδηγεί στο σχηματισμό συζυγών διενίων τα οποία αποτελούν σημαντικό δείκτη οξειδωτικού στρες. Για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιείται φασματοφωτομετρική μέθοδος όπου μετράται η απορρόφηση στα 233nm η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης σε συζυγή διένια. [4,16]

➤ Ox-LDL

Σημαντικός βιοδείκτης οξειδωτικού στρες που συνδέεται άμεσα με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Για τον προσδιορισμό της χρησιμοποιούνται ανοσολογικές μέθοδοι πχ ELISA. [4]

Άλλες μέθοδοι περιλαμβάνουν την έκθεση απομονωμένης LDL σε ιόντα Cu^{2+} *in vitro*, όπου παράγεται συζευγμένο διένιο που απορροφά στα 234nm. Σε υψηλές συγκεντρώσεις παρατηρείται καθυστέρηση της οξείδωσης (lag time), η οποία αποτελεί μέτρο της αντίστασης της LDL στην οξείδωση. Ωστόσο η μέθοδος αυτή δε λαμβάνει υπόψη της αντιοξειδωτικούς και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την οξείδωση της LDL *in vivo*. [42]

Δείκτες οξείδωσης DNA

➤ 8-OHdG

Η 8-OH-2'-δεοξυγουανοσίνη (8-OHdG) είναι ο δείκτης που χρησιμοποιείται συνήθως για τη μέτρηση του οξειδωτικά τροποποιημένου DNA. Αποτελεί προϊόν της οξειδωτικά τροποποιημένης βάσης του DNA γουανίνης. Για τη μέτρηση των επιπέδων της στον οργανισμό μπορούν να χρησιμοποιηθούν ορός, πλάσμα, ούρα και ιστοί. Οι κυριότερες μέθοδοι μέτρησης σε βιολογικά δείγματα είναι ανοσολογικές (πχ ELISA) και χρωματογραφικές (πχ HPLC). Από αυτές η HPLC είναι η μέθοδος με τη μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία αλλά επειδή είναι πολύ χρονοβόρα και πολύπλοκη στην κλινική πράξη χρησιμοποιείται πιο συχνά η μέθοδος ELISA.

Η μέτρηση της 8-OHdG στα ούρα έχει βρεθεί ότι αντικατοπτρίζει το σύνολο της οξειδωτικής βλάβης στο σώμα. [4,48]

Δείκτες οξειδωσης πρωτεϊνών

➤ Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Ο σχηματισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μπορεί να γίνει με α) άμεση οξειδωση πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων (πχ λυσίνης, θρεονίνης, αργινίνης, προλίνης), β) με εισαγωγή μιας ομάδας καρβονυλίου στις πρωτεΐνες λόγω αντίδρασης με αλδεΐδες προϊόντα υπεροξειδωσης λιπιδίων ή γ) λόγω αντιδράσεων γλυκοζυλίωσης ή γλυκοοξειδωσης.

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια κυκλοφορούν στο αίμα για μεγάλο χρονικό διάστημα, σε σύγκριση με άλλα προϊόντα οξειδωσης, και έτσι αποτελούν κατάλληλους δείκτες οξειδωσης των πρωτεϊνών. [4,19]

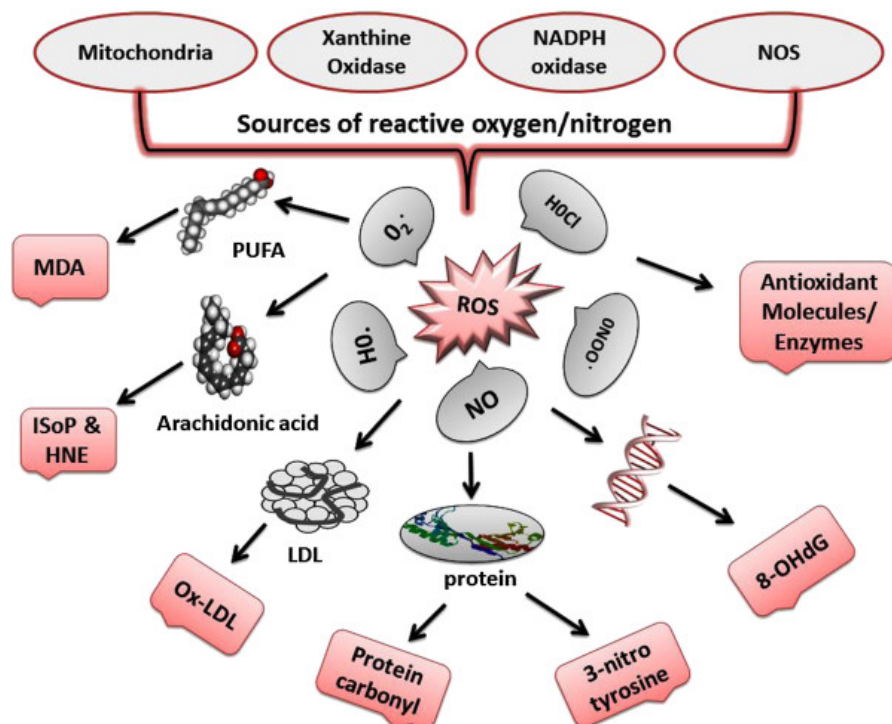
Ποικιλία μεθόδων είναι διαθέσιμες για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Αυτές περιλαμβάνουν φασματοφωτομετρικές, την HPLC και την ELISA. Ωστόσο καμία από αυτές τις μεθόδους δε μπορεί να προσδιορίσει ποια αμινοξέα έχουν υποστεί οξειδωτική βλάβη και ποια είναι η πρωτεΐνη που έχει τροποποιηθεί. [48]

1.6.2 Μέτρηση δραστηρότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων

Η μέτρηση της δραστηρότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων όπως η GPx, SOD, CAT αποτελεί μέτρο της αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους και βοηθά στην αξιολόγηση του αμυντικού συστήματος του οργανισμού. Για τη μέτρηση της ενεργότητας τους στον ορό ή το πλάσμα με υψηλή ακρίβεια είναι διαθέσιμα στο εμπόριο φασματοφωτομετρικά και φθορισμομετρικά κιτ. [4]

1.6.3 Μέτρηση αντιοξειδωτικών

Κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες τα μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά όπως η γλουταθειόνη και οι αντιοξειδωτικές βιταμίνες (βιταμίνη E, C, καροτενοειδή) καταναλώνονται και έτσι τα επίπεδα τους στο αίμα μειώνονται. Έτσι η μέτρησή τους αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της κατάστασης οξειδωτικού στρες στο σώμα. Όπως και στα αντιοξειδωτικά ένζυμα υπάρχουν διαθέσιμα κιτ για την ανάλυση της γλουταθειόνης και των αντιοξειδωτικών βιταμινών. Ωστόσο χρωματογραφικές μέθοδοι (πχ HPLC) έχουν μεγαλύτερη ακρίβεια κατα τη μέτρηση της α-τοκοφερόλης, ρετινόλης και β- καροτενίου. Για την ανάλυση της βιταμίνης C στον ορό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και φασματοφθορισμομετρική μέθοδος. [4,48]



ΣΧΗΜΑ 3. Δείκτες οξειδωτικού στρες

Κεφάλαιο 2^ο- Κλινική σημασία οξειδωτικού στρες

Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία διαφόρων παθολογικών καταστάσεων οι οποίες περιλαμβάνουν την αθηροσκλήρωση, τη στεφανιαία νόσο, καρκίνο, νευρολογικές διαταραχές, διαβήτη, αρτηριακή υπέρταση, παγκρεατίτιδα, καρδιακή ανεπάρκεια, το σύνδρομο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, τη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος, την προεκλαμψία, ρευματοειδή αρθρίτιδα, το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (AIDS), γλαύκωμα καθώς και στη διεργασία της γήρανσης. [19,39,58]

Οξειδωτικό στρες και καρκίνος

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε κακοήγη μετασχηματισμό των κυττάρων. Πολλοί τύποι καρκίνου συνδέονται με το οξειδωτικό στρες όπως ο καρκίνος του μαστού, των πνευμόνων, των ωοθηκών και η λευχαιμία. (book) Δύο μηχανισμοί φαίνεται να εμπλέκονται στην οξειδωτική βλάβη και στην ανάπτυξη της καρκινογένεσης. Ο πρώτος αφορά στην γονιδιακή έκφραση και ο δεύτερος αφορά τις γενετικές αλλαγές που επάγονται από τις δραστικές μορφές όπως είναι οι μεταλλάξεις και χρωμοσωμικοί ανασυνδιασμοί που παίζουν ρόλο στην έναρξη της καρκινογένεσης. Η αύξηση του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος μέσω της διατροφής και της άσκησης έχει οφέλη για την πρόληψη αλλά και την θεραπεία του καρκίνου. [4,19]

Οξειδωτικό στρες και σακχαρώδη διαβήτη

Ολοένα και περισσότερες ενδείξεις από κλινικές μελέτες δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση και των δύο τύπων σακχαρώδη διαβήτη (τύπου I και τύπου II). Υψηλά επίπεδα ROS και μείωση του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος μπορεί να οδηγήσει σε αντίσταση στην ινσουλίνη και σε εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη. Επίσης αυξημένα επίπεδα γλυκόζης σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή ROS οι οποίες μπορούν να προωθήσουν την εμφάνιση των επιπλοκών του διαβήτη. Ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη έχουν ασυνήθιστα αυξημένα επίπεδα δεικτών του οξειδωτικού στρες στον ορό, τα ούρα και σε άλλα σωματικά υγρά. [4,32]

Οξειδωτικό στρες και νευροεκφυλιστικές νόσοι

Το οξειδωτικό στρες συνδέεται άμεσα με τις νευροεκφυλιστικές νόσους (πχ νόσος Alzheimer, Parkinson και Huntington), οι οποίες εμφανίζονται κυρίως στον πληθυσμό των ηλικιωμένων. Το κεντρικό νευρικό σύστημα είναι ιδιαίτερα ευάλωτο στις οξειδωτικές βλάβες λόγω της υψηλής χρησιμοποίησης οξυγόνου, των υψηλών επιπέδων πολυακόρεστων λιπιδίων στις κυτταρικές μεμβράνες των νευρώνων, της παρουσίας οξειδοαναγωγικών δραστικών μετάλλων (πχ Cu, Fe) και του φτωχού αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος των κυττάρων αυτών. Επιπρόσθετα οι νευρώνες είναι μεταμιτωτικά κύτταρα, τα οποία σταδιακά με την πάροδο του χρόνου συσσωρεύουν οξειδωτική βλάβη με αποτέλεσμα η βλάβη στη δομή και

τη λειτουργία τους από το οξειδωτικό στρες να αυξάνεται όσο αυξάνεται η ηλικία και επομένως η εμφάνιση νευροεκφυλιστικών ασθενειών να συμβαίνει πιο συχνά σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Παράλληλα η νευροφλεγμονώδης διαδικασία που επάγεται εν μέρη από προφλεγμονώδης κυτταροκίνες, ενισχύει τα επίπεδα δραστικών μορφών αζώτου και οξυγόνου που έχουν νευροτοξικές ιδιότητες. [4,23,58]

Οξειδωτικό στρες και υπέρταση

Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην παθογένεια της υπέρτασης. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι άτομα με ιδιοπαθή υπέρταση εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ανιόντος υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, καθώς και μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών. Τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης E, γλουταθειόνης, SOD και η αυξημένη ενεργοποίηση της αγγειακής NADPH οξειδάσης, φαίνεται να ευθύνονται για το οξειδωτικό στρες που παρατηρείται στα υπέρταστα άτομα. [19]

Οξειδωτικό στρες και αθηροσκλήρωση

Η αθηροσκλήρωση αποτελεί το βασικό παθοφυσιολογικό μηχανισμό της πλειοψηφίας των καρδιαγγειακών νοσημάτων. [61] Πρόκειται για μια προοδευτική ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από περιοχές ινώδους πάχυνσης του αρτηριακού τοιχώματος που συνοδεύονται από πλάκες λιπιδίων. [4] Θεωρείται ως μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος και συνδέεται με πολλούς παράγοντες κινδύνου όπως είναι ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, το κάπνισμα, η ηλικία και η υπερλιπιδαιμία. Οι παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρωση όπως η υπερλιπιδαιμία, μπορούν να αυξήσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και από τα λεία μυϊκά κύτταρα (SMC) αυξάνοντας έτσι το οξειδωτικό στρες στα αγγεία. [61] Το οξειδωτικό στρες επιδρά στην αγγειακή λειτουργία με μια σειρά από παθογενετικούς μηχανισμούς οι οποίοι περιγράφονται παρακάτω.

Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου αποτελεί αρχικό στάδιο για την αθηρογένεση και επηρεάζεται από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου. Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σχετίζεται με αυξημένο πάχος του αγγειακού τοιχώματος που προκαλείται από εναπόθεση λίπους (πλάκες λιπιδίων) σε περιοχές μέσα στο τοίχωμα των στεφανιαίων αρτηριών. Η αυξημένη αγγειακή παραγωγή ROS ευθύνεται για την οξείδωση της LDL χοληστερόλης η οποία μετατρέπεται σε ox-LDL. Κατά την οξείδωση της LDL παράγονται οξειδωμένα φωσφολιπιδίδια και ο PAF τα οποία έχουν έντονη αθηρογόνο δράση. Τα κλινικά στοιχεία δείχνουν ότι τα προϊόντα οξείδωσης των φωσφολιπιδίων (ox-PLs) και ο PAF κατέχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης. Τα ox-PLs φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα αιμοπετάλια, τα λεία μυϊκά κύτταρα και με την HDL προάγοντας την αθηροσκλήρωση. [12]

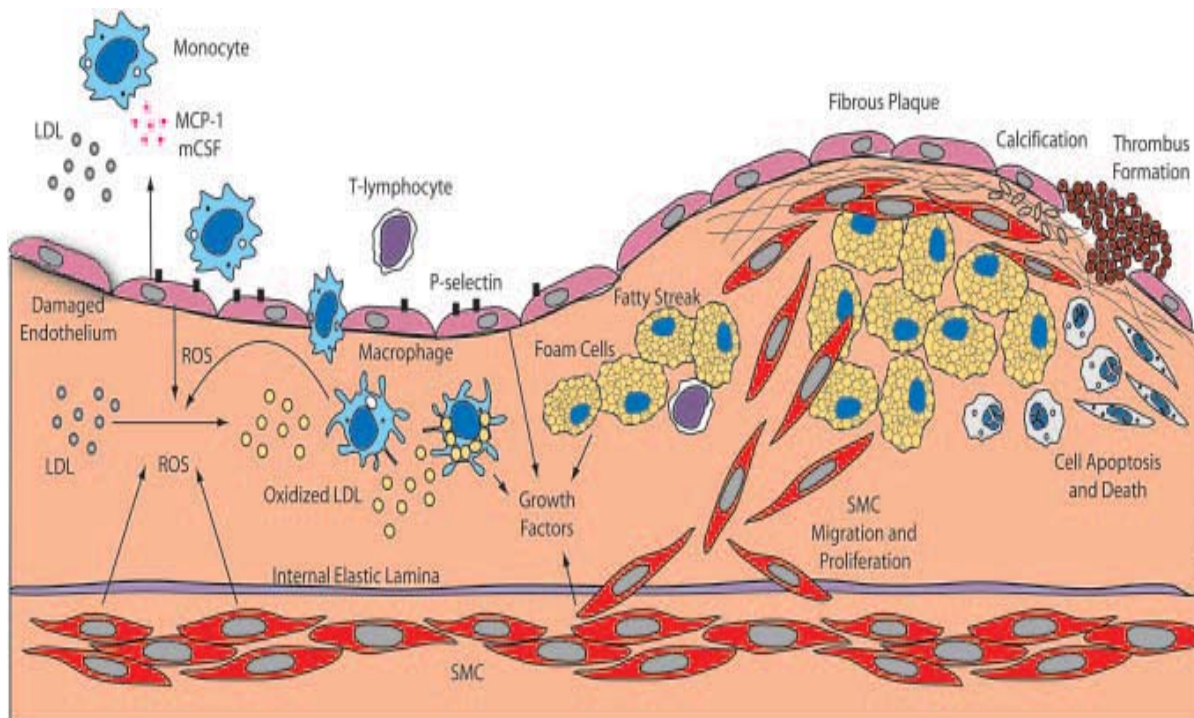
Πηγές των ενεργών μορφών στα αγγεία περιλαμβάνουν την οξειδάση της ξανθίνης, τη λιπooξυγονάση, τη NADPH οξειδάση και την NOS. Έχει αποδειχθεί ότι η μεταφορά ox-LDL από το ενδοθήλιο μέσα στο αγγειακό τοίχωμα είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της πλάκας των λιπιδίων γι' αυτό και πιστεύεται ότι η ox-LDL έχει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της

αθηροσκλήρωσης. Η ox-LDL συγκεκριμένα προκαλεί άθροιση εστέρων χοληστερόλης στα μακροφάγα και έχει ενοχοποιηθεί και σε άλλους μηχανισμούς που πιθανόν να εμπλέκονται στην αθηροσκλήρωση όπως κυτταροτοξικές ή χημειοτακτικές δράσεις στα μονοκύτταρα και αναστολή της κινητικότητας των μακροφάγων. Επίσης, θεωρείται υπεύθυνη για την αύξηση της έκφρασης μορίων προσκόλλησης, η οποία οδηγεί σε προσκόλληση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, πχ μονοκυττάρων, μακροφάγων, T- λεμφοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Αυτή η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου οδηγεί στην απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτταροκινών, ιντερλευκινών, ιντερφερόνης και χημειοτακτικών παραγόντων. Το ενδοθήλιο γίνεται διαπερατό στα λιπίδια και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού με αποτέλεσμα τα μακροφάγα να φαγοκυτταρώνουν την ox-LDL και να μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Επιπρόσθετα προάγει την απελευθέρωση της ιντερλευκίνης-1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μακροφάγα. Έχει προφλεγμονώδη και ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες και είναι ικανή να προκαλέσει ακόμα και τον κυτταρικό θάνατο. [4,19] Ωστόσο η ox-LDL από μόνη της δεν μπορεί να εξηγήσει ολόκληρο τον μηχανισμό που συνδέει το οξειδωτικό στρες με την αθηροσκλήρωση.

