

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ - ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ
ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ ΕΦΗΒΩΝ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : ΠΑΣΣΟΣ Μ., Λέκτορας

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ : ΠΑΣΣΟΣ Μ., Λέκτορας
ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ Σ., Επίκ. Καθηγήτρια
ΠΟΛΥΧΡΟΝΟΠΟΥΛΟΣ Ε., Λέκτορας

ΓΕΩΡΓΑΚΑΚΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

ΜΗΛΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 1999

ΛΙΓΟΛΟΠΗΔΟ

ΕΙΣΒΑΛΙΟΥΣΗΚΗ

Α. Κτην:

ρ. Γασ:

7135

Γασ. γασ:

5041

Ταχυ κ. Αρ.βρ:

ΠΤΥ ΓΕΘ

Περιεχόμενα

	Πρόλογος.....	1
1.	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1.1	Εισαγωγή.....	2
1.2	Οξειδωτικά μέσα.....	3
1.2.1	Ελεύθερες ρίζες.....	3
1.2.1.1	Γενικά.....	3
1.2.1.2	Μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών.....	5
1.2.1.3	Το ανιόν υδροϋπεροξειδικής ρίζας, $O_2^{\cdot-}$	10
1.2.1.4	Η ρίζα υδροξυλίου, $OH^{\cdot}$	11
1.2.1.5	Υπεροξείδιο του υδρογόνου, H_2O_2	13
1.2.1.6	Υπεριώδες φως και υδροξυλικές ρίζες.....	14
1.2.2	Ορισμένα άλλα μόρια που προκαλούν ανησυχία.....	15
1.2.2.1	Οξείδια του αζώτου.....	15
1.2.2.2	Το όζον.....	16
1.2.2.3	Ιονισμένο οξυγόνο (Singlet oxygen).....	16
1.3	Τι ρίζες παράγονται στο ανθρώπινο σώμα;.....	18
1.4	Πώς ενεργούν οι ελεύθερες ρίζες;.....	20
1.5	Υπάρχουν in vivo τα μεταλλικά ιόντα – καταλύτες των αντιδράσεων των ελευθέρων ριζών;.....	21
1.6	Επιδράσεις των οξειδωτικών στα μακρομόρια.....	22
1.6.1	Υδατάνθρακες.....	22
1.6.2	Νουκλεϊκά οξέα.....	23
1.6.3	Πρωτεΐνες.....	24
1.6.4	Λιπίδια.....	25
1.7	Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί.....	26
1.7.1	Κυτταρικά αντιοξειδωτικά.....	26
1.7.1.1	Γλουταθειόνη και πρωτεϊνικά σουλφυδρύλια.....	27
1.7.1.2	Ένζυμα.....	31
1.7.2	Αντιοξειδωτικά του πλάσματος.....	32
1.8	Αντιοξειδωτικές βιταμίνες και θρεπτικά συστατικά.....	33

2.2.3.2	Διαλύτης έκλουσης στο HPLC.....	68
2.2.3.3	Προετοιμασία των δειγμάτων.....	69
2.3	Αποτελέσματα.....	70
2.4	Συζήτηση – Συμπεράσματα.....	76
2.5	Επίλογος.....	82
	Βιβλιογραφία.....	
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	σελ. 9

Περιεχόμενοι Πίνακες

Πίνακας 1. Προέλευση ελευθέρων ριζών.....σελ. 8

Πίνακας 2. Επιπτώσεις των αλλοιώσεων βιολογικών μορίων από ελεύθερες ρίζες.....σελ. 9

Πίνακας 3. Αντιοξειδωτικά που προσβάλλουν ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS – Reactive Oxygen Species) και ενεργές μορφές αζώτου (RNS – Reactive Nitrogen Species).....σελ. 18

Πίνακας 4. Θρεπτικά συστατικά και αντιοξειδωτική άμυνα.....σελ. 34

Πίνακας 5. Περιεκτικότητα βιταμίνης Ε σε τρόφιμα εκφραζόμενη σε ισοδύναμα τοκοφερόλης.....σελ. 37

Πίνακας 6. Σύγκριση 1987 RDIs και 1989 RDAs για την βιταμίνη Α.....σελ. 52

Πίνακας 7. Συντελεστές μετατροπής καροτενοειδών σε μονάδες βιταμίνης Α.
.....σελ.53

Πίνακας 8. Επίπεδα χοληστερόλης (mg/dl) και βιταμινών (mg/L) του δείγματος των 35 ατόμων στην Μόσχα τον Δεκέμβρη του 1992.....σελ. 57

Πίνακας 9. Συγκεντρώσεις καροτενοειδών και ρετινόλης των συμμετεχόντων στην έρευνα πριν ξεκινήσουν την υψηλή σε καροτενοειδή δίαιτα.....σελ. 58

Πίνακας 10. Εύρος (0,025 – 0,975 εκατοστημόρια) για βιταμίνη Α, β-καροτένιο, α-τοκοφερόλη (ΑΤ), χοληστερόλη (CT) ορού σύμφωνα με το φύλο και την ηλικία.....σελ. 58

Πίνακας 11. Μέσοι όροι συγκεντρώσεων καροτενοειδών σε παιδιά στο Belizeσελ. 59

Πίνακας 12. Επίπεδα β-καροτενίου ($\mu\text{mol/L}$) από διάφορα ευρωπαϊκά εργαστήρια.....σελ.59

Πίνακας 13. Μέσοι όροι και εύρη επιπέδων καροτενοειδών στον ορό (#,38) ή στο πλάσμα (21,39) Ευρωπαίων (εκφραζόμενα σε $\mu\text{mol/L}$).....σελ. 60

Πίνακας 14. Μέσοι όροι συγκεντρώσεων ($\mu\text{mol/L}$) αντιοξειδωτικών βιταμινών στο πλάσμα από διάφορες επιδημιολογικές μελέτες.....σελ. 61

Πίνακας 15. Συγκεντρώσεις βιταμινών στο πλάσμα αίματος εφήβων ($\mu\text{mole/L}$).....σελ.71

Πίνακας 16. Αναλυτικά αποτελέσματα μέτρησης βιταμινών (συγκεντρώσεις: $\mu\text{moles/L}$, ηλικία : έτη).....σελ.72

Πρόλογος

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε από τους φοιτητές του Τμήματος Επιστημών Διατροφής – Διαιτολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Γεωργακάκη Χαράλαμπο και Μηλιά Γεώργιο, κατά το ακαδημαϊκό έτος 1998 – 99, με θέμα « Προσδιορισμός επιπέδων αντιοξειδωτικών βιταμινών στο πλάσμα εφήβων ».

Οι αντιοξειδωτικές βιταμίνες αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους αμυντικούς μηχανισμούς του ανθρώπινου οργανισμού απέναντι στην καταστροφική δράση των ελευθέρων ριζών και τη γενικότερη επίδραση του μηχανισμού του οξειδωτικού στρες στο ανθρώπινο σώμα. Ο συγκεκριμένος ρόλος των βιταμινών αυτών καθιστά αναγκαία τη μέτρηση των επιπέδων τους στον ανθρώπινο οργανισμό, η οποία αποτελεί ένα αξιόπιστο μέτρο αξιολόγησης της ευρύτερης αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού. Κατά αυτό τον τρόπο, παρέχεται η δυνατότητα εντοπισμού τυχόν ελλείψεων και επέμβασης όταν αυτό κριθεί σκόπιμο από ειδικούς επιστήμονες (διαιτολόγος, γιατρός), ώστε να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά οι ελλείψεις αυτές.

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη έχει ακριβώς αυτό τον σκοπό, δηλαδή τον προσδιορισμό και την αξιολόγηση των επιπέδων των λιποδιαλυτών αντιοξειδωτικών βιταμινών στο αίμα ενός υγιούς πληθυσμού εφήβων, εφαρμόζοντας τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC – High Pressure Liquid Chromatography).

Στο σημείο αυτό, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον κύριο Πάσσο Μιχαήλ, Λέκτορα του Τμήματος Επιστημών Διατροφής – Διαιτολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, για την ανάθεση της παρούσας πτυχιακής μελέτης και την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγησή του για την πραγματοποίηση αυτής. Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την κυρία Αντωνοπούλου Σμαραγδή, Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστημών Διατροφής – Διαιτολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και τον κύριο Πολυχρονόπουλο Ευάγγελο, Λέκτορα του Τμήματος Επιστημών Διατροφής – Διαιτολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου για την εποικοδομητική συνεργασία και τις σημαντικές παρεμβάσεις τους κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Καλλιθέα, Ιούνιος 1999

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Εισαγωγή

Τα τελευταία έτη, με την βοήθεια ενός αυξανόμενου αριθμού επιστημονικών δημοσιεύσεων, το αποκαλούμενο οξειδωτικό στρες ενέχεται στο μηχανισμό εμφάνισης διάφορων ασθενειών του ανθρώπου. Επιπροσθέτως, διατροφικοί παράγοντες έχουν εμπλακεί είτε ως αιτιολογικοί παράγοντες του οξειδωτικού στρες είτε ως προστατευτικοί παράγοντες στην αντιοξειδωτική άμυνα έναντι του στρες. Τα τρόφιμα περιέχουν τόσο φυσικές όσο και προσθετικές ουσίες, που συμμετέχουν σε αυτές τις διαδικασίες, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται βιταμίνες, μέταλλα, πρόσθετα αντιοξειδωτικά, μικροβιοκτόνα, πολυακόρεστα λιπίδια και μία ποικιλία από τοξίνες που προέρχονται από φυτά και μικροοργανισμούς.

Το οξειδωτικό στρες έχει ορισθεί ως διαταραχή της κατάστασης ισορροπίας ανάμεσα σε προοξειδωτικά (prooxidant) και αντιοξειδωτικά (antioxidant) συστήματα στα κύτταρα [1]. Αυτός ο ορισμός του οξειδωτικού στρες υποδηλώνει ότι τα κύτταρα έχουν στο εσωτερικό τους προοξειδωτικά και αντιοξειδωτικά συστήματα τα οποία δρουν συνεχώς, με αποτέλεσμα, κατά την διάρκεια του φυσιολογικού αερόβιου μεταβολισμού να λαμβάνουν χώρα παράλληλα ο σχηματισμός οξειδωτικών μέσων και η μετατροπή τους σε μη τοξικά. Όταν λαμβάνουν χώρα επιπρόσθετα οξειδωτικά «γεγονότα», πιθανότατα τα προοξειδωτικά συστήματα υπερτερούν των αντιοξειδωτικών συστημάτων, προκαλώντας οξειδωτικές βλάβες σε λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και νουκλεϊκά οξέα. Σε τελευταία ανάλυση, κυτταρικός «θάνατος» μπορεί να λάβει χώρα εξαιτίας σοβαρού οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες μπορεί επίσης να προκαλέσει μία ταχύτατη μεταβολή των αντιοξειδωτικών συστημάτων επηρεάζοντας πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτά τα συστήματα και εξαντλώντας κυτταρικά αποθέματα αντιοξειδωτικών ουσιών όπως η γλουταθειόνη και η βιταμίνη Ε.

Διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών / αντιοξειδωτικών συστημάτων μπορεί να προκληθεί αφενός από αναρίθμητες διαφορετικές οξειδωτικές αιτίες στις οποίες συμπεριλαμβάνονται η ακτινοβολία, ο ξενοβιοτικός μεταβολισμός περιβαλλοντικών μολυσματικών ουσιών και άλλες ουσίες, και αφετέρου από

«προσβολές» κατά του αμυντικού συστήματος σε διάφορες ασθένειες του ανθρώπου ή σε ανώμαλη αμυντική λειτουργία. Σαφείς αποδείξεις για τον ρόλο ποικιλίας ριζών (radical species) σε αυτές τις διαδικασίες έχουν προκαλέσει αξιοσημείωτο ενδιαφέρον για τις αντιδράσεις των μορφών οξυγόνου που ανάγονται μερικώς και των ριζικών (radical) και μη ριζικών (non radical) ειδών που προέρχονται από αυτές.

1.2 Οξειδωτικά μέσα

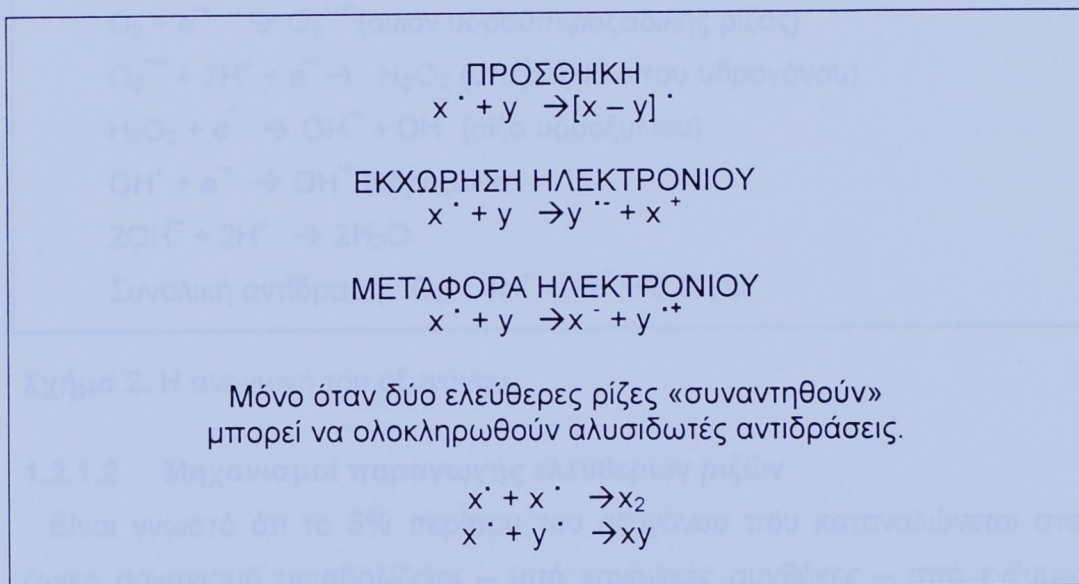
1.2.1 Ελεύθερες ρίζες

1.2.1.1 Γενικά

Το άτομο κάθε στοιχείου αποτελείται από ένα κεντρικό πυρήνα (ο οποίος περιέχει θετικά φορτισμένα πρωτόνια και ουδέτερα νετρόνια) και ηλεκτρόνια που περιστρέφονται γύρω του. Τα ηλεκτρόνια συνδυάζονται ανά ζεύγη, και κάθε ζεύγος κινείται σε δικό του τμήμα του χώρου γύρω από τον πυρήνα. Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται κάθε είδος ατόμου που έχει την ικανότητα ανεξάρτητης ύπαρξης (για αυτό το λόγο και ο όρος «ελεύθερη») και το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα αδέσμευτα ηλεκτρόνια. Η φύση της ελεύθερης ρίζας ενός ατόμου ή ενός μορίου συνήθως υποδηλώνεται από μία άνω τελεία (π.χ. $H^{\cdot}$, $O_2^{\cdot}$, $OH^{\cdot}$). Μόρια μπορεί να είναι ελεύθερες ρίζες εάν ένα ή περισσότερα από τα υπάρχοντα άτομα έχει αδέσμευτα ηλεκτρόνια. Πράγματι, το διατομικό μόριο οξυγόνου (O_2) περιγράφεται ως ελεύθερη ρίζα επειδή περιέχει δύο ελεύθερα ηλεκτρόνια. Άλλες αέριες ελεύθερες ρίζες είναι το νιτρικό οξείδιο ($NO^{\cdot}$) και το διοξείδιο του αζώτου ($NO_2^{\cdot}$). Αντιθέτως, το αέριο όζον (O_3) δεν είναι ελεύθερη ρίζα – δεν υπάρχουν αδέσμευτα ηλεκτρόνια στα μόριά του. Οι ελεύθερες ρίζες διαφορετικών τύπων ποικίλουν σαφώς ως προς την χημική τους δραστηριότητα (reactivity), αλλά γενικώς είναι πιο ενεργές από τα μη ριζικά. Ευτυχώς, ωστόσο, το οξυγόνο είναι μία εξαίρεση αυτού του κανόνα: δεν είναι μία ιδιαίτερα αντιδραστική ελεύθερη ρίζα εξαιτίας της διάταξης των ηλεκτρονίων της.

Όταν συναντηθούν δύο ελεύθερες ρίζες, τα αδέσμευτα ηλεκτρόνιά τους μπορούν να ενωθούν και να σχηματίσουν ένα ζεύγος, με αποτέλεσμα και οι δύο ελεύθερες ρίζες να «χαθούν». (βλ. σχήμα 1). Ωστόσο, αφού τα περισσότερα υπάρχοντα μόρια στους ζώντες οργανισμούς δεν έχουν αδέσμευτα ηλεκτρόνια, οποιεσδήποτε ελεύθερες ρίζες σχηματιστούν,

πιθανότατα θα αντιδράσουν με μη ριζικά, σχηματίζοντας νέες ελεύθερες ρίζες. Για το λόγο αυτό, οι αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών τείνουν να είναι αλυσιδωτές. (βλ. σχήμα 1). Αυτή είναι μία βασική αρχή της χημείας των ελευθέρων ριζών.



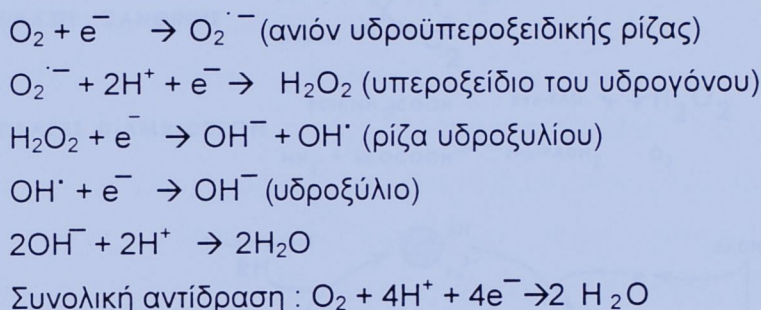
Σχήμα 1. Οι ρίζες «γεννούν» ρίζες

Τα αδέσμευτα ηλεκτρόνια μπορούν να συνδεθούν με πολλά διαφορετικά άτομα και μόρια. Αυτός είναι ο λόγος της ύπαρξης πολλών ελευθέρων ριζών. Για παράδειγμα, η δομή πολλών πρωτεϊνών σταθεροποιείται με συνδέσεις ατόμων θείου με ομοιοπολικούς δεσμούς προς σχηματισμό δισουλφιδικών γεφυρών. Αυτές οι δισουλφιδικές γέφυρες μπορούν να σπάσουν δίνοντας ρίζες θείου, εάν το ένα από τα δύο ηλεκτρόνια του ομοιοπολικού δεσμού παραμείνει σε κάθε άτομο θείου.



Ανάμεσα στους μηχανισμούς διαμέσου των οποίων αυτές και άλλες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν είναι η άλεση των πρωτεϊνών (π.χ. κατά την διάρκεια της επεξεργασίας τροφίμων). Η πρωτεΐνη κερατίνη που υπάρχει στα ανθρώπινα νύχια είναι πλούσια σε δισουλφιδικές γέφυρες, με αποτέλεσμα ρίζες θείου να μπορούν να ανιχνευθούν σε κομμένα νύχια. Ωστόσο, σε βιολογικά συστήματα, μεγαλύτερη προσοχή πρέπει να εστιαστεί στις ρίζες

οξυγόνου. Η αναγωγή του οξυγόνου μπορεί να σχηματίσει δύο ελεύθερες ρίζες – το ανιόν υδροϋπεροξειδικής ρίζας και την ρίζα υδροξυλίου. (βλ. σχήμα 2).



Σχήμα 2. Η αναγωγή του οξυγόνου

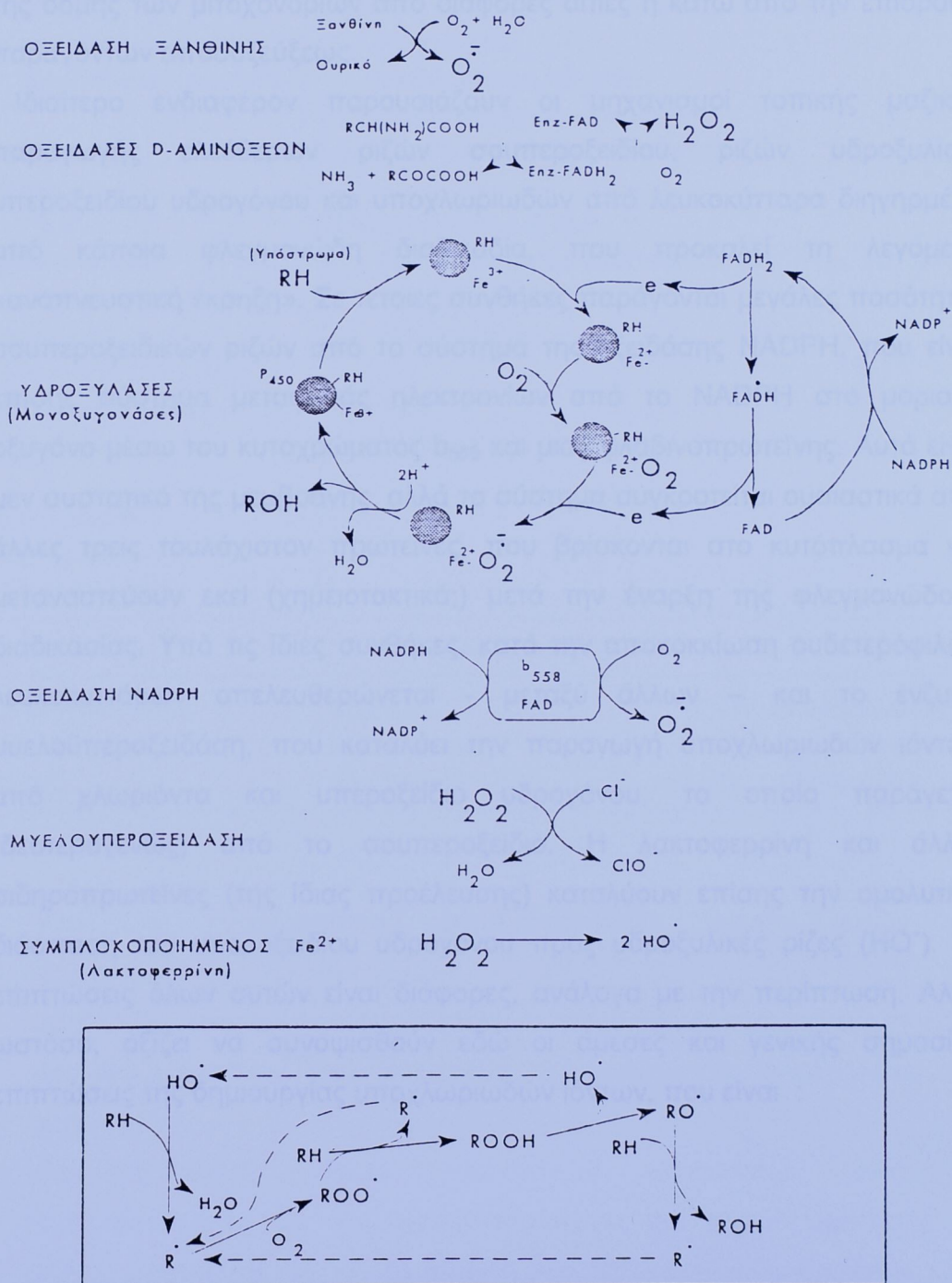
1.2.1.2 Μηχανισμοί παραγωγής ελεύθερων ριζών

Είναι γνωστό ότι το 5% περίπου του οξυγόνου που καταναλώνεται στον ζωικό οργανισμό μεταβολίζεται – υπό κανονικές συνθήκες – από ενζυμικά συστήματα, που παράγουν σουπεροξειδίο, υπεροξειδίο υδρογόνου, ρίζες υδροξυλίου κ.λ.π.

Το σχήμα 3 συνοψίζει τους πιο αντιπροσωπευτικούς τύπους τέτοιων ενζυμικών μηχανισμών. Οι μεγαλύτερες ποσότητες σουπεροξειδίου υπό κανονικές φυσιολογικές συνθήκες παράγονται από την ξανθινοξειδάση κατά τον μεταβολισμό των πουρινικών βάσεων. Διάφορες οξειδάσες αμινοξέων (κυρίως D – αμινοξέων, αλλά και άλλων ειδών μορίων) παράγουν απευθείας υπεροξειδίο υδρογόνου, πρόσθετες ποσότητες του οποίου παράγονται δευτερογενώς από το σουπεροξειδίο.

Υπάρχουν όμως πολλές ενδείξεις ότι σουπεροξειδίο (ή άλλες ελεύθερες ρίζες) προέρχονται επίσης από διαρροές από τα διάφορα συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων, όπως π.χ. οι διάφορες υδροξυλάσες. Όπως δείχνει το σχήμα, αυτές παράγουν σουπεροξειδικές ρίζες ως ενδιάμεσα προϊόντα, δεσμευμένα στον σίδηρο του κυτοχρώματος P₄₅₀. Ωστόσο, ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντος (επιδράσεις ιόντων, αναστολέων, pH κ.λ.π.), αυτές μπορούν να προκαλέσουν είτε αποσύζευξη και διαρροή του σουπεροξειδίου, είτε απευθείας επίδραση σε κάποιο μόριο γειτονικό με την ημιανηγμένη μορφή των φλαβινοσυνενζύμων (FADH[•]), που είναι αυτή

καθεαυτή ρίζα ημικινόνης. Ανάλογα ισχύουν και για τις νεφρικές υδροξυλάσεις στεροειδών, που περιέχουν κυτόχρωμα b_5 και αδρενοδοξίνη



Σχήμα 3. Μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών

(σιδηροθειοπρωτεΐνη), καθώς και για την αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων, όπου πιστεύεται ότι η ημικινονοειδής ρίζα ουβικινόνης προκαλεί σχηματισμό ελεύθερου σουπεροξειδίου σε περιπτώσεις αλλοίωσης της δομής των μιτοχονδρίων από διάφορες αιτίες ή κάτω από την επίδραση παραγόντων αποσυζεύξεως.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μηχανισμοί τοπικής μαζικής παραγωγής ελεύθερων ριζών σουπεροξειδίου, ριζών υδροξυλίου, υπεροξειδίου υδρογόνου και υποχλωριωδών από λευκοκύτταρα διηγηρμένα από κάποια φλεγμονώδη διαδικασία, που προκαλεί τη λεγόμενη «αναπνευστική έκρηξη». Σε τέτοιες συνθήκες παράγονται μεγάλες ποσότητες σουπεροξειδικών ριζών από το σύστημα της οξειδάσης NADPH, που είναι επίσης σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων από το NADPH στο μοριακό οξυγόνο μέσω του κυτοχρώματος b_{558} και μιας φλαβινοπρωτεΐνης. Αυτά είναι μεν συστατικά της μεμβράνης, αλλά το σύστημα συγκροτείται ουσιαστικά από άλλες τρεις τουλάχιστον πρωτεΐνες, που βρίσκονται στο κυτόπλασμα και μεταναστεύουν εκεί (χημειοτακτικά;) μετά την έναρξη της φλεγμονώδους διαδικασίας. Υπό τις ίδιες συνθήκες, κατά την αποκοκκίωση ουδετερόφιλων λευκοκυττάρων απελευθερώνεται - μεταξύ άλλων - και το ένζυμο μυελοϋπεροξειδάση, που καταλύει την παραγωγή υποχλωριωδών ιόντων από χλωριόντα και υπεροξειδίο υδρογόνου, το οποίο παράγεται (δευτερογενώς) από το σουπεροξειδίο. Η λακτοφερρίνη και άλλες σιδηροπρωτεΐνες (της ίδιας προέλευσης) καταλύουν επίσης την ομολυτική διάσπαση του υπεροξειδίου υδρογόνου προς υδροξυλικές ρίζες ($\text{HO}^\bullet$). Οι επιπτώσεις όλων αυτών είναι διάφορες, ανάλογα με την περίπτωση. Αλλά ωστόσο, αξίζει να συνοψισθούν εδώ οι άμεσες και γενικής σημασίας επιπτώσεις της δημιουργίας υποχλωριωδών ιόντων, που είναι :

Πίνακας 1. Προέλευση ελευθέρων ριζών

ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΗΓΕΣ		
Μιτοχόνδρια Αναπνευστική αλυσίδα Υπεροξειδωση λιποειδών Κυτόπλασμα Φλαβίνες Μεταλλοϊόντα μεταπτώσεως Λυσοσώματα Αναπνευστική έκρηξη Μυελοϋπεροξειδάση (φαγοκύτταρα) Υπεροξυσώματα Οξειδάσες Φλαβοπρωτεΐνες	Μεμβράνες Λιπογονάσες Υπεροξειδωση λιποειδών Συνθετάση προσταγλανδινών Οξειδάση NADPH (φαγοκύτταρα) Ενδοπλασματικό δίκτυο Συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων (P ₄₅₀ , b ₅) Οξειδάση ξανθίνης Αιμοσφαιρίνη Πυρήνας Συστήματα μεταφοράς ηλεκτρονίων (P ₄₅₀ , b ₅)	
ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΠΗΓΕΣ		
Ατμοσφαιρικοί ρύποι Καπνός τσιγάρου Διαλύτες	Φάρμακα Φυτοφάρμακα Αναισθητικά	Υπεροξικό περιβάλλον Εκθεση σε ακτινοβολία (UV, ραδιενέργεια)

- Απευθείας ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεϊνών, μεταξύ αυτών της κολλαγονάσης, ζελατινάσης κ.α.
- Απευθείας απενεργοποίηση θειούχων πρωτεϊνών, κυρίως αναστολέων σερινοπρωτεασών, που περιέχουν μεθειονίνη (π.χ. αναστολέων της ελαστάσης).
- Απενεργοποίηση άλλων πρωτεϊνικών αναστολέων από τις ενεργοποιημένες ως άνω μεταλλοπρωτεΐνες και σερινοπρωτεάσες, με τελικό αποτέλεσμα τη γενική αύξηση των πρωτεολυτικών δράσεων κάθε είδους.

Τέλος στο σχήμα 3 απεικονίζεται η πορεία των αλυσιδωτών αυτοξειδωτικών αντιδράσεων, που πολλαπλασιάζουν την απόδοση των προηγούμενων μεταβολικών μηχανισμών παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Πίνακας 2. Επιπτώσεις των αλλοιώσεων βιολογικών μορίων από ελεύθερες ρίζες

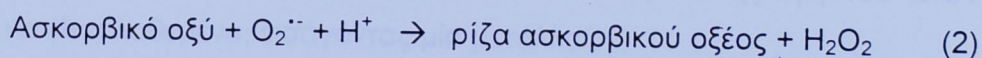
ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΜΟΡΙΑ	ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ - ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (όλων των μεμβρανών και λιποσφαιρίων των λιποκυττάρων)	- Απώλεια ρευστότητας μεμβράνης, αποδιοργάνωση υποδοχέων, κυτταρόλυση - Δημιουργία διαμοριακών δεσμών (πολυμερισμός) λιποειδών-πρωτεϊνών-νουκλεϊνικών οξέων (μέσω παραγωγής αλδεϋδών) Σχηματισμός λιποφουσκίνης Γήρανση κυττάρων - Αλλοίωση μεταβολισμού προσταγλανδινών θρομβοξανών, ελαττωμένη παραγωγή PGI₂ Αυξημένη συσσώρευση αιμοπεταλίων
Νουκλεϊνικά οξέα	Μεταλλάξεις DNA Καρκίνος
Θειούχες πρωτεΐνες και ένζυμα	- Δημιουργία σταυροειδών δεσμών - Μετουσίωση - απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας - Ανενεργοποίηση αναστολέων πρωτεΐνασών - Ευθραυστότητα ερυθροκυττάρων → Αιμόλυση, Ισχαμία
Αιμοσφαιρίνη	- Οξειδωση προς μεθαιμοσφαιρίνη → Ευθραυστότητα ερυθροκυττάρων
Υδατάνθρακες γλυκοπρωτεϊνών και υποδοχέων	- Αλλοίωση λειτουργίας υποδοχέων - Αλλοίωση δράσης ορμόνης νευροδιαβιβαστού - Αλλοίωση ανοσο-αποκρίσεων

Με βάση όλα τα παραπάνω δεδομένα, στον πίνακα 1 συνοψίζονται οι κυριότερες ενδογενείς πηγές δημιουργίας ελεύθερων ριζών στα διάφορα οργανίδια των κυττάρων, αναφέροντας στο κάτω τμήμα και τους κυριότερους εξωγενείς παράγοντες.

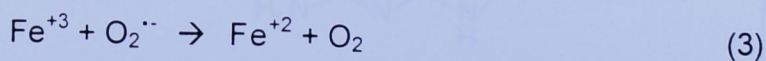
Ο Πίνακας 2 συνοψίζει επιγραμματικά τις κυριότερες επιβλαβείς επιπτώσεις των ελευθέρων ριζών και τις αλλοιώσεις που προκαλούν στα διάφορα βιολογικά μόρια.

1.2.1.3 Το ανιόν υδροϋπεροξειδικής ρίζας, $O_2^{\cdot-}$

Το ανιόν υδροϋπεροξειδικής ρίζας σχηματίζεται με την προσθήκη ενός ηλεκτρονίου σε ένα μόριο οξυγόνου. Το προστιθέμενο ηλεκτρόνιο σχηματίζει ζεύγος με το ένα από τα δύο αδέσμευτα ηλεκτρόνια που ήδη υπάρχουν στο O_2 . Η χημική συμπεριφορά της $O_2^{\cdot-}$ διαφέρει αρκετά ανάλογα με τον διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένη. Στο νερό, η $O_2^{\cdot-}$ δεν είναι πολύ αντιδραστική. Ορισμένες φορές μπορεί να δρα ως ασθενές οξειδωτικό μέσο, αποδεχόμενη ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο. Για παράδειγμα, μπορεί να οξειδώσει το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C)



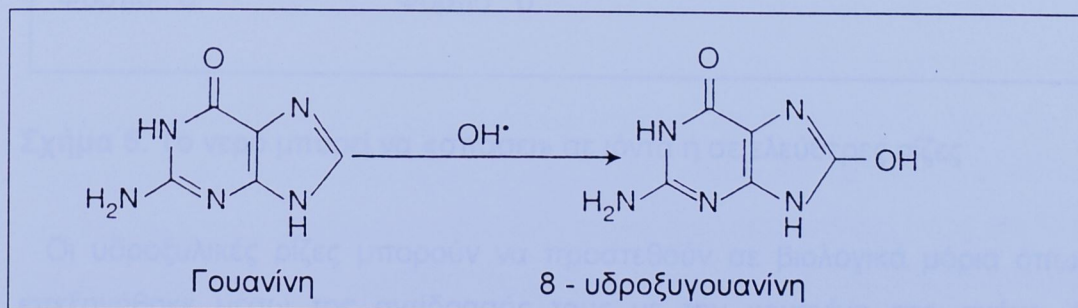
Το ανιόν υδροϋπεροξειδικής ρίζας σε υδατικό διάλυμα συχνότερα δρα ως αναγωγικό μέσο (π.χ. ανάγει τον τρισθενή σίδηρο σε άλατα σιδήρου):



Μετά την προσφορά του ηλεκτρονίου του, η $O_2^{\cdot-}$ οξειδώνεται και επανασχηματίζεται μοριακό οξυγόνο. Ωστόσο, σε οργανικούς διαλύτες, η $O_2^{\cdot-}$ είναι πολύ πιο αντιδραστική και επικίνδυνη. Συνεπώς όποια $O_2^{\cdot-}$ σχηματιστεί στο εσωτερικό βιολογικών μεμβρανών μπορεί να προκαλέσει σημαντική βλάβη.

1.2.1.4 Η ρίζα υδροξυλίου, OH[•]

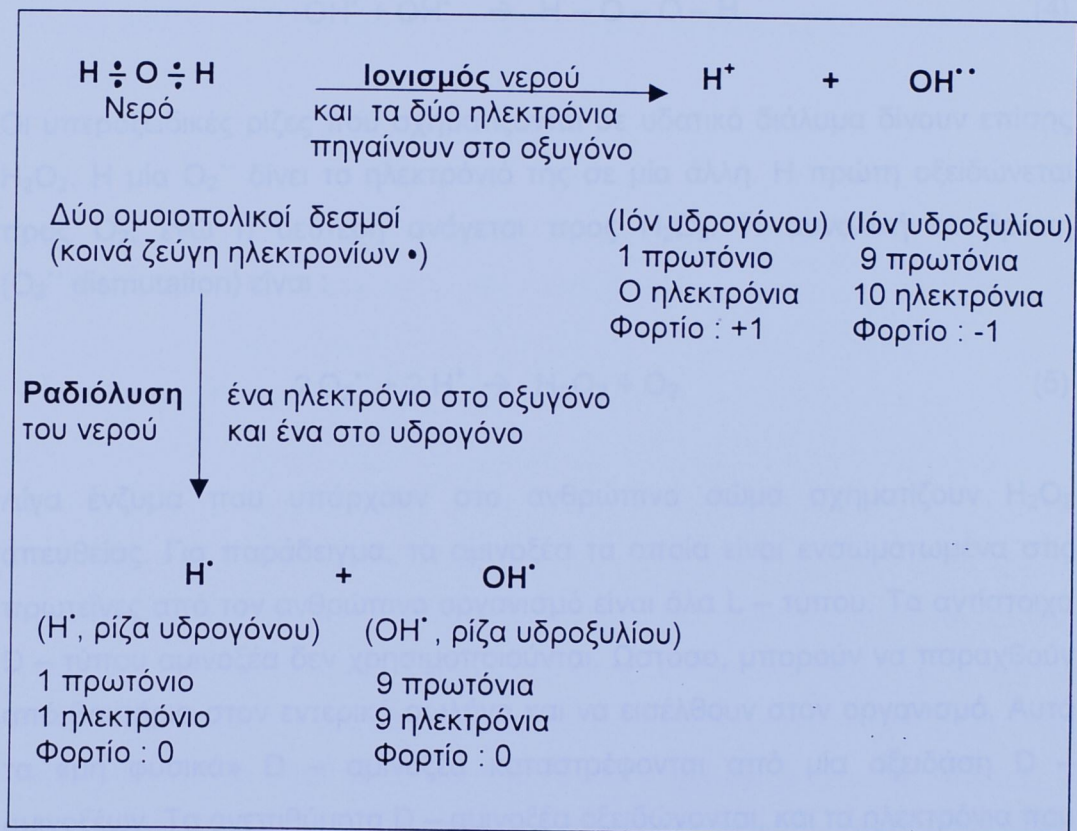
Η ρίζα υδροξυλίου είναι η περισσότερο αντιδραστική ρίζα οξυγόνου που είναι γνωστή στη χημεία. Έχει τρομακτική τάση πρόκλησης βιολογικής βλάβης, αφού προσβάλλει όλα τα βιολογικά μόρια με το που έρχεται σε επαφή μαζί τους, συνήθως προκαλώντας την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων ελευθέρων ριζών. Στο σχήμα 4 απεικονίζεται ένα τέτοιο παράδειγμα. Το DNA περιέχει ως «σπονδυλική στήλη» μόρια του σακχάρου δεσοξυριβόζη που είναι συνδεδεμένα με φωσφορικές ομάδες. Προσαρτημένες στην δεσοξυριβόζη είναι οι βάσεις πουρίνης, αδερίνη και γουανίνη και οι βάσεις πυριμιδίνης, κυτοσίνη και θυμίνη. Η αδερίνη σχηματίζει ζεύγη με θυμίνη, και η γουανίνη με κυτοσίνη. Αυτός ο σχηματισμός ζευγών είναι απαραίτητος για να παρέχει την δυνατότητα στο DNA να αντιγράφεται και να μεταφράζεται. Οι υδροξυλικές ρίζες μπορούν να προσβάλλουν όλα τα τμήματα του DNA. Η αντίδραση στο σχήμα 4 δείχνει μία επίπτωση που μπορεί να έχει στην γουανίνη. Η OH[•] προστίθεται στην γουανίνη και σχηματίζει μία ρίζα υδροξυγουανίνης (hydroxyguanine), η οποία μπορεί τότε να σχηματίσει την 8 – υδροξυγουανίνη (8 – hydroxyguanine). Η ανάγνωση της 8 – υδροξυγουανίνης (8 – hydroxyguanine) κατά την αντιγραφή του DNA μπορεί να γίνει λαθεμένα, εισάγοντας μία μετάλλαξη.



Σχήμα 4. Η αντίδραση της ρίζας υδροξυλίου με το γενετικό υλικό

Τις περισσότερες από τις γνώσεις μας σχετικά με την χημεία της OH[•] μας παρέχουν επιστήμονες - χημικοί ακτινοβολιών , αφού η έκθεση του νερού σε ακτίνες – X ή σε ακτίνες γ προκαλεί την γένεση OH[•]. Το σχήμα 5 δείχνει τον τρόπο. Επίσης εξηγεί την διαφορά μεταξύ της ρίζας υδροξυλίου ρίζας και του ιόντος υδροξυλίου OH⁻, τα οποία συχνά συγχέονται σε επιστημονικά συγγράμματα. Τα ιόντα υδροξυλίου είναι σχετικώς «ακίνδυνα». Κάθε λίτρο

νερού στο ανθρώπινο σώμα στους 37°C περιέχει περίπου 6×10^{16} OH^- ιόντα. Εάν είχαμε αυτόν τον αριθμό υδροξυλικών ριζών, δεν θα επιζούσαμε. Πράγματι, η μεγαλύτερη από την βλάβη που γίνεται σε ζώντες οργανισμούς που εκτίθενται σε υπερβολική ιονίζουσα ακτινοβολία οφείλεται στις συνέπειες από την προσβολή βιολογικών μεμβρανών από τις ρίζες.

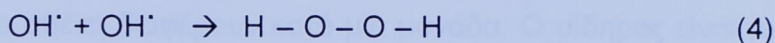


Σχήμα 5. Το νερό μπορεί να «σπάσει» σε ιόντα ή σε ελεύθερες ρίζες

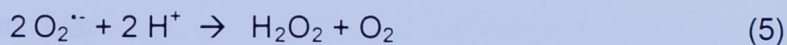
Οι υδροξυλικές ρίζες μπορούν να προστεθούν σε βιολογικά μόρια όπως επεξηγήθηκε μέσω της αντίδρασής τους με την γουανίνη στο σχήμα 4. Μπορούν επίσης να μετατραπούν πάλι σε νερό αποσπώντας άτομα υδρογόνου από ένα βιολογικό μόριο, όπως συμβαίνει στην λιπιδική υπεροξειδωση. Αφού η $\text{OH}^{\bullet}$ αντιδρά τόσο γρήγορα με καθετί, οποιαδήποτε $\text{OH}^{\bullet}$ που σχηματίζεται ενώνεται με οτιδήποτε είναι δίπλα της μέσα στο ανθρώπινο σώμα αφού δεν διαρκεί αρκετό χρόνο για να μετακινηθεί κάπου αλλού.

1.2.1.5 Υπεροξειδίο του υδρογόνου, H_2O_2

Εάν συναντηθούν δύο υδροξυλικές ρίζες, μπορούν να ενώσουν τα αδέσμευτα ηλεκτρόνιά τους προς σχηματισμό ενός ομοιοπολικού δεσμού οξυγόνου – οξυγόνου, δίνοντας H_2O_2 , ένα προϊόν χωρίς αδέσμευτα ηλεκτρόνια.



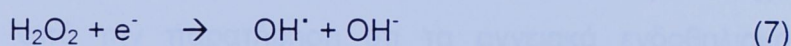
Οι υπεροξειδικές ρίζες που σχηματίζονται σε υδατικό διάλυμα δίνουν επίσης H_2O_2 . Η μία $O_2^{\cdot -}$ δίνει το ηλεκτρόνιό της σε μία άλλη. Η πρώτη οξειδώνεται προς O_2 , ενώ η δεύτερη ανάγεται προς H_2O_2 . Η συνολική αντίδραση ($O_2^{\cdot -}$ dismutation) είναι :



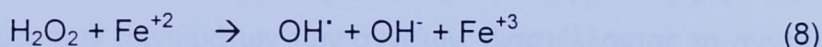
Λίγα ένζυμα που υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα σχηματίζουν H_2O_2 απευθείας. Για παράδειγμα, τα αμινοξέα τα οποία είναι ενσωματωμένα στις πρωτεΐνες από τον ανθρώπινο οργανισμό είναι όλα L – τύπου. Τα αντίστοιχα D – τύπου αμινοξέα δεν χρησιμοποιούνται. Ωστόσο, μπορούν να παραχθούν από βακτήρια στον εντερικό σωλήνα και να εισέλθουν στον οργανισμό. Αυτά τα «μη φυσικά» D – αμινοξέα καταστρέφονται από μία οξειδάση D – αμινοξέων. Τα ανεπιθύμητα D – αμινοξέα οξειδώνονται, και τα ηλεκτρόνια που απομακρύνονται από αυτά χρησιμοποιούνται για την αναγωγή O_2 προς H_2O_2 . Διάφοροι ανθρώπινοι ιστοί (ιδίως ο εντερικός) περιέχουν το ένζυμο οξειδάση της ξανθίνης που οξειδώνει το σύνθετο μόριο της υποξανθίνης προς ξανθίνη, και μετά οξειδώνει την ξανθίνη περαιτέρω προς ουρικό οξύ. Το ουρικό οξύ αποβάλλεται στα ούρα: δεν υπάρχει άλλο ένζυμο για περαιτέρω διάσπαση. Όταν η οξειδάση της ξανθίνης δρα στην ξανθίνη και στην υποξανθίνη σχηματίζονται $O_2^{\cdot -}$ και H_2O_2 . Οι ποσότητες της οξειδάσης της ξανθίνης μπορούν να αυξηθούν ως αποτέλεσμα ιστικού τραυματισμού σε συγκεκριμένες ανθρώπινες ασθένειες, σχηματίζοντας επιπλέον $O_2^{\cdot -}$ και H_2O_2 .

Το H_2O_2 είναι ένα απαλό μπλε υγρό, το οποίο αναμιγνύεται εύκολα με το νερό, και έτσι διαχέεται εύκολα στον οργανισμό και διασχίζει τις μεμβράνες. Έχει χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια σαν «λευκαντικό» και σαν «απολυμαντικό» πληγών. Αφού δεν έχει αδέσμευτα ηλεκτρόνια, δεν είναι

ελεύθερη ρίζα. Ωστόσο, εάν ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο προστεθεί στο H_2O_2 , σχηματίζεται $\text{OH}^\cdot$. (βλ. σχήμα 2). Για το λόγο αυτό το H_2O_2 είναι άκρως επικίνδυνο : είναι ελάχιστα ενεργό μόνο του, αλλά μπορεί οποιαδήποτε στιγμή να σχηματίσει $\text{OH}^\cdot$ εάν ένα του προσφερθεί ένα ηλεκτρόνιο. Από πού μπορεί να προέλθει αυτό το ηλεκτρόνιο; Μία πηγή είναι συγκεκριμένα μεταλλικά ιόντα – αυτά των οποίων τα σθένη διαφέρουν κατά μία μονάδα. Ο σίδηρος είναι το καλύτερο παράδειγμα:



Η συνολική αντίδραση είναι :



Η αντίδραση (8) είναι η αντίδραση Fenton. Για πολλά χρόνια, οι χημικοί αναμίγνυαν θειικό δισθενή σίδηρο και υπεροξείδιο του υδρογόνου για να σχηματίσουν $\text{OH}^\cdot$. Πράγματι, το αντιδραστήριο Fenton περιγράφηκε για πρώτη φορά στα 1890 από τον χημικό του Cambridge H. J. H. Fenton, ο οποίος έδειξε ότι μίγματα αλάτων δισθενή σιδήρου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, μπορούσε να οξειδώσει τα περισσότερα οργανικά μόρια. Ορισμένα άλατα τιτανίου, χαλκού, κοβαλτίου, και χρωμίου μπορούν επίσης να μετατρέψουν το H_2O_2 σε $\text{OH}^\cdot$.

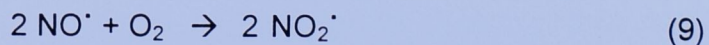
1.2.1.6 Υπεριώδες φως και ρίζες υδροξυλίου

Το υπεριώδες φως (UV) δεν είναι ενεργό αρκετά για να σχηματίσει $\text{OH}^\cdot$ από H_2O , αλλά μπορεί να αντιστρέψει την εξίσωση (5). Κατά τον τρόπο αυτό η UV – ακτινοβολήση συστημάτων που περιέχουν H_2O_2 μπορεί να προκαλέσει σοβαρή βλάβη διαμέσου του σχηματισμού $\text{OH}^\cdot$.