Ένας άλλος μηχανισμός εμπλέκει την ox-LDL και το μονοξείδιο του αζώτου NO γιατί η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που οδηγεί όπως έχει αναφερθεί σε αθηροσκλήρωση χαρακτηρίζεται από μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα σε NO. Τα φυσιολογικά επίπεδα NO στα αγγεία προωθούν την αγγειοδιαστολή και αναστέλλουν τη δράση των κυτοκινών αλλά και την έκφραση μορίων προσκόλλησης που σχετίζονται με την αθηροσκληρωτική διαδικασία. Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προκαλούν άμεση μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO γιατί το ανιόν υπεροξειδίου αντιδρά με το NO σχηματίζοντας υπεροξυνιτρώδες ανιόν, μια άλλη δραστική μορφή αζώτου. Οι ROS και το υπεροξυνιτρώδες ανιόν μπορούν και οξειδώνουν την τετραϋδροβιοπτερίνη, συμπαραάγοντα της ενδοθηλιακής NO συνθάσης. Η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα NO που προκύπτει μπορεί να προκαλέσει αγγειοσυστολή, συσσώρευση αιμοπεταλίων και προσκόλληση ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο. [4]

Επιπρόσθετα το οξειδωτικό στρες κυρίως μέσω του H_2O_2 μπορεί να αυξήσει τη φωσφορυλίωση της κινάσης της τυροσίνης γεγονός που οδηγεί σε πιο ισχυρή δέσμευση των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο και σε μεταβολή της διαπερατότητας των αγγείων. Επίσης προάγει την παραγωγή μεταγραφικών παραγόντων όπως ο πυρηνικός παράγοντας NF-κB και τη πρωτεΐνη ενεργοποίησης -1 (AP-1) που συμμετέχουν στην έκφραση των μορίων προσκόλλησης όπως είναι αγγειακά μόρια κυτταρικής προσκόλλησης (VCAM-1), μόρια ενδοκυτταρικής προσκόλλησης (ICAM-1), E- σελεκτίνης και άλλων κυτοκινών. [61]

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η αθηροσκλήρωση είναι μία νόσος που συνδέεται ισχυρά με το οξειδωτικό στρες. Έχει φανεί ότι οι βιταμίνες C και E όπως επίσης και άλλα αντιοξειδωτικά, μπορούν να αναστείλουν τη διαδικασία οξείδωσης για την πρόληψη των αρτηριοσκληρωτικών αλλοιώσεων. [4]



ΣΧΗΜΑ 4. Ο σχηματισμός και η ανάπτυξη της αθηροσκληρωτικής πλάκας

Κεφάλαιο 3^ο- Διατροφή, συμπληρώματα και οξειδωτικό στρες

3.1 Εξωγενή αντιοξειδωτικά- Αντιοξειδωτικά της διατροφής

Παρόλο που τα ενδογενή αντιοξειδωτικά του σώματος είναι πολύ αποτελεσματικά εντούτοις δεν είναι επαρκή. Έτσι είναι απαραίτητη η πρόσληψη εξωγενών αντιοξειδωτικών από τη διατροφή για την ενίσχυση του αντιοξειδωτικού αμυντικού συστήματος του οργανισμού. [6] Κύριες πηγές των αντιοξειδωτικών της διατροφής του ανθρώπου αποτελούν τα φυτικής προέλευσης τρόφιμα και ποτά, όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, τα μπαχαρικά (κανέλλα, κουρκουμάς), το τσάι, ο καφές, η σοκολάτα, οι ξηροί καρποί, τα βότανα και το κόκκινο κρασί. Τα πιο γνωστά αντιοξειδωτικά της διατροφής είναι οι αντιοξειδωτικές βιταμίνες, βιταμίνη C, β- καροτένιο (βιταμίνη A) και βιταμίνη E. Εκτός από αυτά χιλιάδες αντιοξειδωτικές ενώσεις βρίσκονται στα φυτά και είναι γνωστές ως φυτοχημικά. [4] Η ισορροπημένη διατροφή πλούσια σε ποικιλία φυτικής προέλευσης τροφίμων και ποτών συνδέεται με προώθηση της υγείας και με μείωση του κινδύνου για διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. [6] Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά της διατροφής, οι πηγές και ο ρόλος τους στον οργανισμό περιγράφονται παρακάτω.

Βιταμίνη C- Ασκορβικό οξύ

Τα περισσότερα ζώα μπορούν να συνθέσουν ασκορβικό οξύ από γλυκόζη, αλλά στους ανθρώπους απουσιάζει ένα ένζυμο (οξειδάση της γουλονολακτόνης) που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση και έτσι εξαρτάται από την πρόσληψη μέσω της διατροφής. [51] Είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και συναντάται στα φρούτα (κυρίως εσπεριδοειδή, ακτινίδιο, φράουλες) και τα λαχανικά (λαχανάκια Βρυξελλών, μπρόκολο, ντομάτες, σπανάκι).

Η βιταμίνη C χαρακτηρίζεται ως η μοναδική υδατοδιαλυτή βιταμίνη. Αποτελεί συμπαράγοντα πολλών ενζύμων σε αντιδράσεις υδροξυλίωσης και έτσι συμμετέχει στην σύνθεση κολλαγόνου, καρνιτίνης και πολλών νευροδιαβιβαστών πχ νορεπινεφρίνη, σεροτονίνη, και συμβάλλει στη φυσιολογική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον παρουσιάζει αντιοξειδωτική δράση. Λειτουργεί ως αναγωγικός παράγοντας ή δότης ηλεκτρονίων σε υδατικά διαλύματα όπως είναι το αίμα και το εσωτερικό των κυττάρων εξουδετερώνοντας ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου όπως οι ρίζες υδροξυλίου, υπεροξειδίου του υδρογόνου κ.α. Το ασκορβικό οξύ (AH₂) χρησιμοποιείται για την αναγέννηση της βιταμίνης E (α- τοκοφερόλης) από τη ρίζα της E⁻ και σε αυτή τη διαδικασία παράγεται η ρίζα ασκορβικού οξέος (AH⁻) η οποία πρέπει να αναγεννηθεί. Η αναγέννηση της βιταμίνης C γίνεται από το NADH(νιασίνη), το διϋδρόλιποϊκό οξύ, τη γλουταθειόνη και τηνθειορεδοξίνη. [25,4]

Εντούτοις παρά την αντιοξειδωτική της δράση η βιταμίνη C μπορεί να δρα και ως προοξειδωτικός παράγοντας ανάγοντας μεταβατικά μέταλλα όπως τα ιόντα χαλκού και σιδήρου τα οποία στη συνέχεια συμμετέχουν στην παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου μέσω της αντίδρασης Fenton. Ωστόσο υπάρχουν αποδείξεις ότι η δράση του ασκορβικού οξέος ως προοξειδωτικό δεν παρατηρείται in vivo αλλά γενικά προστατεύει βιολογικά μόρια από την οξείδωση ακόμη και μετά από τη λήψη συμπληρωμάτων σιδήρου. [51] Η ισχυρή αντιοξειδωτική της δράση είναι έκδηλη στους πνεύμονες και στο φακό του ματιού. [19]

Βιταμίνη Ε

Η βιταμίνη Ε είναι λιποδιαλυτή και απαντά σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Από αυτές η α-τοκοφερόλη είναι η πιο δραστική μορφή της βιταμίνης. Αποτελεί το πιο ισχυρό φυσικό αντιοξειδωτικό με κύρια αντιοξειδωτική δράση την προστασία των κυτταρικών μεμβρανών και λιποπρωτεϊνών του πλάσματος από την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Φαίνεται ότι το ασκορβικό οξύ και η βιταμίνη Ε λειτουργούν μαζί ως αντιοξειδωτικές ουσίες σε μια κυκλικού τύπου αντίδραση. [19]

Κατα την αντιοξειδωτική αντίδραση η α-τοκοφερόλη παρέχει το φαινολικό της υδρογόνο σε ένα λιπίδιο ή μια λιποειδική ή μη λιποειδική ρίζα υπεροξειδίου τερματίζοντας έτσι αλυσιδωτές αντιδράσεις οξείδωσης, και η ίδια μετατρέπεται σε ρίζα τοκοφερόλης η οποία στη συνέχεια αναγεννάται με τη βοήθεια της βιταμίνης C, της ουβικινόνης και της γλουταθειόνης.

Η α-τοκοφερόλη είναι απαραίτητη για την υγεία και μπορεί να προστατεύσει από καρδιαγγειακά, καρκίνο και άλλες παθήσεις. Η βιταμίνη Ε βρίσκεται τόσο σε φυτικά (πχ ελαιόλαδο, ηλιέλαιο) αλλά και σε ζωικά τρόφιμα (πχ κρέας, ψάρι, αυγό). [4]

Φυτοχημικά

Χημικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση που βρίσκονται σε φυτικής προέλευσης τρόφιμα. Οι κυριότερες από αυτές είναι οι φαινολικές ενώσεις τα καροτενοειδή και φυτοστερόλες.

- Φαινολικές ενώσεις

Πρόκειται για αρωματικές ενώσεις, φυσικά αντιοξειδωτικά τα οποία βρίσκονται σε φυτικά τρόφιμα. Τροφές πλούσιες σε φαινολικές ενώσεις είναι το τσάι, ο καφές, η σοκολάτα, το κακάο, οι ελιές, το σπανάκι και φρούτα όπως οι φράουλες και τα βατόμουρα. Οι φαινολικές ενώσεις ανάλογα με τη χημική τους δομή χωρίζονται σε φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, στυλβένια, κουμαρίνες και τανίνες. Τα φλαβονοειδή αποτελούν τη σημαντικότερη ομάδα των πολυφαινολών με περισσότερες από 4000 ενώσεις οι οποίες μπορούν να υποδιαιρεθούν σε 13 κατηγορίες. Το κοινό τους δομικό χαρακτηριστικό είναι η ομάδα διφαινυλοπρωπανίου. Στην ομάδα των φαινολικών οξέων ανήκει το καφεϊκό οξύ που βρίσκεται στον καφέ. Από τα στυλβένια η πιο σημαντική ουσία είναι η ρεσβερατρόλη που βρίσκεται στα σταφύλια και το κόκκινο κρασί. [4] Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών ενώσεων οφείλεται στην ικανότητά τους α) να αναστέλλουν οξειδωτικά ένζυμα, β) να δεσμεύουν ιόντα μετάλλων και γ) να δρουν ως δότες ηλεκτρονίων αναστέλλοντας έτσι αλυσιδωτές αντιδράσεις. Παρουσιάζουν ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου οι οποίες περιλαμβάνουν την θεραπεία και την πρόληψη του καρκίνου, την πρόληψη στην εμφάνιση καρδιαγγειακών και άλλων παθολογικών διαταραχών. Εμφανίζουν όμως και προοξειδωτικό χαρακτήρα. [59]

- Καροτενοειδή

Όπως και η βιταμίνη Ε τα καροτενοειδή είναι λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά που βρίσκονται κυρίως στις μεμβράνες των ιστών. Πρόκειται για χρωστικές ουσίες, πρόδρομα μόρια της βιταμίνης Α, που βρίσκονται κυρίως στα φυτά και σε μικροοργανισμούς. Είναι υπεύθυνα για το ερυθρό, το κίτρινο και το πορτοκαλί χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Στη φύση συναντούμε πάνω από 600 καροτενοειδή από τα οποία το πιο γνωστό είναι το β-καροτένιο.

Άλλα σημαντικά καροτενοειδή είναι το λυκοπένιο (βρίσκεται στις ντομάτες), η λουτεΐνη, η β-κρυπτοξανθίνη, και η ζεαξανθίνη. [4]

Η αντιοξειδωτική δράση των καροτενοειδών οφείλεται στο σύστημα συζευγμένων διπλών δεσμών στη δομή τους που τους δίνει την ικανότητα να μεταφέρουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια, εξουδετερώνοντας έτσι ελεύθερες ρίζες όπως ρίζες υδροξυλίου, μονήρες οξυγόνο, οργανικά υπεροξειδία, και ρίζες ανιόντος υπεροξειδίου. Γενικά προτείνονται τρεις μηχανισμοί για τις αντιδράσεις των καροτενοειδών με τις ελεύθερες ρίζες: α) προσθήκη ρίζας, β) αφαίρεση υδρογόνου από τα καροτενοειδή και γ) αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων. [59] Το β-καροτένιο και το λυκοπένιο έχουν εξαιρετική ικανότητα την άμεση εξουδετέρωση μονήρες οξυγόνου στα μεμβρανικά συστήματα. Μπορούν να απορροφήσουν ενέργεια από το μονήρες οξυγόνο χωρίς να υποστούν καμιά χημική μετατροπή με την ταυτόχρονη επιστροφή του διεγερμένου οξυγόνου στην αρχική του κατάσταση. Τα καροτενοειδή στη συνέχεια απελευθερώνουν ενέργεια υπο τη μορφή θερμότητας και δε χρειάζεται να αναγεννηθούν. Το λυκοπένιο φαίνεται να είναι περισσότερο αποτελεσματικό στη εξουδετέρωση του μονήρους οξυγόνου από το β-καροτένιο, ενώ. [4]

Σε επαρκώς υψηλές συγκεντρώσεις τα καροτενοειδή μπορούν να προστατεύσουν τα λιπίδια των μεμβρανών από υπεροξειδική βλάβη. Εντούτοις έρευνες δείχνουν ότι πιθανό τα καροτενοειδή να έχουν προοξειδωτική δράση σε υψηλές συγκεντρώσεις και κάτω από υψηλές πιέσεις οξυγόνου. [59]

Σελήνιο

Η αντιοξειδωτική δράση του σεληνίου συνδέεται με την παρουσία του ως συμπαραγοντας στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και αναγωγή της θειορεδοξίνης που βοηθούν στην προστασία του DNA και άλλων κυτταρικών συστατικών από την οξειδωτική βλάβη. Βρίσκεται κυρίως σε ζωικά τρόφιμα (πχ εντόσθια) αλλά και σε φυτικά (πχ δημητριακά). Η συγκέντρωση του σεληνίου στο έδαφος διαφέρει από περιοχή σε περιοχή περισσότερο από κάθε άλλο απαραίτητο ιχνοστοιχείο. [4]

3.2 Συμπληρώματα διατροφής με αντιοξειδωτικές ενώσεις

Τα συμπληρώματα αντιοξειδωτικών φαίνεται να συνδέονται με βελτίωση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού και είναι αποδεκτά ως μέσο για την πρόληψη ασθενειών που συνδέονται με το οξειδωτικό στρες. [2] Περιλαμβάνουν συνήθως αντιοξειδωτικές βιταμίνες (βιταμίνη C, βιταμίνη E και β-καροτένιο), διάφορα βότανα με αντιοξειδωτική δράση (πχ ginseng, ginko biloba), αντιοξειδωτικές ουσίες φυτικών τροφίμων με αντιοξειδωτική δράση (πχ λυκοπένιο, ρεσβερατρόλη) όπως και άλλα αντιοξειδωτικά συστατικά (πχ συνένζυμο Q, μελατονίνη, γλουταθειόνη). [4]

- Κλινικές μελέτες με συμπληρώματα αντιοξειδωτικών

Πιστεύεται ότι η λήψη συμπληρωμάτων με συνδυασμό αντιοξειδωτικών συστατικών είναι πιο αποτελεσματικά στη μείωση του οξειδωτικού στρες σε σχέση με τη λήψη μιας μόνο ουσίας γιατί φαίνεται να έχουν μια συνεργιστική δράση. Ωστόσο πολλές μελέτες δείχνουν ότι άτομα με χρόνιες νόσους μπορεί να επωφεληθούν από συμπληρώματα ενώ για τον υγιή πληθυσμό δεν έχουν πάντα ευεργετικά αποτελέσματα. [4] Παρακάτω γίνεται μια

μικρή ανασκόπηση σε κλινικές μελέτες που μελέτησαν την επίδραση μίγματος αντιοξειδωτικών σε δείκτες οξειδωτικού στρες. Η αναζήτηση τους πραγματοποιήθηκε από το Pub Med.

<u>ΣΥΓΓΡΑΦΕΑΣ/ ΑΝΑΦΟΡΑ</u>	<u>ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ</u>	<u>N</u>	<u>ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ</u>	<u>ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ</u>	<u>ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΠΟΥ ΜΕΤΡΗΘΗΚΑΝ</u>	<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</u>
<i>Jacob et al, 2003</i> [29]	Υγιείς άντρες ηλικίας 20-51 (39 μη καπνιστές και 38 καπνιστές	77	Συμπληρωματική χορήγηση αντιοξειδωτικών ή εικονικού για 90 μέρες	272 mg βιταμίνης C 31 mg βιταμίνης E 400μg φυλλικού οξέος	F2-ισοπροστάνιο Πρωτεϊνικά καρβονύλια TBARS	Αύξηση ασκορβικού και α-τοκοφερόλης πλάσματος Μη στατιστικά σημαντική μείωση των δεικτών οξειδωτικής βλάβης
<i>Lucas Actis-Goretta et al, 2003</i> [2]	Υγιείς άντρες και γυναίκες ηλικίας 31-48 ετών, μη καπνιστές	16	Συμπληρωματική χορήγηση αντιοξειδωτικών ή εικονικού για 30 μέρες	Βιταμίνη E, β-καροτένιο, σελήνιο, συνένζυμο Q10	MDA, TBARS	Αύξηση α-τοκοφερόλης, β-καροτενίου και ουβικινόνης πλάσματος Στατιστικά σημαντική μείωση MDA και TBARS
<i>Marcelo Lima Ribeiro et al, 2007</i> [45]	Υγιείς άντρες και γυναίκες ηλικίας 45-70 ετών, μη καπνιστές	80	Τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή μελέτη με εικονικό φάρμακο Συμπληρωματική χορήγηση αντιοξειδωτικών ή εικονικού για 4 εβδομάδες	Βιταμίνη A, βιταμίνη E, βιταμίνη C Μίγμα βιταμινών και μετάλλων	Αντίσταση DNA λεμφοκυττάρων στο H2O2 (μέθοδος Comet)	Στατιστικά σημαντική μείωση της οξειδωτικής βλάβης στο DNA
<i>Accini et al, 2004</i> [1]	Εθελοντές με δυσλιπιδαιμία 23-65 ετών	57	Τυχαιοποιημένη μελέτη με εικονικό φάρμακο Συμπληρωματική χορήγηση αντιοξειδωτικών ή εικονικού για 4 μήνες	Βιταμίνη E, ω-3, γ-οριζανόλη, νιασίνη	Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (Total antioxidant Capacity, TAC)	Μείωση δυσλιπιδαιμίας, αύξηση α-τοκοφερόλης πλάσματος και μείωση δεικτών φλεγμονής (ιντερλευκίνη 1 και TNFα)
<i>Tarlovsky et al, 2011</i> [21]	Γυναίκες με καρκίνο του τραχήλου της μήτρας Σε ακτινοθεραπεία με σισπλατίνη	103	Τυφλή κλινική μελέτη	Β-καροτένιο, βιταμίνη E, βιταμίνη C	MDA, πρωτεϊνικά καρβονύλια	Στατιστικά σημαντική μείωση των δεικτών οξειδωτικού στρες αλλά δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αλλαγή στη συγκέντρωση αντιοξειδωτικών του πλάσματος
<i>Jane E. et al, 2000</i> [56]	Εθελοντές με ρυθμισμένο διαβήτη τύπου 2, κάτω των 75 ετών	57	Τυχαιοποιημένη μελέτη με εικονικό φάρμακο Συμπληρωματική χορήγηση αντιοξειδωτικών ή εικονικού για 4 εβδομάδες	Χυμός ντομάτας, βιταμίνη E, βιταμίνη C	Οξείδωση LDL με ιόντα χαλκού (lag time)	Αύξηση της αντίστασης στην οξείδωση της LDL. Αύξηση της συγκέντρωσης του πλάσματος σε λικοπένιο, ασκορβικό οξύ και α-τοκοφερόλη Μείωση CRP (C αντιδρώσα πρωτεΐνη)
<i>Castilla et al,</i>	Κλινικά σταθεροί	32	Συμπληρωματική χορήγηση	Χυμός κόκκινου σταφυλίου και	Δραστικότητα	Στην ομάδα με το συνδυασμό των δύο ουσιών παρατηρήθηκε

2008/[10]	ασθενείς σε αιμοδιάλυση 33-79 ετών		αντιοξειδωτικών ή εικονικού για 2 εβδομάδες	βιταμίνη E σε ή συνδυασμό ξεχωριστά	NADPH οξειδάσης Ox-LDL	μείωση της δραστηριότητας NADPH οξειδάσης και Ox-LDL του πλάσματος
Marion Dietrich et al, 2002[17]	Καπνιστές 20-78 ετών	126	Τυχαιοποιημένη, διπλά-τυφλή ελεγχόμενη, με εικονικό φάρμακο Συμπληρωματική χορήγηση αντιοξειδωτικών ή εικονικού για 2 μήνες	Βιταμίνη C ή συνδυασμός βιταμίνης C, βιταμίνης E και α-λιποϊκού οξέος	F2-ισοπροστάνιο	Στην ομάδα με το συμπλήρωμα βιταμίνης C παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του F2-ισοπροστανίου του πλάσματος
Jun Peng et al, 2000/[38]	Υγιείς εθελοντές μη καπνιστές ηλικίας 19-25	32	Συμπληρωματική χορήγηση αντιοξειδωτικών placebo για 5 εβδομάδες	Βιταμίνη C, α-τοκοφερόλη, β-καροτένιο, B6, B12, φυλλικό οξύ, εκχύλισμα κόκκων σταφυλιού, εκχύλισμα από γάλα γαϊδουράγκαθου	Δραστηριότητα SOD, GPx MDA Πρωτεϊνικά καρβονύλια	Δεν παρατηρήθηκε αλλαγή στη δραστηριότητα SOD, GPx Αύξηση των αντιοξειδωτικών του πλάσματος Μείωση MDA και πρωτεϊνικών καρβονυλίων

- Περιγραφή αντιοξειδωτικών συστατικών του συμπληρώματος

Το συμπλήρωμα που δόθηκε στους εθελοντές της παρούσας μελέτης περιείχε:

Αντιοξειδωτικές βιταμίνες και Σελήνιο (βλ. Αντιοξειδωτικά της διατροφής σελ.33-35)

Χυμό σταφυλιού

Το σταφύλι κατατάσσεται στα φρούτα με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις. Οι φαινολικές ενώσεις βρίσκονται στους σπόρους, στη φλούδα αλλά και στο χυμό του σταφυλιού. Περίπου 100 γρ. φρέσκου φρούτου περιέχουν 200-300mg φαινολικών ενώσεων. [4] Οι πιο σημαντικές από αυτές τις ουσίες περιλαμβάνουν προανθοκυανιδίνες και ρεσβατρατόλη, η οποία βρίσκεται στο σταφύλι και στο κόκκινο κρασί. Οι φαινολικές ενώσεις στο χυμό του σταφυλιού έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και μπορούν να αναστέλλουν την οξείδωση της LDL χοληστερόλης, βοηθώντας έτσι στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Επιπλέον, εκτός από την πρόληψη των καρδιαγγειακών, τα αντιοξειδωτικά συστατικά του σταφυλιού φαίνεται να έχουν ευεργετική δράση στην πρόληψη και άλλων ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης, ο καρκίνος και οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες. [36]

Εκχύλισμα πράσινου τσαγιού

Το πράσινο τσάι είναι πλούσιο σε φαινολικές ενώσεις που ονομάζονται κατεχίνες. Οι σημαντικότερες ουσίες του πράσινου τσαγιού περιλαμβάνουν την επικατεχίνη (EC), την επικατεχίνη-3-gallate (ECG), την επιγαλλοκατεχίνη (EGC) και την επιγαλλοκατεχίνη-3-gallate(EGCG). Από αυτές η EGCG και η ECG έχουν την υψηλότερη ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών. Το εκχύλισμα πράσινου τσαγιού σε συμπληρώματα περιέχει μεγάλες δόσεις από αυτές τις φαινολικές ενώσεις χωρίς να περιέχει τις ανεπιθύμητες δράσεις της

καφεΐνης. [26] Αξίζει να σημειωθεί ότι οι κατεχίνες στο πράσινο τσάι, αν και σε μικρές ποσότητες, εμφανίζονται πολύ γρήγορα στο πλάσμα μετά την κατάποση. [6] Το πράσινο τσάι έχει πολλές ευεργετικές δράσεις για τον οργανισμό. Μπορεί να μειώσει το οξειδωτικό στρες και να ενισχύσει την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού με αποτέλεσμα να προστατεύει από καρδιαγγειακά και να βοηθά στην πρόληψη εμφάνισης καρκίνου. [4] Συμπληρωματική χορήγησή του συνδέεται με μείωση της βλάβης στο DNA που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες. [6]

Ρεσβερατρόλη

Η ρεσβερατρόλη ανήκει στις φαινολικές ενώσεις. Πρόκειται για την ένωση 3,4,5-τριυδροξυσιλβένιο. Βρίσκεται παρούσα σε διάφορα φυτά, όπως στις ρίζες του φυτού *Polygonum cuspidatum*, στα σταφύλια, στα μούρα, στα φιστίκια και κυρίως στο κόκκινο κρασί. [13,46] Η ρεσβερατρόλη έχει κυρίως αντιοξειδωτικές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Πιστεύεται ότι μπορεί να καταστείλει παράγοντες που εμπλέκονται στην διαδικασία της αθηρογένεσης και να μειώσει τους παράγοντες κινδύνου για αθηροσκλήρωση. Φαίνεται επίσης ότι η αντιαθηροσκληρωτική επίδραση του κρασιού οφείλεται στην ρεσβερατρόλη. [41] Επιπρόσθετα, πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα προσδίδουν αντιγηραντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες στη ρεσβερατρόλη. Εντούτοις είναι απαραίτητη περαιτέρω έρευνα για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των συμπληρωμάτων ρεσβερατρόλης. [49]

L-καρνιτίνη

Η L-καρνιτίνη είναι ένα μικρό υδατοδιαλυτό μόριο με σημαντικές δράσεις στο μεταβολισμό των θηλαστικών. Βρίσκεται στο σώμα υπο τη μορφή ελεύθερης καρνιτίνης, ως ακετυλο-L-καρνιτίνη και ως εστέρες καρνιτίνης. Περίπου 25% της καρνιτίνης του σώματος βιοσυντίθεται από τα αμινοξέα μεθειονίνη και λυσίνη στο ήπαρ και τα νεφρά, ενώ το υπόλοιπο ποσοστό λαμβάνεται από τη διατροφή, κυρίως από το κόκκινο κρέας και το γάλα. Το 99% της καρνιτίνης βρίσκεται εντός των κυττάρων (ενδοκυττάριο συστατικό). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις της ουσίας βρίσκονται στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες. Η καρνιτίνη δε μπορεί να μεταβολιστεί από το σώμα και αποβάλλεται ως έχει ή υπο τη μορφή ακετυλο-καρνιτίνης από τα ούρα. Κύριος ρόλος της L-καρνιτίνης στο σώμα είναι η μεταφορά των λιπαρών οξέων στη μήτρα των μιτοχονδρίων για τη β-οξείδωση και την παραγωγή ATP. Εκτός από το σημαντικό της ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων, η καρνιτίνη είναι επίσης ισχυρό αντιοξειδωτικό και έτσι μπορεί να προστατεύει τους ιστούς από την οξειδωτική βλάβη. [44] Έχει φανεί ότι η συμπληρωματική χορήγησή της, έχει ευεργετική δράση σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από αυξημένο οξειδωτικό στρες όπως η στεφανιαία νόσος και η νόσος Alzheimer. [9] Τα συμπληρώματα καρνιτίνης πιστεύεται επίσης ότι μπορούν να αυξήσουν την αθλητική απόδοση και να βοηθήσουν στην απώλεια βάρους. [30]

Συνένζυμο Q10

Ο ρόλος του συνενζύμου Q10 περιγράφεται στη σελ.22 . Κλινικές μελέτες με συμπληρώματα του συνενζύμου δείχνουν ότι είναι ευεργετικό στη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας και της υψηλής πίεσης του αίματος. Είναι εξαιρετικό αντιοξειδωτικό και σε δόση 150 mg μπορεί να μειώσει το οξειδωτικό στρες και να αυξήσει τη δραστηριότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. Ωστόσο μπορεί να αλληλεπιδράσει με πολλά φάρμακα όπως η βαρφαρίνη και φάρμακα για τη μείωση της χοληστερόλης. [4]

Aloe barbadensis Miller (Aloe Vera)

Η Aloe Vera είναι κάκτος που φυτρώνει εύκολα σε ζεστά-ξηρά κλίματα. Ανήκει στην οικογένεια Aloeaceae και είναι γνωστή στη βιβλιογραφία με πολλά ονόματα όπως Aloe Barbadensis Miller. Το φυτό αυτό χρησιμοποιείται εδώ και χιλιάδες χρόνια για τις θεραπευτικές του ιδιότητες και η χρήση του αναφέρεται στους αρχαίους πολιτισμούς της Ινδίας, της Αιγύπτου, της Ελλάδας, της Ρώμης και της Κίνας. Περιέχει πάνω από 200 διαφορετικά συστατικά. Το ζελέ αλόης περιέχει εκτός των άλλων φαινολικές ενώσεις (ανθοκινόνες), αντιοξειδωτικές βιταμίνες (βιταμίνη C, E, A), βιταμίνες (B1-θειαμίνη, B2-ριβοφλαβίνη, φυλλικό, B12), χολίνη, μέταλλα και ιχνοστοιχεία (χαλκός, ψευδάργυρος, μαγνήσιο κ), καθώς και αντιοξειδωτικά ένζυμα καταλάση και SOD. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα από κλινικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η Aloe Vera μπορεί να μειώσει την LDL χοληστερόλη, να αυξήσει την HDL και να μειώσει τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος. Ενδείκνυται επίσης για τη θεραπεία του έρπητα των γεννητικών οργάνων και για τη θεραπεία της ψωρίασης. Η χρήση της εξωτερικά ή σε πόσιμο συμπλήρωμα θεωρείται ασφαλής. Εντούτοις δε συστήνεται η κατανάλωση της κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης, του θηλασμού, σε κοιλιακό πόνο, σε σκωληκοειδίτιδα και σε εντερική απόφραξη. [3,62]

Χολίνη

Η χολίνη είναι ένα συστατικό που βρίσκεται σε ποικιλία τροφίμων τόσο σε ζωικές (πχ συκώτι, αυγό, βοδινό κρέας, γαρίδες, σολομός) όσο και σε φυτικές πηγές (πχ λαχανάκια Βρυξελλών, μπρόκολο, κουνουπίδι, βρώμη). Εκτός από τη διατροφή, η χολίνη μπορεί να συντεθεί ενδογενώς στο ήπαρ από φωσφατίδυσολαιθολαμίνη. Πρόκειται για μια τεταρτοταγή αμίνη που αποτελεί συστατικό των φωσφολιπιδίων και του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη. Επίσης συμμετέχει στο σχηματισμό του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, στην ηπατική έκκριση VLDL και δρα ως μεταφορέας μεθυλοομάδων μέσω της βεταΐνης (παράγωγο χολίνης). [15] Έλλειψη χολίνης μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις. Έχει αποδειχθεί ότι τα συμπληρώματα χολίνης ενισχύουν τη σύνθεση και την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης κατά τη νευρομυϊκή σύναψη. Επίσης φαίνεται ότι συμπληρώματα χολίνης μπορούν να προλάβουν τη μείωση ακετυλοχολίνης που παρατηρείται κατά την έντονη άσκηση (μαραθώνιος) και έτσι ενισχύουν την αθλητική απόδοση. [28]

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο – ΣΚΟΠΟΣ

Η κατανάλωση αντιοξειδωτικών φαίνεται να συνδέεται με βελτίωση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού και με την πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης φαίνεται ότι ο συνδυασμός αντιοξειδωτικών συστατικών έχει πιο ευεργετικά αποτελέσματα σε αντίθεση με τη συμπληρωματική χορήγηση ενός μόνο αντιοξειδωτικού συστατικού, εξαιτίας αλληλεπιδράσεων των αντιοξειδωτικών μεταξύ τους.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να αξιολογήσει το αποτέλεσμα που έχει η βραχυπρόθεσμη κατανάλωση ενός μίγματος βιταμινών, ανόργανων ουσιών και άλλων αντιοξειδωτικών φυτικών συστατικών στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού φαινομενικά υγιών εθελοντών. Για το σκοπό αυτό μετρήθηκαν μεταξύ άλλων η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης ορού (GPx3), ως ένα βασικό αντιοξειδωτικό ένζυμο, το ουρικό οξύ ως βασικό ενδογενές αντιοξειδωτικό και η *ex vivo* αντίσταση του ορού των εθελοντών στην οξειδωση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο – ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 Επιλογή εθελοντών και σχεδιασμός μελέτης

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε είναι τυφλή παρέμβαση με δύο σκέλη, ελεγχόμενη από εικονικό συμπλήρωμα. Οι εθελοντές που επιλέχθηκαν ήταν φαινομενικά υγιείς εθελοντές με ΔΜΣ (Δείκτης Μάζας Σώματος) $>23 \text{ kg/m}^2$, οι οποίοι δεν έπασχαν από χρόνιες παθήσεις και δε λάμβαναν κάποια φαρμακευτική αγωγή ή συμπλήρωμα διατροφής. Από τους εθελοντές ζητήθηκε να αποφύγουν τη λήψη οποιουδήποτε αντιφλεγμονώδους ή αναλγητικού φαρμάκου ή συμπληρώματος διατροφής κατά τη διάρκεια της συμμετοχής τους στην έρευνα. Επιπλέον δόθηκαν οδηγίες στους εθελοντές σχετικά με τη διατήρηση των διατροφικών τους συνηθειών κατά το χρονικό διάστημα της συμμετοχής τους στην έρευνα. Οι εθελοντές που πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια ενημερώθηκαν πλήρως για τις διαδικασίες, τις υποχρεώσεις και τα δικαιώματά τους και υπέγραψαν συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής στη μελέτη.