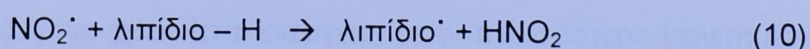
1.2.2 Ορισμένα άλλα μόρια που προκαλούν ανησυχία

1.2.2.1 Οξειδία του αζώτου

Το νιτρικό οξείδιο ($\text{NO}^\bullet$) και το διοξείδιο του αζώτου ($\text{NO}_2^\bullet$) περιέχουν αδέσμευτα ηλεκτρόνια και κατά συνέπεια είναι ελεύθερες ρίζες, ενώ το «γελωτοποιό αέριο» νιτρώδες οξείδιο (N_2O) δεν είναι. Το διοξείδιο του αζώτου είναι ένα πυκνό καφέ δηλητηριώδες αέριο και ένα ισχυρό οξειδωτικό μέσο. Βρίσκεται στον μολυσμένο αέρα, στον καπνό από φλεγόμενες οργανικές ουσίες, και σε υψηλά επίπεδα στον καπνό του τσιγάρου. Το νιτρικό οξείδιο, εξάλλου, είναι ένα άχρωμο αέριο και ένα ασθενές αναγωγικό μέσο. Πρόσφατα, το βιολογικό ενδιαφέρον σχετικά με το νιτρικό οξείδιο έχει επικεντρωθεί γύρω από την παρατήρηση ότι τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα, ορισμένα λευκά αιμοσφαίρια που αμύνονται ενάντια σε ξένους οργανισμούς και μερικά κύτταρα στον εγκέφαλο, παράγουν νιτρικό οξείδιο, ξεκινώντας από το αμινοξύ L – αργινίνη. Στα αιματικά αγγεία, η ρίζα $\text{NO}^\bullet$ χαλαρώνει τους μύες των τοιχωμάτων των αγγείων, διαστέλλοντας τα αγγεία και μειώνοντας την αιματική πίεση. Μερικές φορές αποκαλείται «χαλαρωτικός παράγοντας προερχόμενος από ενδοθήλιο» (endothelial – derived relaxing factor) ή EDRF. Οι οργανικοί νιτρώδεις εστέρες όπως η νιτρογλυκερίνη και ο αμυλ-νιτρίτης (ένα σύνηθες συστατικό του ψυχαγωγικού φαρμάκου “poppers”) δρουν με παρόμοιο μηχανισμό. Αν και η $\text{NO}^\bullet$ είναι βιολογικά απαραίτητη, η υπερβολική παραγωγή $\text{NO}^\bullet$ σε ασθενείς με σοβαρές λοιμώξεις μπορεί να προκαλέσει βλάβη (π.χ. μειώνοντας πάρα πολύ την αιματική πίεση και προκαλώντας σηπτικό σοκ). Σε θερμοκρασία σώματος, η $\text{NO}^\bullet$ μπορεί να ενωθεί με οξυγόνο προς σχηματισμό ρίζας $\text{NO}_2^\bullet$,



Ανάμεσα σε άλλες αντιδράσεις, η $\text{NO}_2^\bullet$ μπορεί να αποσπάσει άτομα υδρογόνου από μεμβρανικά λιπίδια και να ξεκινήσει την λιπιδική υπεροξείδωση.



Για το λόγο αυτό τα οξειδία του αζώτου είναι τοξικά σε μεγάλες ποσότητες. Πράγματι, τα μακροφάγα, κύτταρα που βοηθούν αμυντικά ενάντια σε ξένους οργανισμούς, χρησιμοποιούν οξειδία αζώτου ως μηχανισμό εξουδετέρωσης παρασίτων. Σε μικρές ποσότητες, τα οξειδία του αζώτου (τουλάχιστον η $\text{NO}^{\cdot}$) είναι χρήσιμα. Το ίδιο ισχύει και για άλλες ελεύθερες ρίζες, συμπεριλαμβανομένης της $\text{O}_2^{\cdot-}$.

1.2.2.2 Το όζον (O_3)

Το απαλό μπλε αέριο όζον (O_3) παρέχει μία σημαντική προστατευτική «ασπίδα» στην στρατόσφαιρα ενάντια στην ηλιακή UV ακτινοβολία. Στο επίπεδο της γης, ωστόσο, το όζον είναι μία ανεπιθύμητη τοξική ουσία, που παράγεται στον μολυσμένο αστικό αέρα διαμέσου της επίδρασης του φωτός επάνω σε ορισμένες υπάρχουσες χημικές ουσίες. Το όζον, επίσης, μπορεί να παραχθεί από ορισμένα επιστημονικά μηχανήματα και μερικές φορές από φωτοτυπικά μηχανήματα. Το όζον είναι ερεθιστικό για τα μάτια, την μύτη και τους πνεύμονες. Πράγματι, μπορεί να οξειδώσει και να προκαλέσει βλάβη άμεσα σε πρωτεΐνες, DNA και λιπίδια. Το O_3 δεν είναι ελεύθερη ρίζα και δεν ξεκινά από μόνο του αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών.

1.2.2.3 Ιονισμένο οξυγόνο (Singlet oxygen),

Αν και το οξυγόνο (O_2) έχει δύο αδέσμευτα ηλεκτρόνια, αυτά τα δύο ηλεκτρόνια είναι έτσι διατεταγμένα ώστε το O_2 οξειδώνει πολύ αργά, πολλές ουσίες σε θερμοκρασία δωματίου. Πράγματι, μία θεωρία της γήρανσης (η θεωρία των ελευθέρων ριζών), στην ουσία υποστηρίζει ότι η γήρανση οφείλεται στην αργή συσσωρευτική οξείδωση των ιστών του σώματος κατά την διάρκεια της ζωής.

Μία απλή αναδιάταξη των ηλεκτρονίων του, είναι πιθανό να κάνει το O_2 πολύ πιο αντιδραστικό μετατρέποντάς το σε ατομικά οξυγόνα, τα οποία είναι ισχυρά οξειδωτικά μέσα. Για παράδειγμα, το O_2 οξειδώνει τα λιπίδια σε υπερβολικά αργό ρυθμό, αλλά τα ατομικά οξυγόνα τα οξειδώνουν πολύ γρήγορα προς υπεροξειδία λιπιδίων. Η αναδιάταξη των ηλεκτρονίων που παράγει ατομικό οξυγόνο χρειάζεται ενέργεια· στην περισσότερη μελετημένη πηγή ενέργειας συμμετέχουν φωτοευαίσθητες αντιδράσεις. Συγκεκριμένα, όταν διαλύματα διαφόρων έγχρωμων ουσιών φωτισθούν, απορροφούν

ενέργεια από το φως. Ορισμένη από την απορροφούμενη ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί σε O_2 , σχηματίζοντας ιονισμένο οξυγόνο. Αυτό είναι ένα σημαντικό πρόβλημα στα πράσινα φυτά: πρέπει να φωτισθούν για να προχωρήσει η φωτοσύνθεση και να μετατραπεί το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) του αέρα σε σάκχαρο, αλλά η πράσινη φωτοσυνθετική χρωστική χλωροφύλλη μπορεί να παράγει ιονισμένο οξυγόνο. Ουσίες που υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα και που είναι ικανές να προκαλέσουν την παραγωγή ιονισμένου οξυγόνου είναι η ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B_2) και η αίμη. Φυσικά, μέσα στον οργανισμό προστατεύονται από το φως. Ωστόσο, η λαμπερή ηλιοφάνεια μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο γάλα επειδή το γάλα περιέχει ριβοφλαβίνη. Οι πολύπλοκες αντιδράσεις του όζοντος με διάφορα βιολογικά μόρια σχηματίζουν επίσης ορισμένο ατομικό οξυγόνο, ενώ ορισμένο ατομικό οξυγόνο παράγεται κατά την διάρκεια της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

Διάφορα φάρμακα (στα οποία συμπεριλαμβάνονται ορισμένα ηρεμιστικά, αντιβιοτικά και αντιφλεγμονώδη) είναι φωτοευαίσθητα και μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στο δέρμα εάν ο ασθενής κάνει ηλιοθεραπεία. Κάτι παρόμοιο ισχύει στην πορφυρία, μία σειρά διαταραχών κατά τις οποίες φωτοευαίσθητες χρωστικές συσσωρεύονται στο δέρμα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η συγγενής ερυθροποιητική πορφυρία, ευτυχώς μία πολύ σπάνια ασθένεια. Η κατάσταση αυτή παρουσιάζεται κατά , ή λίγο μετά την γέννηση με σοβαρή φωτοευαισθησία. Τα δόντια (και τα οστά) μπορεί να «χρωματισθούν» κόκκινα εξαιτίας της συσσώρευσης χρωστικών. Μπορεί να παρουσιαστεί και υπερβολική ανάπτυξη των τριχών του σώματος. Μία ενδιαφέρουσα θεωρία είναι ότι αυτά τα ατυχή άτομα με τα τριχώδη πρόσωπα και τα γυαλιστερά δόντια, που αποτολμούν εξόδους μόνο την νύχτα (για να αποφύγουν το φως) έδωσαν άνθηση τουλάχιστον σε μερικούς από τους μύθους των λυκανθρώπων. Ο βασιλιάς Γεώργιος III της Αγγλίας ίσως υπέφερε από πορφυρία, μία ασθένεια που αποδίδει την προέλευση διαμέσου των προγόνων του Τζέιμς I και Μέρι Κουήν της Σκωτίας. Οι γιατροί της εποχής του, σκέφτηκαν ότι υπέφερε από «διαβολικά πνεύματα», και τον θεράπευσαν με αφαίμαξη, χρησιμοποιώντας βδέλλες.

Ωστόσο, δεν είναι όλες οι φωτοευαίσθητες αντιδράσεις επιβλαβείς για τον άνθρωπο. Ένα μίγμα παραγώγων της πορφυρίνης γνωστό ως HPD (haematoporphyrin derivative) χρησιμοποιείται στην θεραπεία του καρκίνου.

Μετά την ένεση του HPD, ορισμένοι όγκοι το απορροφούν και τότε γίνονται ευαίσθητοι σε βλάβη εάν φωτισθούν. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για την θεραπεία ορισμένων μορφών καρκίνου του πνεύμονα, στην οποία ο όγκος μπορεί να φωτισθεί με φως από ένα σωλήνα που εισάγεται από τον λαιμό.

Πίνακας 3. Αντιοξειδωτικά που προσβάλλουν ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS – Reactive Oxygen Species) και ενεργές μορφές αζώτου (RNS – Reactive Nitrogen Species)*

	Radicals	Non radicals
ROS	Ανιόν υδροϋπεροξειδικής ρίζας, $O_2^{\cdot -}$ Ρίζα υδροξυλίου, $OH^{\cdot}$ Ρίζα λιποϋπεροξειδίου, $RO_2^{\cdot}$ Ρίζα αλκοξυλίου, $RO^{\cdot}$ Ανιόν υδροϋπεροξειδίου, $HO_2^{\cdot}$	Υπεροξειδίο του υδρογόνου, H_2O_2 Υποχλωριώδες οξύ, $HOCl$ Όζον, O_3 Ιονισμένο οξυγόνο, $^1\Delta g$
RNS	Νιτρικό οξείδιο, $NO^{\cdot}$ Διοξειδίο του αζώτου, $NO_2^{\cdot}$	Νιτρώδες οξύ, HNO_2 Τετροξειδίο του αζώτου, N_2O_4 Τριοξειδίο του αζώτου, N_2O_3 Υπεροξυνιτρίτης, $ONOO^{\cdot}$ Υπεροξυνιτρώδες οξύ, $ONOOH$ Nitronium κατιόν, NO_2^+ Αλκυλικοί υπεροξυνιτρίτες, $ROONO$

* Ο ROS είναι ένας γενικός τύπος που εμπεριέχει τόσο τις ρίζες οξυγόνου όσο και ορισμένα nonradicals που είναι οξειδωτικά μέσα και/ή μετατρέπονται εύκολα σε ρίζες ($HOCl$, O_2 , $ONOO^{\cdot}$, 1O_2 , H_2O_2). Ο RNS είναι επίσης ένας γενικός τύπος που εμπεριέχει τις ρίζες νιτρικό οξείδιο και διοξειδίο του αζώτου, αλλά και nonradicals όπως τα HNO_2 και N_2O_3 . Ο $ONOO^{\cdot}$ συχνά συμπεριλαμβάνεται και στις δύο κατηγορίες, ενώ το $HOCl$ θα μπορούσε να αποκαλείται και ως ενεργή μορφή χλωρίου. Ο όρος «ενεργή» δεν είναι πάντα ο κατάλληλος: το H_2O_2 , το $NO^{\cdot}$ και το $O_2^{\cdot -}$ αντιδρούν γρήγορα με πολύ λίγα μόρια, ενώ η $OH^{\cdot}$ αντιδρά γρήγορα σχεδόν με οτιδήποτε. Τα $RO_2^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$, $HOCl$, $NO_2^{\cdot}$, $ONOO^{\cdot}$ και O_3 έχουν δραστηριότητα ενδιάμεση των δύο ακραίων αυτών καταστάσεων.

1.3 Τι ρίζες παράγονται στο ανθρώπινο σώμα;

Οι άνθρωποι εκτίθενται σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία από το περιβάλλον, τόσο φυσική (π.χ. ραδιενεργό αέριο ραδόνιο και κοσμική ακτινοβολία) όσο και προερχόμενη από τον άνθρωπο. Η χαμηλού μήκους κύματος ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (π.χ. ακτίνες γ) μπορούν να διασπάσουν το νερό στο σώμα προς σχηματισμό ρίζας υδροξυλίου $OH^{\cdot}$ [2].

Αυτή η τρομακτικά αντιδραστική ρίζα μετά τον σχηματισμό της προσβάλλει οτιδήποτε είναι δίπλα της.

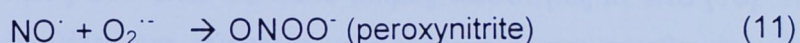
Το ανθρώπινο σώμα παράγει επίσης το ανιόν υδροϋπεροξειδικής ρίζας $O_2^{\cdot -}$ [3]. Μερική ποσότητα ανιόντος υδροϋπεροξειδικής ρίζας παράγεται από τυχαία «σφάλματα χημείας», κατά τα οποία πολλά μόρια στο σώμα αντιδρούν απευθείας με O_2 προς σχηματισμό $O_2^{\cdot -}$. Παραδείγματα αποτελούν η αδρεναλίνη, η ντοπαμίνη, τα τετραϋδροφυλλικά οξέα και ορισμένα συστατικά των αλυσίδων μεταφοράς ηλεκτρονίων των μιτοχονδρίων και των P450 [3]. Ένας τέτοιος σχηματισμός $O_2^{\cdot -}$ είναι αναπόφευκτη συνέπεια της ύπαρξης αυτών των μορίων σε ένα σώμα που χρειάζεται οξυγόνο [3,4]. Ωστόσο, επιπροσθέτως, ορισμένη ποσότητα $O_2^{\cdot -}$ παράγεται σκόπιμα. Για παράδειγμα, τα φαγοκυτταρικά κύτταρα (ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα, μακροφάγα και ηωσινόφιλα) τα οποία αποτελούν αμυντικό μηχανισμό του οργανισμού έναντι βακτηρίων, ιών και μυκήτων, παράγουν μεγάλες ποσότητες $O_2^{\cdot -}$ ως μέρος του μηχανισμού διαμέσου του οποίου εξουδετερώνονται ξένοι οργανισμοί [5]. Αυτός είναι ένας απαραίτητος αμυντικός μηχανισμός ενάντια στην λοίμωξη. Ωστόσο, μπορεί να λειτουργήσει λανθασμένα : υπάρχουν διάφορες ασθένειες (παραδείγματα αποτελούν η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου) στις οποίες παρατηρείται εκτεταμένη φαγοκυτταρική ενεργοποίηση. Αυτή η «ανάρμοστη» φαγοκυτταρική ενεργοποίηση προκαλεί ιστική βλάβη, στην οποία συμβάλλουν οι ROS και RNS ρίζες οξυγόνου [5,6].

Έχει υπολογιστεί ότι 1 – 3% του εισπνεόμενου οξυγόνου χρησιμοποιείται για παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ στο ανθρώπινο σώμα [3]. Επειδή οι άνθρωποι καταναλώνουν αρκετό O_2 , ένας απλός υπολογισμός [4] δείχνει ότι παράγουμε περισσότερο από 2 Kg $O_2^{\cdot -}$ μέσα στο ανθρώπινο σώμα κάθε έτος· άτομα με χρόνιες λοιμώξεις πιθανότατα παράγουν πολύ περισσότερο.

Άλλη μία φυσιολογικά ελεύθερη ρίζα είναι το νιτρικό οξείδιο, $NO^{\cdot}$. Εκπληρώνει πολλές χρήσιμες φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η ρύθμιση της πίεσης του αίματος [7], όμως μεγάλες ποσότητες $NO^{\cdot}$ (όπως επίσης μεγάλες ποσότητες $O_2^{\cdot -}$) μπορεί να είναι τοξικές: υπερβολική παραγωγή $NO^{\cdot}$ πιστεύεται ότι αποτελεί έναν σοβαρό μηχανισμό ιστικού τραυματισμού σε διάφορες ασθένειες συμπεριλαμβανομένων της χρόνιας φλεγμονής, της καρδιακής προσβολής και του σηπτικού σοκ.

1.4 Πώς ενεργούν οι ελεύθερες ρίζες;

Η αντιδραστικότητα εξαρτάται από την ρίζα και από την ουσία με την οποία συνδέεται. Εάν συναντηθούν δύο ελεύθερες ρίζες μπορούν να ενώσουν τα αδέσμευτα ηλεκτρόνιά τους προς σχηματισμό ενός ομοιοπολικού δεσμού· το προϊόν είναι ένα «μη ριζικό». Κατά τον τρόπο αυτό ατομικό υδρογόνο σχηματίζει μοριακό υδρογόνο. Ένα περισσότερο σχετικό με την βιολογία παράδειγμα είναι η ταχύτατη [8] αντίδραση μεταξύ του $\text{NO}^\cdot$ και του $\text{O}_2^{\cdot -}$ [9] προς σχηματισμό ενός μη ριζικού (non radical) προϊόντος, του υπεροξυνιτρίτη (peroxynitrite):



Ωστόσο, όταν μία ελεύθερη ρίζα αντιδρά με ένα μη ριζικό προϊόν (nonradical), σχηματίζεται μία νέα ρίζα και έτσι αρχίζει μία αλυσιδωτή αντίδραση [6]. Επειδή τα περισσότερα βιολογικά μόρια είναι μη ριζικά (nonradicals), η παραγωγή ενεργών ριζών όπως της $\text{OH}^\cdot$ in vivo συνήθως σηματοδοτεί την έναρξη αλυσιδωτών αντιδράσεων. Για παράδειγμα, η «επίθεση» ενεργών ριζών σε σειρές αλυσίδων λιπαρών οξέων των μεμβρανών και των λιποπρωτεϊνών, μπορεί να δώσει την εκκίνηση της διαδικασίας της υπεροξειδωσής των λιπιδίων [6]. Η λιπιδική υπεροξειδωση συμβάλλει στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης [10].

Όταν σχηματιστεί $\text{OH}^\cdot$ δίπλα σε DNA, «επιτίθεται» τόσο στο σάκχαρο δεσοξυριβόζη όσο και σε βάσεις πουρινών και πυριμιδινών, σχηματίζοντας μία μεγάλη σειρά προϊόντων [11]. Αυτό το πολύπλοκο «χημικό αποτύπωμα» είναι διαγνωστικό στοιχείο «επίθεσης» από $\text{OH}^\cdot$ και μπορεί να χρησιμοποιηθεί όπως ένα «δακτυλικό αποτύπωμα» για να δείξει ότι DNA έχει υποστεί μία τέτοια επίθεση in vivo [12]. Προϊόντα επίθεσης από ROS (συμπεριλαμβανομένης της $\text{OH}^\cdot$) και RNS βρίσκονται σε χαμηλά επίπεδα στο DNA υγιών ανθρωπίνων ιστών [12]. Οι ROS και οι RNS προσβάλλουν το DNA in vivo ακόμη και υγιών ανθρώπων. Η $\text{OH}^\cdot$ πρέπει να έχει σχηματισθεί μέσα στον πυρήνα διότι αντιδρά στην θέση σχηματισμού της [12].

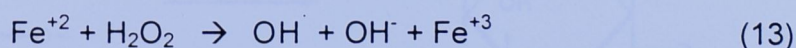
Οι ποσότητες των τελικών προϊόντων της επίθεσης $\text{OH}^\cdot$ στο DNA είναι μεγαλύτερες στο DNA καρκινικών όγκων [13,14], ίσως εξαιτίας αυξημένου σχηματισμού $\text{OH}^\cdot$. Στα υγιή κύτταρα, επιδιορθωτικά ένζυμα διαρκώς

απομακρύνουν τις βάσεις του DNA που έχουν υποστεί βλάβη [15]· μία εναλλακτική πιθανότητα είναι ότι αυτή η διαδικασία είναι λιγότερο επαρκής στα καρκινικά κύτταρα. Η ύπαρξη αυτών των σημαντικών επιδιορθωτικών συστημάτων είναι ένα επιπλέον αποδεικτικό στοιχείο ότι το DNA προσβάλλεται από ROS/RNS in vivo.

1.5 Υπάρχουν in vivo τα μεταλλικά ιόντα – καταλύτες των αντιδράσεων των ελευθέρων ριζών;

Τα ιόντα σιδήρου και χαλκού σε χημικές μορφές που μπορούν να διασπάσουν H_2O_2 προς $OH^\cdot$ είναι σε πολύ μικρές ποσότητες in vivo [16]. Το ανθρώπινο σώμα διαθέτει ένα σύστημα μεταφερουσών και αποθηκευτικών πρωτεϊνών το οποίο διατηρεί δεσμευμένες («ακίνδυνες») όσο το δυνατόν μεγαλύτερες ποσότητες σιδήρου και χαλκού [17]. Πραγματικά, αυτή η δέσμευση των μεταλλικών ιόντων είναι ένας σημαντικός αμυντικός αντιοξειδωτικός μηχανισμός. Για το λόγο αυτό, ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας της φύσης της βλάβης που λαμβάνει χώρα in vivo από την εκτεταμένη παραγωγή $O_2^{\cdot -}$ και H_2O_2 είναι η διαθεσιμότητα και ο εντοπισμός μεταλλικών ιόντων – καταλυτών του σχηματισμού $OH^\cdot$ ρίζας.

Μεταλλαγμένα στελέχη της *Escherichia coli* που παρουσιάζουν έλλειψη σε σουπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase – SOD) είναι υπερευαίσθητα σε βλάβη από H_2O_2 [18], ενώ η ενδοκυττάρια SOD προστατεύει τα ηπατικά κύτταρα έναντι βλάβης από H_2O_2 [19]. Αυτά και πολλά άλλα δεδομένα συμφωνούν με έναν ρόλο της $O_2^{\cdot -}$ στην ενίσχυση της βλάβης από H_2O_2 , και οι αντιδράσεις 12, 13 παρέχουν μία πιθανή εξήγηση.



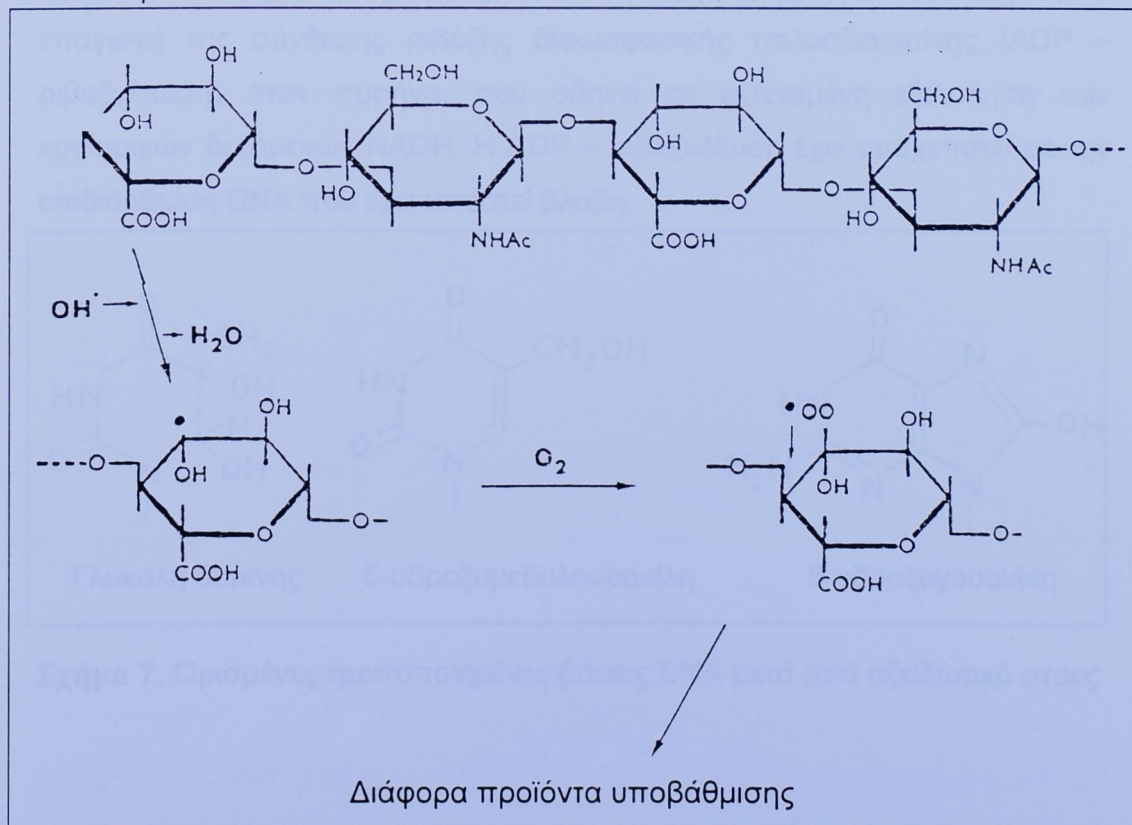
Το ανιόν υδροϋπεροξειδικής ρίζας μπορεί επίσης να βοηθήσει στην παροχή των καταλυτικών μεταλλικών ιόντων. Συγκεκριμένα η $O_2^{\cdot -}$ μπορεί να απελευθερώσει ιόντα σιδήρου από την σιδηροαποθηκευτική πρωτεΐνη φερριτίνη [20]. Επειδή η ποσότητα του σιδήρου που μπορεί να απελευθερωθεί από $O_2^{\cdot -}$ είναι μικρή [21], ο σίδηρος που είναι δεσμευμένος

στην φερριτίνη είναι ακόμη πολύ ασφαλέστερος από μία ισοδύναμη ποσότητα ιόντων σιδήρου. Το ανιόν υδροϋπεροξειδικής ρίζας ίσως απελευθερώνει επίσης σίδηρο όταν προσβάλλει σιδηροθειούχες πρωτεΐνες [22], ενώ το H_2O_2 μπορεί να απελευθερώσει ιόντα σιδήρου από δακτυλίους αίμης πρωτεϊνών όπως η μυοσφαιρίνη, το κυτόχρωμα c και η αιμοσφαιρίνη [23,24].

1.6 Επιδράσεις των οξειδωτικών στα μακρομόρια

1.6.1 Υδατάνθρακες

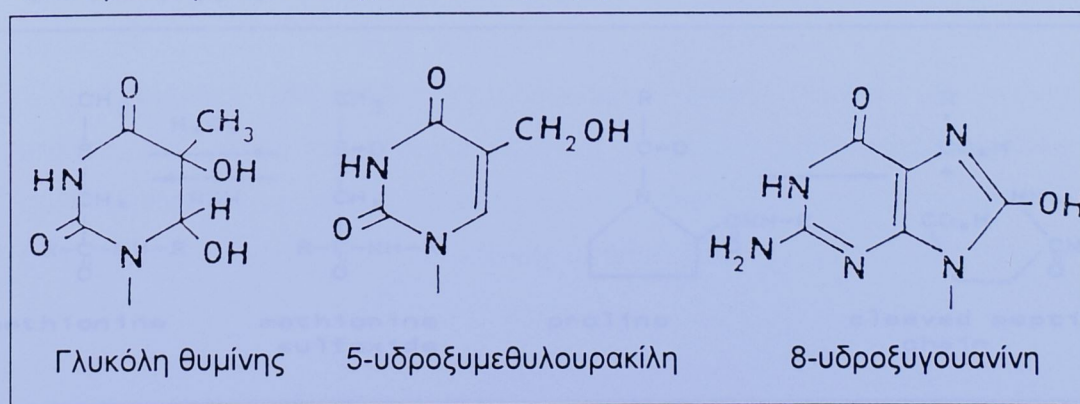
Οι υδροξυλικές ρίζες αντιδρούν με υδατάνθρακες με τυχαία απόσπαση ενός ατόμου υδρογόνου από ένα άτομο άνθρακα, σχηματίζοντας μία ανθρακοκεντρική ρίζα [25]. Αυτό οδηγεί σε αλυσιδωτά «σπασίματα» σε σημαντικά μόρια όπως το υαλουρονικό οξύ σε μία διαδικασία στην οποία εμπλέκονται ενδιάμεσα προϊόντα όπως οι υπεροξυλικές ρίζες. (βλ. σχήμα 6). Στο αρθρικό υγρό που περιβάλλει τους συνδέσμους, μία συσσώρευση και ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων κατά την διάρκεια φλεγμονής παράγει σημαντικές ποσότητες ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Το φαινόμενο αυτό ερμηνεύει μία σημαντική μείωση στο αρθρικό υγρό των προσβαλλομένων συνδέσμων.



Σχήμα 6. Αντίδραση υδροξυλικών ριζών με πολυσακχαρίτες

1.6.2 Νουκλεϊκά οξέα

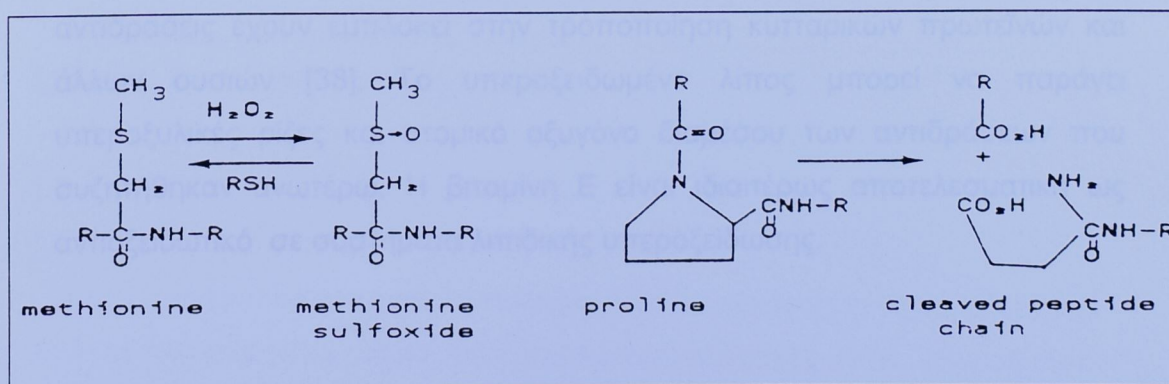
Τα νουκλεϊκά οξέα είναι επίσης πολυμερή υδατανθράκων που μπορούν να υποστούν αντιδράσεις με υδροξυλικές ρίζες όπως αυτές που περιγράφονται για το υαλουρονικό οξύ [26]. (βλ. σχήμα 6). Επιπροσθέτως, έχουν περιγραφεί σημαντικά παραδείγματα διαφοροποιήσεων τμημάτων βάσεων του πολυμερούς (βλ. σχήμα 7). Αυτές οι τροποποιήσεις βάσεων μπορεί να είναι υπεύθυνες για γενετικά ελαττώματα που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες. Προσφάτως, η 8-υδροξύ γουανοσίνη έχει προκαλέσει αξιόλογο ενδιαφέρον ως ένα προϊόν της προσβολής DNA από ρίζα υδροξυλίου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιορισθεί η βλάβη του DNA στους ανθρώπους [27,28]. Η οξειδωτική βλάβη σε DNA έχει προσδιορισθεί ως 10^4 «χτυπήματα» ανά κύτταρο ανά ημέρα. Ο προσδιορισμός των τροποποιημένων βάσεων στα ούρα αποτελεί ένα χρήσιμο μέσο στην αξιολόγηση της βλάβης του DNA σε πειραματόζωα. Προϊόντα όπως η 8-υδροξύ γουανοσίνη, η γλυκόλη θυμίνης και το ουρικό οξύ χρησιμοποιούνται με αυτόν τον τρόπο. Η βλάβη σε DNA έχει επίσης προσδιορισθεί από τα σπασίματα των αλυσίδων και οι τροποποιήσεις των βάσεων κύτταρα που καλλιεργούνται κάτω από οξειδωτικό στρες. Μία σημαντική επίδραση της βλάβης σε DNA είναι η ταχεία επαγωγή της σύνθεσης ριβόζης διφωσφορικής πολυαδενοσίνης (ADP – ριβοζυλίωση) στον πυρήνα, που οδηγεί σε εκτεταμένη εξάντληση των κυτταρικών δεξαμενών NADH. Η ADP – ριβοζυλίωση έχει συσχετιστεί με την επιδιόρθωση DNA που έχει υποστεί βλάβη.



Σχήμα 7. Ορισμένες τροποποιημένες βάσεις DNA μετά από οξειδωτικό στρες

1.6.3 Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες έχουν πολλές αντιδραστικές θέσεις που μπορούν να υποστούν βλάβη κατά την διάρκεια οξειδωτικού στρες, αλλά το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί σε τρία μετρήσιμα γεγονότα. Πρώτον, «επιθετικές» ρίζες όπως η ρίζα υδροξυλίου μπορούν να τεμαχίσουν πρωτεΐνες στο πλάσμα, και τα τεμαχισμένα προϊόντα συγκεκριμένων πρωτεϊνών μπορούν να ανιχνευθούν εφόσον είναι γνωστές [29]. Αυτός ο «τεμαχισμός» συσχετίζεται με αντιδράσεις με συγκεκριμένα αμινοξέα όπως η προλίνη και η ιστιδίνη [30]. (βλ. σχήμα 8). Δεύτερον, πρωτεΐνες μπορούν να περιέχουν θέσεις πρόσδεσης μετάλλων που είναι εξαιρετικά επιρρεπείς στα οξειδωτικά γεγονότα διαμέσου της αλληλεπίδρασης με τα μέταλλα. Αυτές οι αντιδράσεις συνήθως προκαλούν μη αντιστρεπτές τροποποιήσεις σε αμινοξέα που μπορούν να εμπλακούν στην πρόσδεση μεταλλικών ιόντων, όπως η ιστιδίνη. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να προκαλέσουν σειρές μηνυμάτων που αναγνωρίζονται από ειδικές κυτταρικές πρωτεάσες οι οποίες υποβαθμίζουν τέτοιου τύπου πρωτεΐνες [31,32]. Τρίτον, πολλές ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες έχουν αντιδραστικές σουλφυδρυλικές ομάδες σε συγκεκριμένα κομμάτια κυστεΐνης (residues) που μπορούν να τροποποιηθούν (να οξειδωθούν) προς συγκεκριμένες μορφές (δισουλφίδια), που μπορούν να αναχθούν ξανά από μεταβολικές διαδικασίες [33]. Παρομοίως, ορισμένες εξωκυτταρικές πρωτεΐνες έχουν μία «δραστική» μεθειονίνη που μπορεί να υποστεί αντιστρεπτή τροποποίηση [34].



Σχήμα 8. Οξείδωση της μεθειονίνης και της προλίνης

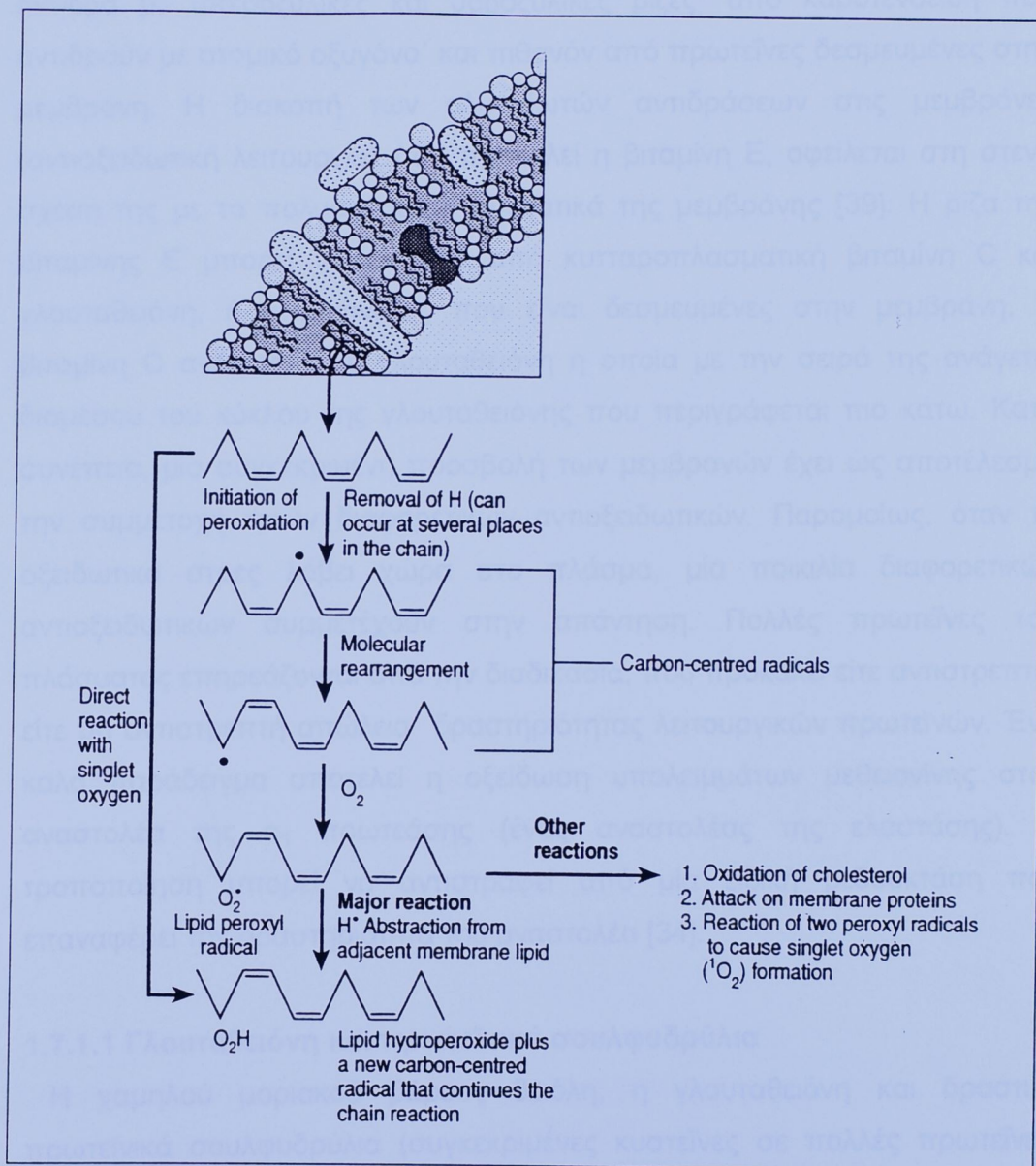
Αυτά τα τελευταία γεγονότα μπορούν να δρουν ως προστατευτικοί μηχανισμοί για μεμονωμένες πρωτεΐνες, και μπορούν επίσης να δρουν προστατευτικά -

αντιοξειδωτικά για άλλα κυτταρικά συστατικά που δεν περιέχουν αυτές τις θειικές ομάδες. Η αντιστρεπτή φύση της τροποποίησης της μεθειονίνης και της κυστεΐνης υποδηλώνει ότι ίσως έχουν έναν ρυθμιστικό ρόλο στον κυτταρικό μεταβολισμό κατά την διάρκεια οξειδωτικού στρες.

1.6.4 Λιπίδια

Η λιπιδική υπεροξειδωση είναι μία διαδικασία στην οποία συμμετέχουν πολυακόρεστα λιπίδια, ουσίες που βρίσκονται σε αφθονία στην διατροφή και στις κυτταρικές μεμβράνες [35,36]. Η υπεροξειδωση των κυτταρικών λιπιδίων έχει ως αποτέλεσμα μία ποικιλία καταστροφικών επιδράσεων σε σημαντικές λειτουργίες των μεμβρανών. Το περισσότερο υπεροξειδωμένο λίπος βρίσκεται ως αποτέλεσμα του οξειδωτικού στρες σε ανέπαφα κύτταρα, αλλά ορισμένο υπεροξειδωμένο λίπος της διαίτας μπορεί να ενσωματωθεί απευθείας σε κυτταρικές δομές [37]. Η υπεροξειδωση των λιπιδίων είναι μία αλυσιδωτή αντίδραση που αρχίζει από ρίζα και που αυτό – πολλαπλασιάζεται στις κυτταρικές μεμβράνες. Ως αποτέλεσμα προκύπτει ότι, μεμονωμένα οξειδωτικά γεγονότα μπορεί να έχουν σοβαρές επιδράσεις στην μεμβρανική λειτουργία. Οι αντιδράσεις αυτής της διαδικασίας περιγράφονται στο σχήμα 9.

Τα προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης ανιχνεύονται εύκολα στο πλάσμα του αίματος και έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες του οξειδωτικού στρες. Το πιο συχνά μετρούμενο προϊόν είναι η μηλονυλο-διαλδεϋδη. (βλ. σχήμα 9). Επιπροσθέτως οι ακόρεστες αλδεϋδες που παράγονται από αυτές τις αντιδράσεις έχουν εμπλακεί στην τροποποίηση κυτταρικών πρωτεϊνών και άλλων ουσιών [38]. Το υπεροξειδωμένο λίπος μπορεί να παράγει υπεροξυλικές ρίζες και ατομικό οξυγόνο διαμέσου των αντιδράσεων που συζητήθηκαν ανωτέρω. Η βιταμίνη Ε είναι ιδιαιτέρως αποτελεσματική ως αντιοξειδωτικό σε συστήματα λιπιδικής υπεροξειδωσης.



Σχήμα 9. Αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης

1.7 Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί

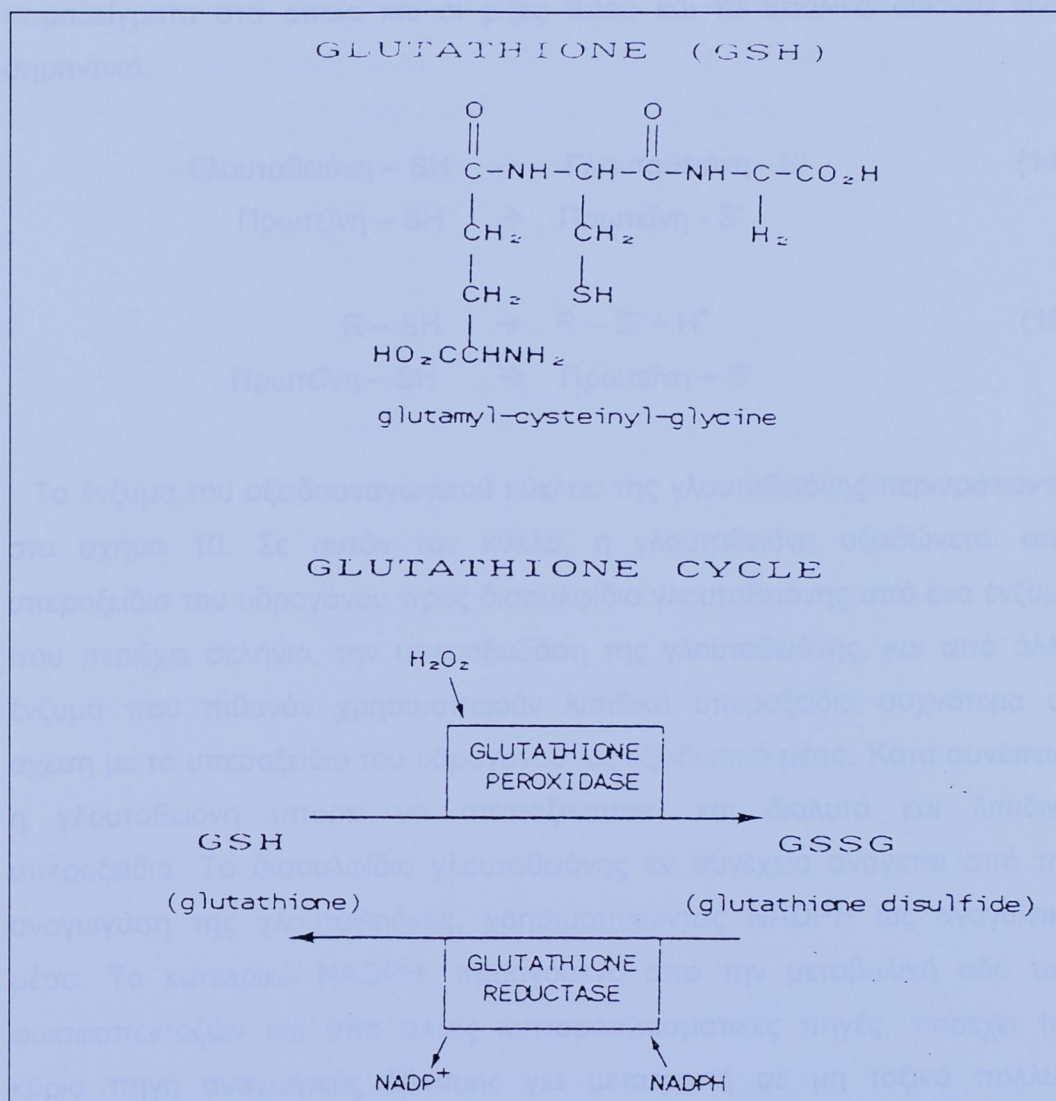
1.7.1 Κυτταρικά αντιοξειδωτικά

Η αποτελεσματικότητα κάθε αντιοξειδωτικού σε κατάσταση στρες εξαρτάται από τα συγκεκριμένα μόρια που προκαλούν το στρες (π.χ. υπεροξειδικό ανión, υπεροξείδια λιπιδίων, ρίζα υδροξυλίου που «γεννιέται από σίδηρο» και την κυτταρική ή εξωκυττάρια θέση της πηγής αυτών των μορίων. Σαν παράδειγμα, βλάβη σε κυτταρική μεμβράνη λαμβάνει χώρα από οξειδωτικό στρες που προκαλείται είτε εσωτερικά είτε εξωτερικά. Αυτή η βλάβη προλαμβάνεται περισσότερο αποτελεσματικά από την βιταμίνη E, η οποία

αντιδρά με υπεροξυλικές και υδροξυλικές ρίζες από καροτενοειδή που αντιδρούν με ατομικό οξυγόνο και πιθανόν από πρωτεΐνες δεσμευμένες στην μεμβράνη. Η διακοπή των αλυσιδωτών αντιδράσεων στις μεμβράνες (αντιοξειδωτική λειτουργία) που προκαλεί η βιταμίνη E, οφείλεται στη στενή σχέση της με τα πολυακόρεστα συστατικά της μεμβράνης [39]. Η ρίζα της βιταμίνης E μπορεί να αναχθεί από κυταροπλασματική βιταμίνη C και γλουταθειόνη, ή από κινόλες που είναι δεσμευμένες στην μεμβράνη. Η βιταμίνη C ανάγεται από γλουταθειόνη η οποία με την σειρά της ανάγεται διαμέσου του κύκλου της γλουταθειόνης που περιγράφεται πιο κάτω. Κατά συνέπεια, μία συγκεκριμένη προσβολή των μεμβρανών έχει ως αποτέλεσμα την συμμετοχή τριών διαφορετικών αντιοξειδωτικών. Παρομοίως, όταν το οξειδωτικό στρες λάβει χώρα στο πλάσμα, μία ποικιλία διαφορετικών αντιοξειδωτικών συμμετέχουν στην απάντηση. Πολλές πρωτεΐνες του πλάσματος επηρεάζονται από την διαδικασία, που προκαλεί είτε αντιστρεπτή, είτε μη αντιστρεπτή απώλεια δραστηριότητας λειτουργικών πρωτεϊνών. Ένα καλό παράδειγμα αποτελεί η οξείδωση υπολειμμάτων μεθειονίνης στον αναστολέα της α_1 πρωτεάσης (ένας αναστολέας της ελαστάσης). Η τροποποίηση μπορεί να αντιστραφεί από μία ειδική ρεδοκτάση που επαναφέρει την δραστηριότητα του αναστολέα [34].

1.7.1.1 Γλουταθειόνη και πρωτεϊνικά σουλφυδρύλια

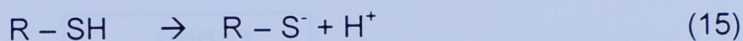
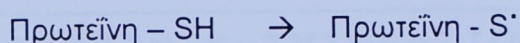
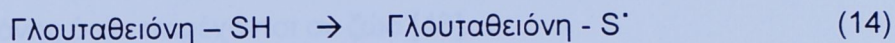
Η χαμηλού μοριακού βάρους θειόλη, η γλουταθειόνη και δραστικά πρωτεϊνικά σουλφυδρύλια (συγκεκριμένες κυστεΐνες σε πολλές πρωτεΐνες) συμμετέχουν πρωταρχικά στα κυτταρικά αντιοξειδωτικά συστήματα. Η γλουταθειόνη είναι άφθονη (3 – 10 mmol/L) στο κυτταρόπλασμα, στον πυρήνα και στα μιτοχόνδρια (βλ. σχήμα 10), και είναι το κύριο διαλυτό αντιοξειδωτικό σε αυτά τα κυτταρικά τμήματα [40]. Η συγκέντρωση των δραστικών πρωτεϊνικών σουλφυδρυλίων είναι εξίσου υψηλή και στις διαλυτές πρωτεΐνες και στις πρωτεΐνες που είναι δεσμευμένες στις μεμβράνες [41]. Τα δραστικά πρωτεϊνικά σουλφυδρύλια πιθανότατα αποτελούν την μεγαλύτερη δεξαμενή θειολών στα κύτταρα.



Σχήμα 10. Δομή και μεταβολισμός της γλουταθειόνης

Το άτομο θείου σε αυτά τα σουλφυδρύλια εύκολα λαμβάνει ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο (βλ. αντίδραση 14), και η διάρκεια ζωής των διαφόρων ειδών ριζών του θείου (π.χ. μία thiyl ρίζα) είναι μεγάλη συγκρινόμενη με άλλες ρίζες που μπορούν να σχηματιστούν κατά την διάρκεια στρες. Πολλές σουλφυδρυλικές ομάδες, επίσης, ιονίζονται μερικώς σε τιμές pH κυττάρων, παράγοντας το πολύ αντιδραστικό, πυρηνόφιλο θειολικό ανιόν (βλ. αντίδραση 15). Το θειολικό ανιόν είναι υπεύθυνο για την αντιδραστικότητα των θειολών με μία ποικιλία από ξένες ουσίες σε αντιδράσεις σύζευξης, κατά την διάρκεια ξενοβιοτικού μεταβολισμού. Κατά συνέπεια, οι αντιδράσεις των σουλφυδρυλίων κατά την διάρκεια οξειδωτικού στρες περιλαμβάνουν

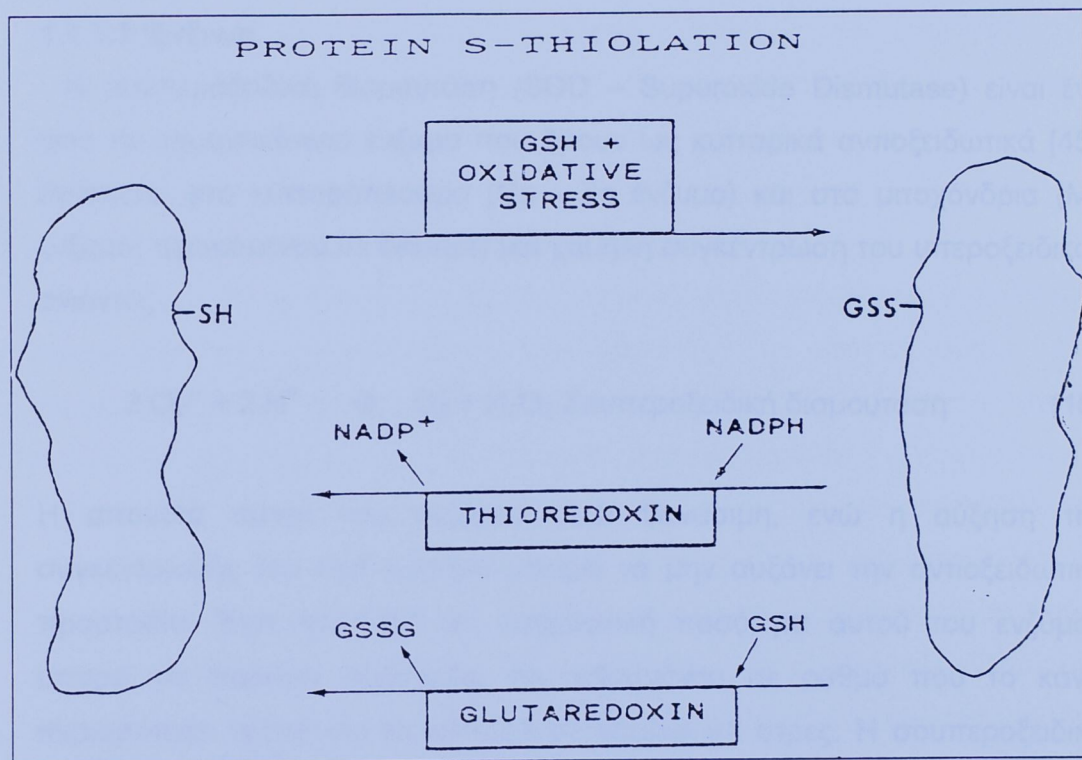
παραδείγματα στα οποία και οι ρίζες θείου και τα θειολικά ανιόντα είναι σημαντικά.



Τα ένζυμα του οξειδοαναγωγικού κύκλου της γλουταθειόνης περιγράφονται στο σχήμα 10. Σε αυτόν τον κύκλο, η γλουταθειόνη οξειδώνεται από υπεροξείδιο του υδρογόνου προς δισουλφίδιο γλουταθειόνης από ένα ένζυμο που περιέχει σελήνιο, την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, και από άλλα ένζυμα που πιθανόν χρησιμοποιούν λιπιδικά υπεροξείδια συχνότερα σε σχέση με το υπεροξείδιο του υδρογόνου ως οξειδωτικό μέσο. Κατά συνέπεια, η γλουταθειόνη μπορεί να αποτοξικοποιεί και διαλυτά και λιπιδικά υπεροξείδια. Το δισουλφίδιο γλουταθειόνης εν συνεχεία ανάγεται από την αναγωγή της γλουταθειόνης, χρησιμοποιώντας NADPH ως αναγωγικό μέσο. Το κυτταρικό NADPH, παραγόμενο από την μεταβολική οδό των φωσφοπεντοζών και από άλλες κυτταροπλασματικές πηγές, παρέχει την κύρια πηγή αναγωγικής δύναμης για μετατροπή σε μη τοξικά πολλών υπεροξειδίων. Όπως προαναφέρθηκε, η γλουταθειόνη μπορεί επίσης να δράσει ως αναγωγικό μέσο για την βιταμίνη C, και μπορεί να ανάγει απευθείας, ορισμένα πρωτεϊνικά δεσμευμένα σουλφυδρύλια. Σε συνδυασμό με το ένζυμο γλουταρεδοξίνη (ή θειολ-τρανσφεράση), η γλουταθειόνη μπορεί να ανάγει μεγαλύτερο αριθμό πρωτεϊνικών σουλφυδρυλίων [42]. (βλ. σχήμα 11)

Η συγκέντρωση της κυτταρικής γλουταθειόνης έχει κυρίαρχη επίδραση στην αντιοξειδωτική της λειτουργία. Ο περιορισμός θρεπτικών συστατικών, η σωματική άσκηση και το οξειδωτικό στρες επιδρούν σημαντικά στην συγκέντρωση της γλουταθειόνης. Κάτω από οξειδωτικές συνθήκες, η γλουταθειόνη μπορεί να μειωθεί αρκετά διαμέσου της σύζευξης με ξενοβιοτικά, και διαμέσου της απέκκρισης των συζευγμάτων γλουταθειόνης και των δισουλφιδίων γλουταθειόνης από τα προσβαλλόμενα κύτταρα. Μία

σημαντική ποσότητα γλουταθειόνης μπορεί επίσης να συνδεθεί σε πρωτεΐνες κατά την διάρκεια σοβαρού οξειδωτικού στρες. Προσφάτως, έχουν βρεθεί ουσίες που μπορούν να αυξάνουν αλλά και να μειώνουν την συγκέντρωση της γλουταθειόνης όταν παρέχονται σε ζώα [43].



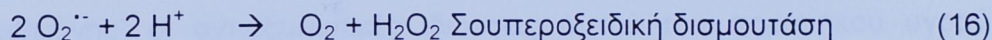
Σχήμα 11. Ο κύκλος πρωτεϊνικών σουλφυδρυλίων σε οξειδωτικό στρες

Τα πρωτεϊνικά σουλφυδρύλια είναι επίσης πολύ αντιδραστικά έναντι ριζών οξειδωτικού και άλλων οξειδωτικών μέσων που σχηματίζονται κατά την διάρκεια οξειδωτικού στρες. Κατά την διάρκεια οξειδωτικού στρες, ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών τροποποιείται από την οξείδωση των σουλφυδρυλίων, συχνά παράγοντας πρωτεϊνικά δισουλφίδια αναμεμιγμένα με γλουταθειόνη, μία διαδικασία που ονομάζεται S – θειολίωση (S – thiolation) [33]. (βλ. σχήμα 11). Τα πρωτεΐνο - πρωτεϊνικά δισουλφίδια και άλλες μορφές οξείδωσης του πρωτεϊνικού σουλφυδρυλίου (Sulfenic and sulfonic acids) μπορούν επίσης να παραχθούν κατά την διάρκεια οξειδωτικού στρες. Οι πρωτεΐνες που έχουν υποστεί S – θειολίωση και τα πρωτεϊνικά δισουλφίδια εύκολα ανάγονται από κυτταρικές αναγωγικές διαδικασίες, ενώ τα σουλφονικά οξέα δεν ανάγονται εύκολα. Το σχήμα 11 δείχνει τις αντιδράσεις που εμπλέκονται στην αντιστρεπτή τροποποίηση των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί S – θειολίωση.

Δύο χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες, όπως η γλουταροδεξίνη και η θεωρεδοξίνη [42,44], μπορούν να συμμετάσχουν στην αναγωγή αυτών των πρωτεϊνών.

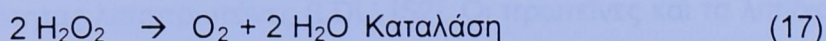
1.7.1.2 Ένζυμα

Η σουπεροξειδική δισμουτάση (SOD – Superoxide Dismutase) είναι ένα από τα σημαντικότερα ένζυμα που δρουν ως κυτταρικά αντιοξειδωτικά [45]. Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Cu - Zn ένζυμο) και στα μιτοχόνδρια (Mn ένζυμο) προκειμένου να διατηρεί μία χαμηλή συγκέντρωση του υπεροξειδικού ανιόντος.



Η απουσία αυτού του ενζύμου είναι θανάσιμη, ενώ η αύξηση της συγκέντρωσής του στα κύτταρα μπορεί να μην αυξάνει την αντιοξειδωτική προστασία. Έχει προταθεί ότι υπερβολική ποσότητα αυτού του ενζύμου μπορεί να παράγει υδροξείδιο του υδρογόνου σε ρυθμό που το κάνει περισσότερο τοξικό για τα κύτταρα σε οξειδωτικό στρες. Η σουπεροξειδική δισμουτάση αυξάνεται από ειδικά οξειδοαναγωγικά – ευαίσθητα γονίδια στα κύτταρα κάτω από συνεχές στρες [46]. Ένας εξωκυτταρικός τύπος της σουπεροξειδικής δισμουτάσης, διαφορετικός από τους ενδοκυττάριους τύπους του ενζύμου, υπάρχει στο πλάσμα, στην λέμφο και στο αρθρικό υγρό [47]. Το εξωκυττάριο ένζυμο μπορεί να δρα στις επιφάνειες των κυττάρων.

Η καταλάση είναι μία αιμο – πρωτεΐνη που καταλύει την αντίδραση 17 που περιγράφεται πιο κάτω. Συνήθως βρίσκεται στα υπεροξειδοσώματα. Σε κύτταρα όπως τα ερυθροκύτταρα, που δεν περιέχουν τέτοια οργανίδια, είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο [48]. Η καταλάση παρέχει προστατευτικό ρόλο που είναι παρόμοιος με αυτόν της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στα περισσότερα κύτταρα. Η σχετική συνεισφορά της καταλάσης και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στην μετατροπή σε μη τοξικό του υπεροξειδίου του υδρογόνου ποικίλει [49].



Η σουπεροξειδική δισμουτάση και η καταλάση παρέχουν ένα ταχύ μέσο εξισσορόπησης και μετατροπής σε μη τοξικά του υδροϋπεροξειδικού ανιόντος και του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα κύτταρα. Επιπροσθέτως, και τα δύο ένζυμα έχουν αξιόλογη χρήση ως φαρμακευτικά μέσα για μείωση της επίδρασης των ριζών οξυγόνου σε διάφορες ασθένειες του ανθρώπου. Τα ένζυμα αυτά δε, παρουσιάζουν ενδιαφέρον για την πρόληψη της βλάβης επανεξίδρωσης (reperfusion injury) [50].

1.7.2 Αντιοξειδωτικά του πλάσματος

Το πλάσμα του ανθρώπινου αίματος περιέχει μικρές ποσότητες καταλάσης, σουπεροξειδικής δισμουτάσης, γλουταθειόνης, ή υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης· οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες αυτού του σημαντικού υγρού οφείλονται πρωτίστως σε έναν αριθμό μικρών μορίων και πρωτεϊνικών συστατικών. Σε μελέτες που χρησιμοποιούν συνθετικά σχηματισμένα και φυσικά οξειδωτικά μέσα όπως ο καπνός του τσιγάρου, έχει βρεθεί ότι το ασκορβικό οξύ είναι ανάμεσα στις πρώτες ουσίες που οξειδώνονται σε στρες [51,52]. Άλλα συστατικά του πλάσματος μπορούν να οξειδωθούν μόνο όταν εξαντληθεί το ασκορβικό οξύ. Η οξείδωση προσβάλλει θειολικές ομάδες (κυρίως σε πρωτεΐνες), χολερυθρίνη, ουρικό οξύ, και τελικά βιταμίνη Ε. Η χολερυθρίνη (δεσμευμένη σε αλβουμίνη) και το ουρικό οξύ, τα οποία θεωρούνται μεταβολικά απόβλητα μέσα στο πλάσμα, είναι εν δυνάμει καλοί εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών οξυγόνου. Η μεταφορά από ερυθροκύτταρα μπορεί να προσφέρει επιπρόσθετο αντιοξειδωτικό δυναμικό, επειδή οι αναγωγικές διαδικασίες αυτών των κυττάρων είναι ισχυρές.

Οι περισσότερες σημαντικές αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες του πλάσματος είναι η σερουλοπλασμίνη, η αλβουμίνη, η τρανσφερρίνη, η άπτο - σφαιρίνη και η αιμοπηξίνη. Οι πρώτες τρεις πρωτεΐνες μπορούν να δεσμεύουν ιόντα σιδήρου και χαλκού σε μορφές που προλαμβάνουν την συμμετοχή τους σε αντιδράσεις που παράγουν την «επιθετική» ρίζα υδροξυλίου. Η άπτο-σφαιρίνη και η αιμοπηξίνη δεσμεύουν ελεύθερη αίμη, μία πηγή σιδήρου που μπορεί να συμμετάσχει σε αντιδράσεις οξείδωσης λιπιδίων.

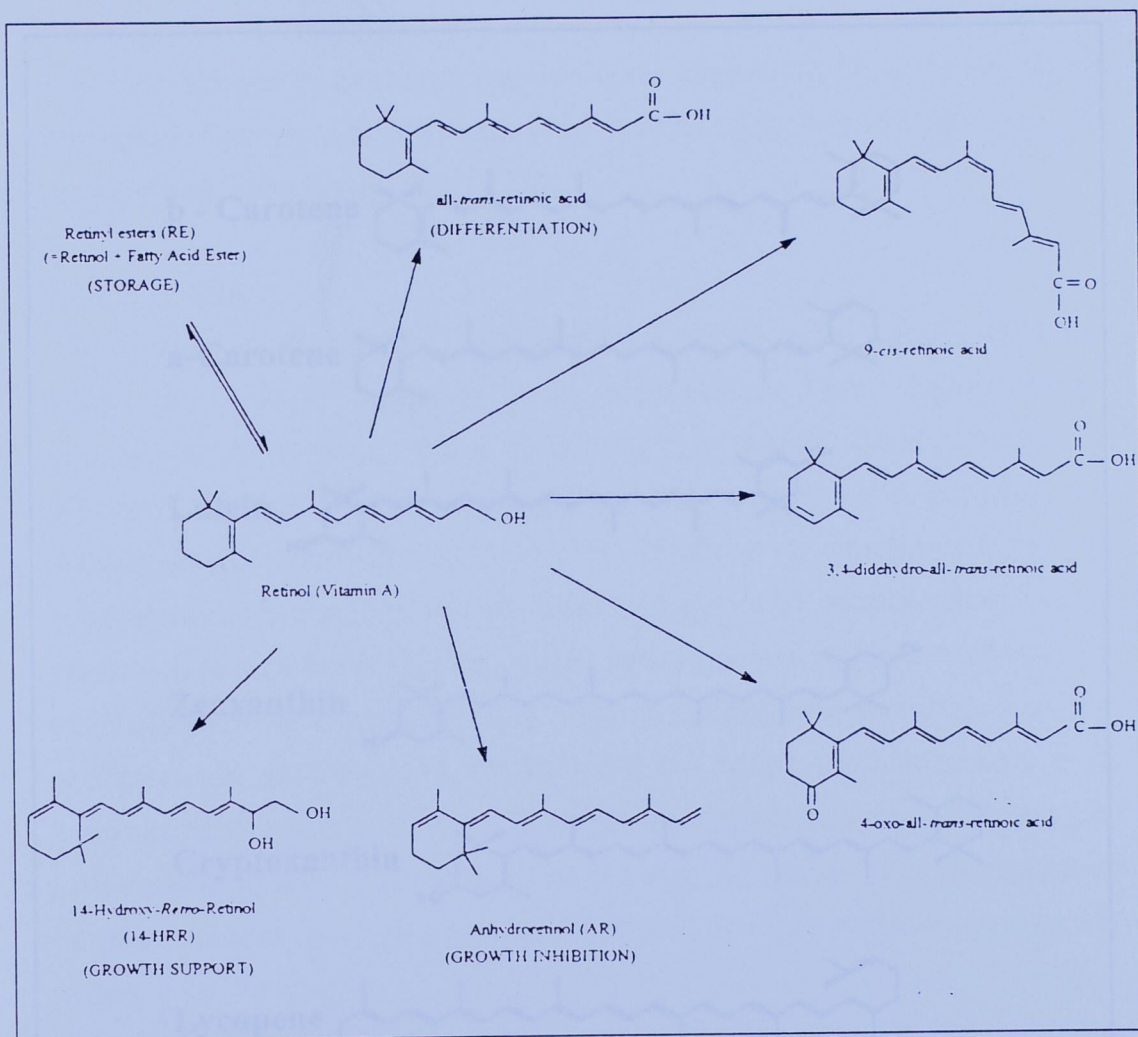
Το οξειδωτικό στρες επίσης προσβάλλει λιποσώματα του πλάσματος όπως οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) [52]. Οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια των LDL είναι καλοί στόχοι για οξείδωση, με αποτέλεσμα σήμερα, οι

οξειδωμένες μορφές των LDL να εμπλέκονται ισχυρά στον σχηματισμό των λιπαρών ζωνών αθηρώματος, στα τοιχώματα των αρτηριών. Η αποπρωτεΐνη Β, συστατικό αυτών των σωματιδίων, τεμαχίζεται από την οξείδωση. Συνέπεια είναι η παραγωγή μιας ποικιλίας προϊόντων από την λιπιδική υπεροξείδωση, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα προσαγωγά του λίπους και της αποπρωτεΐνης Β. Τα LDL σωματίδια περιέχουν σημαντική ποσότητα βιταμίνης Ε και καροτενοειδών που ίσως δρουν ως βασικά αντιοξειδωτικά.

1.8 Αντιοξειδωτικές βιταμίνες και θρεπτικά συστατικά

Οι αντιοξειδωτικές άμυνες βασίζονται αρκετά σε βιταμίνες και μέταλλα της διατροφής. (βλ. Πίνακα 4). Πράγματι, έρευνα στην Τζαμάικα έχει δείξει ότι τα προβλήματα που υφίστανται τα παιδιά με Kwashiorkor, μια ασθένεια που οφείλεται σε ελλιπή πρόσληψη κατάλληλης πρωτεΐνης από την δίαιτα, προκύπτουν όχι μόνο από την έλλειψη της πρωτεΐνης αλλά και από ανεπαρκή επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών (στα οποία συμπεριλαμβάνονται η σερουλοπλασμίνη, τοκοφερόλες και GSH) και από αποτυχία σύνθεσης αρκετής αλβουμίνης ή επαρκούς τρανσφερρίνης που θα εξασφάλιζε ασφαλή δέσμευση του σιδήρου του πλάσματος.

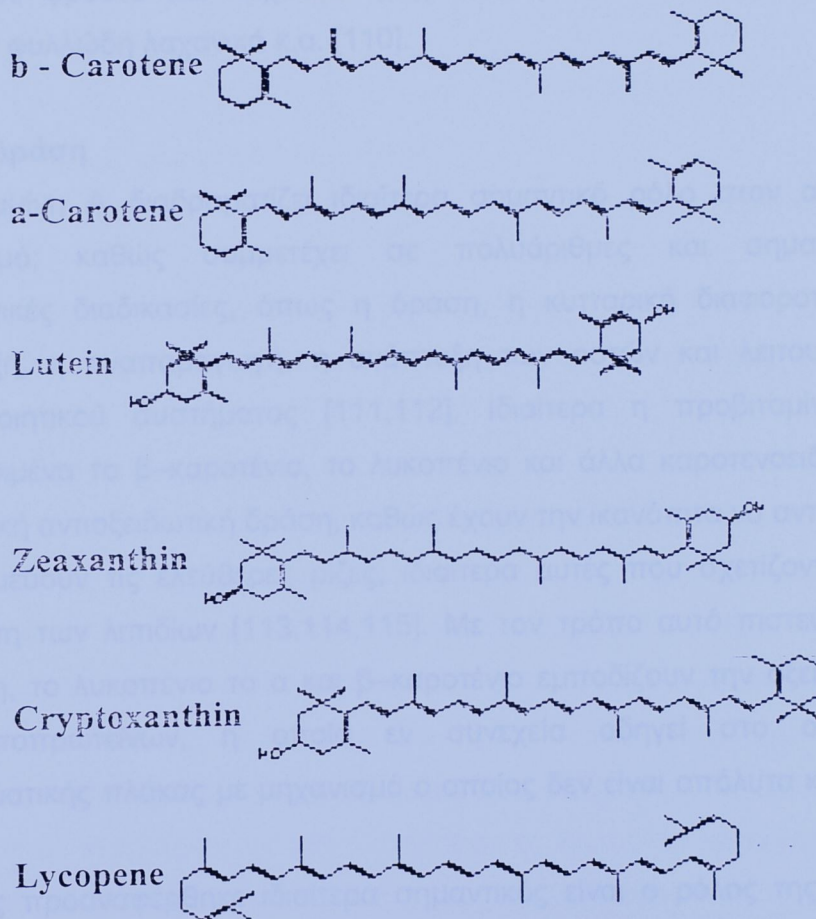
Πίνακας 4. Θρεπτικά συστατικά και αντιοξειδωτική άμυνα	
Θρεπτικό συστατικό	Παραδείγματα χρήσιμων ρόλων στον ανθρώπινο οργανισμό
Σίδηρος	Καταλάση, σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων, αιμοσφαιρίνη Mn – SOD στα μιτοχόνδρια Cu, Zn – SOD, σεουλοπλασμίνη Cu, Zn – SOD : πιο γενικευμένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες; Είναι σταθεροποιητές των μεμβρανικών δομών;
Μαγγάνιο	
Χαλκός	
Ψευδάργυρος	
Πρωτεΐνες	Αμινοξέα τα οποία περιέχουν θείο (S) είναι απαραίτητα για την σύνθεση GSH. SODs, καταλάση, αναγωγή της γλουταθειόνης και υπεροξειδάσες, μεταφορές μετάλλων και αποθηκευτικές πρωτεΐνες. Η αλβουμίνη ίσως είναι «εξιλαστήριο» αντιοξειδωτικό - μεταφορέας του χαλκού στο πλάσμα.
Ριβοφλαβίνη	Αναγωγή της γλουταθειόνης, σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων, απαραίτητη για την σύνθεση FMN και FAD.
Σελήνιο	Υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης, λειτουργία του θυρεοειδή, πιθανή βοήθεια στην μετατροπή σε μη τοξικά καρκινογόνων.
Βιταμίνη E	Προστασία έναντι στην υπεροξείδωση λιπιδίων, πιθανή βοήθεια στην σταθεροποίηση μεμβρανικών δομών.
Βιταμίνη C	Υδροξυλάσες, υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό, ανακυκλώνει βιταμίνη E (;), ανάγει τις καρκινογόνες νιτροζαμίνες.
β – καροτένιο	Πρόδρομος ουσία της βιταμίνης A. Ίσως έχει ορισμένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες, δυναμικός εκκαθαριστής του ιονισμένου O ₂ , ίσως αντιδρά με υπεροξυλικές ρίζες. Μερικές αναφορές υποστηρίζουν ότι εμποδίζει την λιπιδική υπεροξείδωση στις μεμβράνες αλλά μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις O ₂ .
Λυκοπένιο	Πορτοκαλί – κόκκινη χρωστική στις ντομάτες. Δυναμικός εκκαθαριστής του ιονισμένου O ₂ . Έχει προταθεί ως αντιοξειδωτικό in vivo αλλά αυτό ακόμα δεν έχει αποδειχθεί.
Ρετινόλη	Κάποιες αντιοξειδωτικές ιδιότητες έχουν αποδειχθεί in vitro αλλά δεν υπάρχουν αρκετές αποδείξεις ότι δρα ως αντιοξειδωτικό in vivo.
Νιασίνη	Απαραίτητη για την σύνθεση NAD ⁺ , NADH, NADP ⁺ , NADPH – απαραίτητη για την αναγωγή της γλουταθειόνης. Απαραίτητη στον κυτταρικό μεταβολισμό και στην παραγωγή ενέργειας.



Σχήμα 15. Δομή ρετινοειδών

1.8.2.1.β β – Καροτένιο - Καροτενοειδή

Τα περισσότερα καροτενοειδή περιγράφονται από το γενικό τύπο $C_{40}H_{56}O_n$, όπου $0 \leq n \leq 6$. Όταν $n = 0$ οι υδρογονάνθρακες ονομάζονται καροτένια, ενώ όταν περιέχουν οξυγόνο ονομάζονται ξανθοφύλλες. Έχουν βρεθεί περίπου 400 καροτένια μεταξύ των οποίων τα συνηθέστερα είναι τα α-καροτένιο, β-καροτένιο, γ-καροτένιο και τα διάφορα ισομερή και παράγωγά τους (π.χ 9-cis-β-καροτένιο, 13-cis-β-καροτένιο, 4-κετο-β-καροτένιο, 4-υδρόξυ-β-καροτένιο) και οι συνηθέστερες ξανθοφύλλες είναι η λουτεΐνη, το λυκοπένιο, η ζεαξανθίνη, η κρυπτοξανθίνη και η κανθαξανθίνη με τα διάφορα ισομερή τους.



Σχήμα 16. Δομή ορισμένων καροτενοειδών

1.8.2.2 Πηγές

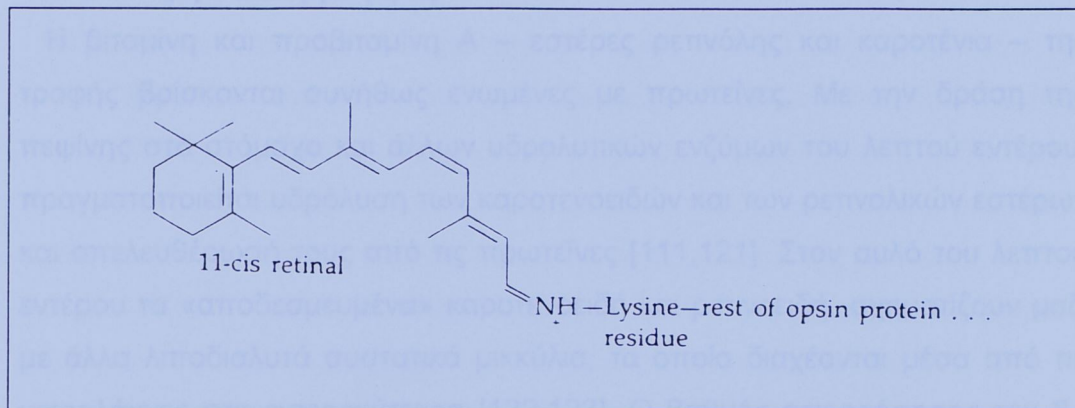
Την ελεύθερη (all-trans) ρετινόλη συνήθως δεν την βρίσκουμε στα τρόφιμα, παρά μόνο υπό την μορφή εστέρων με λιπαρά οξέα, με πιο σύνηθες τον παλμιτικό εστέρα της ρετινόλης (retinyl palmitate). Οι εστέρες της ρετινόλης περιέχονται κυρίως σε ζωικά προϊόντα, όπως είναι τα αυγά, το βούτυρο, τα γαλακτοκομικά προϊόντα (πλήρη), το ήπαρ και τα ιχθυέλαια. Σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα βρίσκονται κυρίως υπό την μορφή του οξικού εστέρα της ρετινόλης [110].

Τα ενεργά καροτενοειδή (α , β , γ – καροτένιο), που μετατρέπονται δηλαδή σε ρετινόλη περιέχονται σε ποικιλία φρούτων και λαχανικών, όπως τα κίτρινα και πορτοκαλί φρούτα και λαχανικά (π.χ. πορτοκάλια, καρότα, λεμόνια), τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά κ.α. [110].

1.8.2.3 Δράση

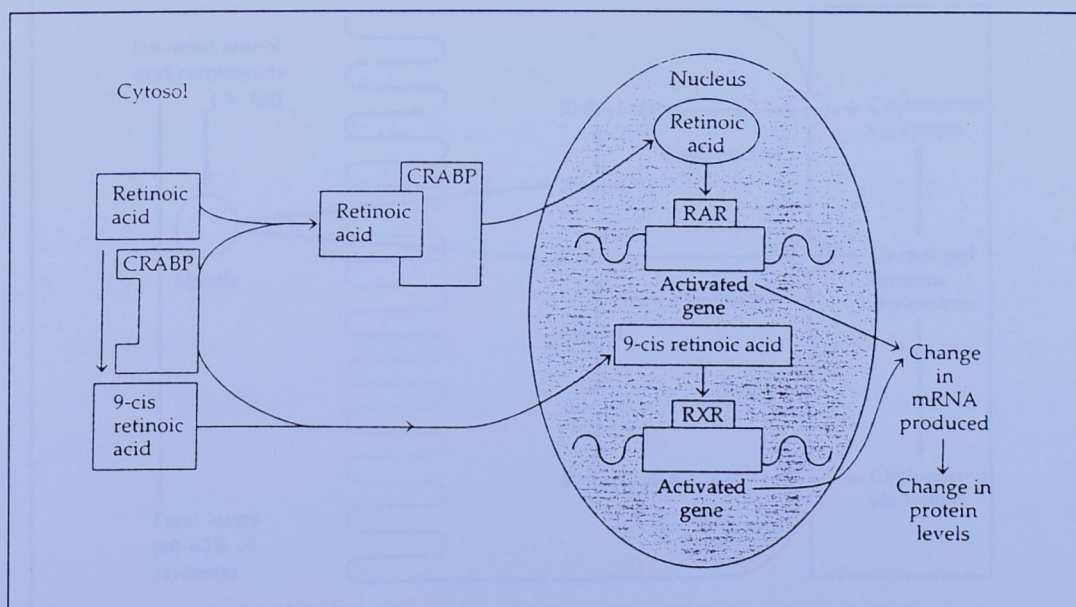
Η βιταμίνη Α διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς συμμετέχει σε πολυάριθμες και σημαντικότες λειτουργικές διαδικασίες, όπως η όραση, η κυτταρική διαφοροποίηση, η ανάπτυξη, η αναπαραγωγή, η ανάπτυξη των οστών και λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος [111,112]. Ιδιαίτερα η προβιταμίνη Α και συγκεκριμένα το β -καροτένιο, το λυκοπένιο και άλλα καροτενοειδή ασκούν σημαντική αντιοξειδωτική δράση, καθώς έχουν την ικανότητα να αντιδρούν και να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες, ιδιαίτερα αυτές που σχετίζονται με την οξείδωση των λιπιδίων [113,114,115]. Με τον τρόπο αυτό πιστεύεται ότι η λουτεΐνη, το λυκοπένιο το α και β -καροτένιο εμποδίζουν την οξείδωση των LDL-λιποπρωτεϊνών, η οποία εν συνεχεία οδηγεί στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας με μηχανισμό ο οποίος δεν είναι απόλυτα κατανοητός ακόμη.

Όπως προαναφέρθηκε ιδιαίτερα σημαντικός είναι ο ρόλος της ρετινόλης στην όραση, ο οποίος εκδηλώνεται μέσω της εισόδου της στο επιθήλιο των φωτοευαίσθητων οφθαλμικών κυττάρων [116]. Εκεί αποθηκεύεται υπό μορφή εστέρα, ο οποίος όταν απαιτείται ρετινόλη, υδρολύεται απελευθερώνοντας ρετινόλη, η οποία οξειδώνεται σε all-trans ρετινόλη. Η all-trans ρετινόλη μετασχηματίζεται στο 11-cis ισομερές της, το οποίο ενώνεται με λυσίνη (αμινοξύ) μιας πρωτεΐνης των οφθαλμικών κυττάρων, της οψίνης, σχηματίζοντας τελικά την ροδοψίνη [117]. Η ροδοψίνη αποτελεί τον «φωτοευαίσθητο υποδοχέα» του οφθαλμικού κυττάρου, που δέχεται και αναγνωρίζει μικρά ποσά φωτός και επιτρέπει την όραση κατά την διάρκεια της νύχτας. (βλ. σχήμα 17).



Σχήμα 17. Δέσμευση της 11-cis ρετινάλης στην οψίνη προς σχηματισμό ροδοψίνης

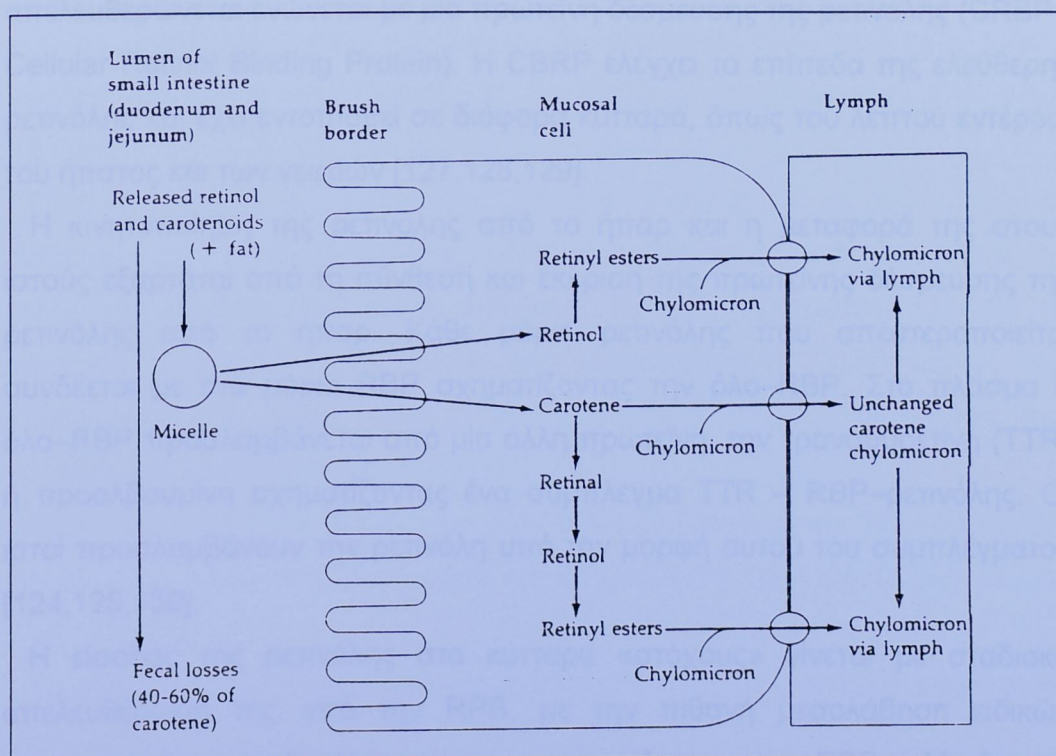
Επίσης, το ρετινοϊκό οξύ συμμετέχει ενεργά στη διαμόρφωση και στην διαφοροποίηση των κυττάρων του οργανισμού, καθώς δρα σαν ορμόνη επηρεάζοντας την έκφραση πολλών γονιδίων [118,119]. (βλ. σχήμα 18). Πυρηνικοί υποδοχείς του ρετινοϊκού οξέος εντοπίζονται σε διάφορα κύτταρα σε ποικίλα στάδια της ανάπτυξης. Συνεπώς, ρετινοϊκό οξύ χρειάζονται τα επιθηλιακά κύτταρα αδένων, της τραχείας, του δέρματος, του γαστρεντερικού σωλήνα κ.α., συμβάλλοντας στη διατήρηση της δομής και λειτουργίας αυτών. Ακόμη πιστεύεται ότι δρα ως σήμα έναρξης της έκφρασης των πρωτεϊνών της κερατίνης [112,118,120].



Σχήμα 18. Υποτιθέμενος τρόπος δράσης του ρετινοϊκού οξέος

1.8.2.4 Πέψη – Απορρόφηση

Η βιταμίνη και προβιταμίνη Α – εστέρες ρετινόλης και καροτένια – της τροφής βρίσκονται συνήθως ενωμένες με πρωτεΐνες. Με την δράση της πεψίνης στο στομάχο και άλλων υδρολυτικών ενζύμων του λεπτού εντέρου, πραγματοποιείται υδρόλυση των καροτενοειδών και των ρετινολικών εστέρων και απελευθέρωσή τους από τις πρωτεΐνες [111,121]. Στον αυλό του λεπτού εντέρου τα «αποδεσμευμένα» καροτενοειδή και ρετινοειδή, σχηματίζουν μαζί με άλλα λιποδιαλυτά συστατικά μικκύλια, τα οποία διαχέονται μέσα από τις μικρολάχνες στα εντεροκύτταρα [122,123]. Ο βαθμός απορρόφησης του β-καροτενίου κυμαίνεται μεταξύ 20 και 50%, ενώ για τα υπόλοιπα καροτενοειδή μπορεί να φτάσει ακόμη και το 5% [123,124,125,126]. Μέσα στα εντεροκύτταρα η ελεύθερη ρετινόλη μετατρέπεται σε εστέρα, ενώ ορισμένη ποσότητα των καροτενοειδών μετατρέπεται σε ρετινάλη, ρετινόλη και τελικά εστέρες ρετινόλης ενώ ορισμένη ποσότητα καροτενοειδών παραμένει ως έχει. Οι ρετινολικοί εστέρες μαζί με ένα μικρό ποσοστό μη εστεροποιημένης ρετινόλης και καροτενοειδών, εισέρχονται σε χυλομικρά, μέσω των οποίων μεταφέρονται αρχικά στην λεμφική και κατόπιν στην συστηματική κυκλοφορία. Σχηματικά η διαδικασία απορρόφησης της βιταμίνης Α έχει ως εξής :



Σχήμα 19. Απορρόφηση της βιταμίνης Α

1.8.2.5 Μεταφορά – Κατανομή

Η μεταφορά και η κατανομή της βιταμίνης Α υπό μορφή εστέρων, μη εστεροποιημένης ρετινόλης και καροτενοειδών πραγματοποιείται διαμέσου των χυλομικρών. Τα χυλομικρά μεταφέρουν την βιταμίνη Α σε εξωηπατικούς ιστούς, όπως ο μυελός των οστών, τα ερυθροκύτταρα, ο σπλήνας, ο λιπώδης ιστός, οι μύες, τα νεφρά κ.α. Τα ποσά της εστεροποιημένης ρετινόλης και των καροτενοειδών που δεν απορροφήθηκαν από τους ιστούς, μεταφέρονται μέσω των «απομεινاريών» των χυλομικρών (remnants) στο ήπαρ.

Στο ήπαρ τα καροτενοειδή μπορούν να ακολουθήσουν τρεις εναλλακτικές οδούς : 1) Ένα μικρό ποσοστό μετατρέπεται σε ρετινόλη 2) Άλλα ενσωματώνονται σε VLDL λιποπρωτεΐνες του ήπατος και απελευθερώνονται ως συστατικό τους στην κυκλοφορία προς διάφορους ιστούς 3) Τα υπόλοιπα αποθηκεύονται στο ήπαρ. Η περίσσεια των καροτενοειδών αποθηκεύεται στο σωματικό λίπος. Στο σημείο αυτό πρέπει να τονισθεί ότι τα επίπεδα καροτενίων του ορού αντανakλούν την πρόσφατη πρόσληψη αυτών και όχι τα σωματικά αποθέματα.

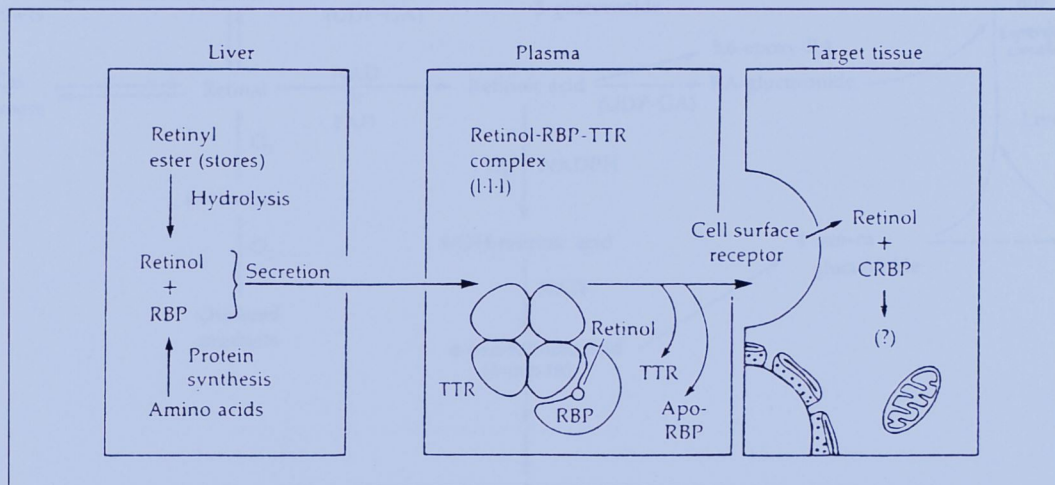
Οι εστέρες της ρετινόλης που εισέρχονται στα ηπατικά παρεγχυματικά κύτταρα υδρολύονται προς ρετινόλη και λιπαρά οξέα. Η ρετινόλη που απελευθερώνεται ενώνεται με μία πρωτεΐνη δέσμευσης της ρετινόλης (CRBP - Cellular Retinol Binding Protein). Η CRBP ελέγχει τα επίπεδα της ελεύθερης ρετινόλης και έχει εντοπισθεί σε διάφορα κύτταρα, όπως του λεπτού εντέρου, του ήπατος και των νεφρών [127,128,129].

Η κινητοποίηση της ρετινόλης από το ήπαρ και η μεταφορά της στους ιστούς εξαρτάται από τη σύνθεση και έκκριση της πρωτεΐνης δέσμευσης της ρετινόλης από το ήπαρ. Κάθε μόριο ρετινόλης που απεστεροποιείται συνδέεται με ένα μόριο RBP σχηματίζοντας την όλο-RBP. Στο πλάσμα η όλο-RBP προσλαμβάνεται από μία άλλη πρωτεΐνη, την τρανσθυρετίνη (TTR) ή προαλβουμίνη σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα TTR – RBP-ρετινόλης. Οι ιστοί προσλαμβάνουν την ρετινόλη υπό την μορφή αυτού του συμπλέγματος [124,125,130].

Η είσοδος της ρετινόλης στα κύτταρα «στόχους» γίνεται με σταδιακή απελευθέρωσή της από την RPB, με την πιθανή μεσολάβηση ειδικών επιφανειακών υποδοχέων που αναγνωρίζουν την RPB. Μετά την απελευθέρωση της ρετινόλης στα κύτταρα, το σύμπλεγμα διαλύεται με την

αποδέσμευση της TTR από την RBP (apo-RBP), η οποία καταβολίζεται τελικώς στους νεφρούς [120].

Σχηματικά η διαδικασία μεταφοράς και κατανομής της ρετινόλης στα κύτταρα απεικονίζεται ως εξής :



Σχήμα 20. Συνοπτική απεικόνιση κινητοποίησης από το ήπαρ, μεταφοράς στο πλάσμα και πρόσληψη από τα κύτταρα της βιταμίνης Α.

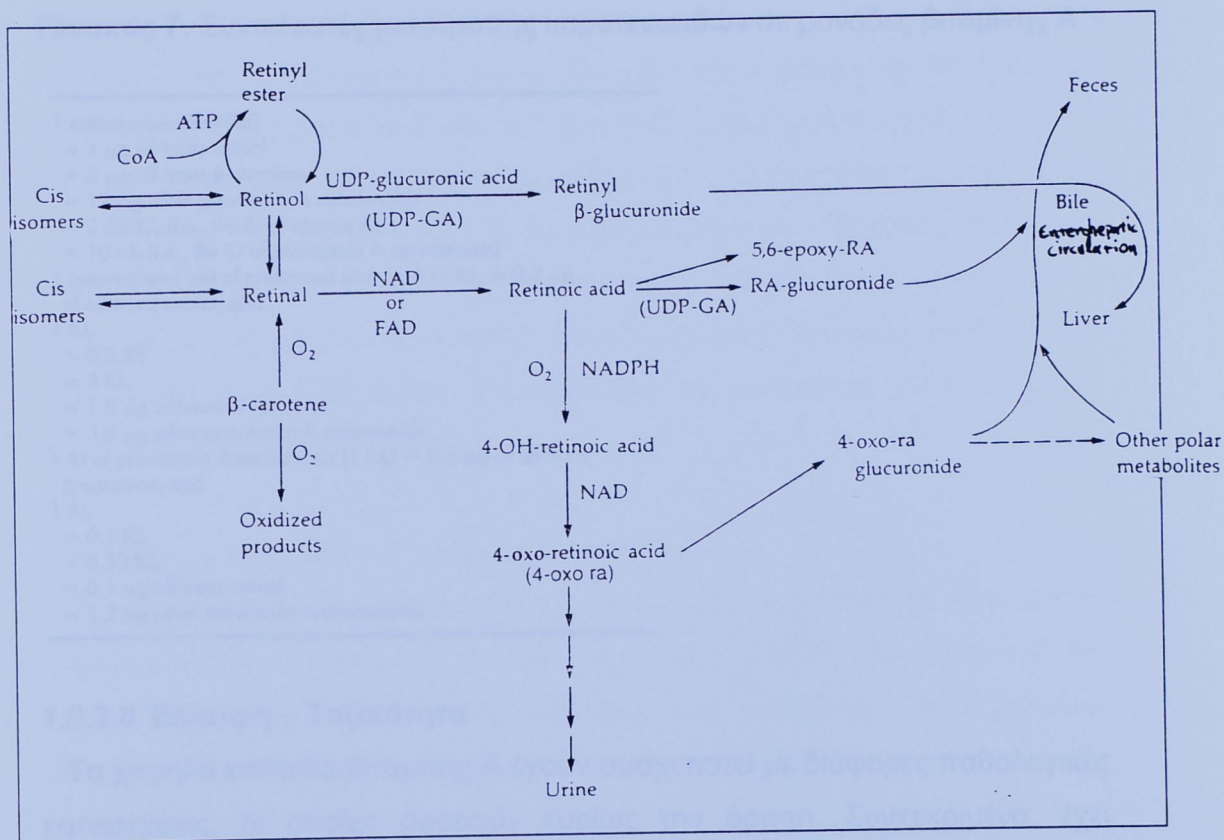
1.8.2.6 Μεταβολισμός – Απέκκριση

Η ρετινόλη είτε ως ελεύθερη μορφή είτε εστεροποιημένη απεκκρίνεται αφού πρώτα μετατραπεί, μέσω ρετινάλης, σε ρετινοϊκό οξύ, το οποίο τελικά, μετασχηματιζόμενο σε διάφορους μεταβολίτες απεκκρίνεται στα ούρα [131,132].