Βάση του πρωτοκόλλου οι εθελοντές χωρίστηκαν σε τυχαία συνδυασμένες ομάδες, (block randomization) με βάση την ηλικία, το φύλο, το ΔΜΣ και τις καπνιστικές συνήθειες. Οι εθελοντές λάμβαναν μετά από το γεύμα, είτε το συμπλήρωμα (80 mL/ ημέρα), είτε το εικονικό σκεύασμα (80 mL/ημέρα) για 8 εβδομάδες και προσήλθαν στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο 3 φορές συνολικά. Η πρώτη έγινε πριν την πρώτη παρέμβαση, στο ενδιάμεσο της παρέμβασης (4 εβδομάδες) και στο τέλος της παρέμβασης (8 εβδομάδες). Πριν από κάθε επίσκεψη ζητήθηκε από τους εθελοντές να φέρουν μαζί τους δείγμα από πρωινά ούρα σε ειδική συσκευασία που τους είχε χορηγηθεί από πριν. Μετά από 12ωρη νηστεία οι εθελοντές προσήλθαν στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο όπου πραγματοποιήθηκαν λήψη αίματος, ανθρωπομετρικές μετρήσεις (βάρος, ύψος, περιφέρεια μέσης) συμπλήρωση ερωτηματολογίου διατροφικών συνηθειών και φυσικής δραστηριότητας και μέτρηση αρτηριακής πίεσης (διαστολικής και συστολικής). Οι αιμοληψίες έγιναν από ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό, παρουσία ιατρού. Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών μετρήθηκαν από έμπειρο διαιτολόγο και η μέτρηση της αρτηριακής πίεσης έγινε από τον ιατρό της μελέτης.

Κατά τη διάρκεια των 8 εβδομάδων πραγματοποιήθηκαν τηλεφωνικές 3ήμερες ανακλήσεις 24ώρου την πρώτη εβδομάδα της παρεμβάσεως, την εβδομάδα μετά τη δεύτερη αιμοληψία και την τελευταία εβδομάδα της παρέμβασης από εξειδικευμένο διαιτολόγο προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι δεν υπήρχε αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες των εθελοντών.

5.2 Συστατικά και διατροφική ανάλυση του συμπληρώματος

Συστατικά: Gel από *Aloe barbadensis* Miller (ΗΠΑ/Μεξικό 36%), χυμός σταφυλιών από συμπύκνωμα, νερό, δεξτρόζη, μείγμα εκχυλισμάτων (εκχύλισμα

πράσινου τσαγιού, εκχύλισμα *Polygonum cuspidatum* που περιέχει ρεσβερατρόλη), σταθεροποιητής (κόμμι ξανθάνης), L-καρνιτίνη, μείγμα βιταμινών (βιταμίνη B1, φυλλικό οξύ, βιταμίνη B12, βιταμίνη E), χρωστική ουσία: χλωροφύλλη από φυτικά εκχυλίσματα, μέσο οξύτητας (κιτρικό οξύ), φωσφορικός σίδηρος (III), συντηρητικό (σορβικό κάλιο), φυσικό άρωμα, γλυκαντική ουσία: στεβιο-γλυκοζίδες, συνένζυμο Q10, αντιοξειδωτικό (ασκορβικό οξύ), χολίνη, σεληνιώδες νάτριο.

Πίνακας 2 - Διατροφική ανάλυση συμπληρώματος

Συστατικά	Ανά 100 ml	ανά ημερήσια δόση (80ml)	% ΣΗΔ *
Φυσιολογική 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 - TE)	15 mg	12 mg	100%
Βιταμίνη B1	1,38 mg	1,1 mg	100%
Βιταμίνη B12	3,13 µg	2,5 µg	100%
Σίδηρο	5,25 mg	4,2 mg	30%
Σελήνιο	34,37 µg	27,5 µg	50%

5.3 Ανθρωπομετρία

Το σωματικό βάρος των εθελοντών μετρήθηκε με ελαφρύ ρουχισμό και χωρίς υποδήματα, σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Το ύψος μετρήθηκε με τη χρήση αναστημόμετρου σε όρθια στάση και χωρίς παπούτσια. Επίσης υπολογίστηκε ο ΔΜΣ κάθε εθελοντή που αντιστοιχεί στο πηλίκο του σωματικού βάρους (σε κιλά) προς το τετράγωνο του ύψους (σε μέτρα). Επιπλέον μετρήθηκε η περιφέρεια μέσης και έγινε λιπομέτρηση.

5.4 Απομόνωση ορού

Κατάλληλη ποσότητα αίματος μεταφερόταν σε vacutainers ορού (10 mL). Το vacutainer παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου για 40 min μέχρι την πήξη του αίματος. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στα 1500g για 10 min σε θερμοκρασία 20 °C. Μετά τη φυγοκέντρηση παραλαμβάνονταν το υπερκείμενο, μοιραζόταν σε σωλήνες erpendorfs ανα 500 µL και φυλασσόταν στους -80 °C.

5.5 Βιοχημικές αναλύσεις

Η γλυκόζη, το ουρικό οξύ, τα τριγλυκερίδια, η ολική χοληστερόλη και η HDL χοληστερόλη μετρήθηκαν σε δείγματα ορού με φασματοφωτομετρική μέθοδο και με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων αντιδραστηρίων.

5.5.1 Προσδιορισμός γλυκόζης

Αρχή μεθόδου

Η γλυκόζη, παρουσία του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης (GOD), οξειδώνεται και παράγει H_2O_2 . Η αντίδραση του H_2O_2 με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι εξής:



Αναλυτική πορεία

Σε erpendorfs σωλήνες προστέθηκαν τα παρακάτω διαλύματα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

(µL)	T	S1	S2	S3	S4	Δ
R4	-	5	10	15	20	-
Αποσταγμένο H₂O	100	95	90	85	80	90
Δείγμα ορού	-	-	-	-	-	10
(R1+R1a)	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Όπου **T**: τυφλό, **Δ**: δείγμα, **S1-4**: πρότυπο, **R1**: Ρυθμιστικό διάλυμα, **R1a**: Ένζυμα και συμπαραγόντες, **R4**: Πρότυπο διάλυμα γλυκόζης 100mg/dl

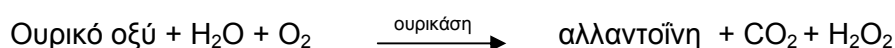
Στη συνέχεια οι σωλήνες αναδεύονταν και επωάζονταν στους 37 °C για 10 min. Μετά την επώαση 200 µL από τον κάθε σωλήνα μεταφέρονταν σε κυψελίδες και φωτομετρούνταν στα

510 nm. Σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις γλυκόζης στα δείγματα του ορού.

5.5.2 Προσδιορισμός ουρικού οξέος

Αρχή μεθόδου

Το ουρικό οξύ, παρουσία του ενζύμου ουρικάση, οξειδώνεται και παράγει H_2O_2 . Η αντίδραση του H_2O_2 με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης ουρικού οξέος στο δείγμα. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι εξής:



Αναλυτική πορεία

Σε erpendorfs σωλήνες προστέθηκαν τα παρακάτω διαλύματα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

(μL)	T	S1	S2	S3	S4	Δ
R4	-	5	10	15	20	-
Αποσταγμένο H_2O	100	95	90	85	80	90
Δείγμα ορού	-	-	-	-	-	10
(R1+R1a)	500	500	500	500	500	500
	Επώαση 5 min στους 37 °C					
Αποσταγμένο H_2O	500	500	500	500	500	500

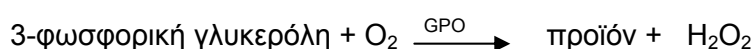
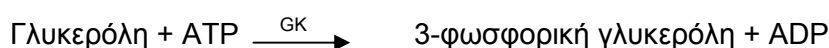
Όπου **T**: τυφλό, **Δ**: δείγμα, **S1-4**: πρότυπο, **R1**: Ρυθμιστικό διάλυμα, **R1a**: Ένζυμα **R4**: Πρότυπο διάλυμα ουρικού οξέος 8mg/dl

Στη συνέχεια 200 μL από τον κάθε σωλήνα μεταφέρονταν σε κυψελίδες και φωτομετρούνταν στα 510 nm. Σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις ουρικού οξέος στα δείγματα του ορού.

5.5.3 Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων

Αρχή μεθόδου

Η παρουσία του ενζύμου λιποπρωτεΐνο- λιπάση καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και η παραγόμενη γλυκερόλη με τη βοήθεια του ενζύμου γλυκερολο- κινάση (GK) φωσφορυλιώνεται. Η 3-φωσφορική γλυκερόλη παρουσία του ενζύμου 3-φωσφορική οξειδάση (GPO) οξειδώνεται με ταυτόχρονη παραγωγή H_2O_2 . Η αντίδραση του H_2O_2 με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων στο δείγμα. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι εξής:



Αναλυτική πορεία

Σε erpendorfs σωλήνες προστέθηκαν τα παρακάτω διαλύματα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

(μL)	T	S1	S2	S3	S4	Δ
R4	-	5	10	15	20	-
Αποσταγμένο H₂O	100	95	90	85	80	90
Δείγμα ορού	-	-	-	-	-	10
(R1+R1a)	500	500	500	500	500	500
Αποσταγμένο H₂O	500	500	500	500	500	500

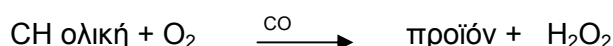
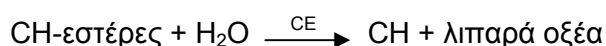
Όπου **T**: τυφλό, **Δ**: δείγμα, **S1-4**: πρότυπο, **R1**: Ρυθμιστικό διάλυμα, **R1a**: Ένζυμα και συμπαραγόντες, **R4**: Πρότυπο διάλυμα τριγλυκεριδίων 200mg/dl

Στη συνέχεια οι σωλήνες αναδεύονταν και επωάζονταν στους 37 °C για 5 min. Μετά την επώαση 200 μL από τον κάθε σωλήνα μεταφέρονταν σε κυψελίδες και φωτομετρούνταν στα 510 nm. Σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων στα δείγματα του ορού.

5.5.4 Προσδιορισμός ολικής χοληστερόλης

Αρχή μεθόδου

Παρουσία του ενζύμου χοληστερολο-εστεράση (CE) οι εστέρες της χοληστερόλης υδρολύονται προς χοληστερόλη (CH) και η ολική χοληστερόλη με τη βοήθεια του ενζύμου χοληστερολο-οξειδάση (CO) οξειδώνεται και παράγει H_2O_2 . Η αντίδραση του H_2O_2 με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510nm είναι ανάλογη της συγκεντρώσης ολικής χοληστερόλης στο δείγμα. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι εξής:



Αναλυτική πορεία

Σε erpendorfs σωλήνες προστέθηκαν τα παρακάτω διαλύματα σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

(μL)	T	S1	S2	S3	S4	Δ
R4	-	5	10	15	20	-
Αποσταγμένο H_2O	100	95	90	85	80	90
Δείγμα ορού	-	-	-	-	-	10
(R1+R1a)	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Όπου T: τυφλό, Δ: δείγμα, S1-4: πρότυπο, R1: Ρυθμιστικό διάλυμα, R1a: Ένζυμα, R4: Πρότυπο διάλυμα χοληστερόλης 200mg/dl

Στη συνέχεια οι σωλήνες αναδεύονταν και επωάζονταν στους 37 °C για 5 min. Μετά την επώαση 200 μL από τον κάθε σωλήνα μεταφέρονταν σε κυψελίδες και φωτομετρούνταν στα 510 nm. Σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη υπολογίστηκαν οι συγκεντρώσεις ολικής χοληστερόλης στα δείγματα του ορού.

5.5.5 Προσδιορισμός HDL χοληστερόλης

Αρχή μεθόδου

Για τον προσδιορισμό της HDL- χοληστερόλης αρχικά γίνεται διαχωρισμός των HDL από το σύνολο των λιποπρωτεϊνών, με καταβύθιση των VLDL, των LDL και των χυλομικρών (CM) στον ορό. Παρουσία φωσφοβολφραμικού οξέος (PTA) και ιόντων μαγνησίου οι VLDL, οι LDL

και τα χυλομικρά καθιζάνουν και απομακρύνονται με διήθηση, ενώ το υπερκείμενο το οποίο περιέχει τις HDL χρησιμοποιείται για την εύρεση της περιεκτικότητας τους σε χοληστερόλη.

Λιποπρωτεΐνες (HDL+LDL+VLDL+CM) + PTA + Mg^{++} $\longrightarrow$ υπερκείμενο(HDL)+ίζημα(LDL+VLDL+CM)

Αναλυτική πορεία

Σε eppendorfs σωλήνες προστέθηκαν 100μL ορού και 200μL διαλύματος φωσφοβολφραμικού. Μετά από έντονη ανάδευση σε Vortex, παρέμειναν 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 15000 στροφές για 10min. Το διαυγές υπερκείμενο από τους φυγοκεντρημένους σωλήνες μεταφέρθηκε σε άλλους eppendorfs σωλήνες, στους οποίους έγινε προσδιορισμός της HDL χοληστερόλης με τα αντιδραστήρια και τη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης.

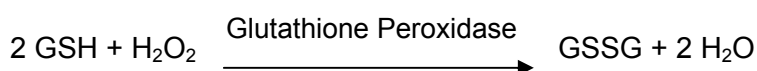
5.5.6 Υπολογισμός δραστηριότητας του ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης GPX3

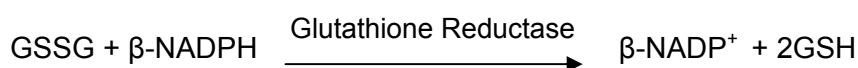
Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50mM με EDTA 0.4 mM, pH 7.0 (**PBS/EDTA**): 6,900 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (S5) και 0,1665 g EDTA (E1) σε 1000 mL απεσταγμένο νερό. Ρύθμιση pH με NaOH 1M
- Sodium Azide 1mM σε PBS 50mM/EDTA 0.4 mM/pH 7.0 (**PBS/Sodium azide**): 0,0032 g NaN_3 σε 50mL PBS/EDTA
- Διάλυμα αναγωγάσης της γλουταθειόνης 100 U/mL (**GR**): Αραίωση stock διαλύματος αναγωγάσης με παγωμένο απεσταγμένο νερό. Απευθείας αραίωση κατά την παρασκευή του μίγματος της αντίδρασης.
- Διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης 200mM (**GSH**): 0,0615g σε 1mL απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα H_2O_2 0.0084% (**H_2O_2**): 1,12μL διαλύματος H_2O_2 από το stock διάλυμα (30%) και 3999μL απεσταγμένο νερό. Παρασκευάζεται αμέσως πριν το assay.

Αρχή μεθόδου – Αντίδραση

Η μέτρηση της δραστηριότητας της GPX γίνεται έμμεσα μέσω της αντίδρασης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης. Η GPX καταλύει την αντίδραση της γλουταθειόνης (GSH) με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Κατά την αντίδραση αυτή παράγεται οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG), η οποία ανάγεται και πάλι σε GSH με τη δράση της αναγωγάσης της γλουταθειόνης παρουσία NADPH. Η οξείδωση του NADPH σε $NADP^+$ συνοδεύεται από μείωση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 340nm. Ο ρυθμός μείωσης της απορρόφησης στα 340nm είναι ευθέως ανάλογος της δραστηριότητας της GPX.





Αναλυτική πορεία

- Παρασκευή διαλυμάτων GR και H₂O₂ λίγο πριν το assay
- Παρασκευή μίγματος αντίδρασης σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

PBS/Sodium azide	7371 μL
GR	20 μL
H ₂ O	70 μL
GSH	45 μL
NADPH	90 μL

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

- Προσθήκη των παρακάτω διαλυμάτων στα πηγαδάκια των plates και διεξαγωγή του assay σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Blank	Sample
Μίγμα αντίδρασης	180 μL	180 μL
Διαλύτης διαλύματος GPX (H₂O)	50 μL	-
Διάλυμα GPX (Ορός)	-	50 μL
	Ανάμιξη με το tip και παραμονή 1 λεπτό σε Θ° δωματίου	
Διάλυμα H₂O₂	25 μL	25 μL
	Μέτρηση A στα 340nm για 5 min ανά 1min (Elisa reader)	

Υπολογισμός δραστηριότητας

$$\text{Units/mL παρασκευάσματος} = \frac{\Delta A/\text{min, sample} - \Delta A/\text{min, blank}) * 2 * 0,255 * df}{5,60 * 0,05}$$

όπου:

2: Τα 2 μmoles της GSH που παράγονται για κάθε μmole NADPH που οξειδώνεται

0,255: Ο τελικός όγκος του assay σε mL

df: Ο συντελεστής αραίωσης αν το δείγμα της GPX αραιωθεί

5,60: ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του NADPH στα 340 nm και για όγκο 0,255 mL (μήκος οπτικής διαδρομής: 0,9cm)

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

5.5.7 Αντίσταση του ορού στην επαγόμενη από Cu^{2+} οξείδωση

Αντιδραστήρια

- Stock Διάλυμα CuSO_4 20mM
- Διάλυμα PBS buffer
- Working Διάλυμα CuSO_4 0,2mM

Αρχή μεθόδου

Με το διάλυμα του CuSO_4 προκαλείται οξείδωση της LDL κατά την οποία παράγονται λιποειδικά υπεροξειδία. Η ανίχνευση τους γίνεται με φωτομέτρηση στα 245 nm. Το αποτέλεσμα εκφράζεται ως χρόνος αντίστασης του ορού στην οξείδωση.