Ορισμένα προϊόντα της ρετινόλης, μπορούν εναλλακτικά να συζευχθούν με γλυκουρονικό οξύ προς γλυκουρονίδια, τα οποία αποτελούν συστατικά της χολής και αποβάλλονται με τα κόπρανα. Ωστόσο, ορισμένα από αυτά τα προϊόντα ανακυκλώνονται μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας και επιστρέφουν στο ήπαρ. Αυτή η ανακύκλωση βοηθά την διατήρηση των αποθεμάτων της βιταμίνης Α [131,132].

Γενικά υποστηρίζεται ότι περίπου το 70% των μεταβολιτών της βιταμίνης Α αποβάλλεται μέσω των κοπράνων και το υπόλοιπο 30% μέσω των ούρων [118,123,133].

Τα καροτενοειδή, τέλος, που δεν μετατρέπονται σε ρετινόλη εκκρίνονται μέσω της χολής [134].



Σχήμα 21. Μεταβολισμός της βιταμίνης A και απέκκριση των μεταβολιτών της

1.8.2.7 RDA

Οι συστάσεις για την πρόσληψη βιταμίνης A έχουν καθορισθεί με βάση τα ποσά που απαιτούνται για την πρόληψη αλλά και για την ανάταξη διαφόρων καταστάσεων (π.χ. κακή όραση κατά την διάρκεια της νύχτας – νυχτωπία) που προκύπτουν από την έλλειψη βιταμίνης A. Κατά τον τρόπο αυτό, η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη κυμαίνεται στα 800 µg για τις ενήλικες γυναίκες και στο 1 mg για τους άνδρες [123,135].

Πίνακας 6. Σύγκριση 1987 RDIs και 1989 RDAs για την βιταμίνη A

Population Groups	RDI (µg)	RDA (µg)
Infants, 0–24 mo	375	375–400
Children, 2–6 yr	400	400–500
Children, 6–9 yr	500	500–700
Males, 10–11 yr	600	700–1,000
Males, 12–70+ yr	700	1,000
Females, 10–70+ yr	600	700–800
Pregnancy, 6–9 mo	+200	800
Lactation, 0–5 mo	+400	1,300
Lactation, 6+ mo	+320	1,200

Πίνακας 7. Συντελεστές μετατροπής καροτενοειδών σε μονάδες βιταμίνης Α

1 retinol equivalent (RE)
= 1 μg all-trans retinol
= 6 μg all-trans β -carotene
= 12 μg other provitamin A carotenoids
= 3.33 IU _a (i.e., the IU of vitamin A)
= 10 IU _c (i.e., the IU of provitamin A carotenoids)
1 international unit of preformed vitamin A (1 IU _a = 0.3 μg of all-trans retinol, and
1 IU _a
= 0.3 RE
= 3 IU _c
= 1.8 μg all-trans β -carotene
= 3.6 μg other provitamin A carotenoids
1 IU of provitamin A carotenoids (1 IU _c) = 0.6 μg of all-trans β -carotene, and
1 IU _c
= 0.1 RE
= 0.33 IU _a
= 0.1 μg all-trans retinol
= 1.2 μg other provitamin A carotenoids

1.8.2.8 Έλλειψη – Τοξικότητα

Τα χαμηλά επίπεδα βιταμίνης Α έχουν συσχετιστεί με διάφορες παθολογικές καταστάσεις, οι οποίες αφορούν κυρίως την όραση. Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση της όρασης κατά την νύχτα, ως αποτέλεσμα της ελαττωματικής σύνθεσης ροδοψίνης και ξηροφθαλμία [118,136]. Επίσης, άλλα συμπτώματα έλλειψης είναι η ανορεξία, η χαμηλή ανάπτυξη, η ευπάθεια σε λοιμώξεις, η αποφολίδωση και η κερατινοποίηση του δέρματος. [137]

Στην αντίθετη περίπτωση, όταν τα επίπεδα ρετινόλης του ορού αυξηθούν πάνω από 200 $\mu\text{g}/\text{dl}$, είναι δυνατόν να προκληθούν τοξικές συνέπειες. Έχει βρεθεί ότι η χρόνια πρόσληψη βιταμίνης Α σε ποσά δεκαπλάσια του RDA μπορεί να προκαλέσει ξηροδερμία, αταξία, κεφαλαλγία, οστικά και μυϊκά άλγη κ.α. [120]. Η υπερβιταμίνωση από υψηλές δόσεις β -καροτενίου δεν έχει συσχετιστεί με σοβαρές παρενέργειες. Ωστόσο, μπορεί να προκαλέσει κίτρινο χρωματισμό του δέρματος, ιδίως των χεριών και του πέλματος. Η κατάσταση αυτή εξαφανίζεται αποκλείοντας τα καροτενοειδή από την δίαιτα [120].

1.8.2.9 Αλληλεπιδράσεις

Η βιταμίνη Α εμφανίζει αλληλεπίδραση με την βιταμίνη Ε, η οποία είναι απαραίτητη για την μετατροπή β -καροτενίου σε ρετινάλη, ενώ υψηλές δόσεις βιταμίνης Ε μπορούν να αναστείλουν την απορρόφηση και μετατροπή του β -καροτενίου στο έντερο [122,138].

Επίσης, παρατηρείται κάποια συσχέτιση ανάμεσα στα επίπεδα των πρωτεϊνών και την βιταμίνη Α, καθώς μειωμένα πρωτεϊνικά επίπεδα έχουν ως αποτέλεσμα ελαττωματική σύνδεση της ρετινόλης με την RBP [122].

Τέλος τα χαμηλά επίπεδα ψευδαργύρου έχουν συσχετιστεί με διαταραχές στον μεταβολισμό της βιταμίνης Α. Συγκεκριμένα, ο ψευδάργυρος συμμετέχει τόσο στην σύνθεση της RBP, όσο και στο ενζυμικό σύστημα της υδρολάσης των εστέρων της ρετινόλης. Κατά συνέπεια, μειωμένα επίπεδα ψευδαργύρου προκαλούν διαταραχή στην κινητοποίηση και μεταφορά των ηπατικών αποθεμάτων βιταμίνης Α [133].

1.9 Οξειδωτικό στρες και ανθρώπινη ασθένεια

Οι ιστοί που έχουν υποστεί βλάβη υφίστανται περισσότερες αντιδράσεις ελευθέρων ριζών συγκριτικά με τους υγιείς ιστούς [139,140]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, στις περισσότερες ασθένειες του ανθρώπου, το οξειδωτικό στρες να είναι ένα δευτερογενές φαινόμενο και όχι το πρωταρχικό αίτιο της ασθένειας [139]. Αυτό δεν σημαίνει ότι το οξειδωτικό στρες δεν είναι σημαντικό. Η σημασία του ποικίλει στις διαφορετικές καταστάσεις των ασθενειών. Για παράδειγμα η οξειδωτική βλάβη σε λιπίδια στο τοίχωμα αγγείων του αίματος είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρυνσης. Η οξειδωτική βλάβη DNA πιθανότατα συμβάλλει στην σχετιζόμενη με την ηλικία ανάπτυξη καρκίνου [141,142]. Εκτεταμένη παραγωγή ριζών πιθανότατα συμβάλλει σημαντικά σε ιστική βλάβη στην ρευματοειδή αρθρίτιδα [6], σε φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου [6] και σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις [143].

Αυξανόμενες είναι οι αποδείξεις ότι οι κυριότερες αιτίες θανάτου, η καρδιαγγειακή ασθένεια και ο καρκίνος, μπορούν να προληφθούν ή να επιβραδυνθούν σε κάποιο επίπεδο με διαιτητικές αλλαγές, όπως η μείωση στην πρόσληψη λίπους και η αυξημένη κατανάλωση φρούτων, δημητριακών και λαχανικών [144,145]. Αποκομίζουμε διάφορες ουσίες από μία υγιεινή διατροφή που δρουν (ή πιθανώς δρουν) προκειμένου να ελαττώσουν την οξειδωτική βλάβη *in vivo*. Επειδή η ενδογενής αντιοξειδωτική άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού δεν επαρκεί 100%, φαίνεται λογική η πρόταση ότι τα διατροφικά αντιοξειδωτικά είναι ιδιαιτέρως σημαντικά στην ελάττωση των συσσωρευτικών επιδράσεων της οξειδωτικής βλάβης κατά την διάρκεια της

μεγάλου προσδόκιμου της ανθρώπινης ζωής και ότι ερμηνεύουν ορισμένες από τις ευεργετικές επιδράσεις των φρούτων, των δημητριακών και των λαχανικών. Για παράδειγμα, εάν εμπλακεί η συνεχόμενη βλάβη του DNA, προερχόμενη από ελεύθερες ρίζες, στην αυτόματη ανάπτυξη καρκίνων (spontaneous cancers), τότε η μεγαλύτερη διαιτητική πρόσληψη αντιοξειδωτικών ίσως βοηθήσει [141,144]. Αυξανόμενες είναι οι αποδείξεις ότι μία μεγαλύτερη διαιτητική πρόσληψη βιταμίνης E θα μειώσει τους θανάτους από εμφράγματα του μυοκαρδίου. Οι διαιτητικές ανάγκες του ανθρώπου σε βιταμίνη E πιθανότατα αυξάνεται εάν το ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στην διατροφή είναι αυξημένο.

1.10 Επιδράσεις της διατροφής στο οξειδωτικό στρες.

Η ιδέα ότι η διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο στο οξειδωτικό στρες έχει ενταθεί τα τελευταία χρόνια από μελέτες σε τοξικές ουσίες της διατροφής όπως τα μικροβιοκτόνα, το αλκοόλ και τα καρκινογόνα (φυσικά και συνθετικά) και σε αντιοξειδωτικά (φυσικά και συνθετικά) [146,147]. Εξίσου σημαντικό είναι το γεγονός ότι η βιολογική δράση πολλών απαραίτητων θρεπτικών συστατικών έχει συσχετιστεί με το οξειδωτικό στρες και την προκαλούμενη ασθένεια. Μέταλλα όπως το σελήνιο, ο σίδηρος, ο χαλκός και ο ψευδάργυρος, βιταμίνες όπως η A, η C και η E, και άλλες συμπληρωματικές ουσίες όπως τα καροτενοειδή, η χοληστερόλη και τα ακόρεστα λίπη πιθανώς παίζουν σημαντικούς ρόλους στην ισορροπία ανάμεσα σε προοξειδωτικά και αντιοξειδωτικά συστήματα στον άνθρωπο. Φαίνεται πολύ πιθανόν ότι ορισμένα διατροφικά συμπληρώματα θα έχουν μία σχέση με την τοξικότητα άλλων συστατικών της διατροφής.

Η τοξικότητα του αλκοόλ αποτελεί ένα καλό παράδειγμα διατροφικής ουσίας που μπορεί άμεσα να αυξήσει το κυτταρικό οξειδωτικό στρες [146]. Η αιθανόλη παράγει λιπιδική υπεροξείδωση στο ήπαρ, ενώ ρίζες οξυγόνου έχουν άμεσα περιγραφεί μετά την απορρόφηση αιθανόλης με προοδευμένες τεχνικές «παγίδων» περιστροφικότητας (spin – trapping). Τα αντιοξειδωτικά μπορούν επίσης να εμποδίσουν την επαγωγή του λιπώδους ήπατος που προκαλείται από την αιθανόλη. Έχουν δε προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για να εξηγήσουν την πρόκληση οξειδωτικού στρες από την απορρόφηση αλκοόλ.

Τα λιπιδικά υδροϋπεροξειδία και τα προϊόντα αποσύνθεσης από την λιπιδική υπεροξειδωση είναι άλλα παραδείγματα συστατικών της διατροφής τα οποία έχουν μελετηθεί ως εν δυνάμει πηγές οξειδωτικού στρες [37,148]. Με μία διατροφή υψηλή σε ακόρεστα λίπη, τα λιπιδικά υπεροξειδία γίνονται μία σημαντική διατροφική συνιστώσα· πράγματι δίαιτες υψηλές σε υπεροξειδομένο λίπος έχουν τοξικές επιδράσεις στην ανάπτυξη και στην λειτουργία των ιστών. Ωστόσο, τα διατροφικά υπεροξειδία δεν συσσωρεύονται σημαντικά στους ιστούς, υποδηλώνοντας ότι τα προϊόντα υποβάθμισης αυτών των ασταθών ουσιών μπορεί να είναι πιο σημαντικά από τα υπεροξειδία τα ίδια. Κατά συνέπεια, η προσθήκη αντιοξειδωτικών στα τρόφιμα μειώνει την ποσότητα των λιπιδικών υπεροξειδίων και των προϊόντων υποβάθμισής τους. Από την άλλη πλευρά, ορισμένα αντιοξειδωτικά όπως το BHA (butylated hydroxyanisole) έχουν καρκινογόνες επιδράσεις σε ορισμένα ζωικά μοντέλα (animals models), υποδηλώνοντας ότι τα προσθετικά αντιοξειδωτικά μπορεί να έχουν σύνθετη δράση ως διατροφικές συνιστώσες [149].

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της διατροφής μπορεί επίσης να έχουν μία άμεση επίδραση στην υπεροξειδωση των κυτταρικών λιπιδίων επειδή αυτά τα λιπίδια της διατροφής μπορούν να μεταβάλλουν την μεμβρανική σύσταση διαφόρων κυττάρων, κάνοντας τα περισσότερο ή λιγότερο επιρρεπή στην υπεροξειδική βλάβη κατά την διάρκεια οξειδωτικού στρες [37].

1.11 Επιδημιολογικές μελέτες

Οι αντιοξειδωτικές βιταμίνες αποτελούν στις μέρες μας σημείο αναφοράς για πολλές έρευνες και επιδημιολογικές μελέτες σε παγκόσμιο επίπεδο. Η ιδιαίτερη σημασία που έχουν για την σωστή λειτουργία του οργανισμού και η προστασία που παρέχουν έναντι πολλών χρόνιων εκφυλιστικών ασθενειών της εποχής μας, έχουν ωθήσει πολλούς ερευνητές στη μελέτη τόσο των επιπέδων τους στον ανθρώπινο οργανισμό όσο και των παραγόντων που σχετίζονται με την ρύθμιση και την δράση αυτών.

Προς την κατεύθυνση αυτή, στη συνέχεια αναφέρονται επιγραμματικά ορισμένες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορες χώρες του κόσμου.

Σε μία από αυτές, που πραγματοποιήθηκε στη Ρωσσία [150], σε δείγμα 13 παιδιών ηλικίας 9 ετών και 22 ηλικιωμένων ηλικίας 65-83 ετών, μετρήθηκαν τα

επίπεδα των βιταμινών E, A, β-καροτενίου και α-καροτενίου στο πλάσμα, και βρέθηκε ότι στα παιδιά ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων της βιταμίνης E ήταν 9,5 mg/L, της βιταμίνης A ήταν 0,36 mg/L, του β-καροτενίου ήταν 0,22 mg/L και του α-καροτενίου ήταν 0,06 ng/L. Οι αντίστοιχες τιμές για τους ενήλικες ήταν για την βιταμίνη E 15,9 mg/L, για τη βιταμίνη A 0,73 mg/L, για το β-καροτένιο 0,21mg/L και για το α-καροτένιο 0,02 ng/L.(βλ. Πίνακα 8)

Πίνακας 8. Επίπεδα χοληστερόλης (mg/dl) και βιταμινών (mg/L) του δείγματος των 35 ατόμων στην Μόσχα τον Δεκέμβρη του 1992

	Children		Elderly		Adequate status ¹
	Mean $\pm$ SD	Range	Mean $\pm$ SD	Range	
Total cholesterol	147 $\pm$ 23	112–190	mg/dl 213 $\pm$ 39	147–302	<200
Vitamin E (α -tocopherol)	9.5 $\pm$ 1.5	7.0–11.7	mg/L 15.9 $\pm$ 3.4	10.2–21.3	>5.0
Vit E/chol $\cdot 10^{-3}$	5.9 $\pm$ 0.7	4.7–7.0	6.8 $\pm$ 1.2	5.0–9.8	>2.5
Vitamin C	10.3 $\pm$ 3.1	4.8–15.2	5.0 $\pm$ 4.0	1.3–15.2	>6.0*, 4.0†
Vitamin A (retinol)	0.36 $\pm$ 0.05	0.28–0.48	0.73 $\pm$ 0.19	0.50–1.39	>0.2*, 0.3†
β -carotene	0.22 $\pm$ 0.12	0.07–0.52	0.21 $\pm$ 0.12	0.04–0.45	
α -carotene	0.06 $\pm$ 0.06	0.01–0.22	0.06 $\pm$ 0.03	0.02–0.12	

Σε μία άλλη έρευνα, η οποία πραγματοποιήθηκε στην περιοχή της Νέας Αγγλίας [151], μετρήθηκαν τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών βιταμινών στο πλάσμα 38 ατόμων (18 άντρες – 18 γυναίκες) ηλικίας 20 – 80 ετών στα οποία επρόκειτο να δοθούν δίαιτες πλούσιες σε καροτένια. Τα αποτελέσματα έδειξαν, όσον αφορά τα παιδιά αντίστοιχα για τα αγόρια και τα κορίτσια, επίπεδα ρετινόλης 2μmol/L και 1,35 μmol/L, β-καροτενίου 0,44 μmol/L και 0,8 μmol/L, λουτεΐνης 0,22 μmol/L και 0,28 μmol/L, λυκοπενίου 0,38 και 0,37 μmol/L, ζεαξανθίνης 0,03 και 0,04 μmol/L, κρυπτοξανθίνης 0,34 και 0,54 μmol/L κ.α. Κατά αντιστοιχία, μετρήθηκαν στο πλάσμα των ηλικιωμένων, και οι τιμές που βρέθηκαν ήταν ελαφρώς μεγαλύτερες σε όλες σχεδόν τις βιταμίνες. (βλ. Πίνακα 9)

Πίνακας 9. Συγκεντρώσεις καροτενοειδών και ρετινόλης των συμμετεχόντων στην έρευνα πριν ξεκινήσουν την υψηλή σε καροτενοειδή διαίτα

	Younger subjects		Older subjects	
	Men (n = 9)	Women (n = 9)	Men (n = 9)	Women (n = 9)
	$\mu\text{mol/L}$			
Lutein isomers	0.06 ± 0.01^2	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.01^2
Lutein	0.22 ± 0.02^2	0.28 ± 0.03	0.38 ± 0.05	0.25 ± 0.03^2
Zeaxanthin	0.03 ± 0.00^2	0.04 ± 0.01^2	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.00^2
Cryptoxanthin	0.34 ± 0.03^2	0.54 ± 0.09^2	1.04 ± 0.24	0.54 ± 0.11^2
13-cis- β -carotene	0.03 ± 0.01^2	0.05 ± 0.01^2	0.09 ± 0.02	0.04 ± 0.01^2
α -Carotene	0.09 ± 0.01^2	0.18 ± 0.04	0.27 ± 0.07	0.20 ± 0.04
all-trans- δ -Carotene	0.44 ± 0.07^2	0.80 ± 0.17^2	1.51 ± 0.41	0.78 ± 0.10^2
13-cis-Lycopene	0.01 ± 0.001	0.01 ± 0.001	0.01 ± 0.003	0.01 ± 0.00
13-cis-Lycopene	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.09 ± 0.01^2
9-cis-Lycopene	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.00
trans-Lycopene	0.38 ± 0.05	0.37 ± 0.06	0.41 ± 0.06	0.28 ± 0.02
Retinol	2.00 ± 0.18^4	1.35 ± 0.08^2	2.14 ± 0.12	1.66 ± 0.08^2

¹ $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

² Significantly different from older men, $P < 0.05$ (ANOVA).

³ Significantly different from older women, $P < 0.05$ (ANOVA).

⁴ Significantly different from younger women, $P < 0.05$ (ANOVA).

Επίσης, σε άλλη επιδημιολογική μελέτη [152] που έλαβε χώρα στην Γαλλία, στην οποία συμμετείχαν 587 υγιή παιδιά (297 αγόρια και 290 κορίτσια) ηλικίας 3 – 16 ετών, μετρήθηκαν τα επίπεδα της ρετινόλης, του β -καροτενίου και της α -τοκοφερόλης του πλάσματος και βρέθηκε ότι ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων ήταν για την ρετινόλη 38,8 $\mu\text{g/dl}$, για το β -καροτένιο 533 $\mu\text{g/L}$ και για την α -τοκοφερόλη 9,1 mg/L . (βλ. Πίνακα 10)

Πίνακας 10. Εύρος (0,025-0,975 εκατοστημόρια) για βιταμίνη Α, β -καροτένιο, α -τοκοφερόλη (ΑΤ), χοληστερόλη (CT) ορού σύμφωνα με το φύλο και την ηλικία

Age, years	No.	Retinol ($\mu\text{g/dl}$)		β -carotene ($\mu\text{g/L}$)		Cholesterol (g/L)		α -tocopherol (mg/L)		AT/CT		Retinol/RBP	
		Median	Range	Median	Range	Median	Range	Median	Range	Median	Range	Median	Range
3-5	54	27.90	17.4-37.0	480	115-1340	1.60	0.97-2.41	8.30	5.5-11.8	5.44	4.19-6.97	0.88	0.47-1.37
	26 boys	28.55	17.4-37.0	400	100-1060	1.63	0.97-2.41	8.30	6.2-10.8	5.35	4.19-9.90	0.88	0.41-1.28
	28 girls	27.65	16.1-40.3	515	140-1350	1.57	0.92-2.42	8.30	2.0-12.8	5.47	2.17-6.97	0.90	0.61-1.40
6-8	161	35.90	20.1-55.2	625	100-1875	1.77	1.03-2.60	9.30	4.6-14.8	5.21	3.48-6.85	0.88	0.44-1.47
	85 boys	36.60	22.0-56.7	740	70-2045	1.81	1.12-2.78	9.20	4.3-15.8	5.12	3.45-6.72	0.93	0.42-1.53
	76 girls	35.55	14.5-51.1	595	150-1695	1.76	0.97-2.58	9.45	5.8-12.4	5.28	3.77-7.23	0.81	0.45-1.29
9-11	161	39.00	25.7-57.3	605	210-1530	1.82	1.16-2.70	9.60	6.2-14.3	5.23	3.86-7.28	0.87	0.47-1.63
	79 boys	39.00	18.7-57.3	615	185-1680	1.81	1.12-2.69	9.30	5.6-15.3	5.22	3.85-6.74	0.97	0.49-1.70
	82 girls	38.95	28.9-58.0	570	210-1450	1.82	1.27-2.70	9.90	6.3-13.7	5.24	4.07-7.48	0.85	0.47-1.51
12-13	77	42.00	23.7-66.4	490	130-1340	1.67	1.09-2.41	8.80	4.8-13.1	5.32	3.68-6.72	0.81	0.52-1.47
	41 boys	44.30	28.4-66.4	480	135-1250	1.64	1.16-2.59	8.30	6.8-13.1	5.37	3.71-6.60	0.81	0.51-1.55
	36 girls	42.15	21.8-64.0	527	153-1405	1.72	0.82-2.21	8.95	1.1-12.2	5.31	2.87-7.80	0.82	0.53-1.37
14-16	134	47.74	28.4-83.2	470	155-1310	1.75	1.07-2.72	9.25	5.7-14.1	5.35	3.57-7.16	0.89	0.48-1.55
	66 boys	51.50	25.4-88.7	487	335-1465	1.78	1.04-3.73	9.10	5.8-15.7	5.44	3.57-7.38	0.95	0.49-1.47
	68 girls	45.90	33.1-83.2	442	210-1310	1.74	1.22-2.72	9.40	3.7-13.7	5.21	2.07-7.08	0.81	0.47-1.65
3-16	587	38.80	18.2-68.3	533	300-1530	1.74	0.65-2.64	9.1	3.0-14.1	5.28	3.57-7.16	0.88	0.40-1.50
	297 boys	38.85	18.7-69.4	560	300-1680	1.75	0.66-2.69	8.9	3.8-15.3	5.30	3.50-7.31	0.88	0.39-1.58
	290 girls	38.20	16.8-64.7	515	300-1450	1.73	0.61-2.59	9.3	2.8-12.9	5.28	3.68-7.16	0.82	0.42-1.48

Ακόμη, μετά από τη μέτρηση των επιπέδων των καροτενοειδών στο πλάσμα 493 παιδιών στο Belize [153], βρέθηκαν συγκεντρώσεις λυκοπενίου περί τα 93 nmol/L, β-καροτενίου 186 nmol/L και β-κρυπτοξανθίνης 163 nmol/L. (βλ. Πίνακα 11)

Πίνακας 11. Μέσοι όροι συγκεντρώσεων καροτενοειδών σε παιδιά στο Belize

District	Lutein/zeaxanthin	Lycopene	α -Carotene	β -Carotene	β -Cryptoxanthin	Total
			nmol/L			
Cayo (<i>n</i> = 123)	264 (193, 422)	93 (37, 130)	93 (56, 149)	186 (130, 242)	163 (108, 271)	869 (633, 1303)
Stann Creek (<i>n</i> = 37)	193 (105, 228)	93 (56, 130)	186 (93, 298)	261 (149, 391)	108 (72, 145)	887 (597, 1249)
Belize (<i>n</i> = 109)	211 (158, 281)	186 (112, 279)	93 (74, 112)	261 (168, 410)	181 (108, 325)	977 (688, 1448)
Toledo (<i>n</i> = 115)	228 (158, 299)	74 (19, 149)	74 (37, 130)	149 (74, 205)	108 (72, 163)	706 (452, 995)
Orange Walk (<i>n</i> = 54)	264 (193, 369)	93 (56, 130)	93 (74, 149)	168 (93, 223)	181 (127, 253)	869 (633, 1155)
Corozal (<i>n</i> = 55)	264 (193, 387)	130 (74, 186)	93 (93, 223)	279 (186, 391)	235 (163, 307)	1104 (814, 1321)
Total (<i>n</i> = 493)	228 (176, 316)	112 (56, 168)	93 (56, 130)	205 (130, 317)	145 (90, 235)	869 (597, 1249)

¹ 25th and 75th percentiles in parentheses. To convert values to $\mu\text{g/dL}$, divide lycopene and α - and β -carotene concentrations by 18.63, lutein/zeaxanthin concentrations by 17.58, and β -cryptoxanthin concentrations by 18.09.

Σε ανάλογες έρευνες που έχουν γίνει για το β-καροτένιο (βλ. Πίνακα 12) αλλά και για άλλα καροτενοειδή (βλ. Πίνακα 13), σε διάφορα ευρωπαϊκά εργατήρια προέκυψαν ανάλογα αποτελέσματα [154]. Χαρακτηριστικά όσον αφορά το β-καροτένιο αναφέρονται τα ακόλουθα. Στην Αγγλία σε δείγμα 21 ατόμων ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων β-καροτενίου για τους άνδρες ήταν 0,24 $\mu\text{mol/L}$ και για τις γυναίκες 0,32 $\mu\text{mol/L}$, στο Έιρε σε δείγμα 39 ατόμων ήταν για τους άνδρες 0,287 $\mu\text{mol/L}$ και για τις γυναίκες 0,337 $\mu\text{mol/L}$, στη Γαλλία σε δείγμα 83 ατόμων ήταν για τους άνδρες 0,65 $\mu\text{mol/L}$ και για τις γυναίκες 0,560 $\mu\text{mol/L}$, στη Γερμανία σε δείγμα 43 ατόμων για τους άνδρες ήταν 0,425 $\mu\text{mol/L}$ και για τις γυναίκες 0,6 $\mu\text{mol/L}$ και τέλος, στην Ελβετία σε δείγμα 44 ατόμων ήταν για τους άνδρες 0,533 $\mu\text{mol/L}$ και για τις γυναίκες 0,686 $\mu\text{mol/L}$.

Πίνακας 12. Επίπεδα β-καροτενίου ($\mu\text{mol/L}$) από διάφορα ευρωπαϊκά εργαστήρια.

Country	Reference	Group Characteristic	Men		Women	
			Median	Range	Median	Range
Spain	#	29M/34W	0.157	0.034–0.70	0.311	0.101–0.769
Italy	38	3M/11W		0.195–0.881	0.52	0.141–1.078
Italy	40	OM/17W			0.209*	
England	21	944M/938W	0.24	0.01–6.52	0.320	0.019–2.93
Eire	39	14M/22W	0.287*	0.093–0.751	0.337*	0.224–0.894
France	41	19M/20W	0.790*		1.03*	
France	42	527M/353W	0.559*		0.539*	
Germany	43	862M/1144W	0.425	0.12–2.6	0.6	0.005–2.18
Switzerland	44	75M/75W	0.533		0.686	

M = Men W = Women / * mean values / # unpublished data reported by us at the FLAIR Meeting, October 1991

Πίνακας 13. Μέσοι όροι και εύρη επιπέδων καροτενοειδών στον ορό (#,38) ή στο πλάσμα (21,39) Ευρωπαίων (εκφραζόμενα σε $\mu\text{mol/L}$)

	Lutein/zeaxanthin		Lycopene		α -carotene		β -cryptoxanthin	
	Men	Women	Men	Women	Men	Women	Men	Women
Spain (#)	0.251	0.304	0.330	0.438	0.073	0.067	0.195	0.359
29M/34W	(0.105–0.490)	(0.147–0.940)	(0.02–0.881)	(0.114–0.98)	(0.019–0.164)	(0.019–0.149)	(0.042–1.173)	(0.091–1.027)
6–65y								
Italy [38]	0.634	0.446	0.907	0.669	0.052	0.037	0.256	0.269
3M/11W	(0.415–0.644)	(0.221–0.698)	(0.543–1.507)	(0.387–1.216)	(0.024–0.068)	(α –0.112)	(0.198–0.344)	(0.09–1.238)
England [21]	0.292	0.286	0.250	0.250	0.061	0.072	0.130	0.160
944M/938F	(0.027–1.105)	(0.057–1.494)	(0.007–1.219)	(0.01–1.32)	(0.001–0.706)	(0.006–1.463)	(0.001–1.237)	(0.001–1.938)
adults								
Ireland [39]	0.109*	0.135*	0.104*	0.119*	0.069*	0.073*	0.121*	0.489*
14M/22W	(0.035–0.179)	(0.074–0.318)	(0.034–0.246)	(0.017–0.138)	(0.035–0.166)	(0.025–0.166)	(0.097–0.449)	(0.086–0.915)
15–22y								

* Mean values

unpublished data reported by us at the ELAIR Meeting, October 1991.

Conversion factors: xanthophylls $\mu\text{mol/L} \times 7.59 = \mu\text{mol/L}$; carotenes $\mu\text{g/ml} \times 1.863 = \mu\text{mol/L}$

Συμπερασματικά, θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι πολλές από τις επιδημιολογικές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, συμπεριλαμβανομένων και κάποιων που ήδη αναφέρθηκαν, αφορούν ένα μικρό αριθμό ατόμων και, κατά συνέπεια, δεν μπορούν να αποτελέσουν στατιστικά σημαντικό δείγμα για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Παρόλα αυτά, ορισμένα στοιχεία που προκύπτουν από τον συσχετισμό των αποτελεσμάτων των ερευνών που προαναφέρθηκαν και την συγκέντρωση όλων των μετρήσεων, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα σημαντικό σημείο αναφοράς. (βλ. Πίνακα 14)

Συγκεκριμένα, οι τιμές των συγκεντρώσεων στο πλάσμα είναι (συγκεντρωτικά) για την ρετινόλη 1,43 $\mu\text{mol/L}$ στους άνδρες, 1,65 $\mu\text{mol/L}$ στις γυναίκες, 2 $\mu\text{mol/L}$ στα αγόρια και 1,55 $\mu\text{mol/L}$ στα κορίτσια. Οι αντίστοιχες τιμές (άνδρες – γυναίκες – αγόρια – κορίτσια) για την α -τοκοφερόλη είναι 43 – 56 – 20,9 – 20,9 $\mu\text{mol/L}$ και για το β -καροτένιο 0,9 – 0,65 – 0,3 – 0,135 $\mu\text{mol/L}$, για την λουτεΐνη 0,38 – 0,7 – 0,22 – 0,28 $\mu\text{mol/L}$, για την ζεαξανθίνη 0,05 – 0,03 – 0,03 – 0,04 $\mu\text{mol/L}$, για την β -κρυπτοξανθίνη 0,09 – 0,54 – 0,34 – 0,54 $\mu\text{mol/L}$ και τέλος για το λυκοπένιο για τους άνδρες 0,41 $\mu\text{mol/L}$ και για τις γυναίκες 0,18 $\mu\text{mol/L}$.

Πίνακας 14. Μέσοι όροι συγκεντρώσεων (μmole/L) αντιοξειδωτικών βιταμινών στο πλάσμα από διάφορες επιδημιολογικές μελέτες

Ρετινόλη	α-τοκοφερόλη	β-καροτένιο	Λουτεΐνη	β-κρυπτο- ξανθίνη	Ζεαξανθίνη
1,43	43	0,9	0,38	0,09	0,05
1,65	56	0,65	0,7	0,54	0,03
2,00	20,9	0,3	0,22	0,34	0,03
1,55	20,9	0,135	0,28	0,54	0,04

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα θα μπορούσε κανείς να υποστηρίξει ότι, γενικά στους ενήλικες παρατηρούνται υψηλότερα επίπεδα των συγκεκριμένων βιταμινών σε σχέση με τα παιδιά, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να αιτιολογηθεί από διάφορους παράγοντες, όπως τα επίπεδα κυκλοφορούντων λιπιδίων κ.α. Επίσης, ενώ για την ρετινόλη και την α-τοκοφερόλη στις γυναίκες παρατηρούνται υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τους άνδρες, στα καροτενοειδή παρατηρείται το αντίστροφο με εξαίρεση την λουτεΐνη, όπου στις γυναίκες βρέθηκαν ιδιαίτερα υψηλές τιμές. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονισθεί ότι τα συμπεράσματα αυτά διατυπώνονται με κάθε επιφύλαξη λόγω τόσο του μεγέθους όσο και της ανομοιογένειας των δειγμάτων.

1.12 Επίλογος

Ο ρόλος των διατροφικών συστατικών στο οξειδωτικό στρες είναι αντικείμενο σημαντικών ερευνών. Η σημασία συναφών πειραμάτων θα ενταθεί διαμέσου της συνεχόμενης μελέτης της κυτταρικής βάσης του οξειδωτικού στρες και της αντιοξειδωτικής προστασίας. Οι μηχανισμοί του κυτταρικού τραυματισμού από το οξειδωτικό στρες, και η προστασία των κυττάρων από αυτόν τον τραυματισμό, εν δυνάμει εμπλέκουν πολλά διατροφικά συστατικά που ίσως ελαττώσουν ή αυξήσουν τον ρόλο του οξειδωτικού στρες στην ασθένεια.

2. Πειραματικό Μέρος

2.1 Σκοπός μελέτης

Μελετώντας τη διεθνή βιβλιογραφία γύρω από την έρευνα για τις αντιοξειδωτικές λιποδιαλυτές βιταμίνες (Α, Ε, καροτενοειδή), διαπιστώνεται έντονο ενδιαφέρον στο πεδίο έρευνας που αφορά τη συσχέτιση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών στον οργανισμό με την πρόληψη και την αντιμετώπιση χρόνιων εκφυλιστικών ασθενειών της σύγχρονης εποχής, ιδίως όταν υπάρχει επαρκής πρόσληψή τους από τα πρώτα στάδια της ζωής, δηλαδή την παιδική και εφηβική ηλικία. Αλλαγή των διατροφικών συνηθειών, με περιορισμό της πρόσληψης λιπών και αύξηση της κατανάλωσης φρούτων, λαχανικών και δημητριακών ήδη από την παιδική ηλικία, μπορούν να προλάβουν την εμφάνιση ή να καθυστερήσουν την εξέλιξη των νοσημάτων αυτών, μειώνοντας την οξειδωτική βλάβη των ιστών. Για το λόγο αυτό, είναι πολύ σημαντική η διατήρηση των αντιοξειδωτικών βιταμινών σε φυσιολογικά επίπεδα από την παιδική ηλικία, η οποία έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί το πρώτο στάδιο έκθεσης του οργανισμού σε επιβαρυντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες και ηλικία έναρξης πολλών χρόνιων νοσημάτων. Ένα σημαντικό μέτρο ελέγχου των επιπέδων αυτών είναι η μέτρηση των συγκεντρώσεων των βιταμινών στο αίμα, η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί με την μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Προς την κατεύθυνση αυτή, σκοπός της μελέτης είναι :

- i) Η εκμάθηση της λειτουργίας του υγρού χρωματογράφου υψηλής απόδοσης (HPLC).
- ii) Η μέτρηση των επιπέδων ρετινόλης, α-τοκοφερόλης και ορισμένων καροτενοειδών στο πλάσμα αίματος εφήβων, συγκεκριμένα μαθητών Λυκείου Αθήνας.
- iii) Η προσπάθεια συσχέτισης των υπολογισθέντων αποτελεσμάτων με ορισμένες παραμέτρους όπως το φύλο και το κάπνισμα.

2.2 Μέθοδος

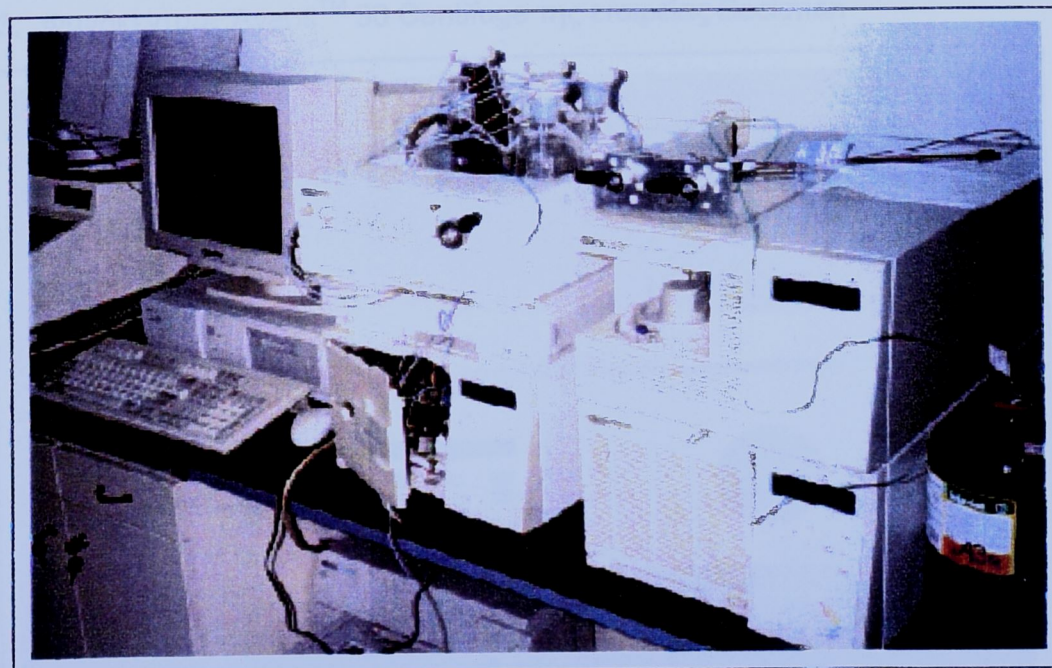
2.2.1 Όργανα

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή μελέτη είναι :

1. Υγρός Χρωματογράφος Υψηλής Πίεσης (HPLC) της εταιρείας HEWLETT PACKARD, σειρά 1050 (εκτός από τον απάερωτή που είναι της σειράς 1100), με αντλία σταθερής ροής με βρόγχο βαλβίδας έκχυσης 100. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν C18, σε χρωματογραφία ανάστροφης φάσης και ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν υπεριώδους – ορατού (UV – VIS) μεταβαλλόμενου μήκους κύματος.

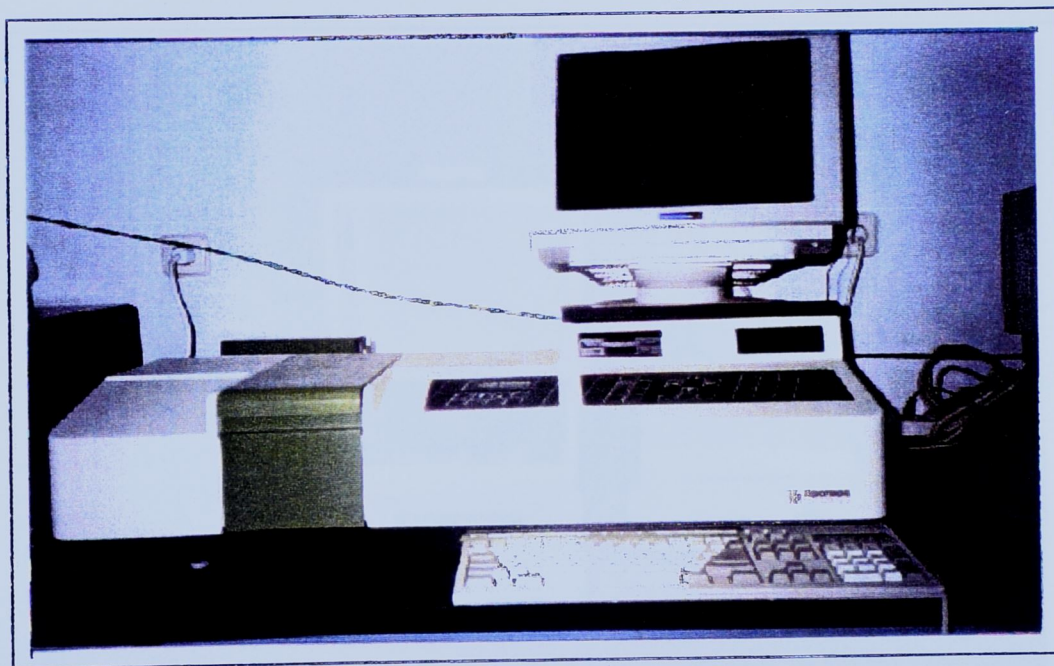


Εικ.1



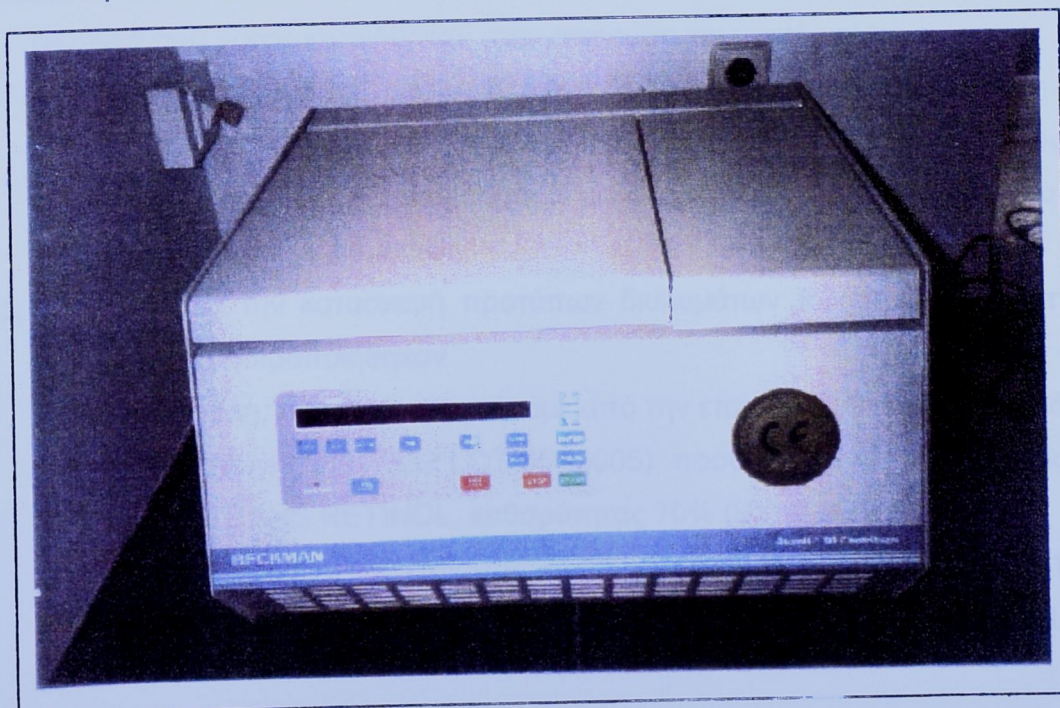
Εικ.2

2. Φασματοφωτόμετρο UNIKON 931 (Serial No 04941035) της εταιρείας KONTRON INSTRUMENTS, (εφαρμοζόμενη μέθοδος WAVELENGTH SCANNING (σάρωση σε διάφορα μήκη κύματος)).



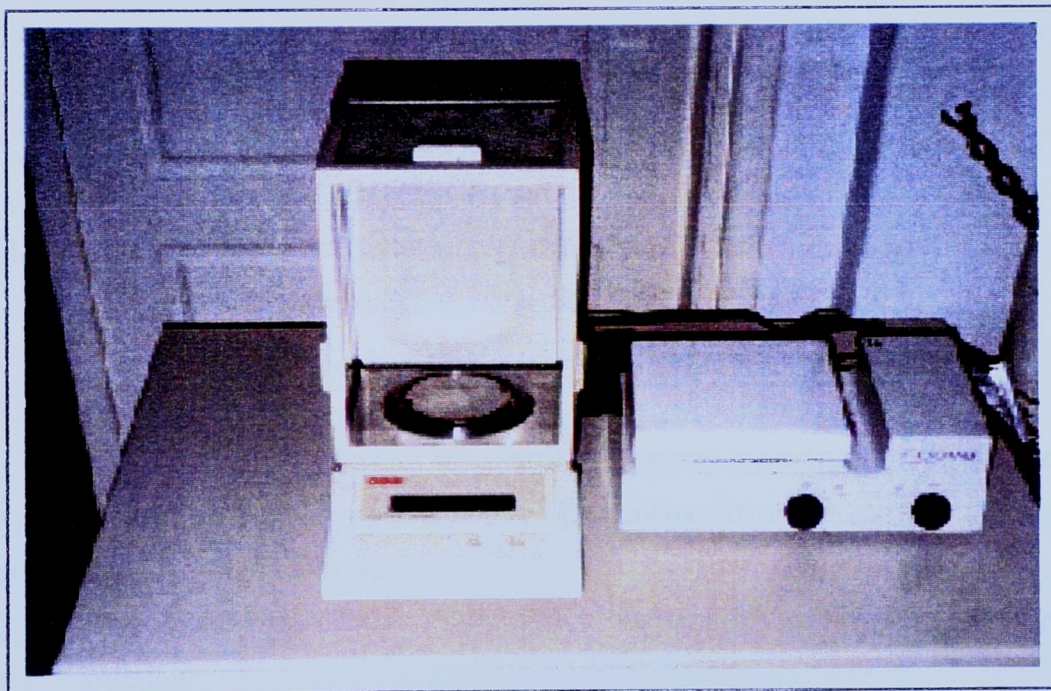
Εικ.3

3. Φυγόκεντρος Avanti™ 30 Centifuge της εταιρείας Beckman



Εικ.4

4. Ζυγός ακριβείας, ANALYTICAL Standard, Model AS120 (Serial No 1975) της εταιρείας OHAUS[®] και μαγνητικός αναδευτής, Nuova, STIR PLATE, Model No SP18420-26 (Serial No 757950468374) της εταιρείας BARNSTEAD / THERMOLYNE).



Εικ.5

2.2.2 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή μελέτη είναι :

- 1) Ως διαλύτες έκλουσης, καθαροί διαλύτες, ειδικά παρασκευασμένοι για την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC GRADE). Συγκεκριμένα, ως διαλύτες έκλουσης χρησιμοποιήσαμε μεθανόλη, αιθανόλη, ακετονιτρίλιο, χλωροφόρμιο και διαιθυλαμίνη.
- 2) Ως μέσα για την κατασκευή προτύπων διαλυμάτων των προς μέτρηση βιταμινών χρησιμοποιήθηκαν
 - i) Ρετινόλη, που προμηθευτήκαμε από την εταιρεία SIGMA, με αριθμό παραγωγής P – 7632 LOT 66H5005), ποσότητας 250 , ονομασίας ALL-TRANS RETINOL, καθαρότητας 70% (SYNTHETIC).
 - ii) α-τοκοφερόλη, της εταιρείας SIGMA με αριθμό παραγωγής T-3251 LOT 45H1397, ποσότητας 25 γρ. ονομασίας α-TOCOPHEROL

(VITAMIN E), καθαρότητας 95% (παρασκευασμένη από SYNTHETIC PHYTOL).

iii) β-καροτένιο, της εταιρείας SIGMA, με αριθμό παραγωγής C-9750 LOT 95H2637, ποσότητας 5 γρ., ονομασίας TRANS-β-CAROTENE, καθαρότητας 95% (τύπου I : SYNTHETIC).

iv) Οξικός εστέρας ρετινόλης, από την εταιρεία SIGMA, με αριθμό παραγωγής R-3250 LOT 126H1171, ποσότητας 10 γρ., ονομασίας ALL-TRANS RETINOL ACETATE, καθαρότητας 500000 U SP UNITS / GR (SYNTHETIC).

3) Ως μέσα για την επεξεργασία των δειγμάτων αίματος χρησιμοποιήθηκαν αιθανόλη, πετρελαϊκός αιθέρας και μεθανόλη.

2.2.3 Μεθοδολογία

Τα στάδια της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκαν προκειμένου να γίνει ο προσδιορισμός των αντιοξειδωτικών βιταμινών στα δείγματα αίματος συνοπτικά είναι τα ακόλουθα :

- i) Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων αναφοράς των προς μέτρηση ουσιών.
- ii) Παρασκευή εσωτερικών προτύπων διαλυμάτων (Retinol Acetate)
- iii) Προσδιορισμός με ακρίβεια των συγκεντρώσεων των παρασκευασθέντων προτύπων διαλυμάτων μέσω φασματοφωτομέτρησης και απαραίτητων μαθηματικών υπολογισμών.
- iv) Εισαγωγή προτύπων διαλυμάτων (με ένεση 50μL) στο HPLC και λήψη αντίστοιχων χρωματογραφημάτων.
- v) Αντιστοίχιση των επιφανειών των χρωματογραφημάτων με τις τιμές συγκεντρώσεων που υπολογίστηκαν μέσω των φασματοφωτομετρήσεων
- vi) Λήψη ποσότητας (0,25 mL) από κάθε δείγμα αίματος και κατάλληλη προετοιμασία αυτών των ποσοτήτων.
- vii) Εισαγωγή των προετοιμασμένων δειγμάτων (με ένεση 50 μL) στο HPLC και λήψη των αντίστοιχων χρωματογραφημάτων.
- viii) Προσδιορισμός των συγκεντρώσεων στα αρχικά δείγματα αίματος μέσω σύγκρισης των αντίστοιχων χρωματογραφημάτων των σταδίων iv και vii και των απαραίτητων μαθηματικών υπολογισμών.

Αναλυτικότερα η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής :

2.2.3.1 Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων

Κατά την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων αναφοράς λήφθηκαν υπόψιν τα ακόλουθα :

- Οι συγκεντρώσεις των προς μέτρηση αντιοξειδωτικών βιταμινών πρέπει να είναι παρόμοιες με των αναμενόμενων τιμών στα δείγματα αίματος, προκειμένου η σύγκριση των αντίστοιχων χρωματογραφημάτων να είναι όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστη.
- Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε είναι η μεθανόλη (παρόμοιος με τον διαλύτη κινητής φάσης) ώστε να αποφευχθούν τυχόν προβλήματα διαλυτοποίησης και ανάμιξης με την κινητή φάση.

Από τα αρχικά πυκνά πρότυπα διαλύματα (μητρικά), τα οποία μπορούν να διατηρηθούν ανεπηρέαστα έως και 2 εβδομάδες σε θερμοκρασία συντήρησης του ψυγείου, παρασκευάζονται αραιά πρότυπα διαλύματα (θυγατρικά), τα οποία αποτελούν τα διαλύματα εργασίας και δεν μπορούν να διατηρηθούν χωρίς απώλειες στο ψυγείο για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο του 24ώρου.

Ο προσδιορισμός των ακριβών συγκεντρώσεων των διαλυμάτων εργασίας γίνεται με φασματοφωτομέτρησή τους, πριν την εισαγωγή στο HPLC, σε φασματοφωτόμετρο UVICON 931 και στη λειτουργία «WAVELENGTH SCANNING», από το οποίο λαμβάνεται η μέγιστη απορρόφηση του δείγματος. Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, τα μήκη κύματος στα οποία παρατηρούνται οι μέγιστες απορροφήσεις είναι :

Ρετινόλη : 325 nm

α-τοκοφερόλη : 292nm

β-καροτένιο : 450nm

Οξικός εστέρας ρετινόλης : 325 nm

Στη συνέχεια, χρησιμοποιώντας το νόμο των LAMBERT – BEER υπολογίζουμε την ακριβή συγκέντρωση του πρότυπου διαλύματος αναφοράς.

Συγκεκριμένα :

$A = E \times C$: Νόμος Lambert – Beer
--

Όπου A : η μέγιστη απορρόφηση της ουσίας

E : ειδικός συντελεστής απορρόφησης της ουσίας

C : η συγκέντρωση της ουσίας

Ουσία	E	Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (nm)
Ρετινόλη	1780	325
α-τοκοφερόλη	75,8	292
β-καροτένιο	2500	450
Οξικός εστερας ρετινόλης	1512	325

Στη συνέχεια το πρότυπο διάλυμα εισάγεται στο HPLC (ένεση 50μL) και λαμβάνεται το αντίστοιχο χρωματογράφημα. Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής προσδιορίζει το εμβαδόν της επιφάνειας), που αντιστοιχεί στη συγκεκριμένη ουσία και η οποία περικλείεται από την κορυφή (peak) έως την γραμμή βάσης (base line). Στη συνέχεια γίνονται οι απαραίτητες διορθώσεις λαμβάνοντας υπόψιν την καθαρότητα των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων αναφοράς.

2.2.3.2 Διαλύτης έκλουσης στο HPLC

Η χρησιμοποίηση ενός μόνο διαλύτη έκλουσης για την ανίχνευση των βιταμινών A, E και β-καροτενίου δεν παρέχει ικανοποιητικά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό, θεωρείται πολυτιμότερη η έκλουση των δειγμάτων με δύο διαλύτες έκλουσης, έναν για τις βιταμίνες A και E και έναν για το β-καροτένιο και τα υπόλοιπα καροτενοειδή. Προς την κατεύθυνση αυτή χρησιμοποιείται ως διαλύτης έκλουσης για τις βιταμίνες A και E το μίγμα μεθανόλη – νερό σε αναλογία 99 : 1, ενώ για το β-καροτένιο και τα καροτενοειδή το μίγμα ακετονιτρίλιο – αιθανόλη σε αναλογία 1 : 1 και προσθήκη 0,1ml δισουλφιδίου ανά λίτρο του μίγματος.

Η ροή του διαλύτη έκλουσης ήταν 1 ml/min ενώ οι τιμές της πίεσης ήταν περίπου 110 bar όταν ο διαλύτης έκλουσης ήταν το μίγμα μεθανόλη – νερό και περίπου 130 bar όταν ο διαλύτης έκλουσης ήταν το μίγμα ακετονιτρίλιο – αιθανόλη. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι ο χρόνος έκλουσης

συνολικά για τις βιταμίνες Α και Ε είναι περίπου 15 min, ενώ για τα καροτενοειδή είναι περίπου 12 min.

2.2.3.3 Προετοιμασία των δειγμάτων

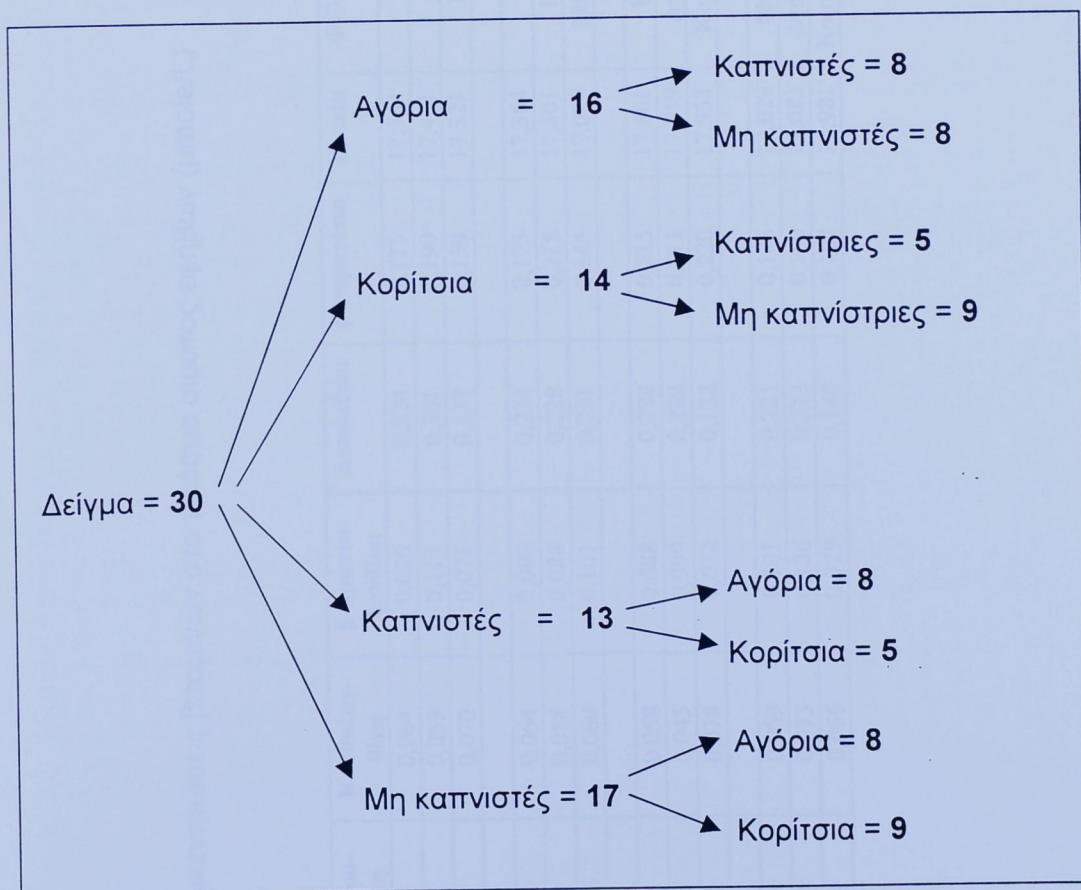
Η μέθοδος προετοιμασίας των δειγμάτων (ανεξαρτήτως του διαλύτη έκλουσης) περιλαμβάνει την λήψη 0,25 mL πλάσματος και την εισαγωγή του σε δοκιμαστικό σωλήνα όπου στη συνέχεια προστίθενται 0,45 mL αιθανόλης και 0,05 mL εσωτερικού προτύπου αναφοράς Retinol Acetate γνωστής συγκέντρωσης. Ο λόγος της προσθήκης εσωτερικού προτύπου αναφοράς είναι η διευκόλυνση του υπολογισμού των απωλειών των προς μέτρηση αντιοξειδωτικών βιταμινών που παρατηρούνται κατά την επεξεργασία των δειγμάτων. Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά την επιλογή εσωτερικού προτύπου λαμβάνεται υπόψιν ο χρόνος έκλουσης του υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες ώστε να διαχωρίζονται ευκρινώς από τις προς μέτρηση ουσίες. Στη συνέχεια αναδεύουμε το μίγμα σε Vortex για 45 δευτερόλεπτα και προσθέτουμε 2,3 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Αναδεύουμε εκ νέου για 45 δευτερόλεπτα σε Vortex. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στις 3500 στροφές και μετάγγιση του υπερκείμενου υγρού (χωρίς το ίζημα) σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα, απ' όπου και απαερώνεται με αέριο άζωτο (N_2) για την απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύτη. Η λιπαρή στιβάδα που απομένει στο δοκιμαστικό σωλήνα, επαναδιαλύεται με προσθήκη 0,20 mL μεθανόλης και επαναφυγοκεντρείται στις 3500 στροφές για 5 min. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση λαμβάνεται προσεκτικά ποσότητα 50 μ L από το υγρό και η οποία εισάγεται στο χρωματογράφο.

Συνοπτικά τα στάδια προετοιμασίας του δείγματος για ποσότητα 0,25 mL πλάσματος είναι τα ακόλουθα :

- 450 μ L αιθανόλης και 50 μ L οξικού εστέρα της ρετινόλης
- ανάμιξη σε Vortex για 45 δευτερόλεπτα
- 2,3 mL πετρελαϊκού αιθέρα
- ανάμιξη σε Vortex για 45 δευτερόλεπτα
- φυγοκέντρηση για 10 min στις 2500 στροφές
- απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύτη με αέριο άζωτο
- επαναδιάλυση με 0,20 mL μεθανόλη
- φυγοκέντρηση για 5 min στις 3500 στροφές

2.3 Αποτελέσματα

Υπενθυμίζεται ότι το δείγμα των εφήβων, των οποίων μετρήθηκαν οι συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών βιταμινών στο πλάσμα του αίματός τους, απαρτίζεται από τριάντα (30) άτομα. Συγκεκριμένα, οι έφηβοι οι οποίοι απαρτίζουν το δείγμα μπορούν να ταξινομηθούν με κριτήρια το φύλο και το κάπνισμα όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα 22. Ταξινόμηση δείγματος

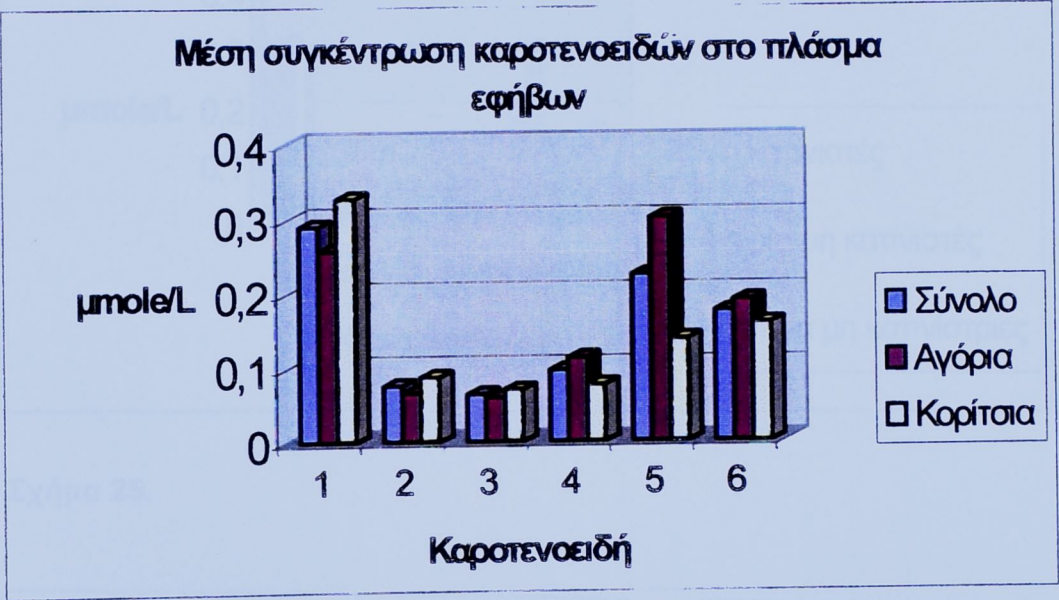
Μετά την ολοκλήρωση των απαραίτητων μαθηματικών υπολογισμών οι οποίοι μας επιτρέπουν την «μετατροπή» τιμών επιφανειών των χρωματογραφημάτων (βλ. Παράρτημα) σε τιμές συγκεντρώσεων των προς μέτρηση αντιοξειδωτικών βιταμινών, καταρτίσθηκε ο ακόλουθος συνοπτικός πίνακας αποτελεσμάτων. (βλ. Πίνακα 22). Στον Πίνακα 23 παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων των υποομάδων (βλ σχ.22) του δείγματος εφήβων που μελετήθηκε

Πίνακας 15. Συγκεντρώσεις βιταμινών στο πλάσμα αίματος εφήβων (μmole/L)

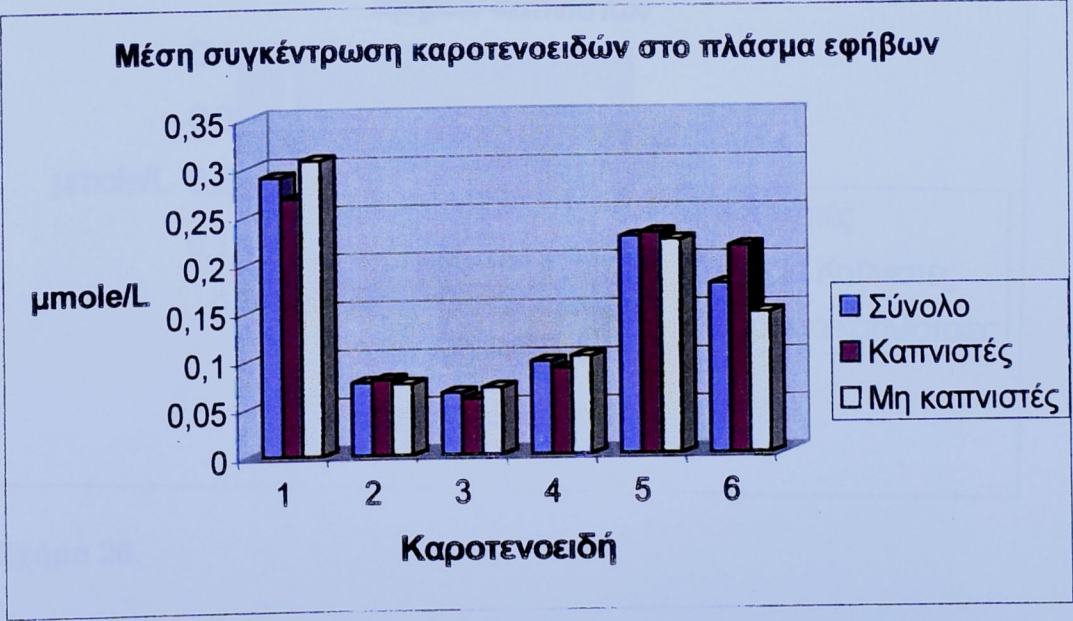
α-τοκοφερόλη	Ρετινόλη	Λουτεΐνη	2,3 ανδρο- λουτεΐνη	Κανθαξαν- θίνη	β-κρυπτο- ξανθίνη	Λυκοπένιο	β-καροτένιο	Ηλικία	Φύλο/Κάπνισμα
10,880	1,499	0,289	0,075	0,064	0,096	0,224	0,175	17,364	Όλοι
11,569	1,528	0,257	0,065	0,059	0,113	0,301	0,190	17,401	Αγόρια
10,093	1,465	0,326	0,087	0,070	0,076	0,137	0,159	17,321	Κορίτσια
10,880	1,499	0,289	0,075	0,064	0,096	0,224	0,175	17,364	Όλοι
11,354	1,593	0,267	0,078	0,058	0,088	0,228	0,215	17,801	Καπνιστές
10,518	1,426	0,306	0,0735	0,069	0,101	0,221	0,145	17,029	Μη καπνιστές
11,354	1,593	0,267	0,078	0,058	0,088	0,228	0,215	17,801	Καπνιστές
12,388	1,650	0,195	0,063	0,045	0,099	0,289	0,211	17,719	Αγόρια καπν.
9,700	1,502	0,382	0,102	0,078	0,072	0,132	0,220	17,933	Κορίτσια καπν.
10,518	1,426	0,306	0,074	0,069	0,101	0,221	0,145	17,029	Μη καπνιστές
10,750	1,406	0,319	0,068	0,073	0,126	0,313	0,169	17,083	Αγόρια μη καπν.
10,311	1,444	0,296	0,079	0,066	0,079	0,140	0,124	16,981	Κορίτσια μη καπν.

Πίνακας 16. Αναλυτικά αποτελέσματα μέτρησης βιταμινών (συγκεντρώσεις : $\mu\text{moles/L}$, ηλικία : έτη)												
Κωδικός	Ρετινόλη	α -τοκοφερόλ.	Λουτεΐνη	2,3-ανδρολout.	Κανθαξανθ.	β -κρυπτοξαν.	Λυκοπένιο	β -καροτένιο	Ηλικία	Κάπνισμα	Φύλο	
1	1,89	11,9	0,42	0,11	0,14	0,12	0,67	0,28	17,417	O	A	
2	1,82	5	0,33	0,14	0,06	0,13	0,17	0,14	18,25	O	K	
3	1,34	8,9	0,21	0,05	0,05	0,08	0,12	0,1	14,167	O	K	
4	1,68	5,3	0,46	0,15	0,09	0	0	0	18	N	K	
5	0,98	13	0,3	0,09	0,09	0	0,09	0,11	15,917	O	K	
6	1,24	8,1	0,31	0,06	0,05	0,07	0	0	18,083	O	K	
7	1,5	11,4	0,17	0,07	0,03	0,11	0,18	0,2	17,083	N	A	
8	1,64	11,8	0,15	0,03	0,03	0,04	0,08	0,46	17,5	N	A	
9	0,16	8,1	0,37	0,04	0,04	0,05	0,18	0,11	16,083	O	A	
10	0,89	9,8	0,22	0,04	0,06	0	0	0	18,25	O	K	
11	2,37	5,9	0,1	0,03	0,05	0	0	0	17,833	N	K	
12	1,43	7,4	0,23	0,04	0,04	0,08	0	0,07	17,083	O	K	
13	1,65	10,4	0,19	0,06	0	0,04	0	0	17,333	O	A	
14	2,21	19,2	0,36	0,11	0,08	0,04	0,19	0,12	16,5	O	K	
15	0,95	13,3	0,24	0,1	0,06	0,16	0,14	0,26	17,583	N	K	
16	1,47	9,1	0,28	0,07	0,08	0,31	0,19	0,19	17,583	O	A	
17	1,59	7,5	0,4	0,13	0,09	0,25	0,56	0,35	18,25	O	K	
18	1,63	12,8	0,11	0,04	0,05	0,08	0,31	0,16	18	N	A	
19	1,22	11,3	0,43	0,06	0,05	0,12	0,37	0,17	17,167	O	A	
20	1,36	14,6	0,36	0,09	0,1	0,27	0,35	0,23	15,25	O	A	
21	1,76	16	0,31	0,08	0,08	0,07	0,63	0,18	18,833	N	A	
22	1,1	13,9	0,58	0,1	0,1	0,06	0,33	0,28	18,5	N	K	
23	1,88	14,1	0,15	0,07	0,03	0,13	0,23	0,24	17,75	N	A	
24	1,41	10,1	0,53	0,13	0,09	0,14	0,19	0,56	17,75	N	K	
25	1,67	8,9	0,38	0,11	0,08	0,19	0,38	0,24	16,417	N	A	
26	1,75	13,1	0,18	0,05	0,07	0,07	0,33	0,16	17,25	O	A	
27	1,61	12,7	0,21	0,06	0,04	0,1	0,33	0,16	17,417	N	A	
28	1,5	13,9	0,3	0,05	0,07	0,06	0,13	0,23	16,333	O	K	
29	1,75	7,5	0,32	0,06	0,1	0,03	0,41	0,21	18,583	O	A	
30	1,51	11,4	0,08	0,04	0,02	0,07	0,17	0,05	18,75	N	A	
mean	1,49867	10,88	0,289333	0,075333	0,064	0,095667	0,224333	0,175333	17,3638			
Std.dev.	0,41931	3,3046884	0,125833	0,034515	0,029781	0,078155	0,185094	0,131928	1,05889			

Οι μέσοι όροι των συγκεντρώσεων των αντιοξειδωτικών βιταμινών που μετρήθηκαν στο πλάσμα των εφήβων του δείγματος, παρουσιάζονται με την βοήθεια των ακόλουθων ραβδογραμμάτων.



Σχήμα 23.



Σχήμα 24.

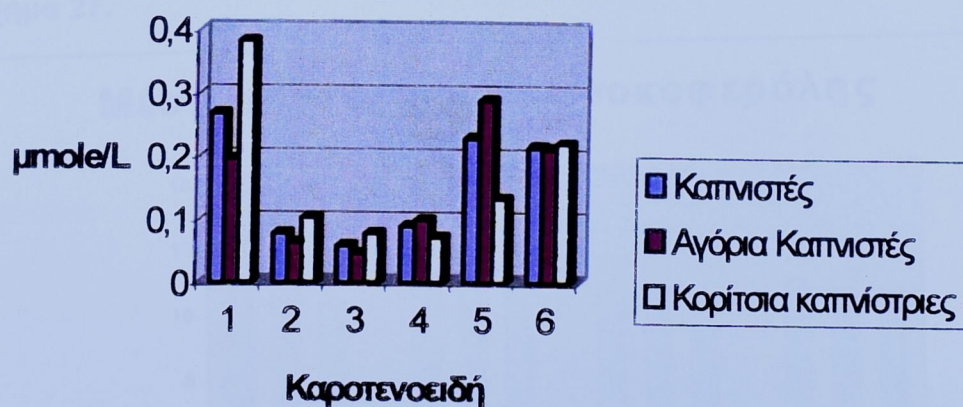
1. Λουτεΐνη
2. 2,3 ανυδρολουτεΐνη
3. Κανθαξανθίνη
4. β -κρυπτοξανθίνη
5. Λυκοπένιο
6. β -καροτένιο

Μέση συγκέντρωση καροτενοειδών στο πλάσμα
εφήβων-μη καπνιστών



Σχήμα 25.

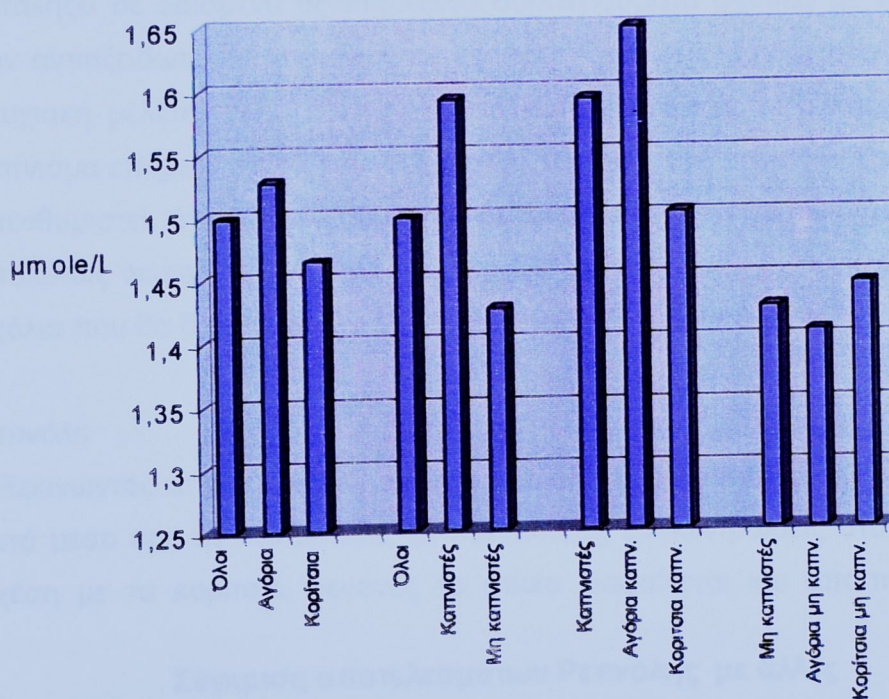
Μέση συγκέντρωση καροτενοειδών στο πλάσμα
εφήβων-καπνιστών



Σχήμα 26.

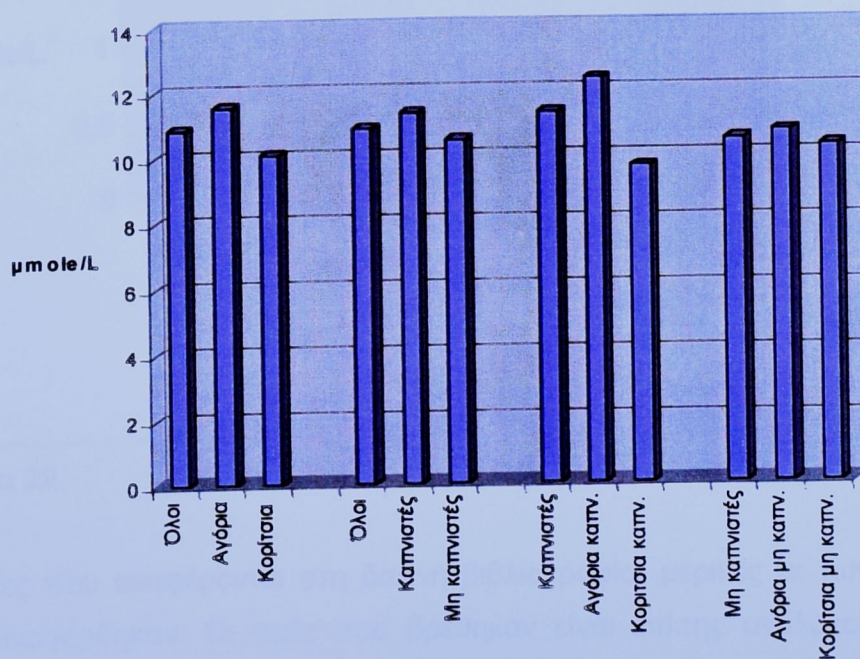
7. Λουτεΐνη
8. 2,3 ανυδρολουτεΐνη
9. Κανθαξανθίνη
10. β-κρυπτοξανθίνη
11. Λυκοπένιο
12. β-καροτένιο

Μέση συγκέντρωση ρετινόλης στο πλάσμα εφήβων



Σχήμα 27.

Μέση συγκέντρωση α-τοκοφερόλης



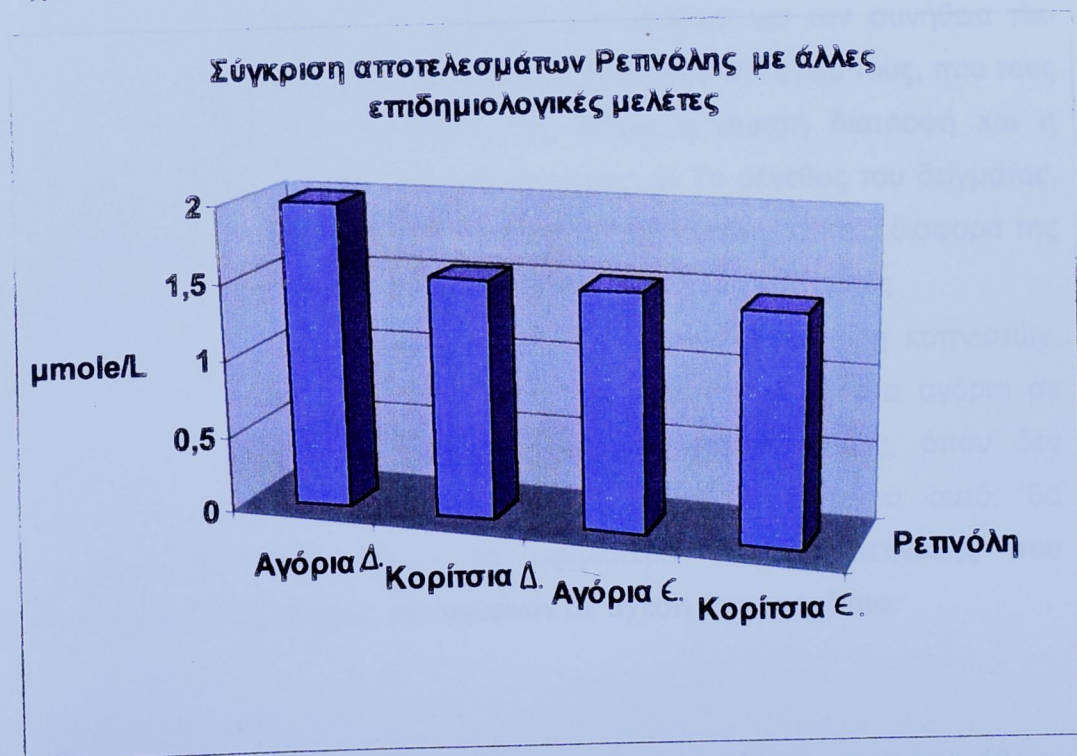
Σχήμα 28.

2.4 Συζήτηση – Συμπεράσματα

Αναλύοντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων, θα μπορούσε κανείς να καταλήξει σε ορισμένα αξιοσημείωτα συμπεράσματα σχετικά με τα επίπεδα των αντιοξειδωτικών βιταμινών σε εφήβους που μελετούνται στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, αλλά και τον τρόπο κατά τον οποίο συνήθειες όπως το κάπνισμα επηρεάζουν τα επίπεδα αυτών. Ωστόσο, στο σημείο αυτό πρέπει να υπενθυμιστεί ότι το μέγεθος του δείγματος δεν επιτρέπει την εξαγωγή απολύτως ασφαλών συμπερασμάτων. Για το λόγο αυτό, οι συγκρίσεις και τα σχόλια που θα διατυπωθούν δεν θα πρέπει να θεωρηθούν απόλυτες.

Ρετινόλη

Ξεκινώντας από τη ρετινόλη παρατηρούμε ότι τα επίπεδα της κυμαίνονται κατά μέσο όρο σε $1,5 \mu\text{mol/L}$, με υψηλότερες συγκεντρώσεις στα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια, γεγονός το οποίο διαφαίνεται και από τις διάφορες



Σχήμα 29.

έρευνες που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία, μερικές εκ των οποίων ήδη αναφέρθηκαν. Οι τιμές που βρέθηκαν είναι επίσης ανάλογες (ή λίγο μικρότερες) τόσο για τα αγόρια όσο και για τα κορίτσια, γεγονός το οποίο θα

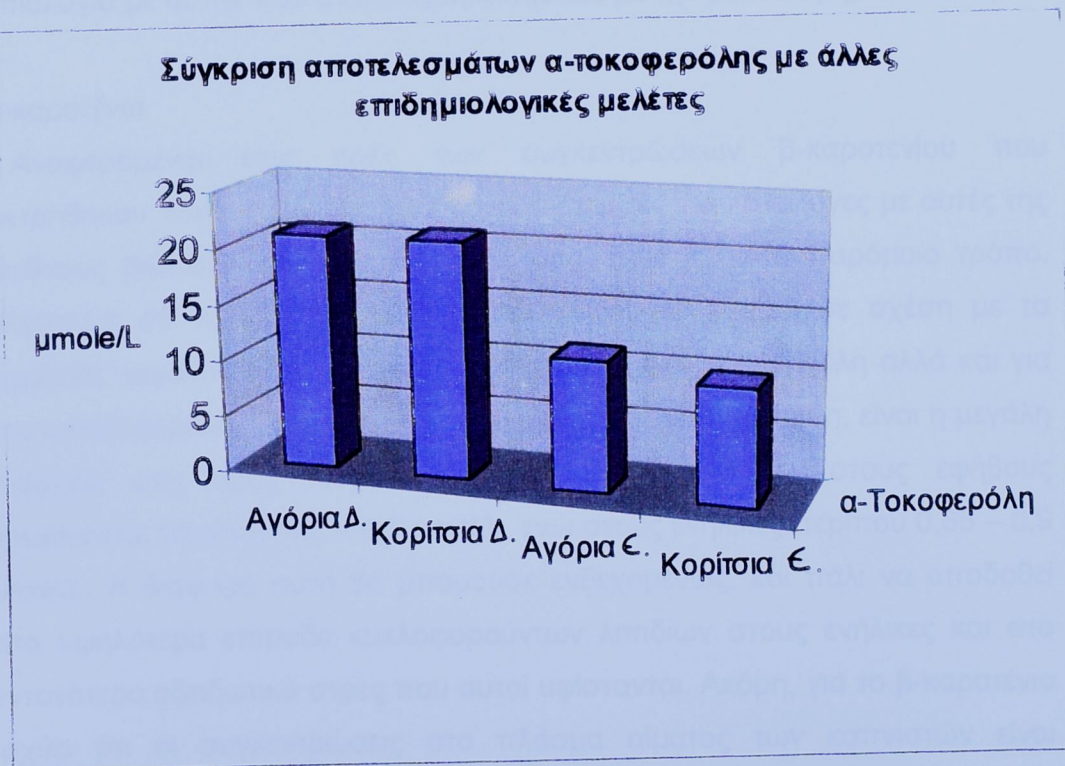
μπορούσε να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι σε γενικές γραμμές τα άτομα του δείγματος είτε έχουν παρόμοιες διατροφικές συνήθειες, είτε παρά τις όποιες διαφορές τους, αυτές επηρεάζουν σε μικρό βαθμό τα επίπεδα ρετινόλης του πλάσματος. Επίσης, παρατηρείται ότι στους καπνιστές εμφανίζονται υψηλότερα επίπεδα ρετινόλης στο πλάσμα σε σχέση με τους μη καπνιστές. Με δεδομένο το ότι στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν ιδιαίτερες αναφορές σχετικά με το συγκεκριμένο φαινόμενο, θα μπορούσε κανείς να το αποδώσει σε διάφορους παράγοντες, όπως : α) τα αυξημένα επίπεδα ελευθέρων ριζών που απελευθερώνονται στον οργανισμό λόγω του καπνού, τα οποία πιθανότατα προκαλούν την άμεση κινητοποίηση αντιοξειδωτικών ουσιών όπως η ρετινόλη. Το συμπέρασμα όμως αυτό δεν θα πρέπει να θεωρηθεί βέβαιο, διότι αναφερόμαστε σε εφήβους και δεν γνωρίζουμε κατά πόσο το μικρής διάρκειας, και συνήθως περιστασιακό, κάπνισμα, το οποίο παρατηρείται σε αυτές τις ηλικίες, μπορεί να επηρεάσει την συγκέντρωση της ρετινόλης του πλάσματος, β) η ενοχή των εφήβων για την συνήθεια του καπνίσματος και ο φόβος ότι ενδεχομένως βλάπτουν την υγεία τους, που τους ωθεί σε «μεθόδους προστασίας» της, όπως η σωστή διατροφή και η κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε βιταμίνες, γ) Το μέγεθος του δείγματος, από το οποίο μπορεί τυχαία να προκύπτει αυτή η μικρή σχετικά διαφορά της ρετινόλης του πλάσματος ανάμεσα σε καπνιστές και μη καπνιστές.

Επίσης, βλέποντας κανείς το δείγμα των καπνιστών και μη καπνιστών, παρατηρεί στους καπνιστές υψηλότερα επίπεδα ρετινόλης στα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια, σε αντίθεση με τους μη καπνιστές, όπου δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες διαφοροποιήσεις. Κατά τον τρόπο αυτό, θα μπορούσαν να αιτιολογηθούν τα υψηλότερα επίπεδα ρετινόλης που παρατηρούνται στο σύνολο των αγοριών σε σχέση με τα κορίτσια.

α-τοκοφερόλη

Όσον αφορά την βιταμίνη Ε και ιδίως την α-τοκοφερόλη, η οποία μετρήθηκε, παρατηρεί κανείς σχετικά χαμηλά επίπεδα, καθώς ο μέσος όρος στα αγόρια και στα κορίτσια του δείγματος είναι 11,569 $\mu\text{mol/L}$ και 10,093 $\mu\text{mol/L}$ αντίστοιχα, που είναι χαμηλότερος από αυτόν που επισημαίνεται στη διεθνή βιβλιογραφία ($>20 \mu\text{mol/L}$). Το γεγονός αυτό, αν πράγματι ισχύει, θα μπορούσε να αποδοθεί ενδεχομένως στις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες

των ατόμων των επιμέρους δειγμάτων, οι οποίες σχετίζονται με την κατανάλωση τροφών ζωικής προέλευσης, λίπους κ.α. Παράλληλα, όπως συμβαίνει και με την ρετινόλη, τα επίπεδα της α-τοκοφερόλης είναι υψηλότερα στα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια, γεγονός το οποίο υποστηρίζεται και από τα δεδομένα τα οποία έχουμε συγκεντρώσει από άλλες επιδημιολογικές έρευνες. Το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε ενδεχομένως να αιτιολογηθεί από τις διαφορετικές συνήθειες και διατροφικές προσλήψεις ανάμεσα στα αγόρια και τα κορίτσια αλλά και από το γεγονός ότι γενικότερα τα κορίτσια έχουν μια διαφορετική αντίληψη για το σώμα τους και προσέχουν περισσότερο τη διατροφή τους περιορίζοντας κατά κύριο λόγο την πρόσληψη λίπους.



Σχήμα 30.

Επίσης, αναφερόμενοι στα επίπεδα της α-τοκοφερόλης, ιδιαίτερη εντύπωση προκαλούν οι ιδιαίτερα χαμηλές συγκεντρώσεις που παρατηρούνται, συγκρίνοντας τις τιμές των εφήβων τόσο της παρούσης μελέτης, όσο και των άλλων επιδημιολογικών μελετών που ήδη αναφέρθηκαν (~ 20 μmol/L), με τις αντίστοιχες ενηλίκων, όπως προκύπτουν από ανάλογες έρευνες (~ 56 μmol/L). Η μεγάλη αυτή διαφορά θα μπορούσε να αιτιολογηθεί τόσο από τις

διαφορετικές διατροφικές συνήθειες ανάμεσα στις δύο ομάδες ηλικίας όσο και από τα διαφορετικά επίπεδα ενδογενούς λίπους, κυκλοφορούντων λιποπρωτεϊνών κ.α., που επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδα των λιποδιαλυτών βιταμινών του πλάσματος. Ακόμη, οι μεγαλύτερες ανάγκες για κινητοποίηση της α-τοκοφερόλης λόγω του μεγαλύτερου στρες που συνήθως παρατηρείται στους ενήλικες, είναι πιθανόν να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων της α-τοκοφερόλης του πλάσματος σε υψηλότερες τιμές σε σχέση με τους εφήβους. Τέλος, όπως και στη ρετινόλη, παρατηρούνται σχετικά υψηλότερες τιμές α-τοκοφερόλης στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές, φαινόμενο το οποίο ίσως έχει αντίστοιχη αιτιολογία με αυτήν που αναπτύχθηκε σχετικά με την ρετινόλη. (βλ. σελ.72)

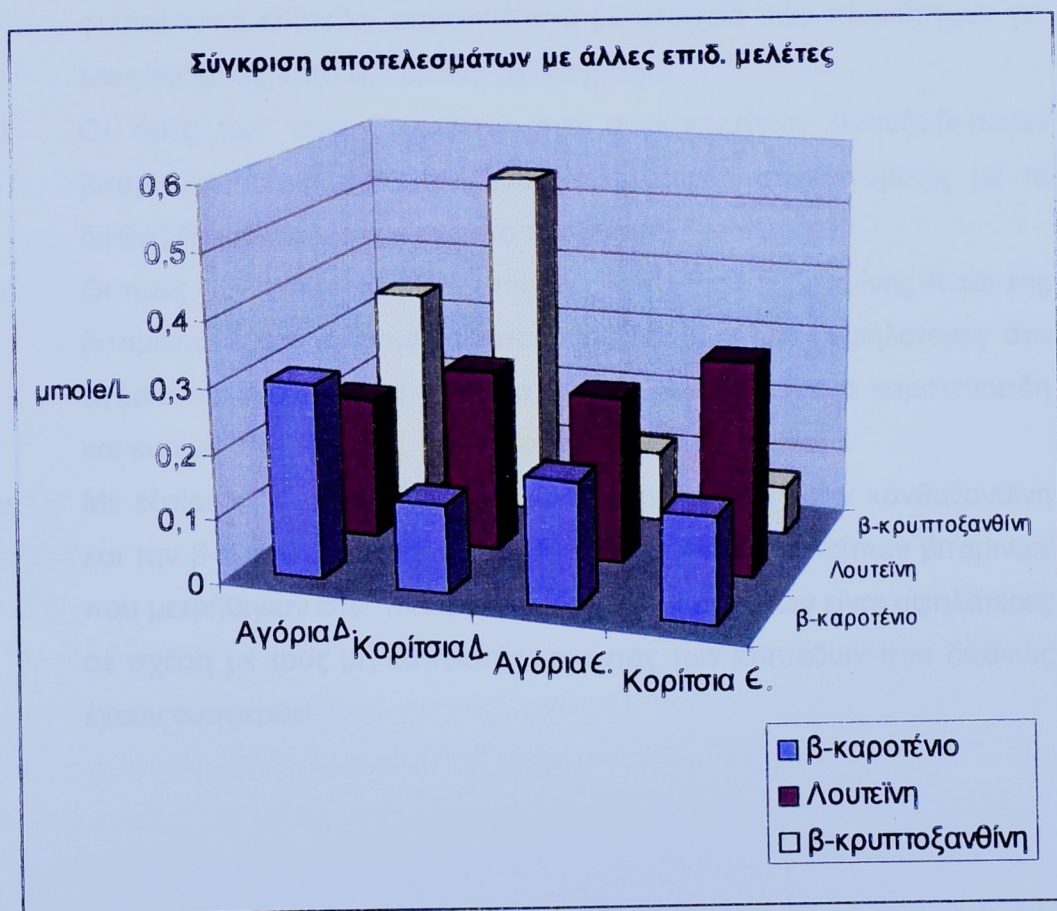
β-καροτένιο

Αναφερόμενοι στις τιμές των συγκεντρώσεων β-καροτενίου που μετρήθηκαν, παρατηρούμε ότι σε γενικές γραμμές είναι ανάλογες με αυτές της διεθνούς βιβλιογραφίας για τους εφήβους. Επίσης, κατά παρόμοιο τρόπο, βλέπουμε ότι τα επίπεδα των αγοριών είναι υψηλότερα σε σχέση με τα κορίτσια, γεγονός το οποίο παρατηρήθηκε και για την ρετινόλη αλλά και για την α-τοκοφερόλη. Το γεγονός όμως, που προκαλεί εντύπωση, είναι η μεγάλη διαφορά στις τιμές εφήβων και ενηλίκων, οι οποίες στους εφήβους κυμαίνονται περίπου 0,2 – 0,3 $\mu\text{mol/L}$, ενώ στους ενήλικες περίπου 0,65 – 0,9 $\mu\text{mol/L}$. Η διαφορά αυτή θα μπορούσε ενδεχομένως, και πάλι να αποδοθεί στα υψηλότερα επίπεδα κυκλοφορούντων λιπιδίων στους ενήλικες και στο εντονότερο οξειδωτικό στρες που αυτοί υφίστανται. Ακόμη, για το β-καροτένιο ισχύει ότι οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα αίματος των καπνιστών είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες των μη καπνιστών, γεγονός το οποίο επισημάνθηκε για την ρετινόλη αλλά και για την α-τοκοφερόλη.

Υπόλοιπα καροτενοειδή

Στα καροτενοειδή, τα αποτελέσματα που προκύπτουν παρουσιάζουν κάποιες διαφοροποιήσεις σε σχέση με τα αντίστοιχα για την ρετινόλη, την α-τοκοφερόλη και το β-καροτένιο. Συγκεκριμένα, για την λουτεΐνη, την 2,3-ανυδρολουτεΐνη και την κανθαξανθίνη βρέθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα των κοριτσιών σε σχέση με αυτές των αγοριών, γεγονός που

συμπίπτει άλλωστε με τις αντίστοιχες παρατηρήσεις στη διεθνή βιβλιογραφία. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αιτιολογηθεί από τη διαφορετική διατροφική πρόσληψη των κοριτσιών, που συνήθως είναι πλουσιότερη σε προϊόντα φυτικής προέλευσης σε σχέση με τα αγόρια κ.α. Παράλληλα, όπως και για τις βιταμίνες που προαναφέρθηκαν, οι συγκεντρώσεις των συγκεκριμένων καροτενοειδών είναι μικρότερες σε σχέση με των αντιστοίχων των ενηλίκων σύμφωνα με τα αποτελέσματα διεθνών μελετών. Επίσης, για την λουτεΐνη και την κανθαξανθίνη, παρατηρούμε ότι οι τιμές των συγκεντρώσεών τους στους καπνιστές δεν είναι σημαντικά μικρότερες από τις αναμενόμενες.