Αναλυτική πορεία

Το διάλυμα ορού αραιώνεται ως 1: 12 με PBS buffer. Λαμβάνονται 22.98 ml PBS και τοποθετούνται και 20 μl CuSO_4 (τελική συγκέντρωση 16μM). Τοποθετούνται σε plates φωτομέτρησης 20μl αραιωμένου ορού. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 230 μl μίγματος που περιέχουν PBS και CuSO_4 . Γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 245 nm για 3,5 h ανά 2 min.

5.6 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS 18.0 για τα Windows. Η κανονικότητα των ποσοτικών μεταβλητών αξιολογήθηκε με το στατιστικό τεστ Kolmogorov–Smirnov. Οι ποσοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση, ενώ οι ποιοτικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως ποσοστά (%). Οι διαφορές ανάμεσα στην ομάδα με το συμπλήρωμα και το εικονικό συμπλήρωμα ελέγχθηκαν με τον έλεγχο t – test του Student, για τις ποσοτικές μεταβλητές που ακολουθούσαν την κανονική κατανομή, για όσες δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός έλεγχος Mann – Whitney U test και για τις ποιοτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος χ^2 . Ο έλεγχος ύπαρξης γραμμικής σχέσης μεταξύ ποσοτικών μεταβλητών που δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή έγινε με το συντελεστή συσχέτισης του Spearman ή με τον συντελεστή συσχέτισης του Pearson για τα κανονικές μεταβλητές. Σε όλες τις αναλύσεις ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το 5% (0.05).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Βασικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών

Στην παρούσα μελέτη μέχρι στιγμής έχουν ολοκληρώσει 46 εθελοντές εκ των οποίων 22 από αυτούς έπαιρναν το συμπλήρωμα ενώ οι 24 έπαιρναν το εικονικό σκεύασμα (placebo). Στην ομάδα παρέμβασης με το συμπλήρωμα συμμετείχαν 16 άνδρες (72,7%) και 6 γυναίκες (27,3%) με ηλικιακό εύρος $32,5 \pm 5,4$ ετών. Στην ομάδα με το εικονικό σκεύασμα συμμετείχαν 16 άνδρες (66,7%) και 8 γυναίκες (33,3%) με ηλικιακό εύρος $34,5 \pm 6,4$ ετών.

Στον πίνακα που ακολουθεί βλέπουμε τα παραπάνω στοιχεία και επιπλέον το βάρος και το BMI των δύο ομάδων στις 3 χρονικές στιγμές (εβδομάδα 0, εβδομάδα 4, εβδομάδα 8).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3- Βασικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά συμμετεχόντων

	<u>ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ</u>			<u>PLACEBO</u>		
	<u>ΕΒΔΟΜΑΔΑ 0</u>	<u>ΕΒΔΟΜΑΔΑ 4</u>	<u>ΕΒΔΟΜΑΔΑ 8</u>	<u>ΕΒΔΟΜΑΔΑ 0</u>	<u>ΕΒΔΟΜΑΔΑ 4</u>	<u>ΕΒΔΟΜΑΔΑ 8</u>
<u>ΦΥΛΟ</u>	72,7% άνδρες, 27,3% γυναίκες			66,7% άνδρες, 33,3% γυναίκες		
<u>ΗΛΙΚΙΑ</u> (years)	$32,5 \pm 5,4$			$34,5 \pm 6,4$		
<u>ΒΑΡΟΣ</u> (kg)	$81,2 \pm 15,1$	$81,4 \pm 14,9$	$81,8 \pm 15,1$	$78,9 \pm 10,1$	$78,2 \pm 10,4$	$78,8 \pm 10,1$
<u>BMI</u> (kg/m ²)	$27,0 \pm 2,8$	$27,1 \pm 2,9$	$27,2 \pm 2,8$	$26,7 \pm 2,1$	$26,5 \pm 2,1$	$26,6 \pm 2,0$

Μετά από στατιστικό έλεγχο των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών, παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς την ηλικία ($p=0,272$), το φύλο ($p=0,664$), το βάρος ($p=0,542$) και το BMI ($p=0,652$) μεταξύ των 2 ομάδων (συμπληρώματος και placebo). Επίσης παρατηρούμε ότι ο πληθυσμός που συμμετείχε στην παρέμβαση είχε αυξημένο BMI, περίπου στο 26,8 και έτσι χαρακτηρίζεται ως υπέρβαρος. Μετά από σύγκριση του BMI των 3 χρονικών στιγμών (εβδομάδα 0, εβδομάδα 4, εβδομάδα 8) μεταξύ τους με το paired-Samples Test, στην ομάδα με το συμπλήρωμα παρατηρούμε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση του BMI κατά τη διάρκεια της παρέμβασης με το συμπλήρωμα, εκτός από τη σύγκριση μεταξύ του BMI₀ - BMI₈ που βγήκε στατιστικά σημαντικό. χωρίς όμως να υπάρχει φυσιολογική σημασία ($p_{BMI_{0,4}}=0,341$, $p_{BMI_{4,8}}=0,182$, $p_{BMI_{0,8}}=0,036$). Το ίδιο test πραγματοποιήθηκε και για την ομάδα με το εικονικό σκεύασμα όπου και εκεί δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις του BMI, παρα μόνο στη σύγκριση του BMI₀-BMI₄ χωρίς όμως φυσιολογική σημασία ($p_{BMI_{0,4}}=0,018$, $p_{BMI_{4,8}}=0,466$, $p_{BMI_{0,8}}=0,225$).

6.2 Βιοχημικά χαρακτηριστικά εθελοντών

6.2.1 Βιοχημικά χαρακτηριστικά εθελοντών πριν την παρέμβαση (εβδομάδα 0)

Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών την εβδομάδα 0, δηλαδή πριν ξεκινήσει η παρέμβαση, και για τις 2 ομάδες (συμπλήρωμα και εικονικό). Πρέπει να σημειωθεί ότι η ανάλυση των βιοχημικών χαρακτηριστικών δεν έχει ολοκληρωθεί στο πλαίσιο της συγκεκριμένης πτυχιακής μελέτης για αυτό το λόγο και παρουσιάζεται κάθε φορά ο αριθμός των εθελοντών που έχει πραγματοποιηθεί η ανάλυση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4- Βιοχημικά χαρακτηριστικά εθελοντών πριν την παρέμβαση (εβδομάδα 0)

	<u>N_Σ</u>	<u>ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ</u>	<u>N_Ε</u>	<u>PLACEBO</u>	<u>p</u>
<u>TC</u> (mg/dl)	10	192,0 ± 47,5	9	227,6 ± 30,1	0,072
<u>HDL</u> (mg/dl)	10	40,4 ± 13,0	9	38,2 ± 10,2	0,690
<u>LDL</u> (mg/dl)	9	140,2 ± 47,7	8	173,4 ± 24,1	0,096
<u>TG</u> (mg/dl)	9	87,8 ± 34,1	8	97,6 ± 43,0	0,611
<u>GLU</u> (mg/dl)	17	95,6 ± 28,0	21	103,6 ± 14,6	0,263
<u>UA</u> (mg/dl)	20	4,8 ± 1,2	24	4,6 ± 1,2	0,619
<u>GPx</u> (Unit/ml)	21	0,088 ± 0,019	24	0,093 ± 0,057	0,471
<u>Lag- time</u> (min)	18	57,5 ± 16,8	19	56,4 ± 12,9	0,803

Όπως φαίνεται από τον πίνακα, δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των βιοχημικών χαρακτηριστικών των δύο ομάδων και όταν ξεκίνησε η παρέμβαση οι εθελοντές των δύο ομάδων είχαν ίδια βιοχημικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον μετά από στατιστική ανάλυση των βιοχημικών χαρακτηριστικών των ανδρών και των γυναικών στις δύο ομάδες παρέμβασης, παρατηρούμε ότι οι εθελοντές είχαν φυσιολογικές τιμές γλυκόζης, ουρικού οξέος και τριγλυκεριδίων. Παρατηρήθηκαν αυξημένες τιμές χοληστερόλης (>200 mg/dl) στους άνδρες της ομάδας με το συμπλήρωμα, και στα δύο φύλα της ομάδας με το εικονικό σκεύασμα. Επίσης βρέθηκαν αυξημένες τιμές LDL (>172 mg/dl για τους άνδρες και >167

mg/dl για τις γυναίκες) χοληστερόλης και στα δύο φύλα της ομάδας με το εικονικό σκεύασμα και στους άνδρες της ομάδας με το συμπλήρωμα.

6.2.2 Βιοχημικά χαρακτηριστικά εθελοντών κατά τη διάρκεια της παρέμβασης

Στους πίνακες που ακολουθούν φαίνονται τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών κατά τη διάρκεια της παρέμβασης στις 3 χρονικές στιγμές καθώς και ο αριθμός των εθελοντών που μετρήθηκαν τα βιοχημικά τους χαρακτηριστικά.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5 - Βιοχημικά χαρακτηριστικά εθελοντών κατά τη διάρκεια της παρέμβασης με το εικονικό σκεύασμα (placebo)

	<u>N₀</u>	<u>ΕΒΔΟΜΑΔΑ 0</u>	<u>N₄</u>	<u>ΕΒΔΟΜΑΔΑ 4</u>	<u>N₈</u>	<u>ΕΒΔΟΜΑΔΑ 8</u>
<u>TC</u> (mg/dl)	9	227,6 ± 30,1	9	231,1 ± 34,5	9	231,6 ± 32,3
<u>HDL</u> (mg/dl)	9	38,2 ± 10,2	9	36,5 ± 4,6	9	41,5 ± 10,4
<u>LDL</u> (mg/dl)	8	173,4 ± 24,1	8	179,7 ± 36,7	9	171,8 ± 32,6
<u>TG</u> (mg/dl)	8	97,6 ± 43,0	7	88,5 ± 39,9	9	91,4 ± 37,4
<u>GLU</u> (mg/dl)	21	103,6 ± 14,6	21	103,5 ± 13,1	20	102,7 ± 14,1
<u>UA</u> (mg/dl)	24	4,6 ± 1,2	22	4,6 ± 1,1	22	4,6 ± 1,1
<u>GPx</u> (Unit/ml)	24	0,095 ± 0,051	20	0,10 ± 0,061	23	0,11 ± 0,063
<u>Lag-time</u> (min)	19	56,4 ± 12,9	19	55,2 ± 10,0	19	57,8 ± 12,0

ΠΙΝΑΚΑΣ 6 - Βιοχημικά χαρακτηριστικά εθελοντών κατά τη διάρκεια της παρέμβασης με το συμπλήρωμα

	N₀	ΕΒΔΟΜΑΔΑ 0	N₄	ΕΒΔΟΜΑΔΑ 4	N₈	ΕΒΔΟΜΑΔΑ 8
TC (mg/dl)	10	192,0 ± 47,5	10	192 ± 47,3	10	196,9 ± 51,7
HDL (mg/dl)	10	40,4 ± 13,0	10	40,7 ± 13,1	10	42,7 ± 15,0
LDL (mg/dl)	9	140,2 ± 47,7	9	137,7 ± 50,3	9	136,1 ± 58,9
TG (mg/dl)	9	87,8 ± 34,1	9	91,8 ± 50,4	9	75,6 ± 28,6
GLU (mg/dl)	17	95,6 ± 28,0	18	99,5 ± 13,3	18	99,0 ± 14,2
UA (mg/dl)	20	4,8 ± 1,2	21	4,8 ± 1,1	21	4,8 ± 1,3
GPx (Unit/ml)	21	0,086 ± 0,022	20	0,088 ± 0,019	21	0,076 ± 0,023
Lag-time (min)	18	57,5 ± 16,8	18	53,087 ± 16,2	18	54,0 ± 11,2

6.2.3 Μεταβολή βιοχημικών χαρακτηριστικών μεταξύ των ομάδων παρέμβασης (συμπληρώματος, εικονικού)

Για τη σύγκριση των βιοχημικών χαρακτηριστικών κατά τη διάρκεια της παρέμβασης αρχικά ελέγξαμε την κανονικότητα των μεγεθών που θέλαμε να συγκρίνουμε με το test Kolmogorov - Smirnov. Όλα τα μεγέθη ήταν κανονικά εκτός από την GPx. Έτσι λογαριθμήσαμε την GPx και ελέγξαμε και πάλι την κανονικότητα των μεγεθών. Με τη λογαριθμοποίηση της GPx όλα τα μεγέθη ήταν κανονικά ($p > 0,05$). Για τη σύγκριση των βιοχημικών χαρακτηριστικών στις δύο ομάδες χρησιμοποιήθηκε το Repeated Measures Anova.

- Σύγκριση TC, HDL, LDL, TG, GLU, UA, logGPx, lag-time κατά τη διάρκεια της παρέμβασης

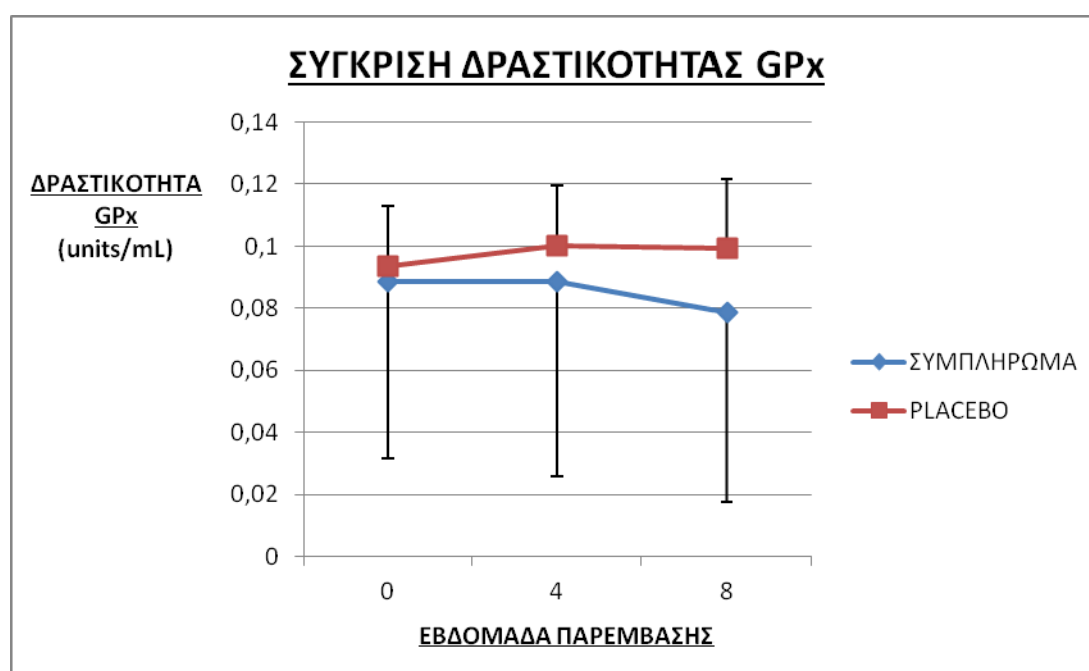
Κατά τη διάρκεια της παρέμβασης δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων παρέμβασης στους παρακάτω δείκτες ($p > 0,05$).

pTC	0,058
pHDL	0,627

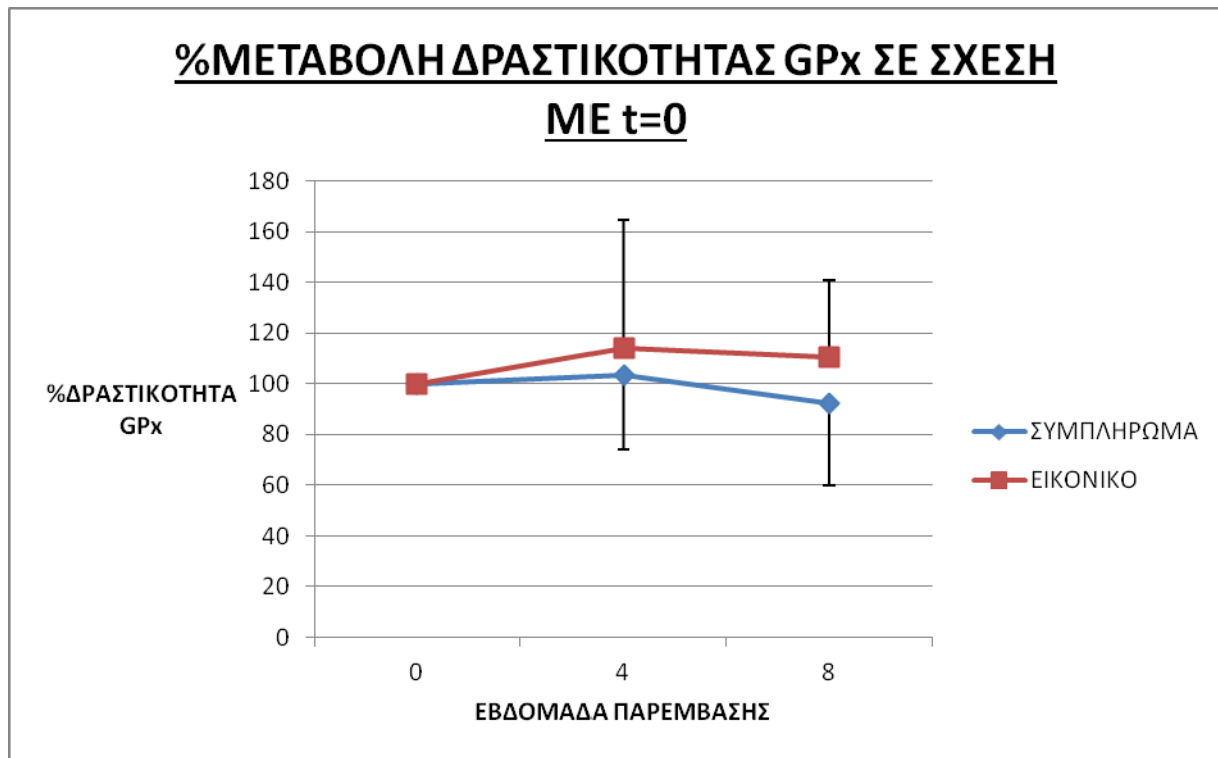
pLDL	0,115
pTG	0,580
pGLU	0,412
pUA	0,919
plogGPx	0,500
plog-time	0,674

- Μεταβολή της δραστικότητας του ενζύμου GPx κατά τη διάρκεια της παρέμβασης

Στο σχεδιάγραμμα 1 φαίνονται οι τιμές των μέσων όρων και της απόκλισης των τιμών δραστικότητας της GPx των εθελοντών κατά τις 3 χρονικές στιγμές της παρέμβασης (εβδομάδα 0, εβδομάδα 4, εβδομάδα 8) στην ομάδα με το συμπλήρωμα και στην ομάδα με το εικονικό σκεύασμα. Στην ομάδα με το συμπλήρωμα υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών δραστικότητας 20 εθελοντών και στην ομάδα με το placebo 19 εθελοντών (N=39). Στο σχεδιάγραμμα 2 υπολογίσαμε την % μεταβολή της δραστικότητας της GPx σε σχέση με το χρόνο 0, προκειμένου να εξαλείψουμε τυχόν διαφορές μεταξύ των εθελοντών στο χρόνο 0.