Σχήμα 31.

Για το λυκοπένιο οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα των εφήβων βρέθηκαν αρκετά υψηλότερες στα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια, όπως έχει περιγραφεί και σε διεθνείς έρευνες. Ωστόσο, πάλι οι τιμές των συγκεντρώσεων των εφήβων της παρούσης μελέτης είναι χαμηλότερες σε

σχέση με αυτές που επισημαίνονται από τις περισσότερες επιδημιολογικές μελέτες, γεγονός που θα πρέπει να αποδοθεί στο ότι στις επιδημιολογικές έρευνες που αναφέρθηκαν, συνήθως το δείγμα είναι μεικτό, δηλαδή αποτελείται από άτομα όλων των ηλικιών (παιδιά και ενήλικες), χωρίς να επικεντρώνονται στους εφήβους, όπως στοχεύει η παρούσα πτυχιακή μελέτη.

Συνοψίζοντας, και λαμβάνοντας υπόψη τόσο τα αποτελέσματα της παρούσης πτυχιακής μελέτης όσο και άλλων αντίστοιχων διεθνών επιδημιολογικών μελετών, θα μπορούσε κανείς να καταλήξει επιγραμματικά στα εξής γενικά συμπεράσματα :

- i) Οι συγκεντρώσεις των βιταμινών που μετρήθηκαν κυμαίνονται σε φυσιολογικά επίπεδα, συγκρινόμενα με στοιχεία που προκύπτουν για τους εφήβους, από την διεθνή βιβλιογραφία.
- ii) Οι τιμές των συγκεντρώσεων των συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών βιταμινών που μετρήθηκαν είναι χαμηλότερες, συγκρινόμενες με τα διεθνή δεδομένα για τον ενήλικο πληθυσμό.
- iii) Οι τιμές των συγκεντρώσεων της προβιταμίνης και βιταμίνης Α και της βιταμίνης Ε στο πλάσμα αίματος των εφήβων είναι υψηλότερες στα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια, με εξαίρεση ορισμένα καροτενοειδή και κυρίως την λουτεΐνη, για την οποία ισχύει το αντίθετο.
- iv) Με εξαίρεση την λουτεΐνη, την 2,3-ανυδρολουτεΐνη, την κανθαξανθίνη και την β-κρυπτοξανθίνη, οι συγκεντρώσεις των υπολοίπων βιταμινών που μετρήθηκαν στο πλάσμα των εφήβων καπνιστών είναι υψηλότερες σε σχέση με τους μη καπνιστές και εντός των επιπέδων που διεθνώς έχουν αναφερθεί.

2.5 Επίλογος

Όπως τελικά διαφαίνεται, τα συμπεράσματα στα οποία οδηγηθήκαμε μπορούν να αποτελέσουν ένα αρχικό σημείο αναφοράς για την εκτίμηση των επιπέδων των αντιοξειδωτικών βιταμινών στο αίμα ενός ελληνικού πληθυσμού εφήβων και την συσχέτισή τους με ορισμένες συνήθειες αυτών, όπως το κάπνισμα. Φυσικά, θα ήταν σωστό να υπενθυμιστεί για μια ακόμη φορά, ότι το μέγεθος του δείγματος (30 άτομα) δεν είναι απόλυτα ασφαλές για την εξαγωγή σαφών και ακλόνητων συμπερασμάτων. Η παρούσα έρευνα θα μπορούσε να συνεχιστεί, να γίνει πιο διεξοδική και πλήρης, με την ανάλυση μεγαλύτερου δείγματος και με την συσχέτιση των αποτελεσμάτων και με άλλες σημαντικές παραμέτρους, όπως ο δείκτης μάζας σώματος, οι διατροφικές συνήθειες και προσλήψεις των παιδιών, το επίπεδο της άσκησης κ.α.

Παρόλα αυτά, πιστεύουμε ότι τα στοιχεία τα οποία παρουσιάσαμε και τα συμπεράσματα στα οποία καταλήξαμε είναι ικανοποιητικά στα πλαίσια της εκπόνησης μιας πτυχιακής μελέτης. Βασιζόμενοι στην αναζήτηση και μελέτη της διεθνούς βιβλιογραφίας, θεωρούμε ότι οργανώσαμε και μεθοδεύσαμε την εργασία μας, ώστε να παρουσιάσουμε κατά τον καλύτερο δυνατό τρόπο τα αποτελέσματα της έρευνάς μας. Ότι αποκομίσαμε κατά την διάρκεια της εκπόνησης της πτυχιακής μας μελέτης ήταν γνώση, πνεύμα συνεργασίας, ερευνητική εμπειρία και εμπειρία χειρισμού ενός πολυσύνθετου και σύγχρονου μηχανήματος, όπως είναι ο Υγρός Χρωματογράφος Υψηλής Πίεσης (HPLC), αλλά κυρίως το ότι μας δόθηκε η δυνατότητα να αξιοποιήσουμε τις γνώσεις και τις εμπειρίες μας προς μία συγκεκριμένη κατεύθυνση, την διεκπεραίωση μιας ερευνητικής μελέτης.

Κλείνοντας θα ήταν σκόπιμο να αναφερθεί ότι η ελλιπής ελληνική πραγματικότητα, ως προς τις δημοσιευμένες μελέτες μέτρησης επιπέδων αντιοξειδωτικών βιταμινών, επιβάλλει την διεξαγωγή ανάλογων εργασιών, ώστε να καθοριστούν και στον ελληνικό πληθυσμό τα επίπεδα και οι ενδεχόμενες ελλείψεις ή και υπερεπάρκειες αυτών, με σκοπό να γίνουν εν συνεχεία, οι ανάλογες διαιτητικές, εμπορικές, ακόμη και κοινωνικές παρεμβάσεις. Με τον τρόπο αυτό, θα δοθεί μία νέα ώθηση στην προσπάθεια αντιμετώπισης αλλά κυρίως στην πρόληψη των διάφορων χρόνιων εκφυλιστικών ασθενειών της εποχής μας.

Βιβλιογραφία

1. Sies, H. 1985. Oxidative stress : introductory remarks. In oxidative stress. Edited by H. Sies. Orlando, FL, Academic Press. 1-8
2. von Sonntag C. 1987. The Chemical Basis of Radiation Biology. London : Taylor and Francis
3. Fridovich I. 1986. Superoxide dismutases. Methods Enzymol. 58 : 61-97
4. Halliwell B. 1994. Free radicals and antioxidants : a personal view. Nutr. Rev. 52 : 253-265
5. Babior BM, Woodman RC. 1990. Chronic granulomatous disease. Semin. Hematol. 27 : 247-259
6. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1980. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford : Clarendon. 2nd ed.
7. Moncada S, Higgs A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. N. Engl. J. Med. 329 : 2002-2011
8. Huie RE, Padmaja S. 1993. The reaction of NO with superoxide. Free Rad. Res. Commun. 18 : 195-199
9. Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. 1994. Oxidative chemistry of peroxynitrite. Meth. Enzymol. 233 : 29-40
10. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. 1989. Beyond cholesterol. Modification of low density lipoproteins that increase its atherogenicity. N. Engl. J. Med. 320 : 915-924
11. Dizdaroglu M, Nackerdien Z, Chao BC, Gajewski E, Rao J. 1991. Chemical nature of in vivo DNA base damage in hydrogen peroxide-treated mammalian cells. Arch Biochem. Biophys. 285 : 388-390
12. Halliwell B, Arboma OL. eds. 1993. DNA and free radicals . Chichester Ellis-Harwood
13. Malins DC. 1993. Identification of hydroxyl-induced lesion in DNA base structure : biomarkers with a putative link to cancer development. J. Toxicol. Environ. Health. 40 : 247-261
14. Olinski R, Zastawny T, Budzbon J, Skokowski J, Zegarskiw, Dizdaroglu M. 1992. DNA modification in chromatin of human cancerous tissues. FEBS Lett. 309 : 193-198
15. Demple B, Harrison L. 1994. Repair of oxidative damage to DNA : Enzymology and Biology. Annu. Rev. Biochem. 63 : 915-948
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch. Biochem. Biophys. 280 : 1-8
17. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. Methods Enzymol. 186 : 1-85
18. Touati D. 1989. The molecular genetics of superoxide dismutase in E. coli Free Rad. Res. Commun. 8 : 1-9
19. Kyle ME, Nakae D, Sakaida J, German B, Kinsella JE, et al. 1988. Endocytosis of superoxide dismutase is required in order for the enzyme to protect hepatocytes from the cytotoxicity of hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 263 : 3784-3789
20. Biemond P, Van Eijk HG, Swaak AJG, Koster JF. 1984. Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. J. Clin. Invest. 73 : 576-579
21. Bolann BJ, Ulvik RJ. 1990. On the limited ability of superoxide to release iron from ferritin. Eur. J. Biochem. 193 : 899-904

22. Flind DH, Tuminello JF, Emptage MH. 1993. The inactivation of Fe S cluster containing hydrolases by superoxide. *J. Biol. Chem.* 268 : 22369-22376
23. Gutteridge JMC. 1986. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett.* 201 : 291-295
24. Harerll S, Salan MA, Kanner J. 1988. Iron release from metmyoglobin, methaemoglobin and cytochrome c by system generating hydrogen peroxide. *Free Rad. Res. Commun.* 5 : 11-19
25. von Sonntag, C. 1980. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 37 : 7-77
26. Shulte-Frohlinde, D., von Sonntag, C. 1985. *Radiolysis of DNA and Modern Systems in the Presence of Oxygen.* Edited by H. Sies. Orlando, FL, Academic Press. pp. 11-40
27. Fraga, C. G., Shigenaga, J. P., Degan, P., Ames, B. N. 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 4533-4537
28. Floyd, R. A. 1990. *FASEB J.* 4 : 2587-2597
29. Wolff, S. P., Garner, A., Dean, R. T. 1986. *Trends Biochem. Sci.* 11 : 27-31
30. Dean, R. T., Wolff, S. P., and McElligott, M. A. 1989. *Free Radic. Res. Commun.* 7 : 97-103
31. Stadtman, E. R. 1990. *Free Radic. Biol. Med.* 9 : 315-325
32. Davies, K. J. A. 1987 *J. Biol. Chem.* 262 : 9895-9901
33. Miller, R. M. Sies, H., Park, E-M., Thomas, J. A. 1990. *Arch. Biochem. Biophys.* 276 : 355-363
34. Brot, H., Weissbach, H. 1983. 223 : 271-281
35. Gutteridge, J. M. C. 1988. *Lipid peroxidation ; some Problems and Concepts.* Edited by Halliwell. Bethesda, MD, FASEB for Upjohn Co.
36. Gardner, H. W. 1989. *Free Radic. Biol. Med.* 7 : 65-86
37. Wills, E. D. 1985. *The Role of Dietary Components in Oxidative Stress in Tissues.* Edited by H. Sies. Orlando, FL, Academic Press, pp. 197-220
38. Witz, J. 1989. *Free Radic. Biol. Med.* 7 : 333-349
39. Pascoe, G. A., Reed, D. J. 1989. *Free Radic. Biol. Med.* 6 : 209-224
40. Meister, A. 1988. *J. Biol. Chem.* 263 : 17205-17208
41. Ziegler D. M. 1985. *Annu. Rev. Biochem.* 254 : 305-330
42. Chai, Y-C., Jung, C-H., Lii, C-K., et al. 1991. *Arch. Biochem. Biophys.* 284 : 191-200
43. Anderson, M. E., Meister, A. 1989. *Anal. Biochem.* 183 : 16-20
44. Park, E. M., Thomas, J. A. 1989. *Arch. Biochem. Biophys.* 272 : 47-54
45. Fridovich, I. 1989. *J. Biol. Chem.* 264 : 7761-7764
46. Storz, J. Tartaglia, L. A. Ames, B. N. 1990. *Science.* 248 : 189-194
47. Marklund, S. L. 1982. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79 : 7634-7638
48. Jones, D. P. 1982. *Archiv. Biochem. Biophys.* 214 : 806-814
49. Thayer, W. S. 1986. *FEBS Lett.* 202 : 137-140
50. Greenwald, R. A. 1990. *Free Radic. Biol. Med.* 8 : 201-209
51. Stocker, R., Glazer, A. N., Ames, B. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 5918-5922
52. Steinbrecher, U. P., Zhang, H., Loughheed, M. 1990. *Free Radic. Biol. Med.* 9 : 155-168

53. Kasperek S. 1980. Chemistry of tocopherols and tocotrienols. In Vitamin E : A Comprehensive Treatise, ed. LJ Machlin. New York. Marsel Dekker. 7-65
54. Burton GW, Traber MG. 1990. Vitamin E : Application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res.* 19 : 194-201
55. Tappel AL. 1962. Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitamin. Horm.* 20 : 493-510
56. Wefers H, Sies H. 1988. The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is depended on vitamin E. *Eur. J. Biochem.* 174 : 353-357
57. McCay PB. 1985. Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. *Annu. Rev. Nutr.* 5 : 323-340
58. Niki E. 1987. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* 44 : 227-253
59. Sies H, Murphy ME. 1991. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *Photochem. Photobiol.* 8 : 211-224
60. Sies h, Stahl W, Sundquist AR. 1992. Antioxidant functions of vitamins (vitamins E and C , beta-carotene, and other carotenoids). *Ann. NY Acad. Sci.* 669 : 7-20
61. Fahrenholtz SR, Doleiden FH, Trozzolo AM, Lamola AA. 1974. On the quenching of singlet oxygen by a-tocopherol. *Photochem. Photobiol.* 20 : 505-509
62. Foote CS, Geller GG, Ching TY, Geller GG. 1974. Chemistry of singlet oxygen-XVIII. Rates of reaction and quenching of atocopherol and singlet oxygen. *Photochem. Phorobiol.* 20 : 511-519
63. Kaiser S, DiMaschio P, Murphy ME, Sies H. 1990. Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Arch. Biochem. Biophys.* 227 : 101-108
64. Neely WC, Martin JM, Barker SA. 1988. Products and relative reaction rates of the oxidation of tocopherols with singlet molecular oxygen. *Photochem. Photobiol.* 48 : 423-428
65. Stevens B, Small RD, Perez SR. 1974. The photoperoxidation of unsaturated organic molecules – XIII. $O_2^1 \Delta g$ quenching by a-tocopherol. *Photochem. Photobiol.* 20 : 515-517
66. de Groot H, Hegi U, Sies H. 1993. Loss of alpha-tocopherol upon exposure to nitric oxide or the sydnimine SIN-1. *Febs Lett.* 315 : 139-142
67. Traber MG, Packer L. 1995. Vitamin E : beyond antioxidant function. *Am. J. Clin. Nutr.* 62 (Suppl.) : 1501S-1509S
68. Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A. 1991. Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266 : 6188-6194
69. Stauble B, Boscoboinik D, Tasinato A, Azzi A. 1994. Modulation of activator protein-1 (AP-1) transcription factor and protein kinase C by hydrogen peroxide and D-alpha-tocopherol in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Biochem.* 226 : 393-402

105. Bieri JG, Corash L, Hubbard VS. Medical uses of vitamin E. *N. Engl. J. Med.* 1983. 308 : 1063-1071
106. Bendich A, Machlin LJ. Safety of oral intake of vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.* 1988. 48 : 612-619
107. Council on Scientific Affairs, American Medical Association. Vitamin preparations as dietary supplements and as therapeutic agents. *JAMA* 1987. 257 : 1929-1936
108. Erdman JW, Poor CL, Dietz JM. Factors affecting the bioavailability of vitamin A, carotenoids and vitamin E. *Food Tech* 1988. 42 : 214-221
109. Olson JA. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin A in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987. 45 : 704-716
110. Olson JA. Needs and sources of carotenoids and vitamin A. *Nutr. Rev.* 1994. 52 : S67-S73
111. Rigtrup KM, McEwen LR, Said HM, Ong DE. Retinyl ester hydrolytic activity associated with human intestinal brush border membranes. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994 ; 60 : 111-116
112. Wolf G. Multiple functions of vitamin A. *Physiol Rev.* 1984. 64 : 873-937
113. Mascio PD, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems : The role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991. 53 : 194S-200S
114. Luc G, Fruchart J-C. Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 1991. 53 : 206S-209S
115. Abbey M, Nestel PJ, Baghurst PA. Antioxidant vitamins and low-density-lipoprotein oxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993. 58 : 525-532
116. Ross AC. Overview of retinoid metabolism. *J. Nutr.* 1993. 123 : 346-350
117. Ong DE. Vitamin A-binding proteins. *Nutr. Rev.* 1985. 43 : 225-232
118. Olson JA. Vitamin A. In : Shils ME, Olson JA, Shike M, eds. *Modern Nutrition in health and disease*, 8th ed. Philadelphia : Lea and Febiger, 1994. 287 – 307
119. Wolf G. The intracellular vitamin A-binding proteins : An overview of their functions. *Nutr. Rev.* 1991. 49 : 1-12
120. Creek KE, St. Hilaire P, Hodam JR. A comparison of the uptake, metabolism and biologic effects of retinol delivered to human keratinocytes either free or bound to serum-retinol binding protein. *J. Nutr.* 1993. 123 : 356-361
121. Ong DE. Retinoid metabolism during intestinal absorption. *J. Nutr.* 1993. 123 : 351-355
122. Olson JA. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin A in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 1987. 45 : 704-716
123. National Research Council. *Recommended dietary allowances*, 10th ed. Washington, DC : National Academy Press, 1989. 78-92
124. Blomhoff R, Green MH, Norum KR. Vitamin A : Physiological and biochemical processing. *Ann. Rev. Nutr.* 1992. 12 : 37-57
125. Norum KR, Blomhoff R. McCollum Award Lecture, 1992 : Vitamin A absorption, transport, cellular uptake, and storage. *Am. J. Clin. Nutr.* 1992. 56 : 735-744
126. Bender DA. *Nutritional biochemistry of the vitamins*. New York : Cambridge University Press, 1992. 19-50

127. Ong DE. Cellular transport and metabolism of vitamin A : Roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr. Rev.* 1994. 52 : S24-S31
128. Napoli JL. Biosynthesis and metabolism of retinoic acid : Roles of CRBP and CRABP in retinoic acid : roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis. *J. Nutr.* 1993. 123 : 362-366
129. Ross AC, Ternus ME. Vitamin A as a hormone : Recent advances in understanding the actions of retinol, retinoic acid, and beta carotene. *J. Am. Diet Assoc.* 1993. 93 : 1285-1290
130. Blomhoff R. Transport and metabolism of vitamin A. *Nutr. Rev.* 1994. 52 : S13-S23
131. Goodman DS. Vitamin A and retinoids in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 1984. 310 : 1023-1031
132. Stephensen CB, Alvarez JO, Kohatsu J, Hardmeier R, Kennedy JI, Gammon RB. Vitamin A is excreted in the urine during acute infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 1994. 60 : 388-392
133. Olson JA. Vitamin A. In : Machlin LJ. *Handbook of vitamins*, 2nd ed. New York : Dekker, 1991. 1-57
134. Olson JA. 1992 Atwater Lecture : The irresistible fascination of carotenoids and vitamin A. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993. 57 : 833-839
135. National Research Council. *Recommended dietary allowances*, 9th ed. Washington, DC : National Academy of Sciences, 1980. 55-60
136. Combs GF. *The vitamins*. New York : Academic Press, 1992. 119-150
137. Olson JA. Hypervitaminosis A : Contemporary scientific issues. *J. Nutr.* 1994. 124 : 1461S-1466S
138. Erdman JW, Poor CL, Dietz JM. Factors affecting the bioavailability of vitamin A, carotenoids, and vitamin E. *Food Tech.* 1988. 42 : 214-221
139. Gutteridge JMC. 1993. Free radicals and disease processes : a complication of cause and consequence. *Free Rad. Res. Commun.* 19 : 141-158
140. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease : where are we now ? *J. Lab. Clin. Med.* 119 : 598-620
141. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 : 7915-7922
142. Totter JR. 1980. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 : 1763-1767
143. Jenner P. 1994. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet* 344 : 796-798
144. Block G, Patterson B, Subar A. 1992. Fruit, vegetables, and cancer prevention : a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer.* 18 : 1-29
145. Willet WC. 1994. Diet and health : what should we eat ? *Science.* 264 : 532-537
146. Cederbaum, A. I. 1989. *Free Radic. Biol. Med.* 7 : 537-539
147. Ames, B. N., Magaw, R., Gold, L. S. 1987. *Science.* 236 : 271-280
148. Kowalski, D. P., Feeley, R. M., Jones, D. P. 1990. *J. Nutr.* 120 : 1115-1121
149. Ito, N., Hirose, M. 1989. *Adv. Cancer Res.* 53 : 247-303

150. M van Dusseldorp, EJ Poortvliet, FG de Waart, FJ Kok, AA Alexandrov, V Mazaev, MB Katan. 1996. Anti-oxidant vitamin status of Russian children and elderly. *Europ. J. Clin. Nutr.* 50 : 195-196
151. Kyung – Jin Yeum, Sarah L Booth, James A Sadowski, Chun Liu, Guangwen Tang, Norman I Krinsky, Robert M Russell. 1996. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am. J. Clin. Nutr.* 64 : 594-602
152. Denis J-M Malvy, Bernard Burtschy, Ludmila Dostalova, Oliver Amedee – Manesme. 1993. Serum Retinol, β -Carotene, α -Tocopherol and Cholesterol in Healthy French Children. *Inter. J. Epidem.* Vol.22, No.2 : 237-246
153. Jean Apgar, Dhiren Makdani, Anne L Sowell, Elaine W Gunter, Amin Hegar, Will potts, David Rao, Adeline Wilcox, J Cecil Smith. 1996. Serum carotenoid concentrations and their reproducibility in children in Belize. *Am. J. Clin. Nutr.* 64 : 726-730
154. E. Rojas – Hidalgo, B. Olmedilla. 1993. Carotenoids. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 63 : 265-269

Δείγματα πλάσματος γρήβων * : 1,2,3,12,14 – 30

* Σε κάθε δείγμα πλάσματος αντιστοιχούν τρία διαδοχικά χρωματογραφήματα. Το πρώτο (ρετινόλη, οξικός εστέρας ρετινόλης) και το δεύτερο (τοκοφερόλη) προκύπτουν όταν ο διαλύτης έκλουσης είναι $\text{Meth}/\text{H}_2\text{O}$ ενώ το τρίτο (καροτενοειδή) προκύπτει όταν ο διαλύτης έκλουσης είναι $\text{ACN}/\text{Eth}/\text{Dieth}$.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Χρωματογραφήματα

Πρότυπα διαλύματα αναφοράς : Ρετινόλη

Τοκοφερόλη

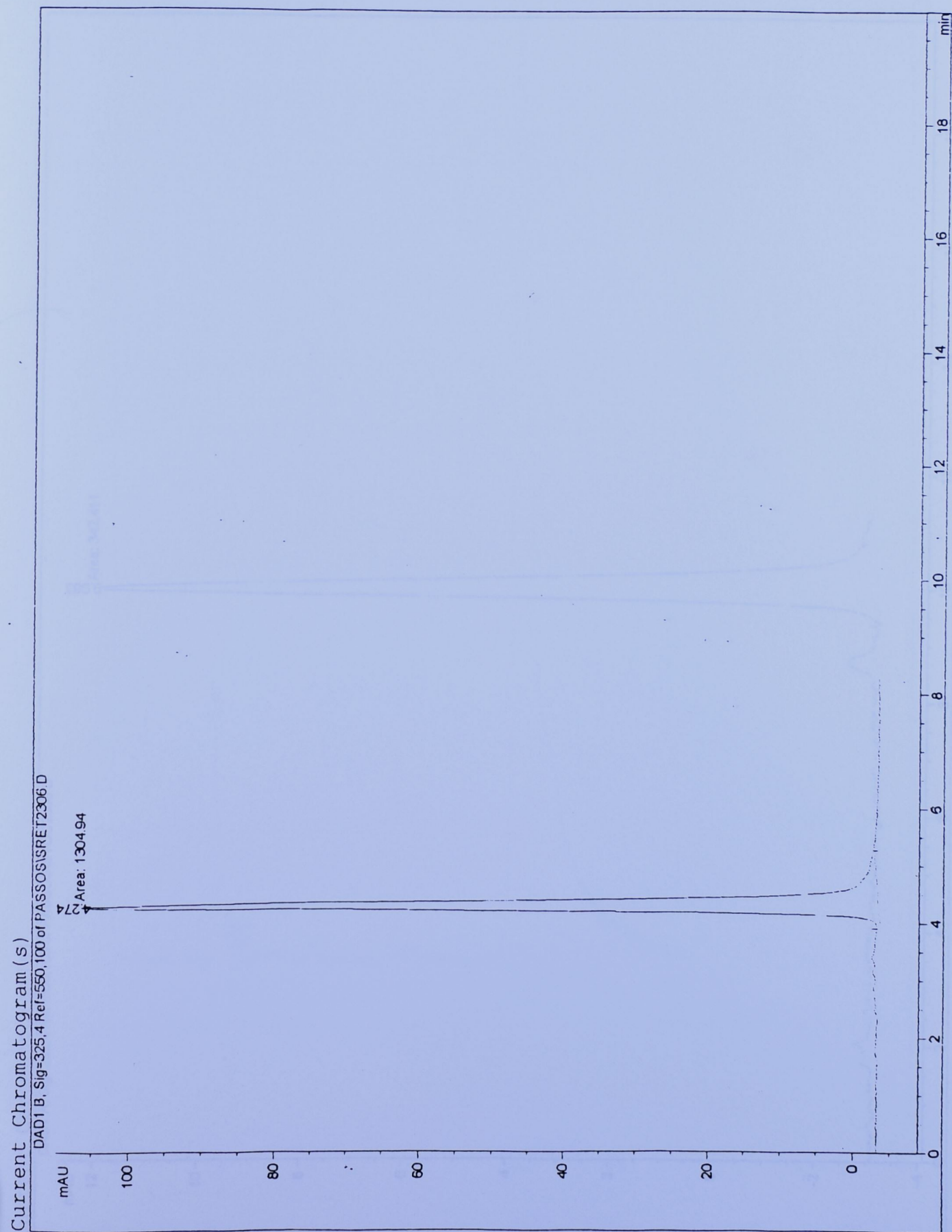
B – καροτένιο

Οξικός εστέρας ρετινόλης

Δείγματα πλάσματος εφήβων * : 1,2,3,12,14 – 30

* Σε κάθε δείγμα πλάσματος αντιστοιχούν τρία διαδοχικά χρωματογραφήματα. Το πρώτο (ρετινόλη, οξικός εστέρας ρετινόλης) και το δεύτερο (τοκοφερόλη) προκύπτουν όταν ο διαλύτης έκλουσης είναι Meth/H₂O ενώ το τρίτο (καροτενοειδή) προκύπτει όταν ο διαλύτης έκλουσης είναι ACN/Eth/Dieth.

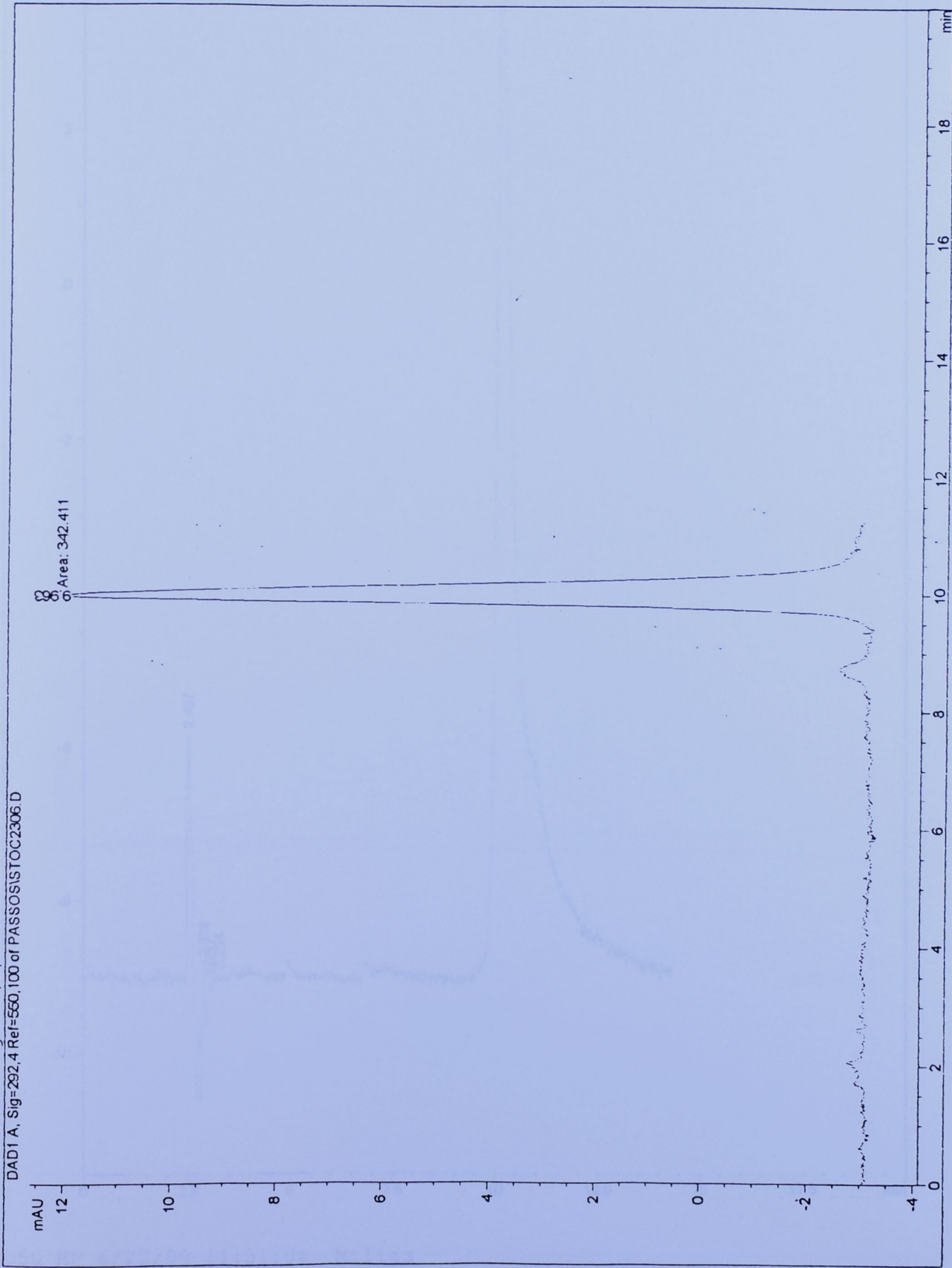
Πρότυπο δ/α αναφοράς : Ρεκινόλη



Πρότυπο δ/α αναφοράς : α-τοκοφερόλη

Current Chromatogram(s)

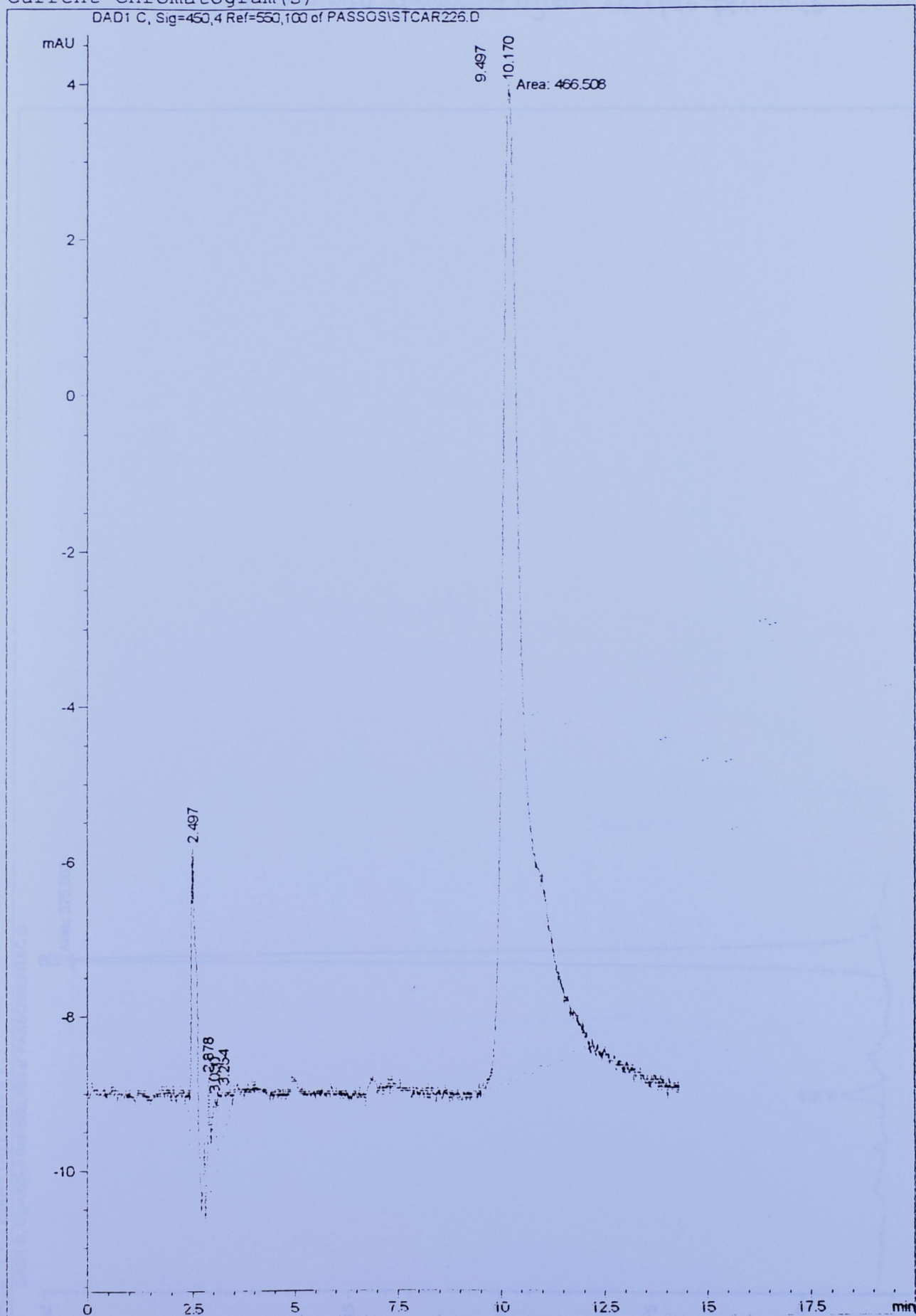
DAD1 A, Sig=292.4 Ref=550, 100 of PASSOSIS\STOC2306.D



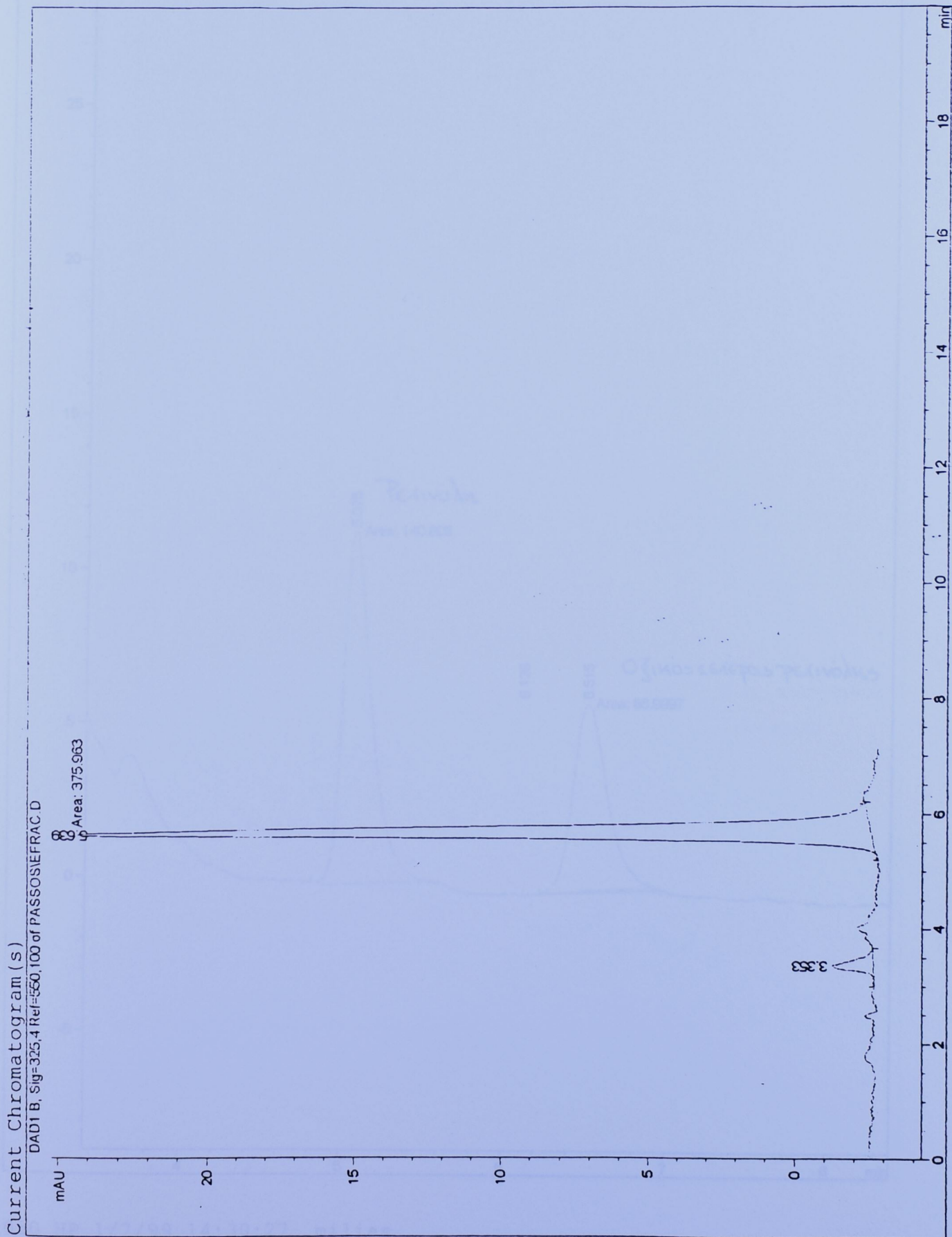
Πρότυπο δ/α αναφοράς : β-καρβένιο

Current Chromatogram(s)

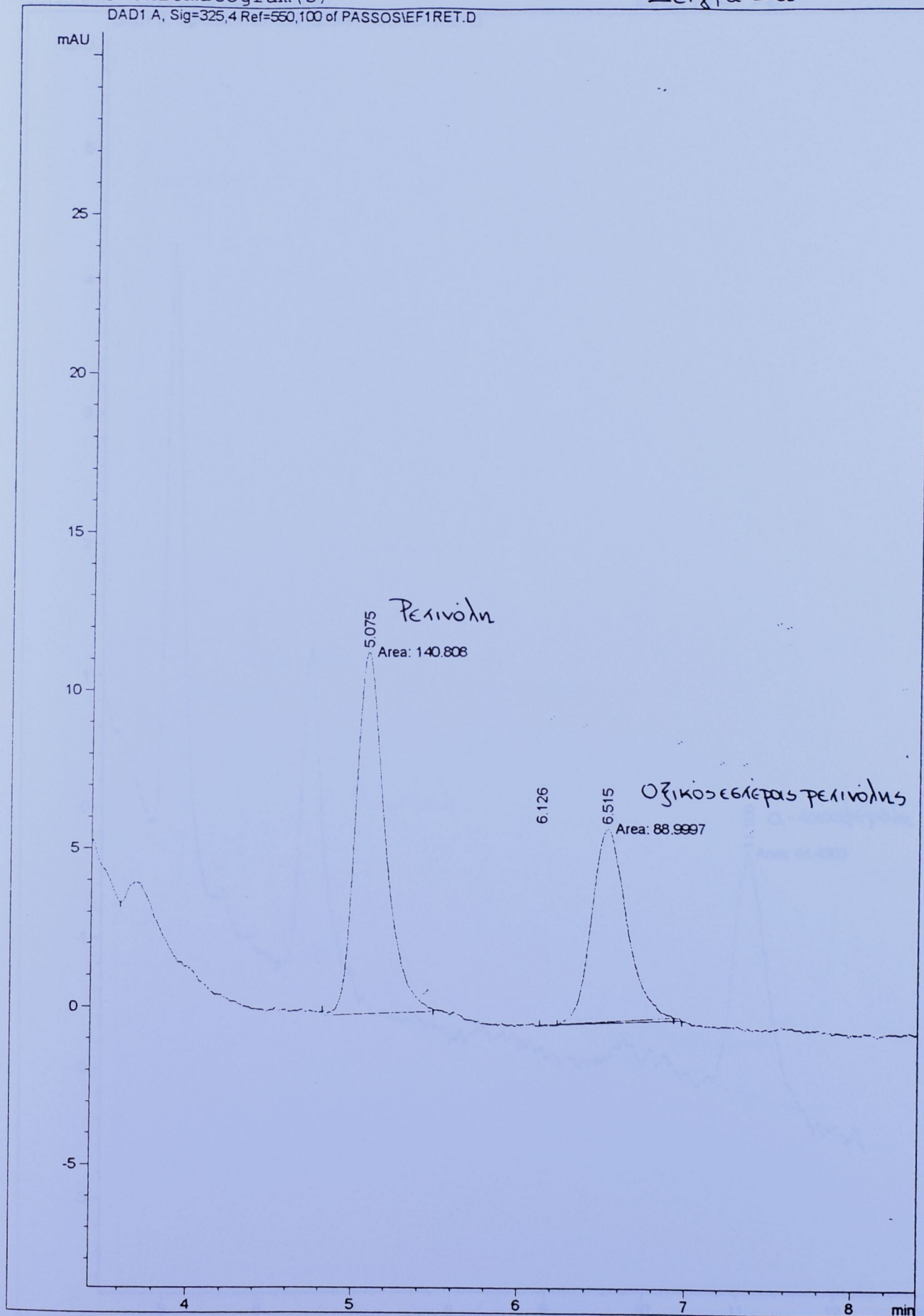
DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOSISTCAR226.D



Πρόσχημο δ/φα αναφοράς: οξικός εγγέρας πελινούλης



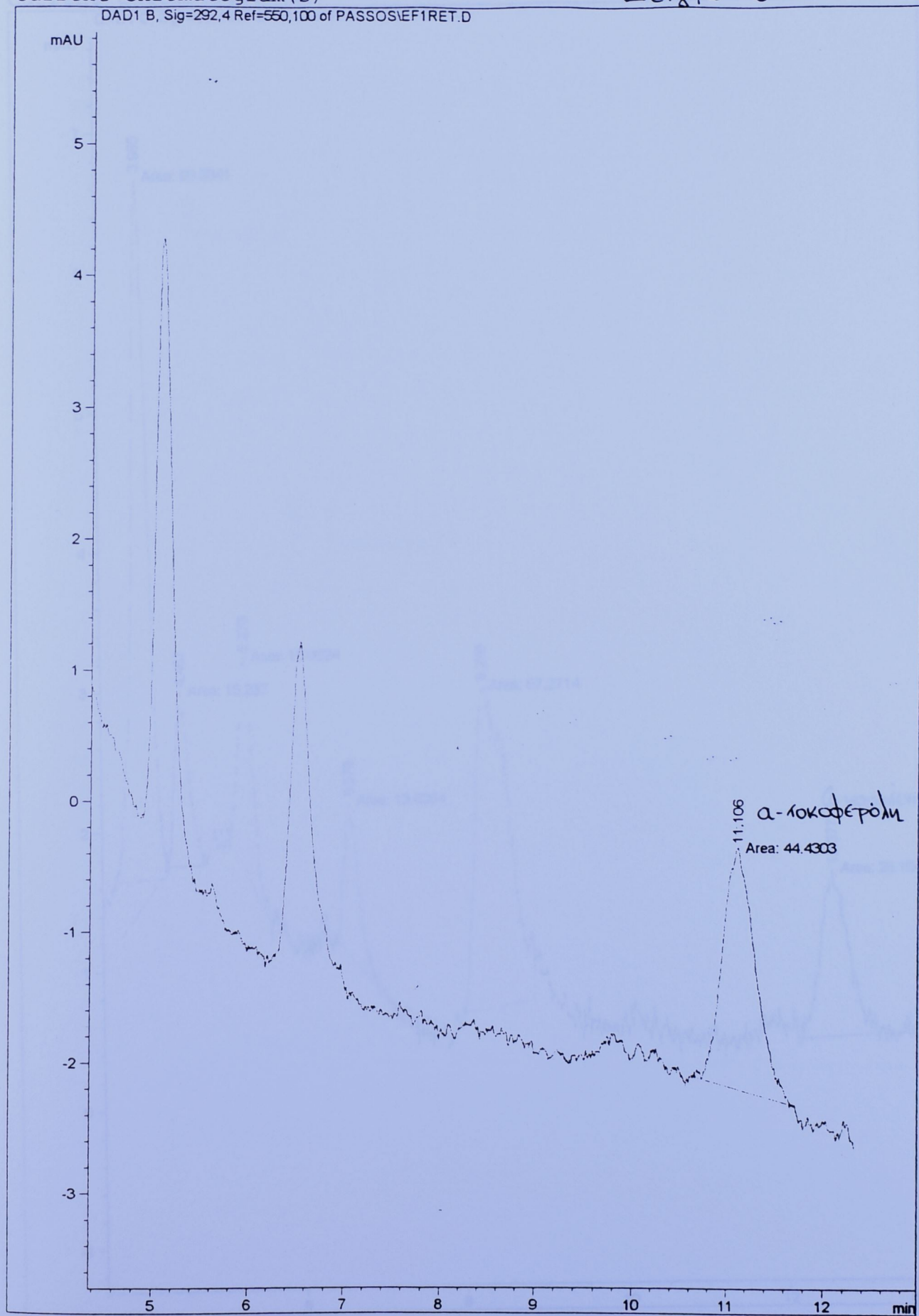
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF1RET.D



Current Chromatogram(s)

Δείγμα 18

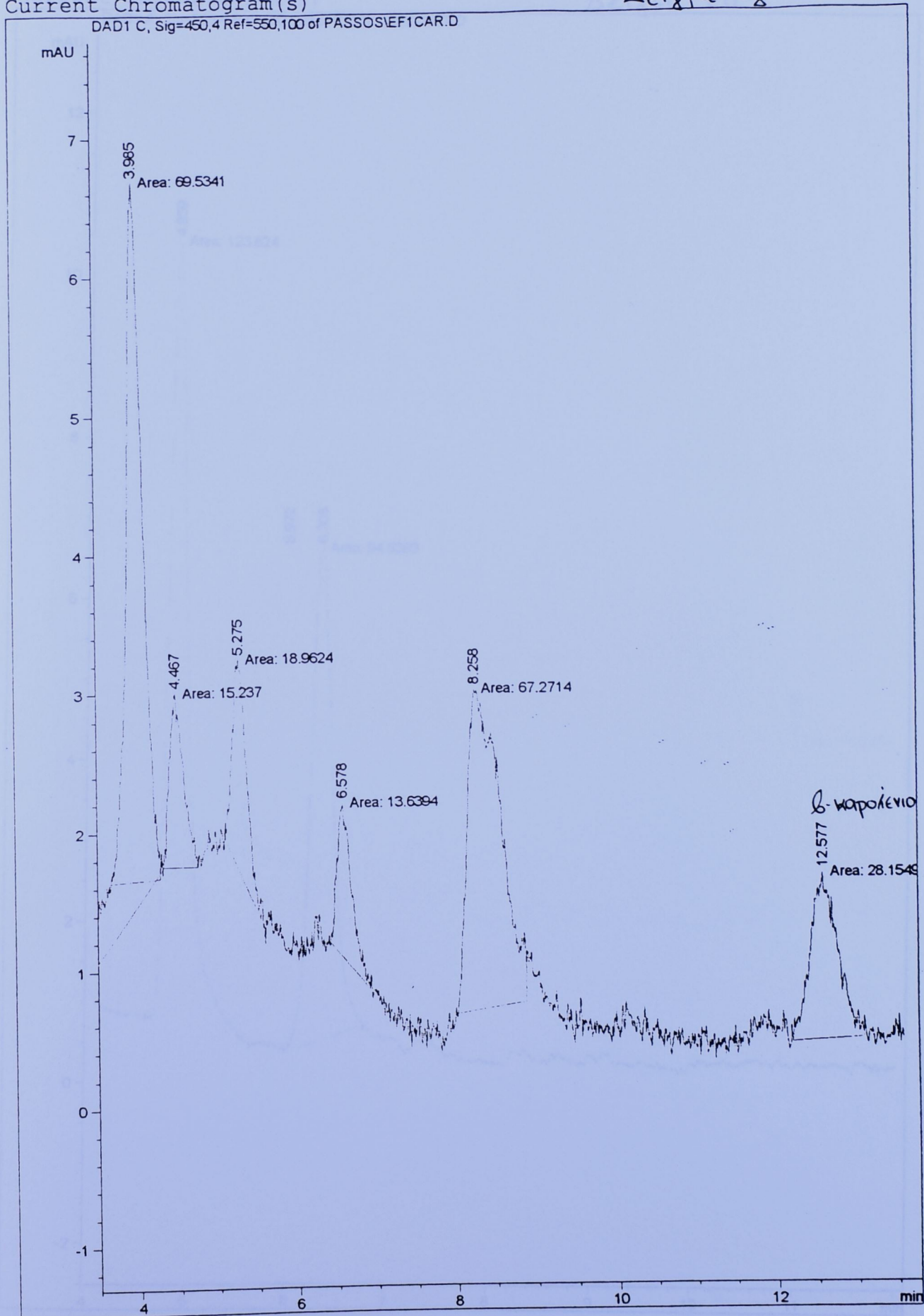
DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF1RET.D



Current Chromatogram(s)

Δειγμα 18

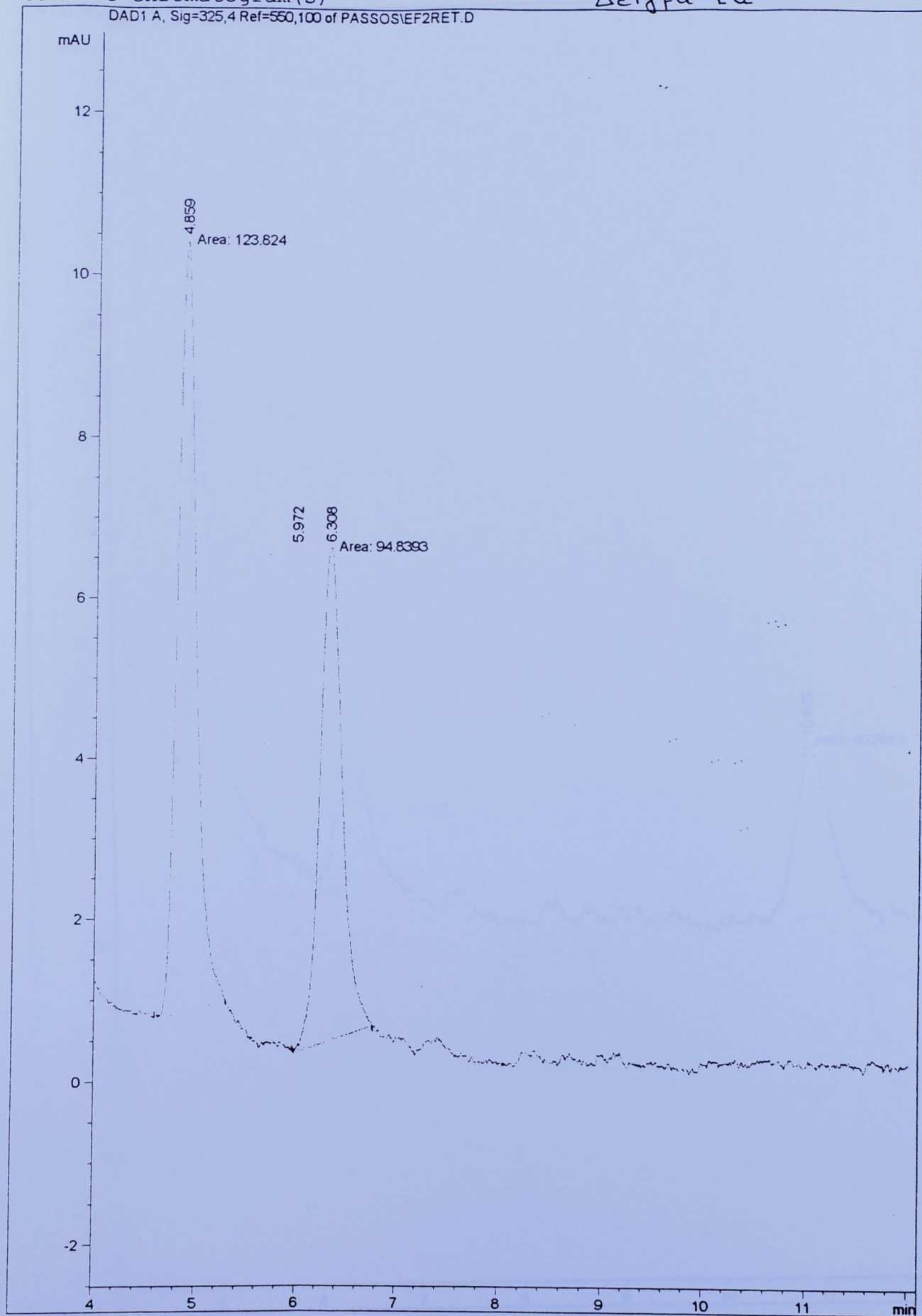
DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF1CAR.D



Current Chromatogram(s)

Delta 2a

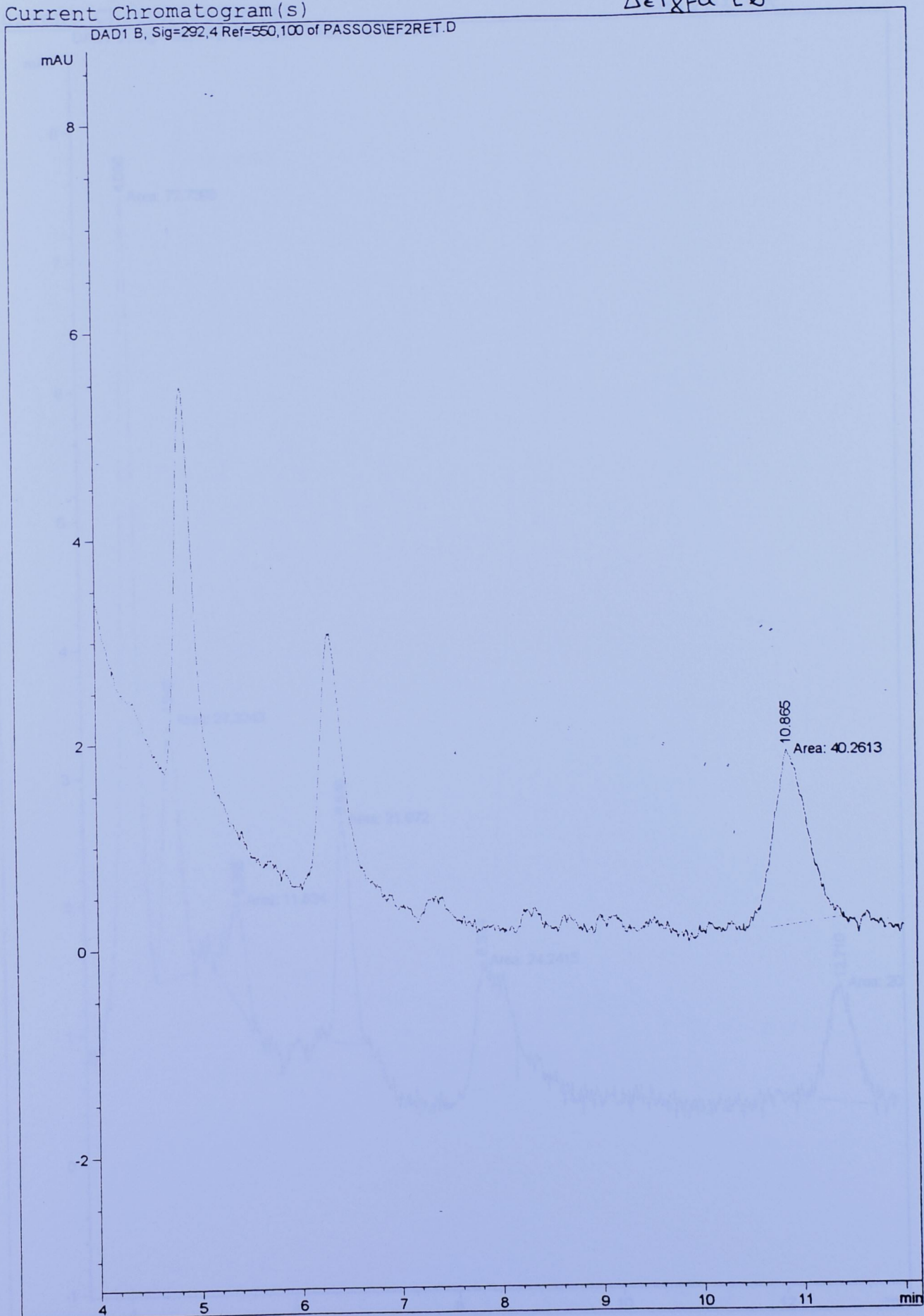
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF2RET.D



Current Chromatogram(s)

Deixa 26

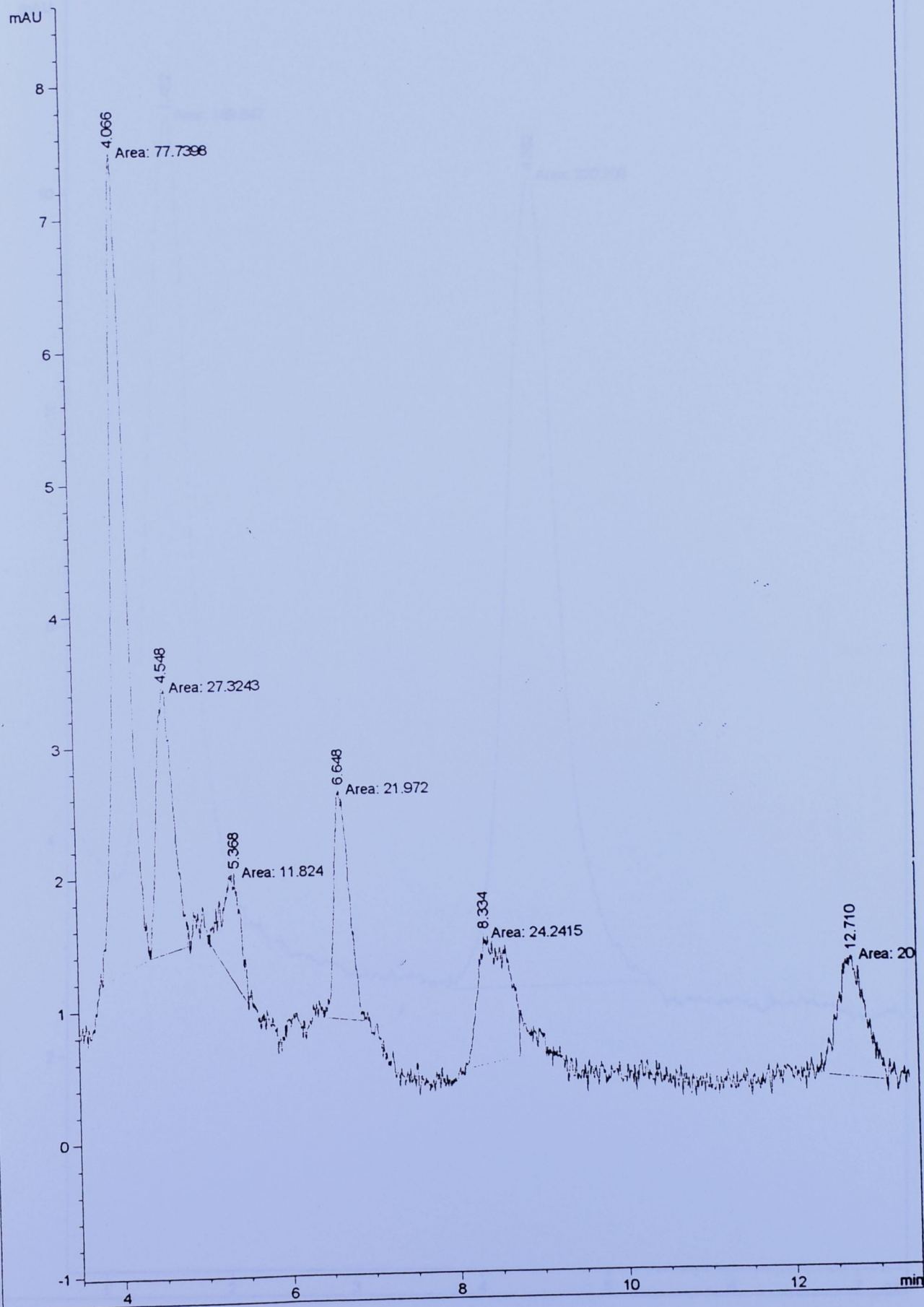
DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF2RET.D



Current Chromatogram(s)

Δεight 28

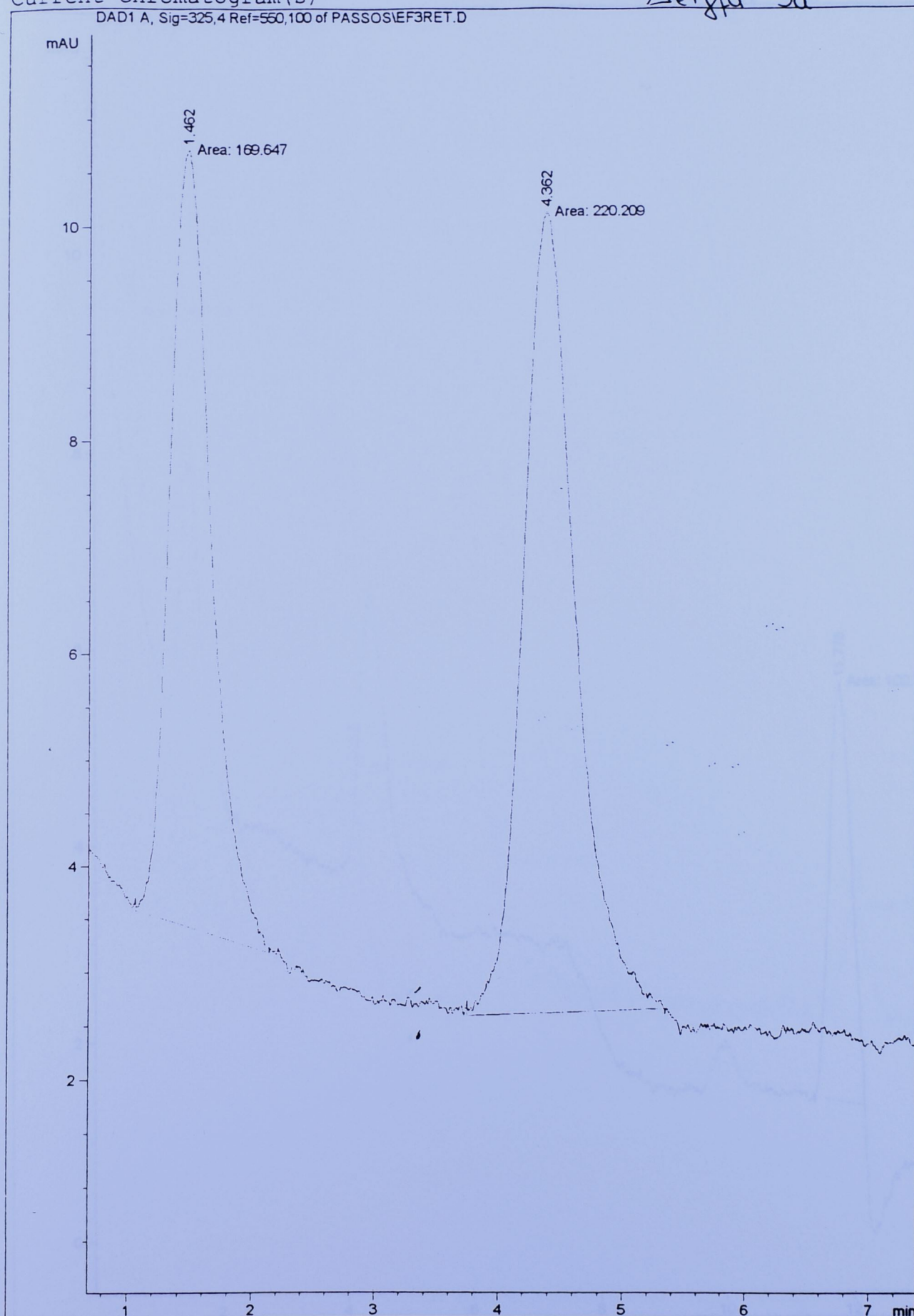
DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF2CAR.D



Current Chromatogram(s)

$\Delta \epsilon_{\gamma/a}$ 3a

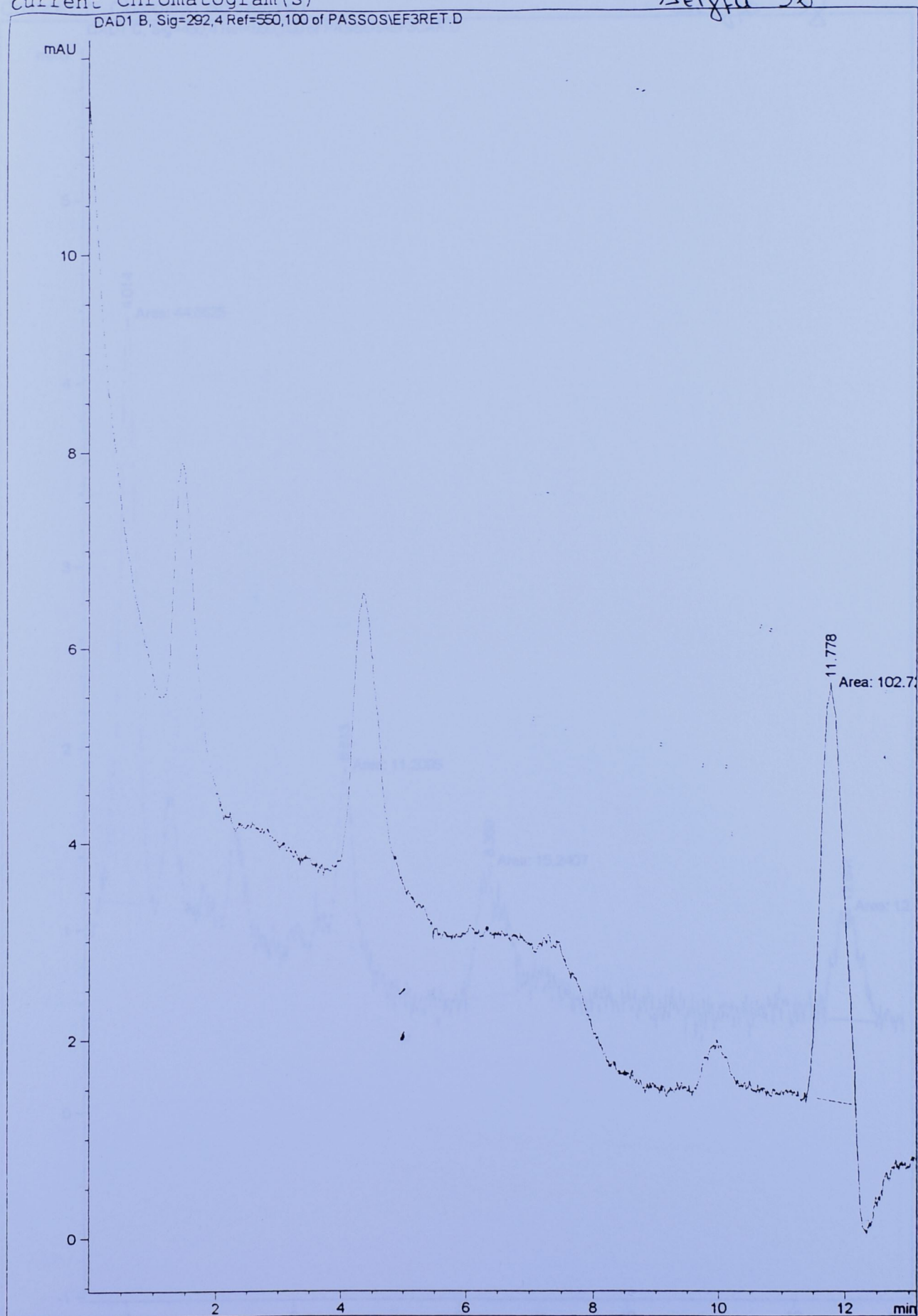
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOSIEF3RET.D



current Chromatogram(s)

Seiya 36

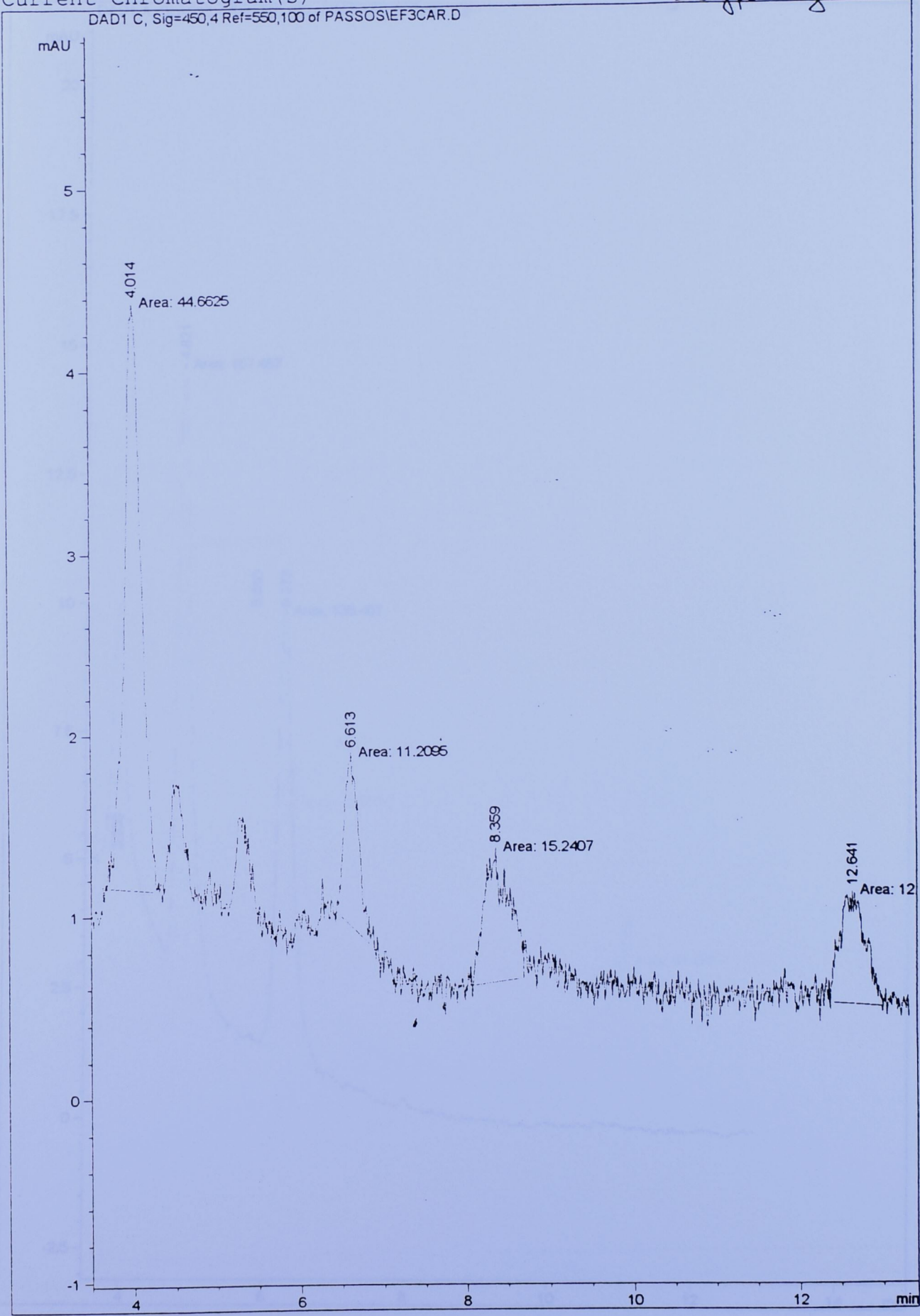
DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF3RET.D



Current Chromatogram(s)

Δειγτα 3x

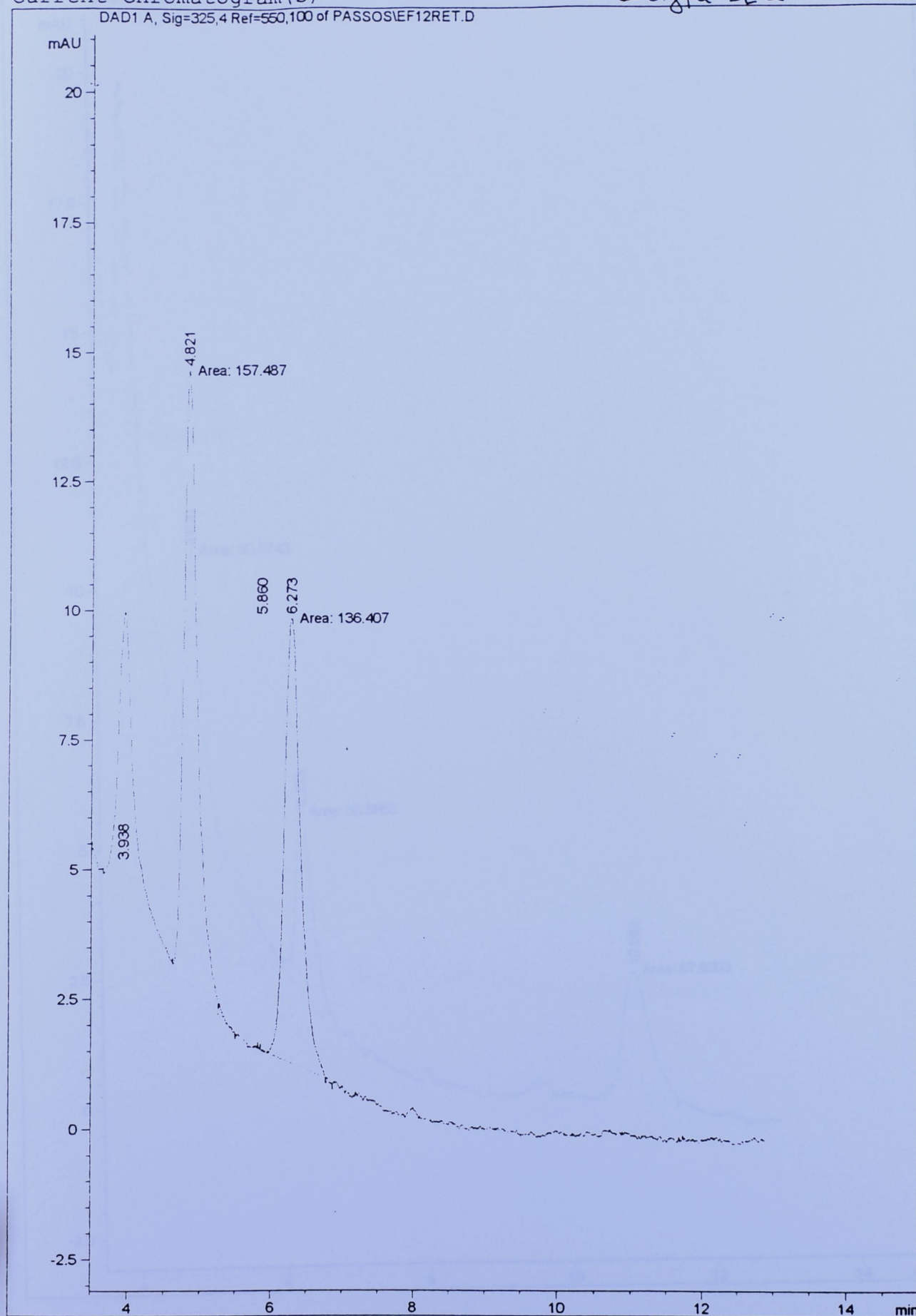
DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOSIEF3CAR.D



Current Chromatogram(s)

Delta 12a

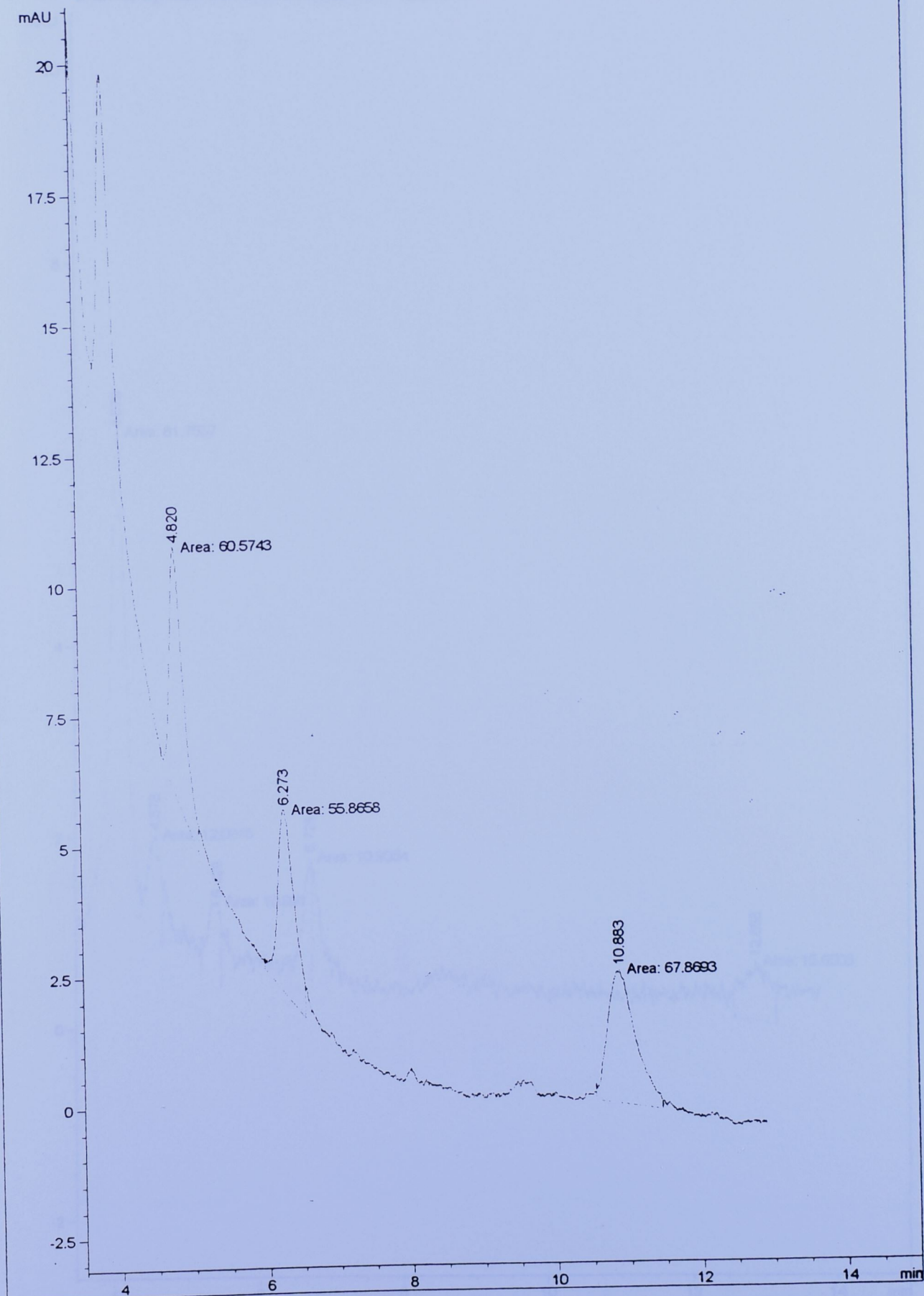
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF12RET.D



Current Chromatogram(s)

Delta 126

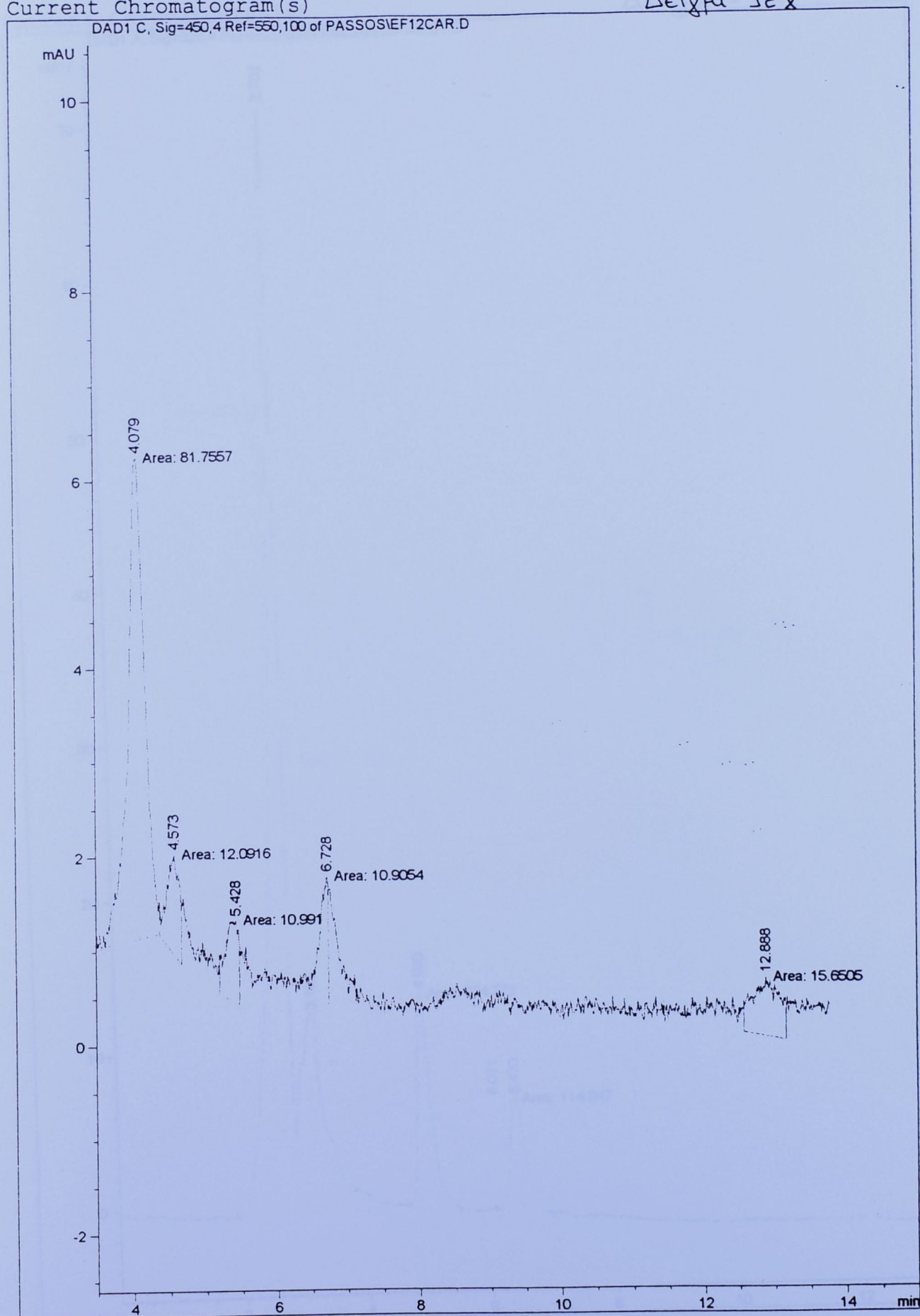
DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOSIEF12RET.D



Current Chromatogram(s)

Δειγτα 12x

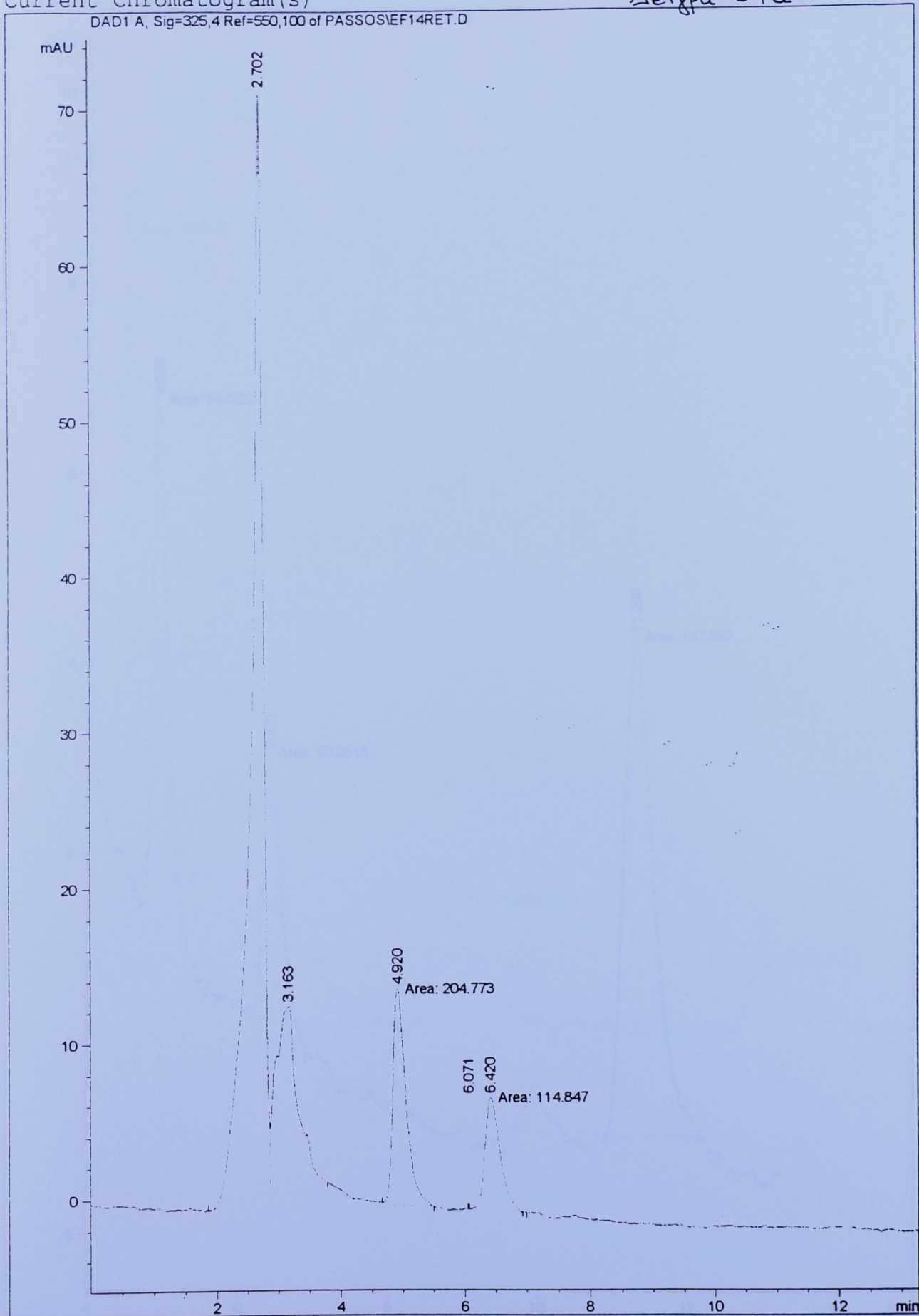
DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOSIEF12CAR.D



Current Chromatogram(s)

Δειγμα J4a

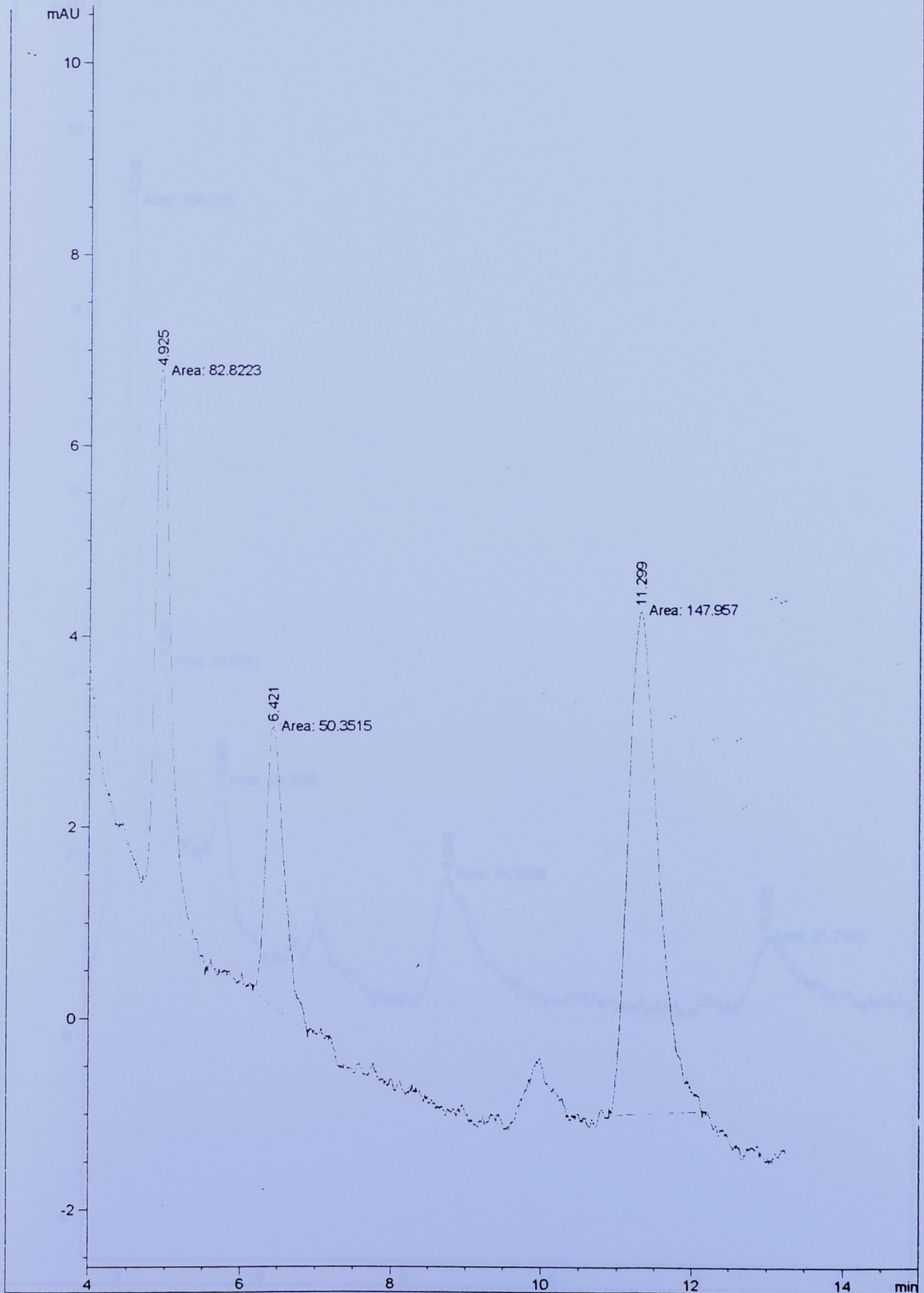
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF14RET.D



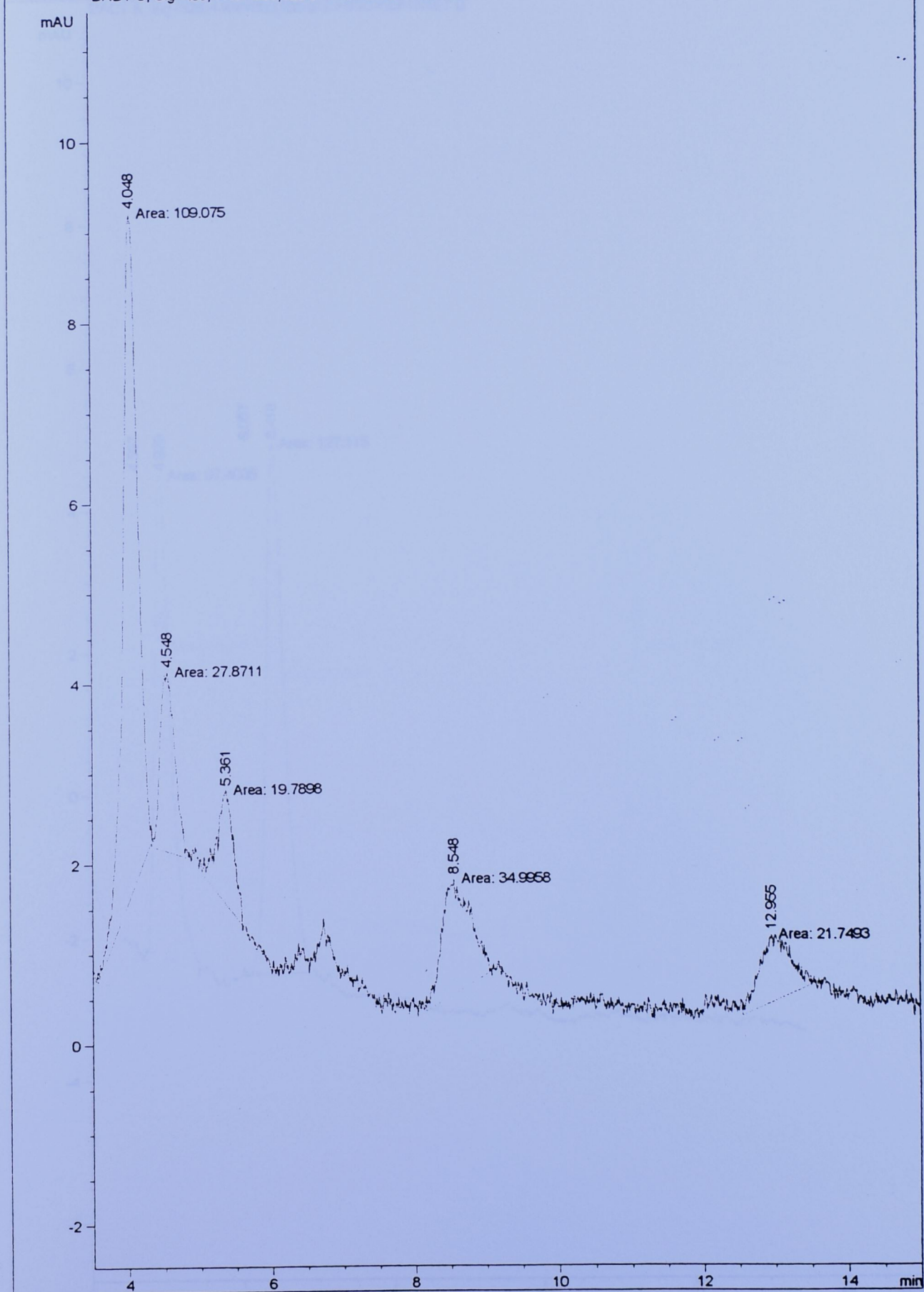
Current Chromatogram(s)