Σχεδιάγραμμα 1- Δραστικότητα της GPx κατά τη διάρκεια της παρέμβασης



Σχεδιάγραμμα 2- % Μεταβολή της δραστικότητας GPx σε σχέση με το χρόνο 0

- Σύγκριση της δραστικότητας της GPx στις 3 χρονικές στιγμές μεταξύ της ίδιας ομάδας παρέμβασης

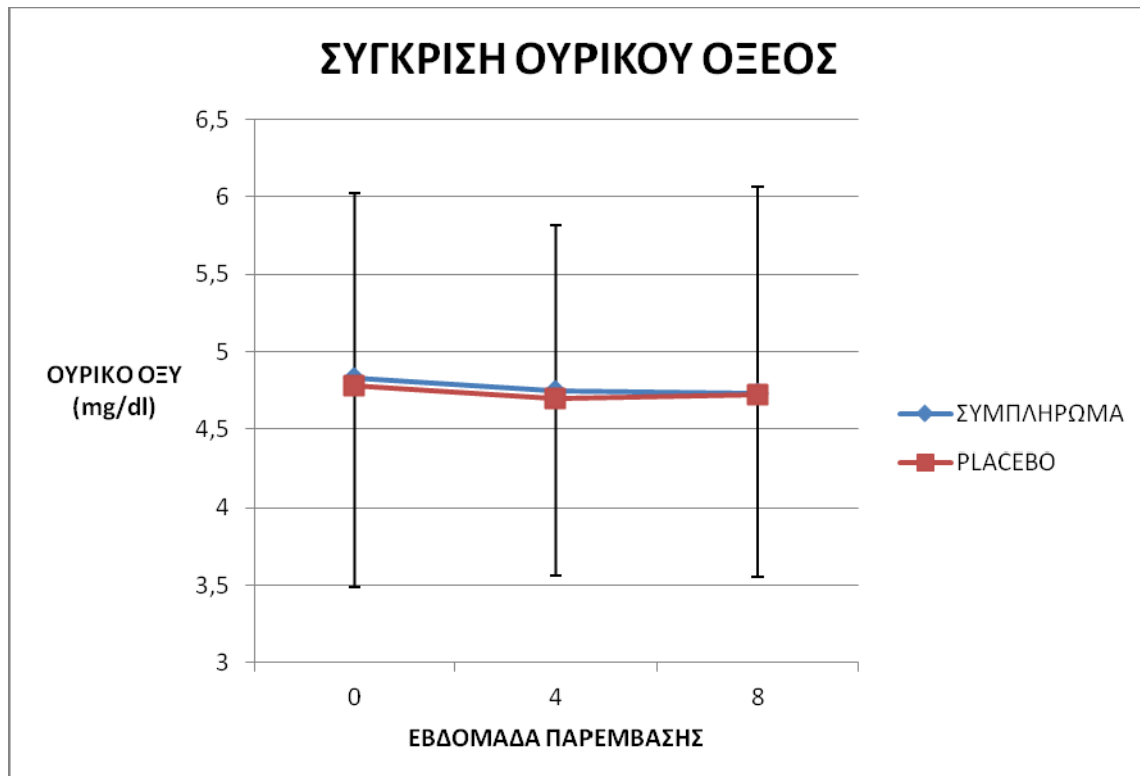
Η σύγκριση των 3 χρονικών στιγμών (εβδομάδα0, εβδομάδα4, εβδομάδα8) της δραστικότητας της GPx στις δύο ομάδες παρέμβασης έγινε με το paired-Samples Test. Επειδή όπως αναφέρθηκε η GPx δεν ήταν κανονικό μέγεθος η σύγκριση έγινε με τον λογάριθμο των τιμών δραστικότητας GPx. Τα αποτελέσματα από το paired-Samples Test μεταξύ των λογάριθμων της GPx, δείχνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των 3 χρονικών στιγμών ούτε στην ομάδα με το συμπλήρωμα ούτε στην ομάδα με το εικονικό σκεύασμα. Φαίνεται όμως ότι υπάρχει μια τάση για μείωση της GPx μεταξύ της εβδομάδας 4-8 και της εβδομάδας 0-8 του συμπληρώματος με $plogGPx_{4,8}=0,083$ και $plogGPx_{0,8}=0,073$.

- Μεταβολή ουρικού οξέος κατά τη διάρκεια της παρέμβασης

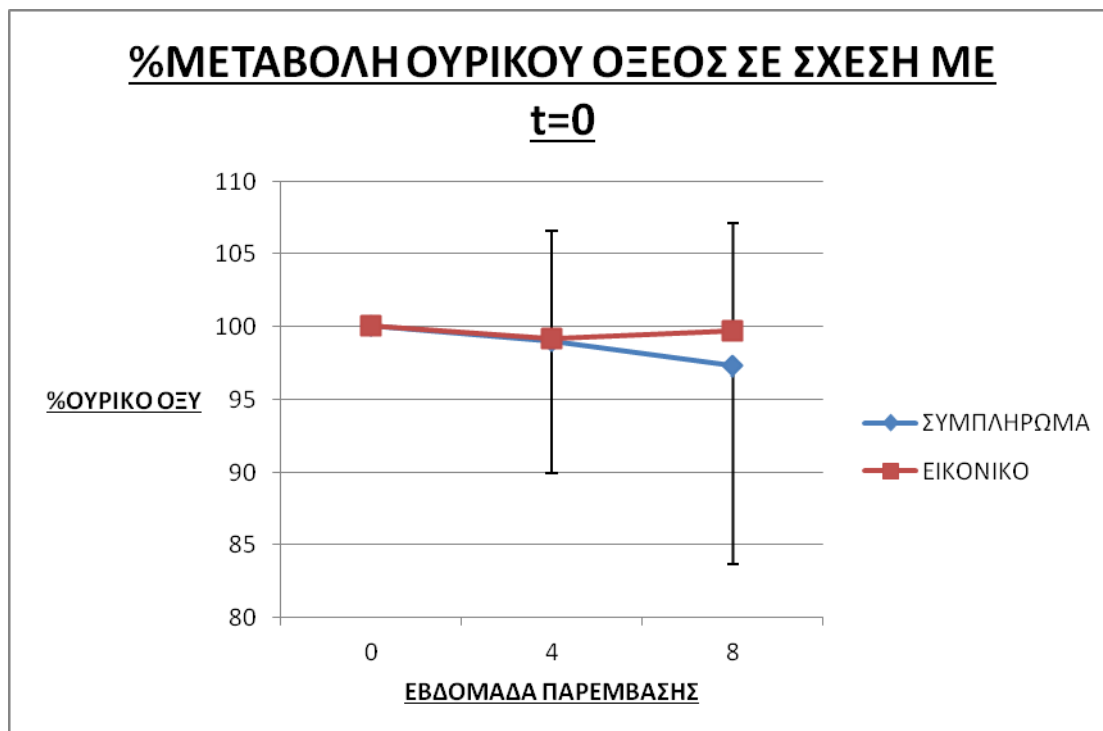
Στο σχεδιάγραμμα 3 βλέπουμε τις τιμές των μέσων όρων και των αποκλίσεων των τιμών ουρικού οξέος ορού κατά τις 3 χρονικές στιγμές της παρέμβασης (εβδομάδα 0, εβδομάδα 4, εβδομάδα 8) στην ομάδα με το συμπλήρωμα και στην ομάδα με το εικονικό σκεύασμα. Στην

ομάδα με το συμπλήρωμα υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών ουρικού οξέος 20 εθελοντών και στην ομάδα με το placebo 20 εθελοντών (N=40).

Στο σχεδιάγραμμα 4 παρατηρούμε την % μεταβολή των τιμών ουρικού οξέος σε σχέση με το χρόνο 0, προκειμένου να εξαλείψουμε τυχόν διαφορές μεταξύ των εθελοντών στο χρόνο 0 που υπάρχουν από τα επίπεδα νηστείας.



Σχεδιάγραμμα 3- Μεταβολή ουρικού οξέος κατά τη διάρκεια της παρέμβασης



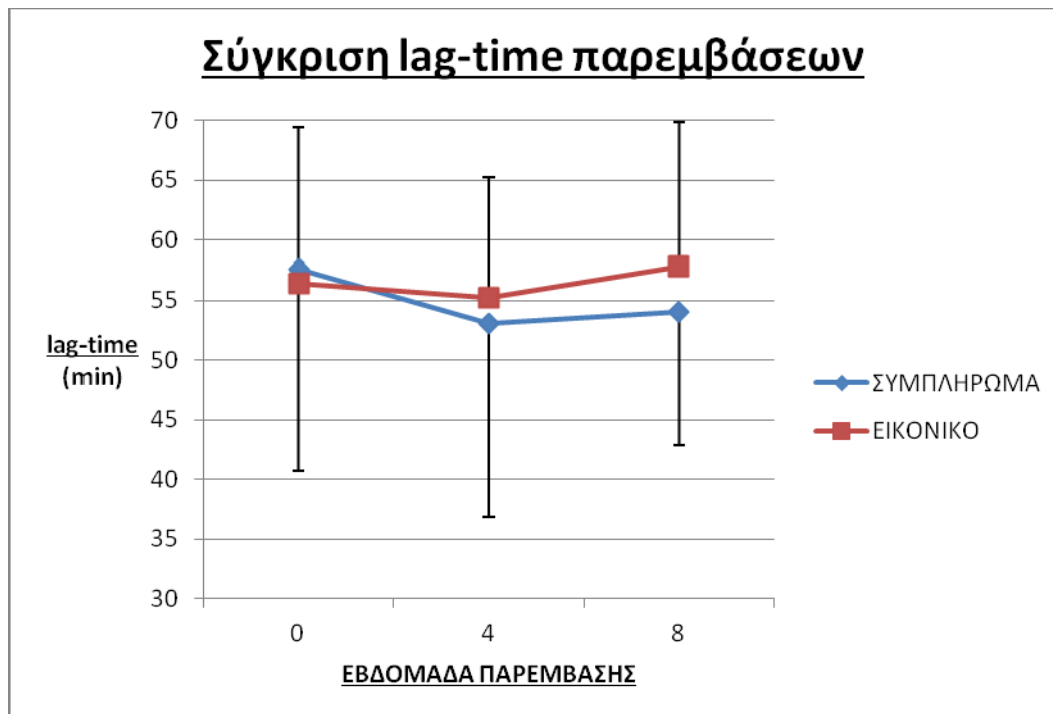
Σχεδιάγραμμα 4- %Μεταβολή ουρικού οξέος σε σχέση με το χρόνο 0

- Σύγκριση τιμών ουρικού οξέος στις 3 χρονικές στιγμές μεταξύ της ίδιας ομάδας παρέμβασης

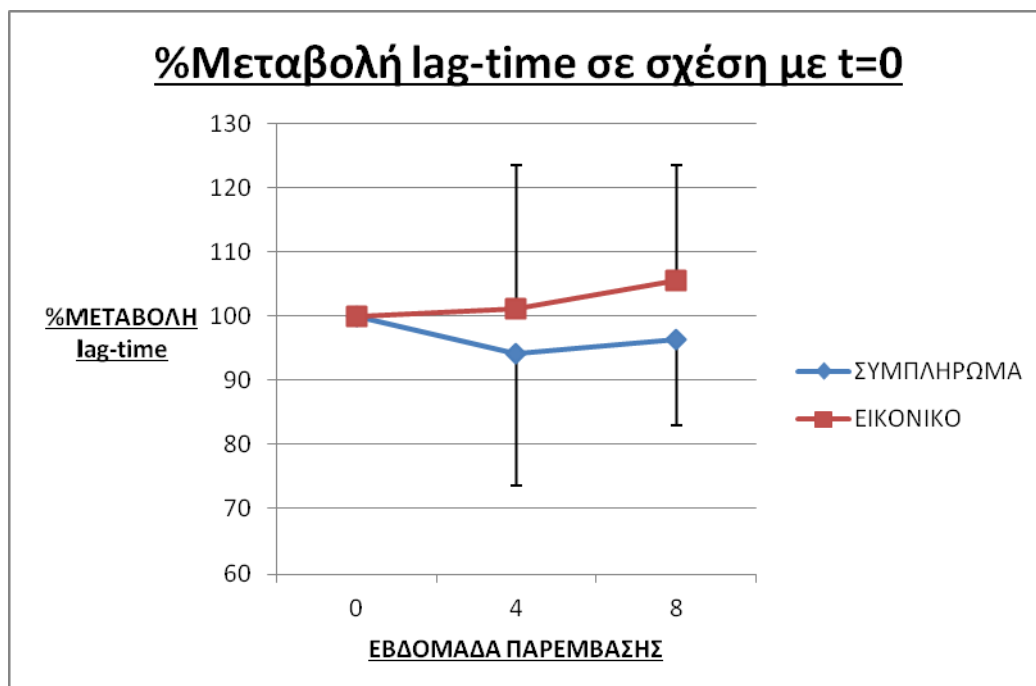
Η σύγκριση των μέσων όρων των τιμών ουρικού οξέος κατά τις 3 χρονικές στιγμές (εβδομάδα 0, εβδομάδα 4, εβδομάδα 8) στις δύο ομάδες παρέμβασης έγινε με το paired-Samples Test. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των 3 χρονικών στιγμών ούτε στην ομάδα με το συμπλήρωμα ούτε στην ομάδα με το εικονικό σκεύασμα ($p > 0,05$).

- Μεταβολή στην ex vivo αντίσταση του ορού στην οξείδωση κατά τη διάρκεια της παρέμβασης

Στο σχεδιάγραμμα 5 βλέπουμε τις τιμές των μέσων όρων και των αποκλίσεων των τιμών lag-time κατά τις 3 χρονικές στιγμές της παρέμβασης (εβδομάδα 0, εβδομάδα 4, εβδομάδα 8) στην ομάδα με το συμπλήρωμα και στην ομάδα με το εικονικό σκεύασμα. Στην ομάδα με το συμπλήρωμα υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών lag-time 18 εθελοντών και στην ομάδα με το εικονικό σκεύασμα 19 εθελοντών (N=37). Στο σχεδιάγραμμα 6 παρατηρούμε την % μεταβολή των τιμών lag-time σε σχέση με το χρόνο 0, προκειμένου να εξαλείψουμε τυχόν διαφορές μεταξύ των εθελοντών στο χρόνο 0.



Σχεδιάγραμμα 5- Μεταβολή lag-time κατά τη διάρκεια της παρέμβασης



Σχεδιάγραμμα 6- %Μεταβολή lag-time σε σχέση με το χρόνο 0

- Σύγκριση lag-time στις 3 χρονικές στιγμές μεταξύ της ίδιας ομάδας παρέμβασης

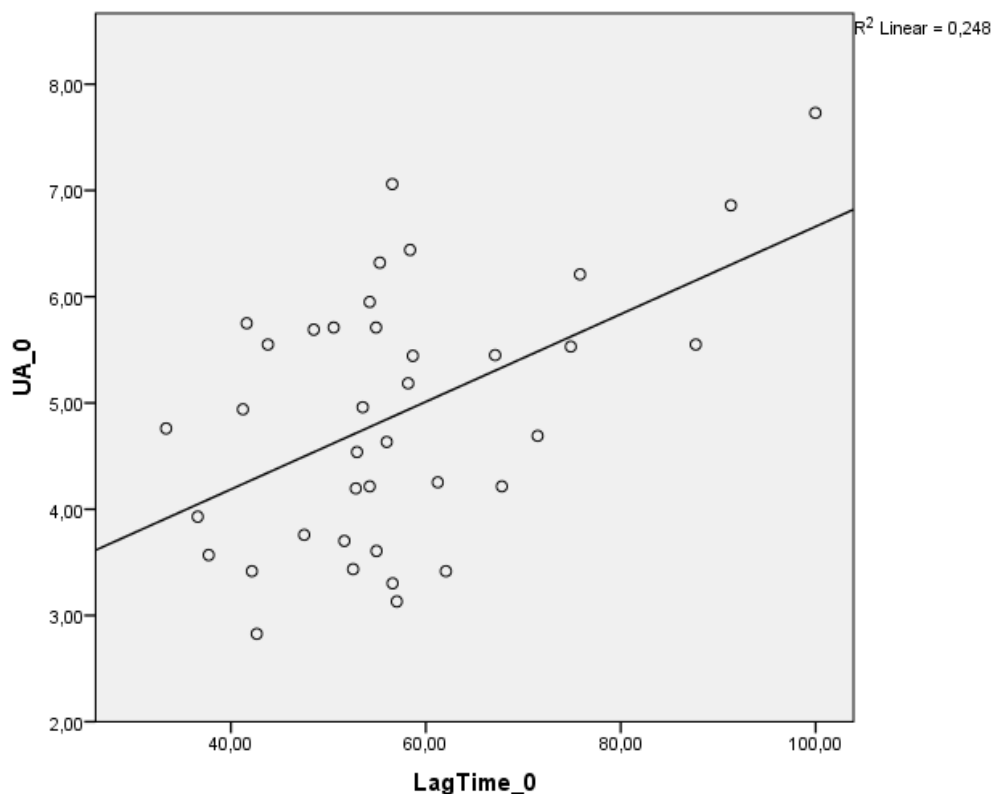
Η σύγκριση των 3 χρονικών στιγμών (εβδομάδα0, εβδομάδα4, εβδομάδα8) lag-time στις δύο ομάδες παρέμβασης έγινε με το paired-Samples Test. Τα αποτελέσματα από το paired-Samples Test δείχνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των 3 χρονικών στιγμών ούτε στην ομάδα με το συμπλήρωμα ούτε στην ομάδα με το εικονικό σκεύασμα. Παρόλα αυτά φαίνεται μια τάση για μείωση στην ομάδα με το συμπλήρωμα που ίσως γίνει στατιστικώς σημαντική όταν ολοκληρωθεί η μέτρηση στο συνολικό αριθμό των εθελοντών.

6.3 Συσχέτιση βιοχημικών δεικτών μεταξύ τους

Για την διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ των βιοχημικών δεικτών πραγματοποιήθηκε έλεγχος συσχέτισης κατά Pearson, στον χρόνο 0 στο σύνολο του πληθυσμού και για όλους τους βιοχημικούς δείκτες. Παρακάτω αναφέρονται οι συσχετίσεις που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές ($p < 0,05$).

- Συσχέτιση ουρικού οξέος – lag-time

Όπως φαίνεται και από το παρακάτω διάγραμμα παρατηρείται θετική συσχέτιση μεταξύ ουρικού οξέος και lag-time με συντελεστή συσχέτισης +0,498 και $p=0,001$, που σημαίνει ότι όσο αυξάνονται οι τιμές ουρικού οξέος αυξάνεται η αντίσταση στην οξειδωση (lag-time).



Σχεδιάγραμμα 7- Συσχέτιση μεταξύ ουρικού οξέος και lag-time

- Συσχέτιση ουρικού οξέος – LDL, HDL, TC, GLU

Ο συντελεστής συσχέτισης ουρικού οξέος και χοληστερόλης βρέθηκε $+0,527$ με $p<0,00$, που σημαίνει ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ των δύο βιοχημικών χαρακτηριστικών. Θετική συσχέτιση βρέθηκε επίσης μεταξύ ουρικού οξέος και LDL χοληστερόλης, με συντελεστή συσχέτισης $+0,672$ και $p=0,003$. αρά παρατηρούμε ότι όσο αυξάνονται οι τιμές ουρικού οξέος αυξάνεται η ολική και η LDL χοληστερόλη.

Αρνητική συσχέτιση βρέθηκε να υπάρχει μεταξύ ουρικού οξέος και γλυκόζης, όπου ο συντελεστής συσχέτισης υπολογίστηκε $-0,589$ με $p<0,00$, που σημαίνει ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ των δύο βιοχημικών χαρακτηριστικών, δηλαδή όσο μειώνεται η γλυκόζη αυξάνεται το ουρικό οξύ. Επιπλέον παρατηρήθηκε μια τάση αρνητικής συσχέτισης μεταξύ ουρικού οξέος και HDL χοληστερόλης με συντελεστή συσχέτισης $-0,419$ και $p=0,074$, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική.

- Συσχέτιση lag-time – HDL χοληστερόλης

Κατά τη συσχέτιση του lag-time με την HDL χοληστερόλη βρέθηκε συντελεστής συσχέτισης ίσος με $-0,580$ και $p=0,009$. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει αρνητική σχέση μεταξύ των δύο βιοχημικών δεικτών και όσο αυξάνονται οι τιμές του lag-time μειώνονται οι τιμές HDL-χοληστερόλης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο – ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Για τη βέλτιστη υγεία του ανθρώπινου σώματος είναι απαραίτητη η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ του οξειδωτικού στρες και της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού. Δραστικές μορφές οξυγόνου και δραστικές μορφές αζώτου παράγονται κατά τη διάρκεια των φυσιολογικών διεργασιών του οργανισμού και είναι απαραίτητες σε χαμηλές έως μέτριες συγκεντρώσεις για τη μεταγωγή σήματος και για άλλες σημαντικές βιολογικές λειτουργίες. Ωστόσο, εάν η υπερβολική παραγωγή αυτών των δραστικών μορφών δε μπορεί να εξουδετερωθεί από την αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, δημιουργείται οξειδωτικό στρες το οποίο συνδέεται με πολλές ασθένειες συμπεριλαμβανομένων καρδιαγγειακών παθήσεων, διαφόρων τύπων καρκίνου, διαβήτη και νευροεκφυλιστικών νόσων. Η ισορροπημένη διατροφή, πλούσια σε ποικιλία φρούτων και λαχανικών, καθώς και ένας υγιεινός τρόπος ζωής, αποτελούν την καλύτερη προσέγγιση για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες, αφού η υγιεινή διατροφή παρέχει περισσότερα από αρκετά αντιοξειδωτικά. Ωστόσο κάποιες ειδικές ομάδες του πληθυσμού οι οποίες πάσχουν από συγκεκριμένες ασθένειες ή ακολουθούν ένα ανθυγιεινό τρόπο ή έντονο τρόπο ζωής, πιθανό να χρειάζονται συμπληρώματα αντιοξειδωτικών βιταμινών και άλλων αντιοξειδωτικών συστατικών για να καλύψουν τις ανάγκες τους.

Τα πιθανά οφέλη για την υγεία από τη συμπληρωματική χορήγηση αντιοξειδωτικών είναι διφορούμενα. Πληθώρα επιδημιολογικών στοιχείων προτείνει ότι έχουν θετική επίδραση για την υγεία αλλά μετα-αναλύσεις που έγιναν σε αυτές τις μελέτες δεν επιβεβαιώνουν αυτή τη δράση. Οι μετα-αναλύσεις που έγιναν όμως αφορούν μελέτες που περιλαμβάνουν συνήθως μόνο ένα αντιοξειδωτικό συστατικό όπως τις αντιοξειδωτικές βιταμίνες E, C και β-καροτένιο. Αυτή η αντίφαση στην βιβλιογραφία θα μπορούσε να εξηγηθεί υποθέτοντας ότι το οξειδωτικό στρες είναι πολυπαραγοντική κατάσταση και παράγεται μέσω πολλών μηχανισμών και επομένως η αύξηση ενός μόνο αντιοξειδωτικού θα ήταν δύσκολο να εξουδετερώσει τις αρνητικές συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Άρα για βέλτιστη υγεία απαιτείται μια ισορροπία ενός αριθμού ποικιλίας αντιοξειδωτικών συστατικών και όχι ενός μόνο. Έτσι είναι απαραίτητο να γίνουν και άλλες κλινικές μελέτες που να συνδυάζουν αντιοξειδωτικά συστατικά για να αποδειχθούν τα οφέλη από τα συμπληρώματα αντιοξειδωτικών.

Μετά από ανασκόπηση στη βιβλιογραφία για αντίστοιχες μελέτες με την παρούσα μελέτη, παρατηρήσαμε ότι οι μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει συμπλήρωμα με μίγμα αντιοξειδωτικών συστατικών σε υγιείς εθελοντές είναι πολύ λίγες. Παρακάτω περιγράφονται μερικές από τις μελέτες που βρέθηκαν.

Η πρώτη αφορά μελέτη που έγινε από Jacob et al [29], στην οποία μετρήθηκαν δείκτες οξειδωτικού στρες σε 77 υγιείς άνδρες καπνιστές και μη καπνιστές ηλικίας 20-51 ετών, των οποίων η τυπική δίαιτα περιείχε μέτριες ποσότητες φρούτων και λαχανικών (μέσος όρος 2,6 μερίδες/ημέρα), για τον προσδιορισμό της επίδρασης μέτριας πρόσληψης αντιοξειδωτικών στους δείκτες οξειδωτικής βλάβης. Το συμπλήρωμα περιείχε βιταμίνη C, α-τοκοφερόλη και φυλλικό οξύ. Ο σχεδιασμός του συμπληρώματος ήταν έτσι ώστε οι προσλήψεις των αντιοξειδωτικών συστατικών να μην είναι παραπάνω από όσο περιέχουν 5 μερίδες φρούτων

και λαχανικών την ημέρα. Οι διατροφικές και καπνιστικές συνήθειες των εθελοντών παρακολουθήθηκαν έτσι ώστε να μην αλλάξουν συνήθειες κατά τη διάρκεια της παρέμβασης. Οι εθελοντές της μελέτης χωρίστηκαν σε δύο ομάδες παρέμβασης, την ομάδα με το συμπλήρωμα και την ομάδα που λάμβανε εικονικό σκεύασμα. Η παρέμβαση είχε διάρκεια 90 μέρες. Οι δείκτες που μετρήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν τα TBARS, το F2-ισοπροστανό και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια σε δείγματα αίματος και ούρων. Τα αποτελέσματα της μελέτης δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική μείωση των δεικτών από το συμπλήρωμα. Το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξαν ήταν πως μέτρια συμπληρωματική χορήγηση αντιοξειδωτικών σε υγιείς νέους άνδρες, συμπεριλαμβανομένων και καπνιστών με μικρή κατανάλωση φρούτων/λαχανικών δεν μειώνει αισθητά *in vivo* τις οξειδωτικές βλάβες και ότι η ενδογενής αντιοξειδωτική άμυνα νέων και υγιών ενηλίκων είναι συνεπώς επαρκής και δε χρειάζεται επιπλέον χορήγηση αντιοξειδωτικών για μείωση της *in vivo* οξειδωτικής βλάβης.

Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε από τους Loucas Actis-Goretti et al [2], στην οποία συμμετείχαν 16 εθελοντές άντρες και γυναίκες ηλικίας 31-48 ετών, μη καπνιστές. Το συμπλήρωμα που δόθηκε σε αυτή τη μελέτη περιείχε βιταμίνη E, β-καροτένιο, σελήνιο και συνένζυμο Q10. Οι εθελοντές της μελέτης χωρίστηκαν σε δύο ομάδες παρέμβασης, την ομάδα με το συμπλήρωμα και την ομάδα που λάμβανε εικονικό σκεύασμα. Η παρέμβαση είχε διάρκεια 30 μέρες. Πριν ξεκινήσει η παρέμβαση και για 10 ημέρες οι εθελοντές δεν κατανάλωσαν κανένα συμπλήρωμα αντιοξειδωτικών (περίοδος κάθαρσης). Στη μελέτη αυτή μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις MDA, TBARS, α-τοκοφερόλης, h-καροτενίου και ουβικινόνης πλάσματος. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν στατιστική αύξηση στην συγκέντρωση α-τοκοφερόλης, h-καροτενίου και ουβικινόνης πλάσματος και στατιστικά σημαντική μείωση MDA και TBARS κατά τη διάρκεια της παρέμβασης. Επιπλέον όταν οι εθελοντές διαχωρίστηκαν με βάση το φύλο, φάνηκε ότι η συγκέντρωση MDA και TBARS πλάσματος ήταν υψηλότερη στους άνδρες από ότι στις γυναίκες της παρέμβασης κατά την έναρξη. Είναι ενδιαφέρον ότι μετά την περίοδο των 30 ημερών, αυτές οι διαφορές τείνουν να εξαφανιστούν. Τα αποτελέσματα από αυτή τη μελέτη δείχνουν κατά πρώτο λόγο ότι το συμπλήρωμα είχε αποτελεσματική δράση στη μείωση των δεικτών οξειδωτικής βλάβης και κατά δεύτερο λόγο ότι οι άντρες πρέπει να ενισχύουν την αντιοξειδωτική τους άμυνα νωρίτερα από ό,τι οι γυναίκες. Ωστόσο τα αποτελέσματα δεν είναι αντικειμενικά γιατί πρόκειται για μελέτη με πολύ μικρό αριθμό εθελοντών.

Παρόμοια αποτελέσματα είχε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από Jun Peng et al [2], στην οποία συμμετείχαν 32 υγιείς εθελοντές, μη καπνιστές, ηλικίας 19-25 ετών. Οι εθελοντές της μελέτης χωρίστηκαν σε δύο ομάδες παρέμβασης, την ομάδα με το συμπλήρωμα και την ομάδα που λάμβανε εικονικό σκεύασμα. Η παρέμβαση είχε διάρκεια 5 εβδομάδες. Το συμπλήρωμα στη συγκεκριμένη μελέτη περιείχε μίγμα με πολλά αντιοξειδωτικά συστατικά (Βιταμίνη C, α-τοκοφερόλη, β-καροτένιο, B6, B12, φυλλικό οξύ, εκχύλισμα κόκκων σταφυλιού, εκχύλισμα από γάλα γαϊδουράγκαθου) και ήταν σε μορφή κάψουλας. Οι δείκτες που μέτρησαν περιλαμβάνουν τη δραστηριότητα των ενζύμων SOD και GPx, ολική αντιοξειδωτική ικανότητα, πρωτεϊνικά καρβονύλια και MDA πλάσματος. Δεν παρατήρησαν καμία αλλαγή στη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων που μετρήθηκαν αλλά βρήκαν στατιστικά σημαντική αύξηση στην ολική αντιοξειδωτική ικανότητα και μείωση της MDA και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Από τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης συμπεραίνουμε ότι η συμπληρωματική χορήγηση αντιοξειδωτικών βελτιώνει την αντιοξειδωτική κατάσταση και

μπορεί να μειώσει την οξειδωτική βλάβη. Περιορισμό αυτής της μελέτης αποτελεί το ότι δεν καταγράφηκαν οι διατροφικές συνήθειες των εθελοντών κατά τη διάρκεια της παρέμβασης.

Σε αυτή τη μελέτη χορηγήσαμε ένα μίγμα αντιοξειδωτικών βιταμινών, ιχνοστοιχείων και φυσικών αντιοξειδωτικών συστατικών σε φαινομενικά υγιείς εθελοντές για διάστημα 8 εβδομάδων και μελετήσαμε την επίδραση του σε δείκτες οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα μελετήσαμε τα επίπεδα του ουρικού οξέος ορού, ενδογενές αντιοξειδωτικό, τη δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και την αντίσταση του ορού των εθελοντών στην ex vivo οξείδωση.

Οι δύο ομάδες παρέμβασης δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τα ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά κατά το χρόνο 0 όταν ξεκίνησε η μελέτη. Μετά από σύγκριση του BMI κατά τις 3 χρονικές στιγμές μεταξύ των ομάδων παρέμβασης καταλήξαμε ότι δεν υπήρχε κάποια διαφοροποίηση με φυσιολογική σημασία. Ο πληθυσμός της μελέτης χαρακτηρίζεται ως υπέρβαρος, και μετά από διαχωρισμό των ομάδων παρέμβασης σε σχέση με το φύλο, καταλήξαμε ότι κυρίως οι άνδρες της μελέτης είχαν αυξημένες τιμές ολικής χοληστερόλης και LDL χοληστερόλης. Τα ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών δεν είχαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις κατά τη διάρκεια της παρέμβασης.

Αξίζει να αναφερθεί ότι στο διάστημα των 8 εβδομάδων έγινε καταγραφή των διατροφικών συνηθειών των εθελοντών με ανακλήσεις 24ώρου με σκοπό να εξακριβώσουμε ότι οι διατροφικές τους συνήθειες δεν μεταβλήθηκαν σε αυτό το διάστημα. Λόγω μειωμένου χρόνου δεν καταφέραμε να επεξεργαστούμε τα αποτελέσματα και δεν συμπεριλήφθηκαν στη παρούσα πτυχιακή μελέτη.

Κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της GPx δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο ομάδων παρέμβασης. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αντίστοιχη παρέμβαση όπου δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στη δραστικότητα του ενζύμου (Jun Peg et al,[38]) μετά από χορήγηση μίγματος αντιοξειδωτικών σε υγιείς εθελοντές. Ωστόσο όταν συγκρίναμε τις τρεις χρονικές στιγμές της παρέμβασης με το συμπλήρωμα παρατηρήθηκε μια τάση για μείωση μεταξύ της εβδομάδας 4-8 και της εβδομάδας 0-8, η οποία πιθανό να γίνει στατιστικά σημαντική όταν ολοκληρωθούν όλες οι μετρήσεις.

Όσον αφορά το χρόνο αντίστασης ορού στην οξείδωση (lag- time) και στις δύο παρεμβάσεις αυξήθηκε χωρίς στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Όταν συγκρίναμε τις τρεις χρονικές στιγμές μεταξύ τους, και πάλι δε βρήκαμε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα. Παρόμοια μελέτη στην οποία συμμετείχαν εθελοντές με διαβήτη τύπου II είχε στατιστικά σημαντική αύξηση του lag-time της οξείδωσης της LDL (Jane E. et al, [56]). Ωστόσο δεν υπάρχουν πολλές μελέτες που να έχουν μετρήσει αυτό το δείκτη οξειδωτικού στρες. Πιθανό τα αποτελέσματα να αλλάξουν όταν ολοκληρωθεί η μελέτη και υπολογιστεί το lag-time όλων των εθελοντών.

Επιπλέον, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των τιμών ουρικού οξέος κατά τη διάρκεια της παρέμβασης. Παρατηρήσαμε μικρή (μη στατιστικά σημαντική) μείωση του ουρικού οξέος και των δύο παρεμβάσεων ενώ αναμέναμε αντίθετο αποτέλεσμα στην ομάδα με το συμπλήρωμα. Μετά από αναζήτηση στη βιβλιογραφία δε βρέθηκε κάποια μελέτη που να μετρήθηκε το ουρικό οξύ ορού αλλά πολλές παρόμοιες μελέτες αναφέρουν αύξηση άλλων αντιοξειδωτικών του πλάσματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη βιβλιογραφία δεν

υπάρχει ομοφωνία για το αν τα αυξημένα επίπεδα ουρικού οξέος είναι προστατευτικά ή αν αποτελούν παράγοντα κινδύνου. Οξεία μικρή αύξηση στα επίπεδα ουρικού οξέος φαίνεται να είναι προστατευτικά και να μειώνουν το οξειδωτικό στρες, ενώ χρόνια αύξηση αποτελεί παράγοντα κινδύνου για καρδιαγγειακά και άλλα νοσήματα.[14]

Η συσχέτιση βιοχημικών δεικτών μεταξύ τους, έδειξε στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ lag-time και ουρικού οξέος, lag-time και HDL χοληστερόλης και ουρικού οξέος με TC, LDL, HDL και επιπέδων γλυκόζης. Η σχέση μεταξύ lag-time και ουρικού οξέος εξηγείται πιθανώς με το γεγονός ότι η αύξηση του ουρικού οξέος επιφέρει μείωση του οξειδωτικού στρες, και ως αποτέλεσμα αυτού αυξάνεται η αντίσταση του ορού στην οξειδωση. Η αύξηση του ουρικού οξέος του ορού επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες εκ των οποίων και η αντίσταση στην ινσουλίνη. Η αντίσταση στην ινσουλίνη οδηγεί σε μειωμένη νεφρική απέκκριση ουρικού οξέος και επομένως σε αύξηση του ουρικού οξέος πλάσματος. Η σχέση αυτή πιθανό να εξηγεί την αρνητική συσχέτιση που βρέθηκε με τη γλυκόζη και την τάση που βρέθηκε με την HDL χοληστερόλη, αφού η αντίσταση στην ινσουλίνη σχετίζεται με μειωμένα επίπεδα HDL χοληστερόλης.[14] Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 1, αύξηση επιπέδων ουρικού οξέος ορού σχετίζονται με αντισταθμιστικό μηχανισμό για τη μείωση του οξειδωτικού στρες σε άτομα με αθηροσκλήρωση. Το γεγονός αυτό φαίνεται να εξηγεί τη θετική σχέση που βρήκαμε μεταξύ ουρικού οξέος και ολικής και LDL χοληστερόλης.

Η HDL χοληστερόλη όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, προστατεύει την LDL χοληστερόλη από την οξειδωση και έχει αθηροπροστατευτική δράση. [20] Όσο αυξάνεται η αντίσταση του ορού στην οξειδωση μειώνεται το οξειδωτικό στρες. Άρα θα περιμέναμε να βρούμε μια θετική συσχέτιση αντι μια αρνητική σχέση μεταξύ lag-time και της HDL.

Συμπερασματικά φαίνεται ότι η χορήγηση του συμπληρώματος διατροφής δεν είχε κάποια σημαντική επίδραση στους μέχρι στιγμής μετρούμενους δείκτες του οξειδωτικού στρες. Η μελέτη ωστόσο συνεχίζεται και όταν ολοκληρωθούν οι μετρήσεις πιθανό να βρεθούν πιο σαφή αποτελέσματα. Επιπλέον θα συμπεριληφθούν και άλλοι πιο αξιόπιστοι δείκτες οξειδωτικού στρες όπως τα ισοπροσάνια για να έχουμε μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την επίδραση του συμπληρώματος.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Accinni, R., Rosina, M., Bamonti, F., Della Noce, C., Tonini, A., Bernacchi, F., . . . Gorini, M. (2006). Effects of combined dietary supplementation on oxidative and inflammatory status in dyslipidemic subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 16(2), 121-127. doi: 10.1016/j.numecd.2005.05.006
2. Actis-Goretti, L., Carrasquedo, F., & Fraga, C. G. (2004). The regular supplementation with an antioxidant mixture decreases oxidative stress in healthy humans. Gender effect. *Clin Chim Acta*, 349(1-2), 97-103. doi: 10.1016/j.cccn.2004.06.009
3. Ahlawat, K. S., & Khatkar, B. S. (2011). Processing, food applications and safety of aloe vera products: a review. *J Food Sci Technol*, 48(5), 525-533. doi: 10.1007/s13197-011-0229-z
4. Amitava Dasgupta, Kimberly Klein, (2014). Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements, Prevention and Treatment of Disease. *Elsevier e-book*. Book chapter 1,2,7,8,9,10,12,15,16.
5. Arthur, J. R. (2000). The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci*, 57(13-14), 1825-1835.
6. Benzie, I. F., & Choi, S. W. (2014). Antioxidants in food: content, measurement, significance, action, cautions, caveats, and research needs. *Adv Food Nutr Res*, 71, 1-53. doi: 10.1016/B978-0-12-800270-4.00001-8
7. Bonomini, F., Tengattini, S., Fabiano, A., Bianchi, R., & Rezzani, R. (2008). Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*, 23(3), 381-390.
8. Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., Jr., & Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 142, w13659. doi: 10.4414/smw.2012.13659
9. Calo, L. A., Pagnin, E., Davis, P. A., Semplicini, A., Nicolai, R., Calvani, M., & Pessina, A. C. (2006). Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters: relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. *Int J Cardiol*, 107(1), 54-60. doi: 10.1016/j.ijcard.2005.02.053
10. Castilla, P., Davalos, A., Teruel, J. L., Cerrato, F., Fernandez-Lucas, M., Merino, J. L., . . . Lasuncion, M. A. (2008). Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. *Am J Clin Nutr*, 87(4), 1053-1061.
11. Cherubini, A., Ruggiero, C., Polidori, M. C., & Mecocci, P. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med*, 39(7), 841-852. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.06.025
12. Constantinos A. Demopoulos, Haralabos C. Karantonis, Smaragdi Antonopoulou. (2003). Platelet activating factor-a molecular link between atherosclerosis theories. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105 (2003) 705–716
13. de la Lastra, C. A., & Villegas, I. (2007). Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 5), 1156-1160. doi: 10.1042/BST0351156
14. de Oliveira, R. C. Burini. (2012). High plasma uric acid concentration: causes and consequences. *Diabetology&Metabolic Syndrome*. 4:12.
15. Detopoulou, P., Panagiotakos, D. B., Antonopoulou, S., Pitsavos, C., & Stefanadis, C. (2008). Dietary choline and betaine intakes in relation to concentrations of inflammatory markers in healthy adults: the ATTICA study. *Am J Clin Nutr*, 87(2), 424-430.
16. Devasagayam, T. P., Bloor, K. K., & Ramasarma, T. (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J Biochem Biophys*, 40(5), 300-308.
17. Dietrich, M., Block, G., Hudes, M., Morrow, J. D., Norkus, E. P., Traber, M. G., . . . Packer, L. (2002). Antioxidant supplementation decreases lipid peroxidation biomarker F(2)-isoprostanes in plasma of smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(1), 7-13.
18. Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1), 47-95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001

19. E. Yiannakopoulou. (2009). Oxidative stress-antioxidant mechanisms: *Clinical implications*. *Archive of Hellenic Medicine* 26(1): 23-25
20. Eugene A Podrez. (2010). Antioxidant properties of high density lipoprotein and atherosclerosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 37(7): 719–725. doi:10.1111/j.1440-1681.2010.05380.x.
21. Fuchs-Tarlovsky, V., Bejarano-Rosales, M., Gutierrez-Salmean, G., Casillas, M. A., Lopez-Alvarenga, J. C., & Ceballos-Reyes, G. M. (2011). [Effect of antioxidant supplementation over oxidative stress and quality of life in cervical cancer]. *Nutr Hosp*, 26(4), 819-826. doi: 10.1590/S0212-16112011000400023
22. Fusco, D., Colloca, G., Lo Monaco, M. R., & Cesari, M. (2007). Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging*, 2(3), 377-387.
23. Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 428010. doi: 10.1155/2012/428010
24. Halliwell, B. (2013). The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol*, 75(3), 637-644. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04272.x
25. Harrison, F. E., Bowman, G. L., & Polidori, M. C. (2014). Ascorbic acid and the brain: rationale for the use against cognitive decline. *Nutrients*, 6(4), 1752-1781. doi: 10.3390/nu6041752
26. Henning, S. M., Niu, Y., Lee, N. H., Thames, G. D., Minutti, R. R., Wang, H., . . . Heber, D. (2004). Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *Am J Clin Nutr*, 80(6), 1558-1564.
27. Ho, E., Karimi Galougahi, K., Liu, C. C., Bhindi, R., & Figtree, G. A. (2013). Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol*, 1(1), 483-491. doi: 10.1016/j.redox.2013.07.006
28. Hongu, N., & Sachan, D. S. (2000). Caffeine, carnitine and choline supplementation of rats decreases body fat and serum leptin concentration as does exercise. *J Nutr*, 130(2), 152-157.
29. Jacob, R. A., Aiello, G. M., Stephensen, C. B., Blumberg, J. B., Milbury, P. E., Wallock, L. M., & Ames, B. N. (2003). Moderate antioxidant supplementation has no effect on biomarkers of oxidant damage in healthy men with low fruit and vegetable intakes. *J Nutr*, 133(3), 740-743.
30. Karlic, H., & Lohninger, A. (2004). Supplementation of L-carnitine in athletes: does it make sense? *Nutrition*, 20(7-8), 709-715. doi: 10.1016/j.nut.2004.04.003
31. Kondo, T., Hirose, M., & Kageyama, K. (2009). Roles of oxidative stress and redox regulation in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 16(5), 532-538.
32. Madamanchi, N. R., Vendrov, A., & Runge, M. S. (2005). Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(1), 29-38. doi: 10.1161/01.ATV.0000150649.39934.13
33. Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins, J. B., 3rd. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*, 17(1), 24-38. doi: 10.1002/jbt.10058
34. Mayne, S. T. (2003). Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr*, 133 Suppl 3, 933S-940S.
35. Nieto, F. J., Iribarren, C., Gross, M. D., Comstock, G. W., & Cutler, R. G. (2000). Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis? *Atherosclerosis*, 148(1), 131-139.
36. Nile, S. H., Kim, S. H., Ko, E. Y., & Park, S. W. (2013). Polyphenolic contents and antioxidant properties of different grape (*V. vinifera*, *V. labrusca*, and *V. hybrid*) cultivars. *Biomed Res Int*, 2013, 718065. doi: 10.1155/2013/718065
37. Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2010). Markers of oxidative stress in erythrocytes and plasma during aging in humans. *Oxid Med Cell Longev*, 3(1), 2-12. doi: 10.4161/oxim.3.1.10476
38. Peng, J., Jones, G. L., & Watson, K. (2000). Stress proteins as biomarkers of oxidative stress: effects of antioxidant supplements. *Free Radic Biol Med*, 28(11), 1598-1606.

39. Pinazo-Duran, M. D., Gallego-Pinazo, R., Garcia-Medina, J. J., Zanon-Moreno, V., Nucci, C., Dolz-Marco, R., . . . Diaz-Llopis, M. (2014). Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes. *Clin Interv Aging*, 9, 637-652. doi: 10.2147/CIA.S52662
40. Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, 88(4), 1243-1276. doi: 10.1152/physrev.00031.2007
41. Prasad, K. (2012). Resveratrol, wine, and atherosclerosis. *Int J Angiol*, 21(1), 7-18. doi: 10.1055/s-0032-1306417
42. Proudfoot, J. M., Puddey, I. B., Beilin, L. J., Stocker, R., & Croft, K. D. (1997). Unexpected dose response of copper concentration on lipoprotein oxidation in serum: discovery of a unique peroxidase-like activity of urate/albumin in the presence of high copper concentrations. *Free Radic Biol Med*, 23(5), 699-705.
43. Puddu, P., Puddu, G. M., Cravero, E., Vizioli, L., & Muscari, A. (2012). Relationships among hyperuricemia, endothelial dysfunction and cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *J Cardiol*, 59(3), 235-242. doi: 10.1016/j.jjcc.2012.01.013
44. Ribas, G. S., Vargas, C. R., & Wajner, M. (2014). L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene*, 533(2), 469-476. doi: 10.1016/j.gene.2013.10.017
45. Ribeiro, M. L., Arcari, D. P., Squassoni, A. C., & Pedrazzoli, J., Jr. (2007). Effects of multivitamin supplementation on DNA damage in lymphocytes from elderly volunteers. *Mech Ageing Dev*, 128(10), 577-580. doi: 10.1016/j.mad.2007.08.002
46. Sadowska-Bartosz, I., & Bartosz, G. (2014). Effect of Antioxidants Supplementation on Aging and Longevity. *Biomed Res Int*, 2014, 404680. doi: 10.1155/2014/404680
47. Saran, M. (2003). To what end does nature produce superoxide? NADPH oxidase as an autocrine modifier of membrane phospholipids generating paracrine lipid messengers. *Free Radic Res*, 37(10), 1045-1059.
48. Shah, D., Mahajan, N., Sah, S., Nath, S. K., & Paudyal, B. (2014). Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci*, 21, 23. doi: 10.1186/1423-0127-21-23
49. Smoliga, J. M., Baur, J. A., & Hausenblas, H. A. (2011). Resveratrol and health--a comprehensive review of human clinical trials. *Mol Nutr Food Res*, 55(8), 1129-1141. doi: 10.1002/mnfr.201100143
50. Soltani, Z., Rasheed, K., Kapusta, D. R., & Reisin, E. (2013). Potential role of uric acid in metabolic syndrome, hypertension, kidney injury, and cardiovascular diseases: is it time for reappraisal? *Curr Hypertens Rep*, 15(3), 175-181. doi: 10.1007/s11906-013-0344-5
51. Stocker, R., & Keaney, J. F., Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, 84(4), 1381-1478. doi: 10.1152/physrev.00047.2003
52. Stocker, R., & Keaney, J. F., Jr. (2005). New insights on oxidative stress in the artery wall. *J Thromb Haemost*, 3(8), 1825-1834. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01370.x
53. Strazzullo, P., & Puig, J. G. (2007). Uric acid and oxidative stress: relative impact on cardiovascular risk? *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 17(6), 409-414. doi: 10.1016/j.numecd.2007.02.011
54. Sugamura, K., & Keaney, J. F., Jr. (2011). Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*, 51(5), 978-992. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.004
55. Tabima, D. M., Frizzell, S., & Gladwin, M. T. (2012). Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radic Biol Med*, 52(9), 1970-1986. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.041
56. Upritchard, J. E., Sutherland, W. H., & Mann, J. I. (2000). Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E, and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 23(6), 733-738.

57. Urso, M. L., & Clarkson, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2), 41-54.
58. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1), 44-84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
59. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160(1), 1-40. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009
60. Venables, M. C., Hulston, C. J., Cox, H. R., & Jeukendrup, A. E. (2008). Green tea extract ingestion, fat oxidation, and glucose tolerance in healthy humans. *Am J Clin Nutr*, 87(3), 778-784.
61. Vogiatzi, G., Tousoulis, D., & Stefanadis, C. (2009). The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol*, 50(5), 402-409.
62. Vogler, B. K., & Ernst, E. (1999). Aloe vera: a systematic review of its clinical effectiveness. *Br J Gen Pract*, 49(447), 823-828.
63. Willcox, J. K., Ash, S. L., & Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44(4), 275-295. doi: 10.1080/10408690490468489