Δειγτα 148

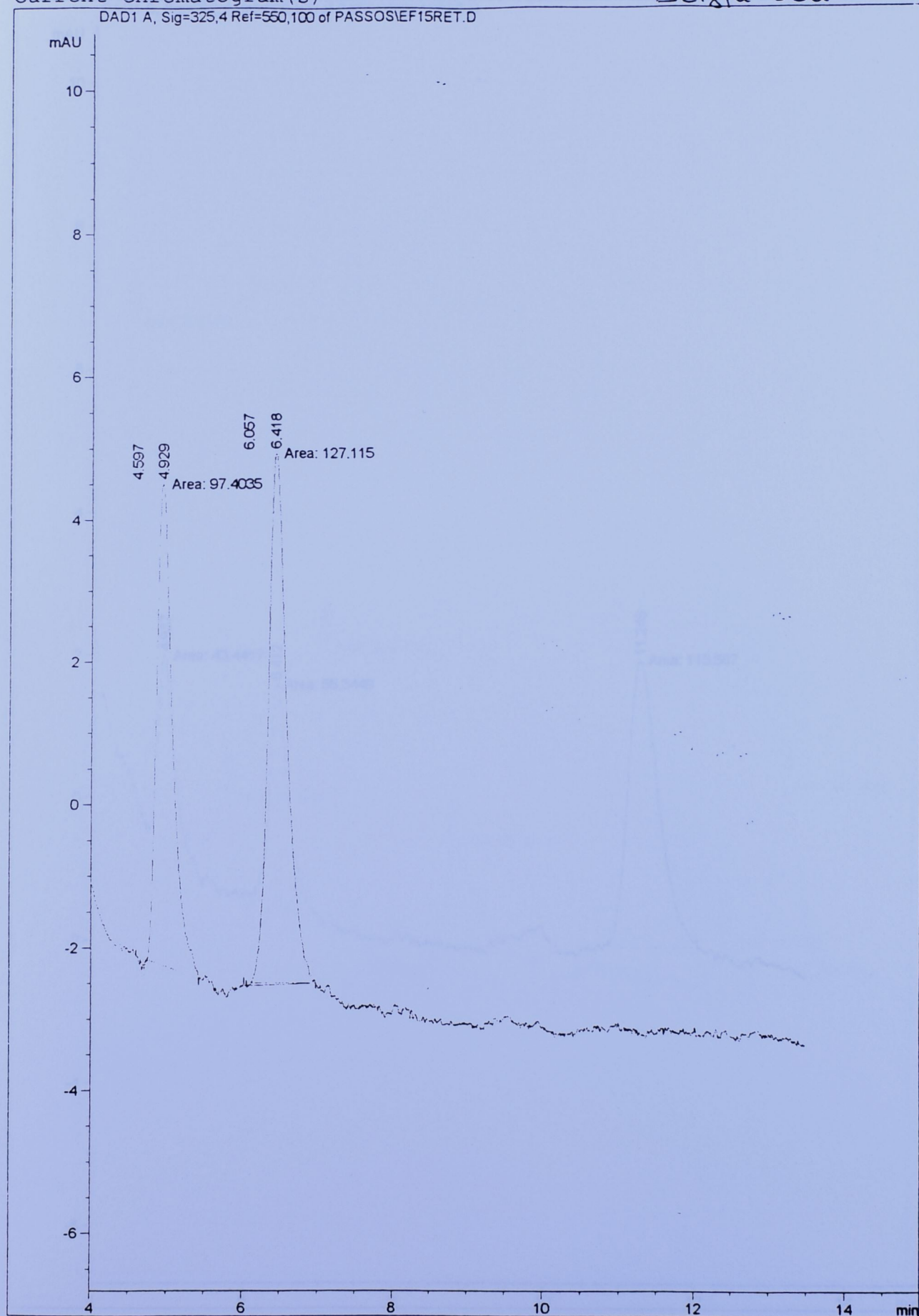
DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF14RET.D



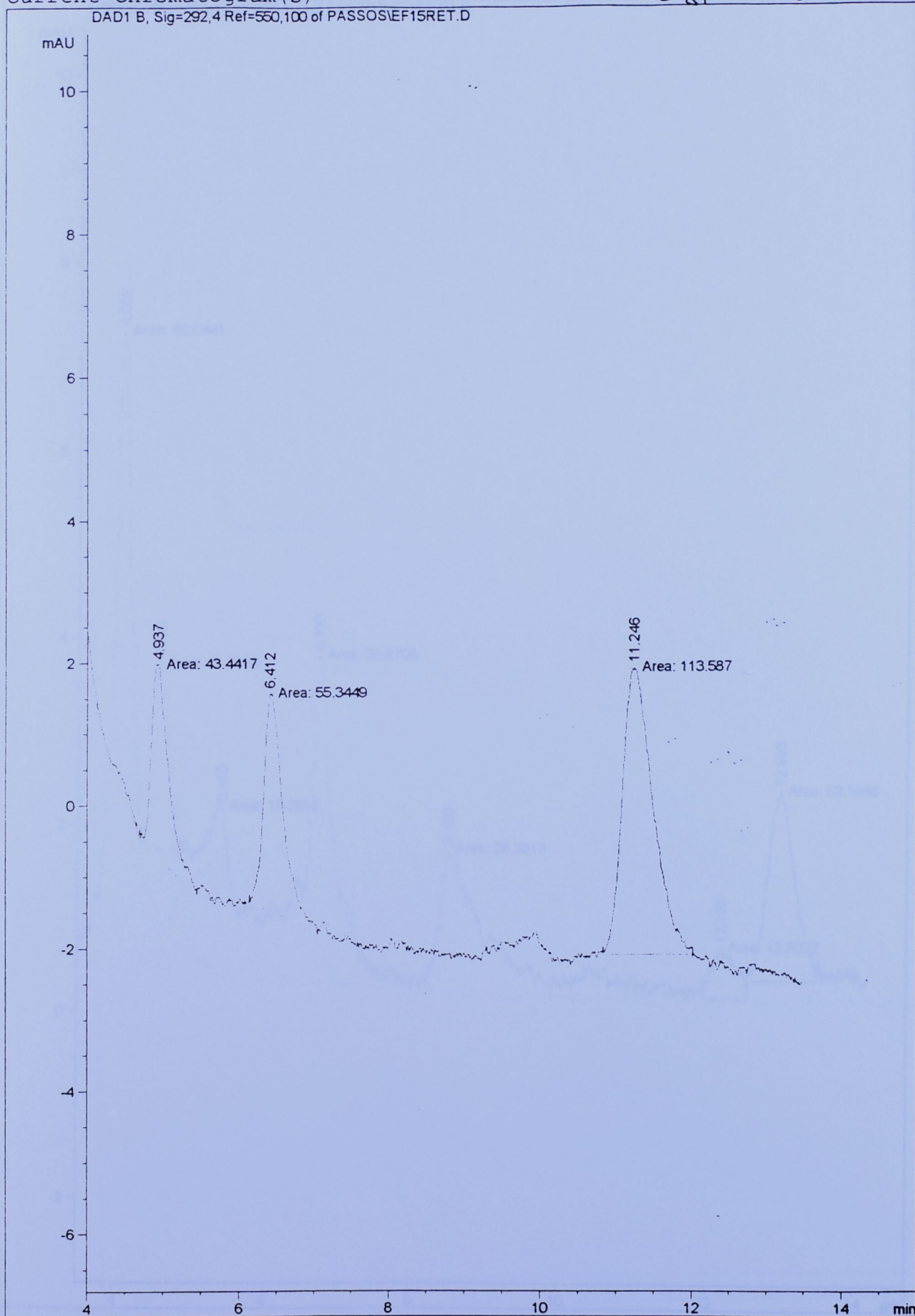
DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF14CAR.D



DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF15RET.D



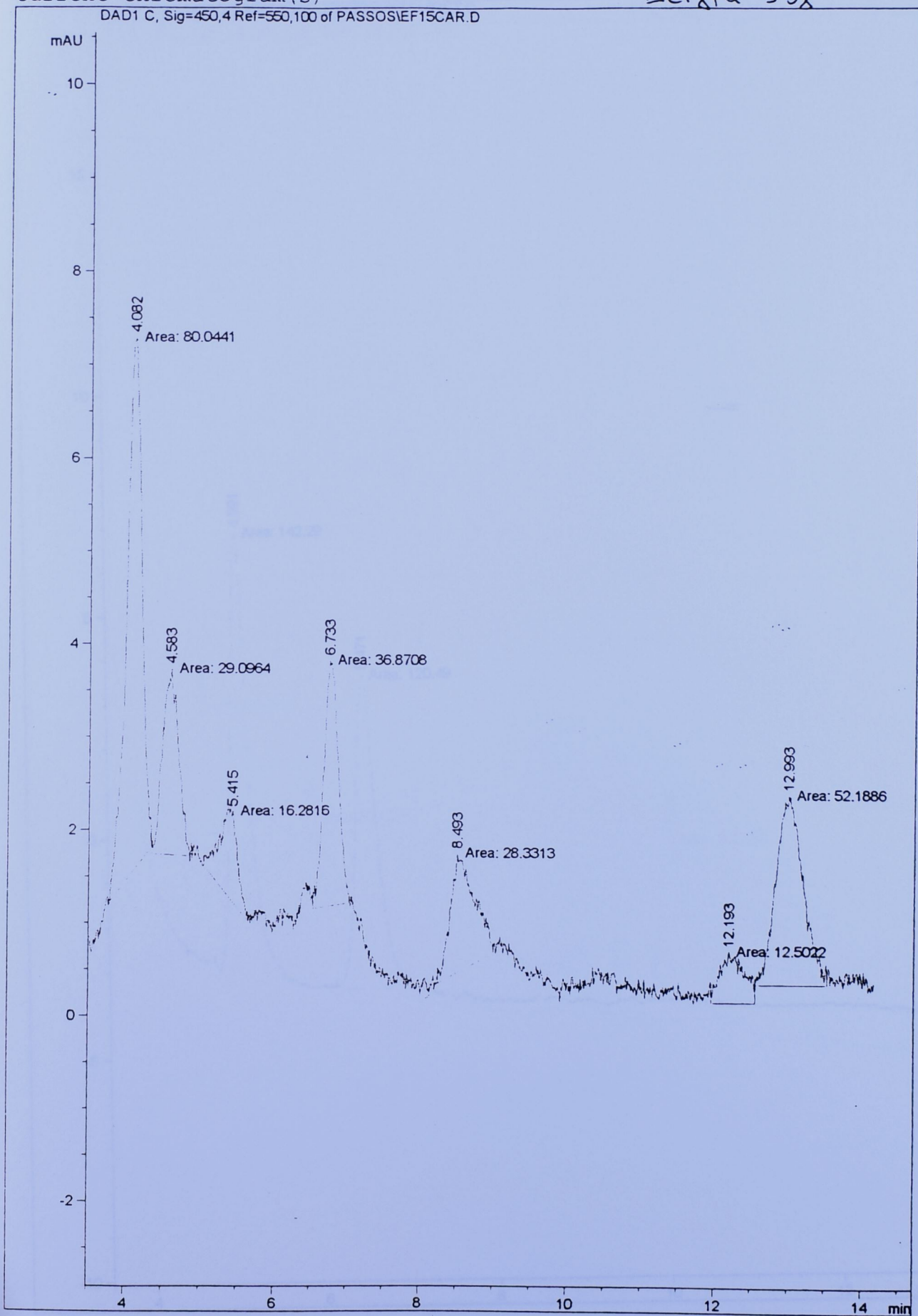
DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF15RET.D



Current Chromatogram(s)

Delta 15x

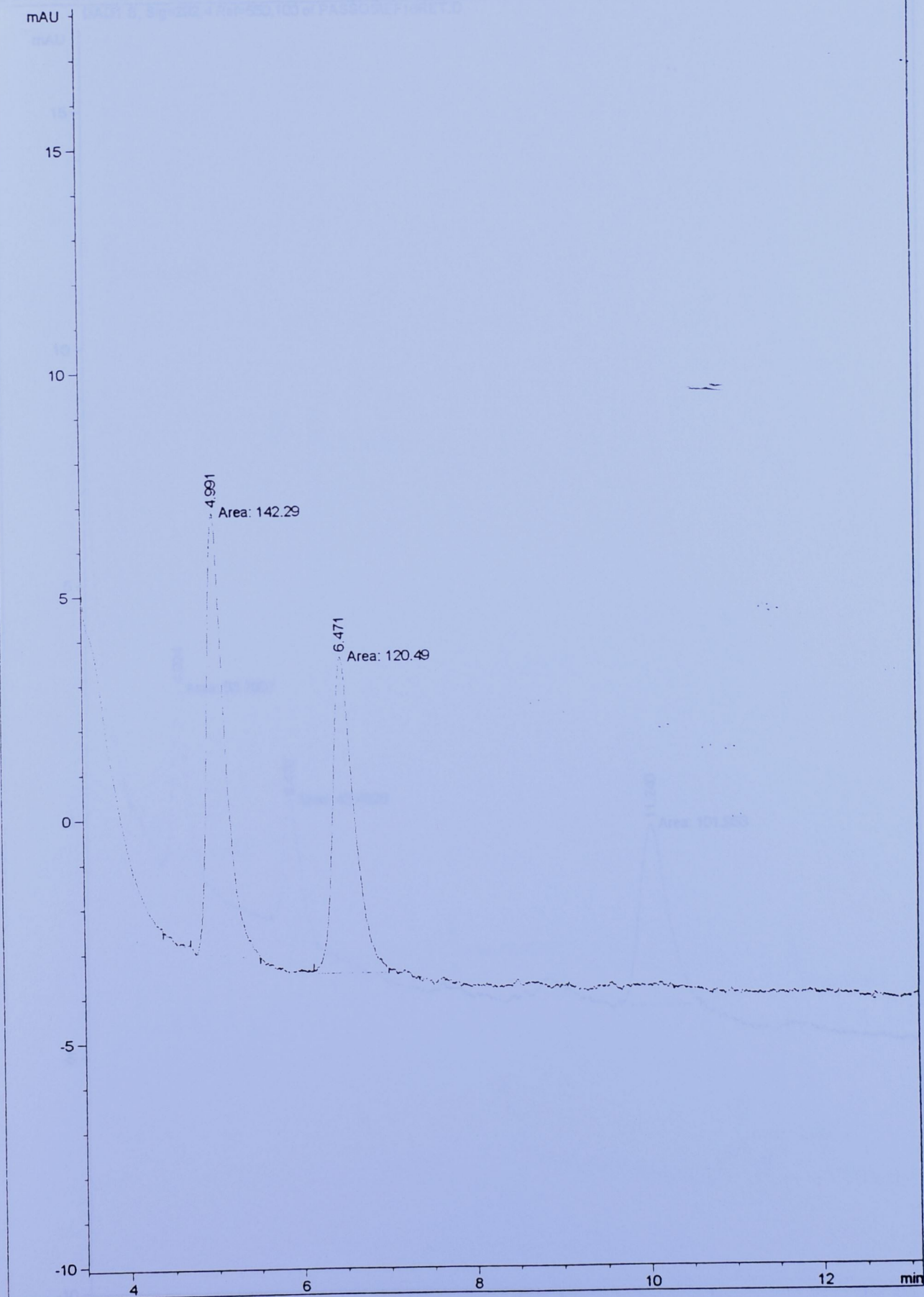
DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF15CAR.D



Current Chromatogram(s)

Delta 16a

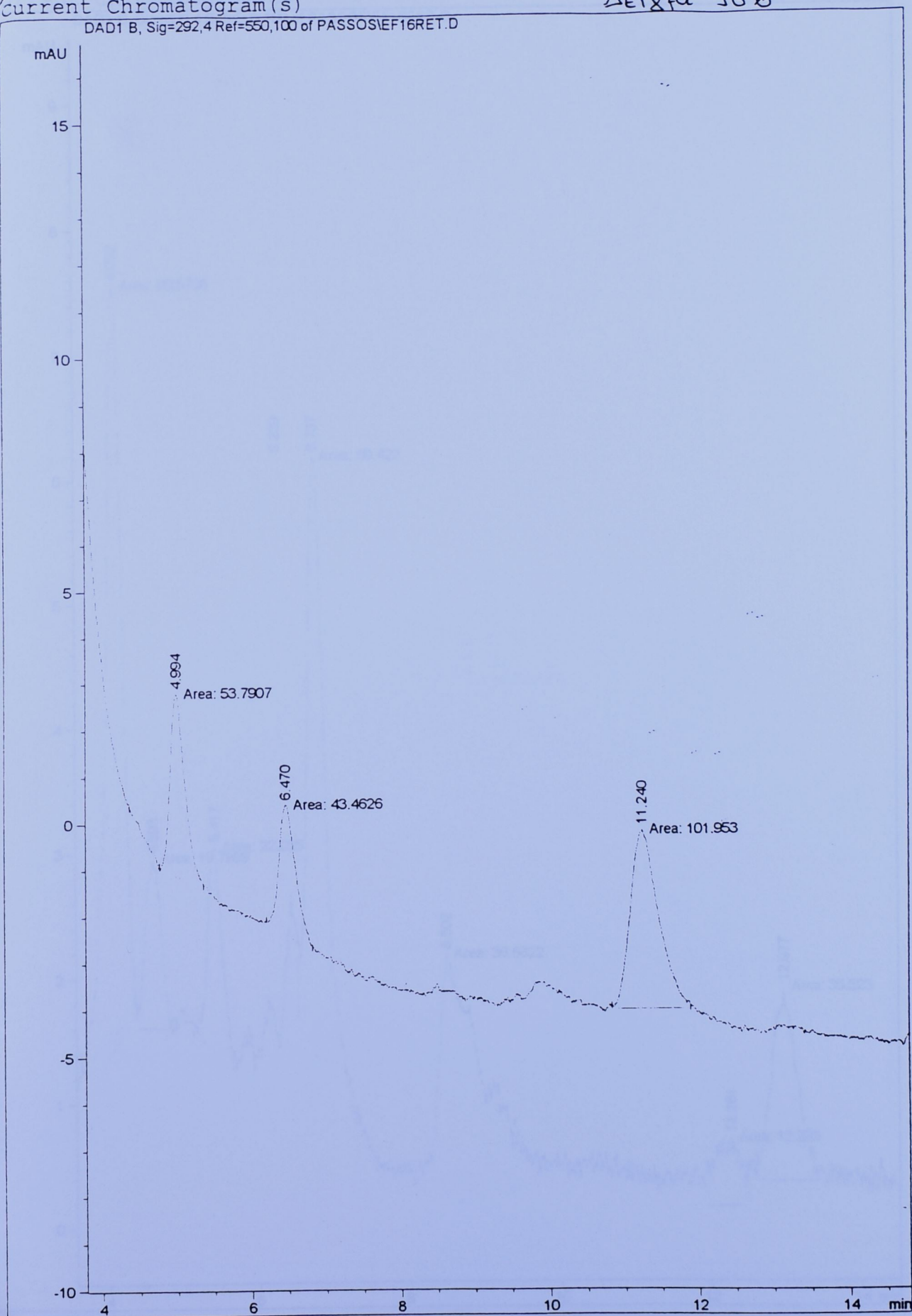
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF16RET.D



current Chromatogram(s)

Delta 168

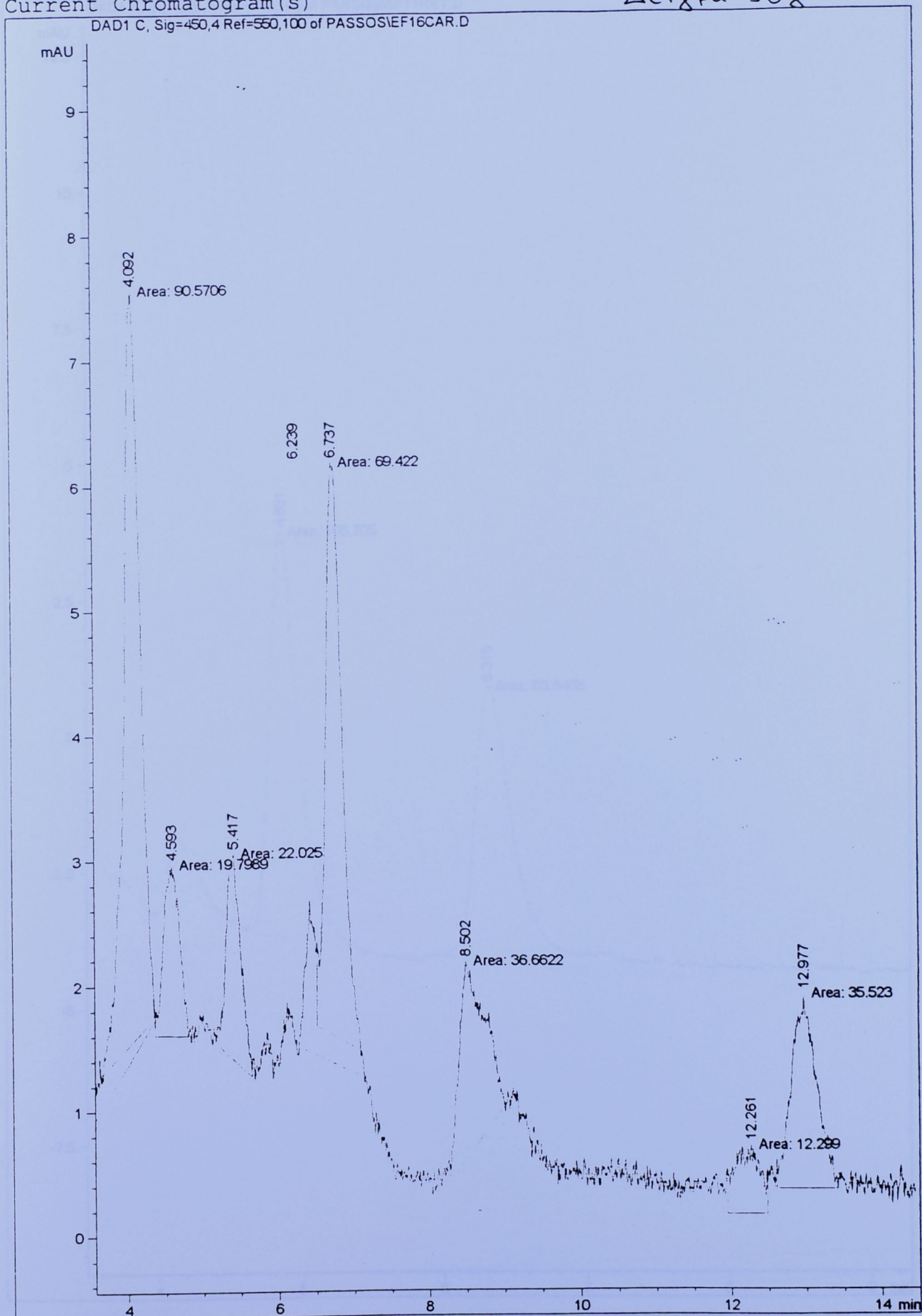
DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOSIEF16RET.D



Current Chromatogram(s)

Delta 16x

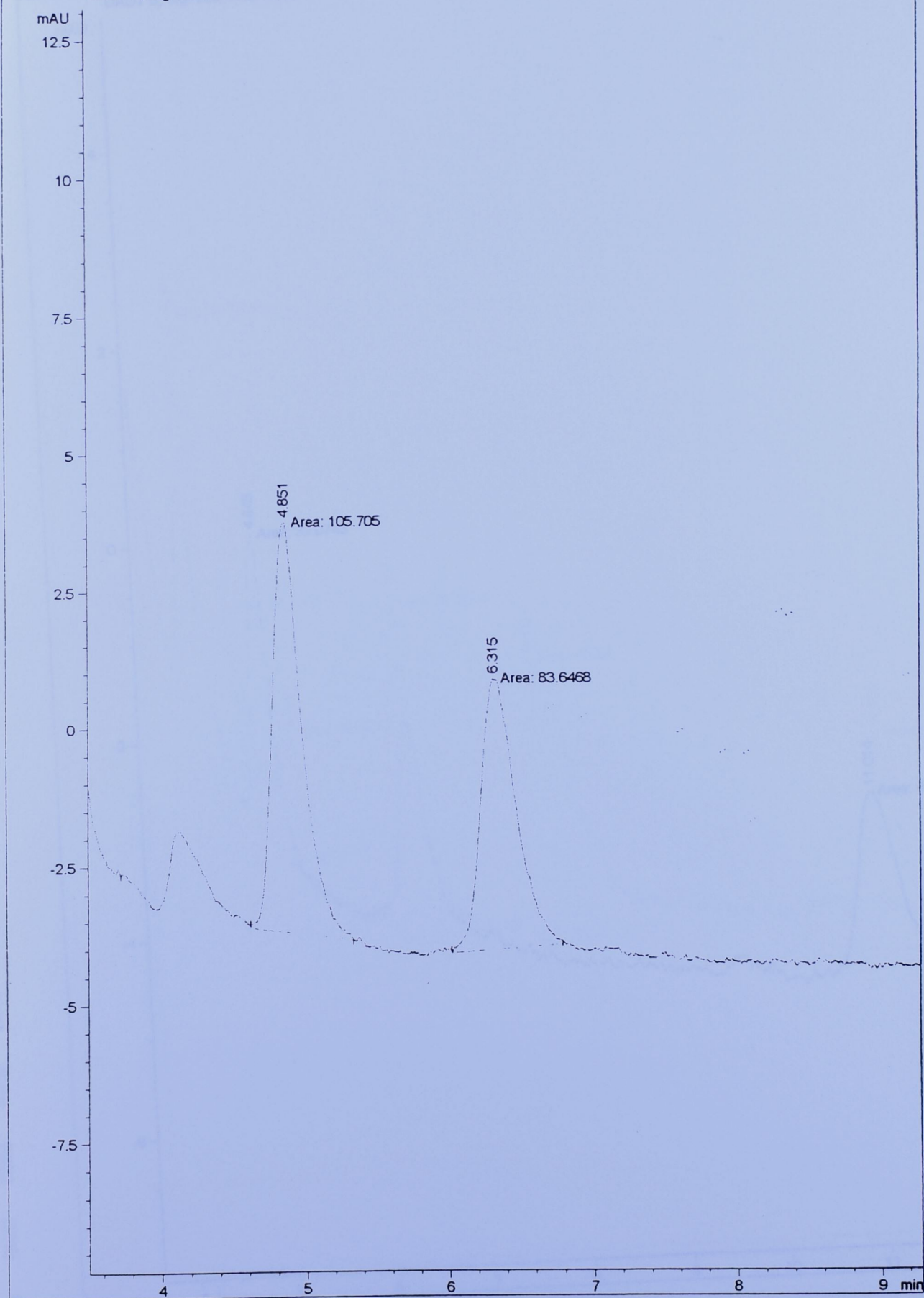
DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF16CAR.D



Current Chromatogram(s)

Deixa 17a

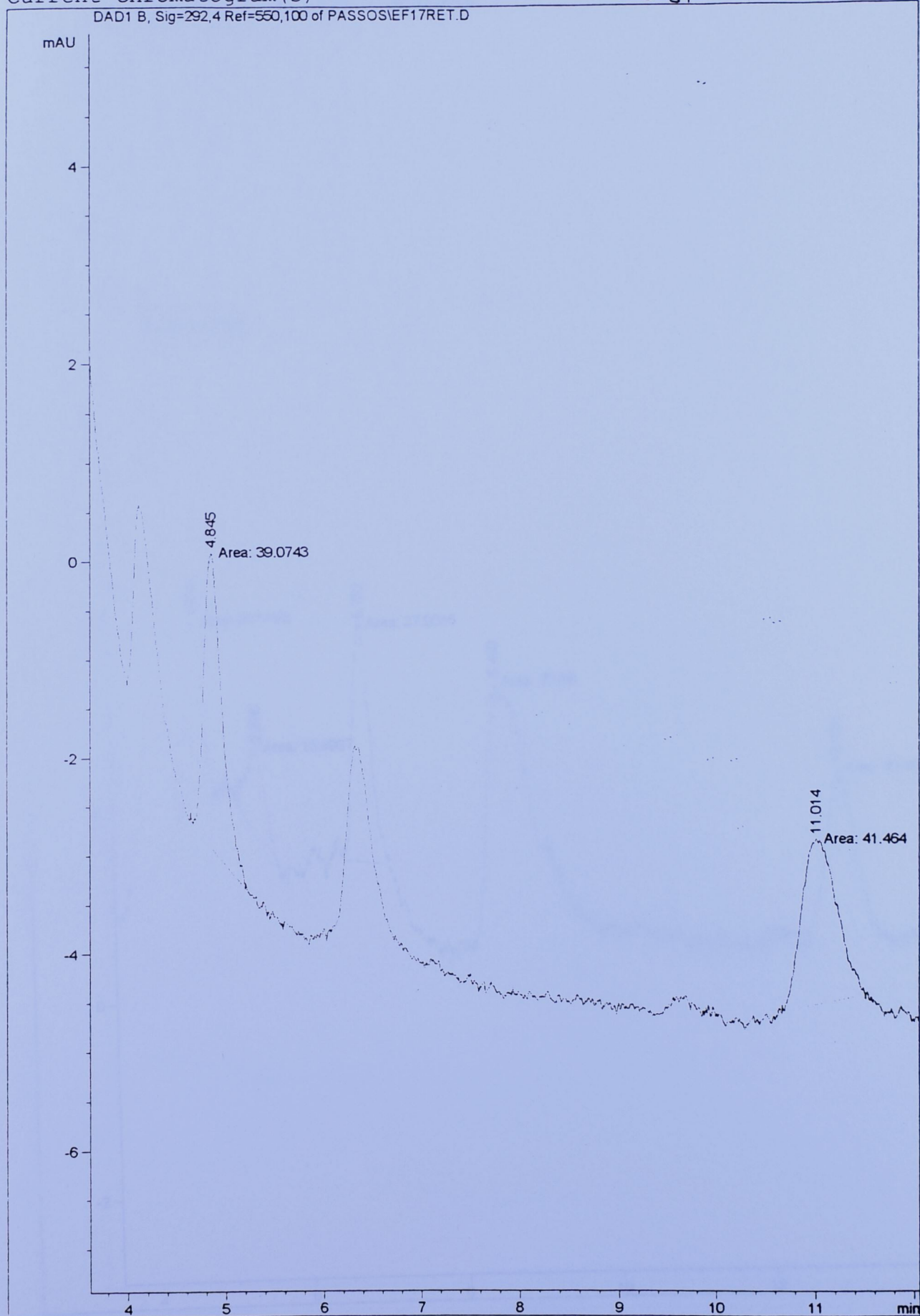
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF17RET.D



Current Chromatogram(s)

Delta 178

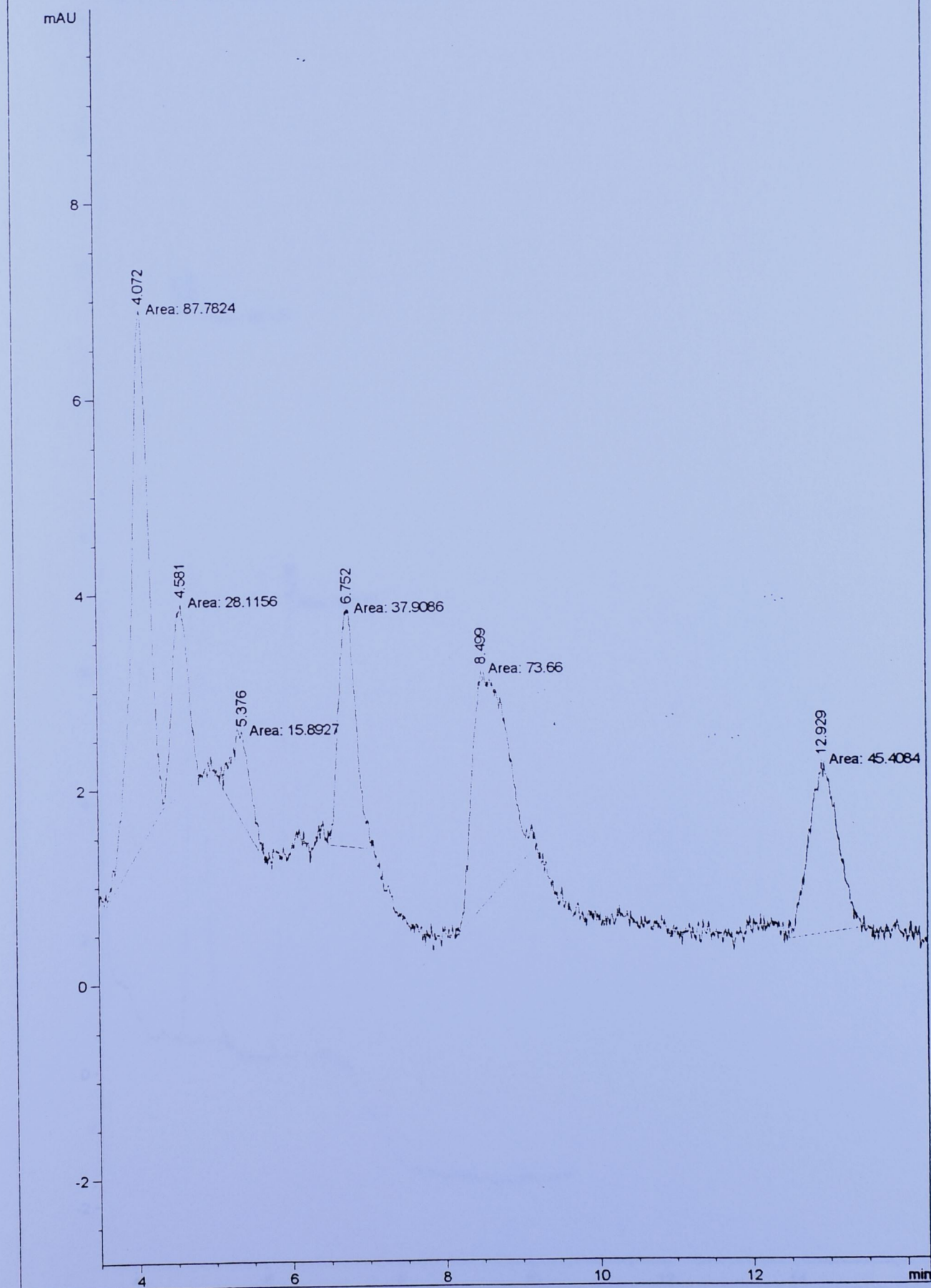
DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF17RET.D



Current Chromatogram(s)

Delta 578

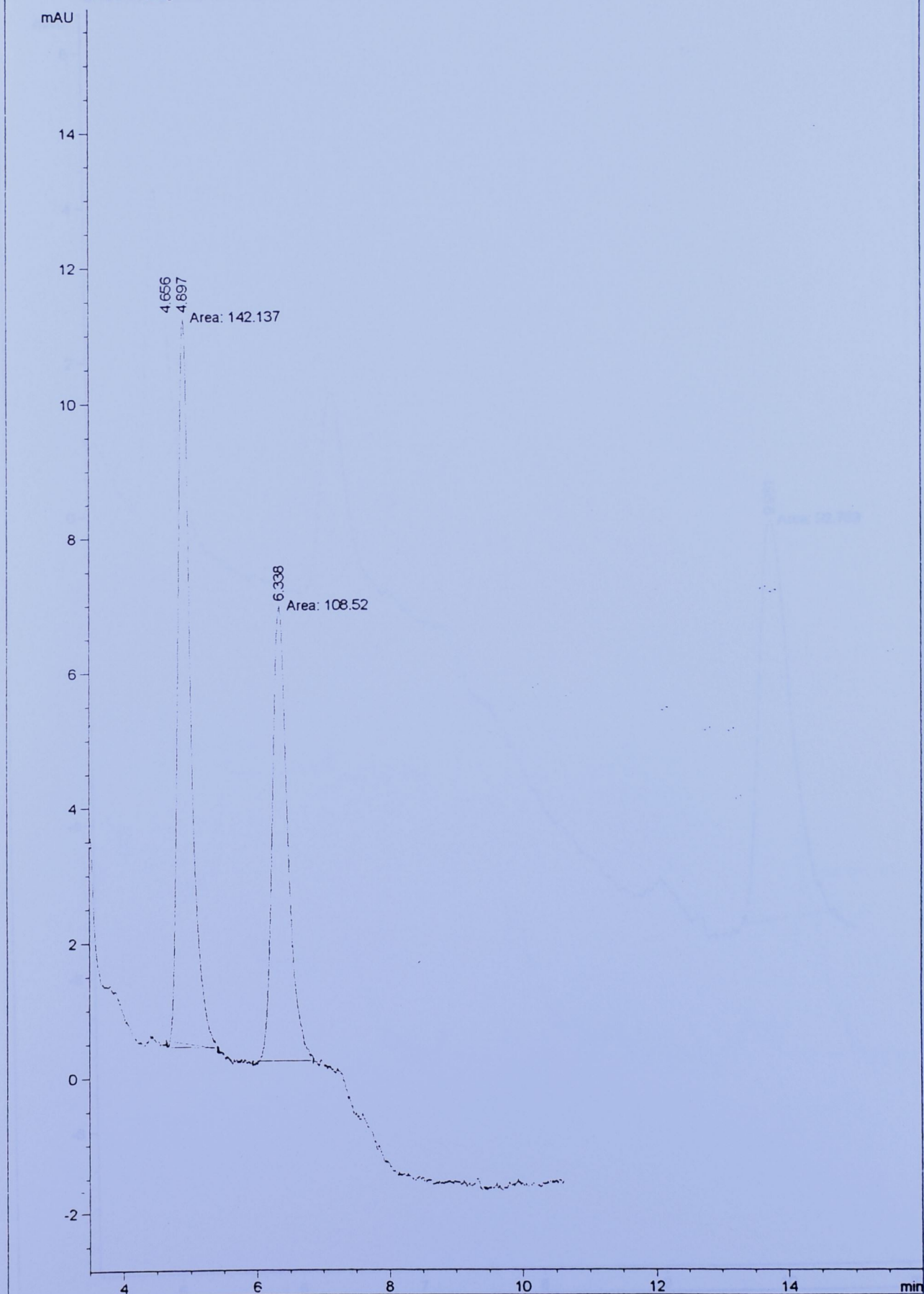
DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOSIEF17CAR.D



Current Chromatogram(s)

Δεight 18a

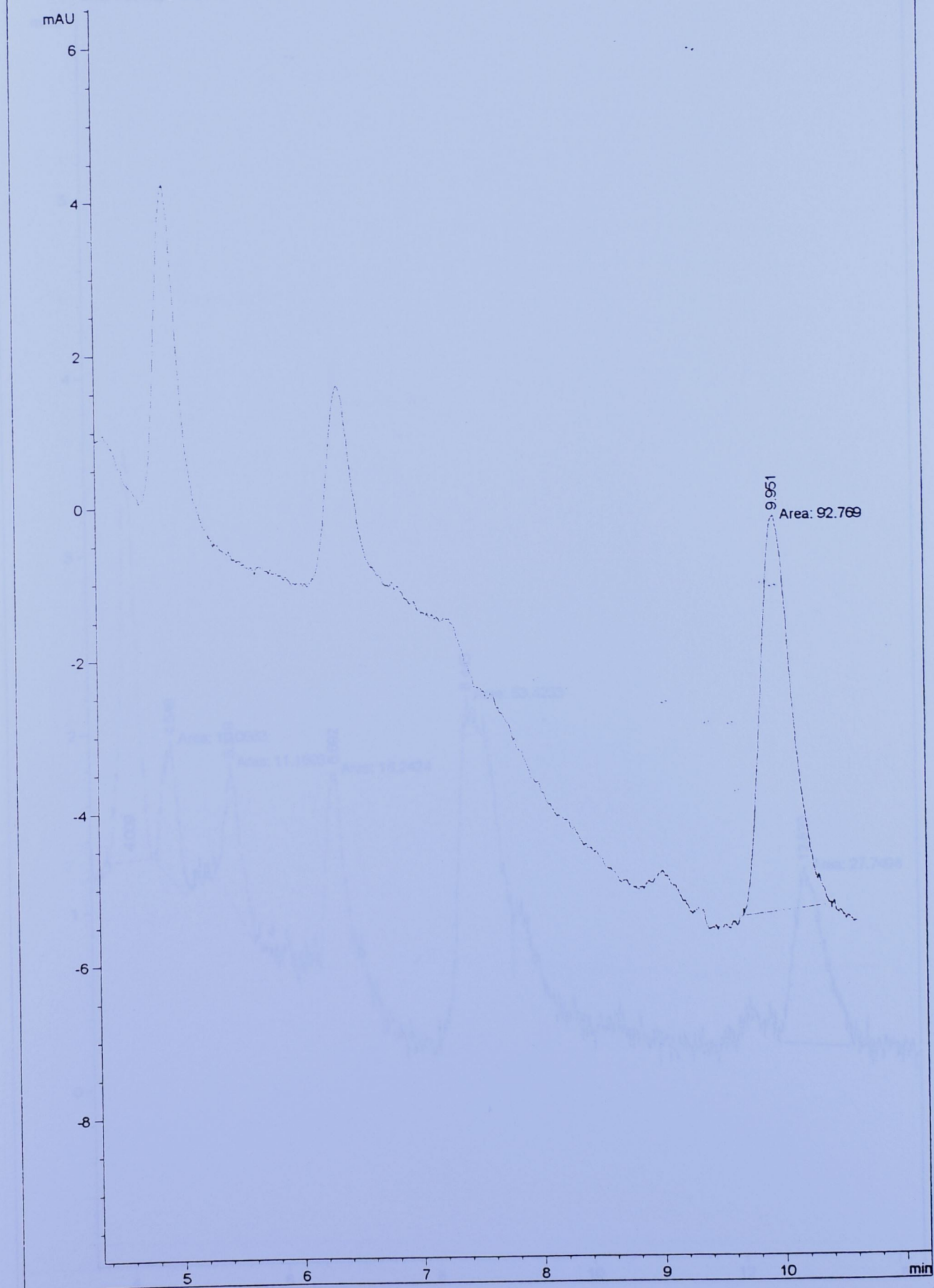
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOSIE718RET.D



Current Chromatogram(s)

Delta 186

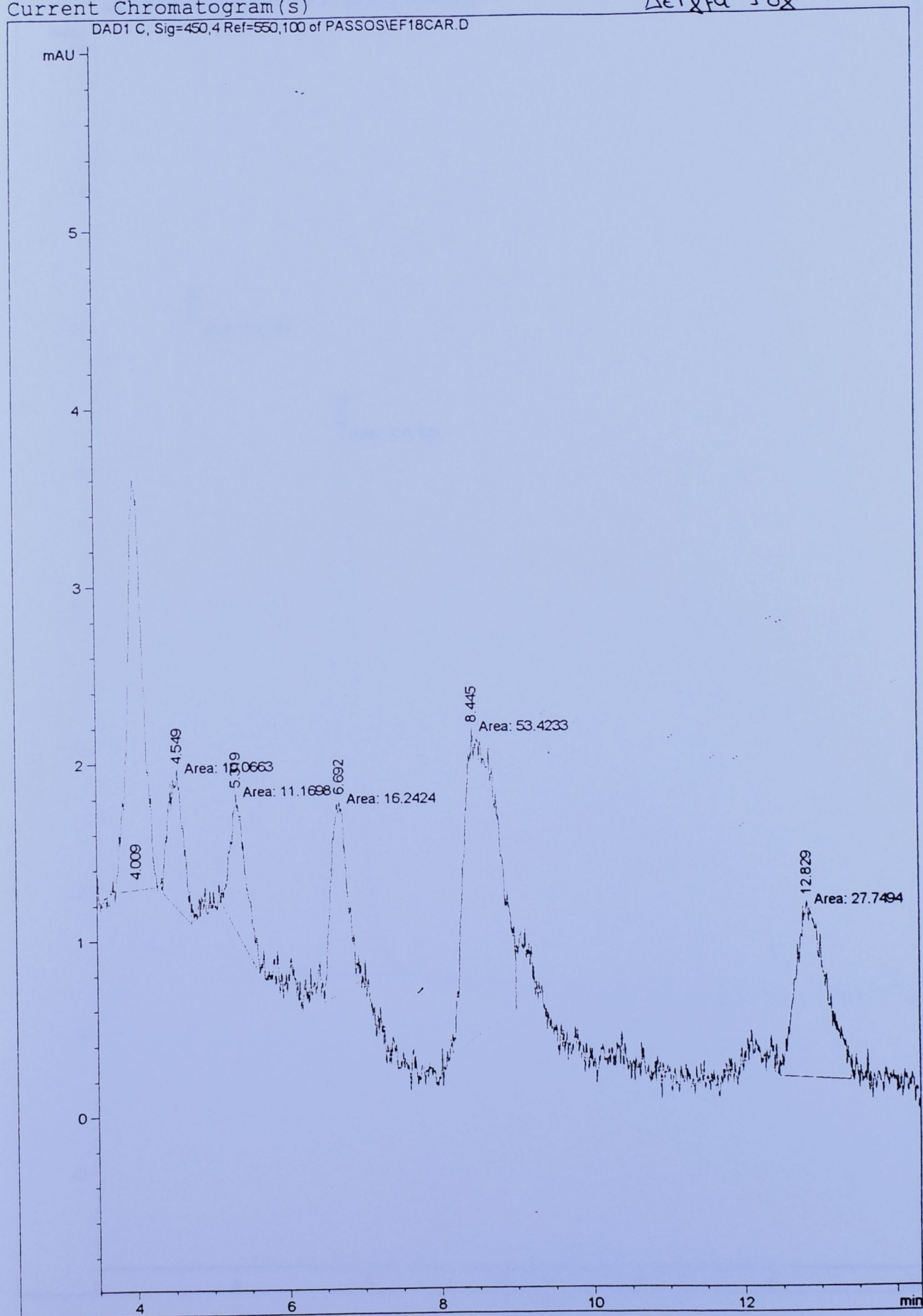
DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF18REF11



Current Chromatogram(s)

Δειγτα 18x

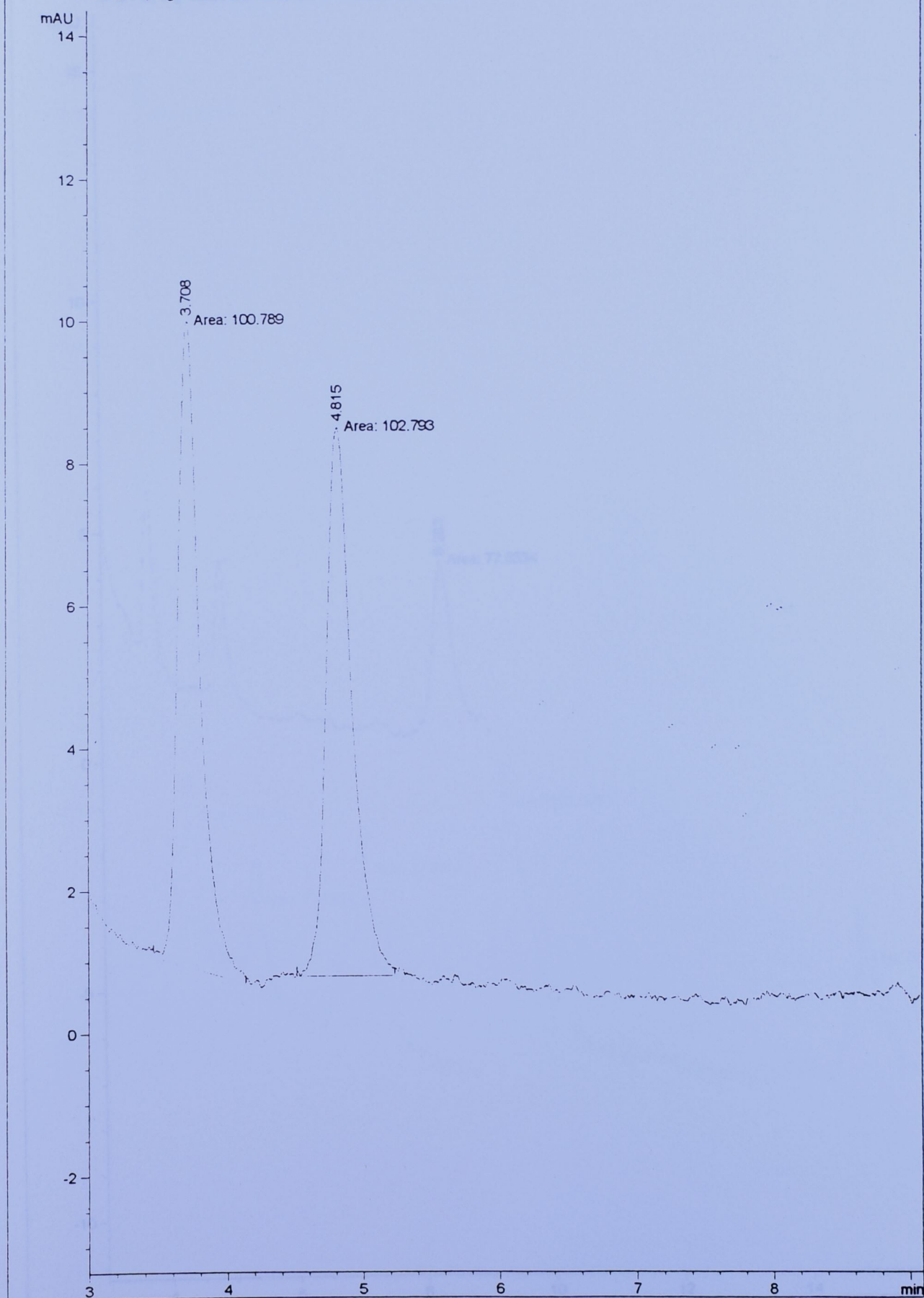
DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOSIEF18CAR.D



Current Chromatogram(s)

Delta 19a

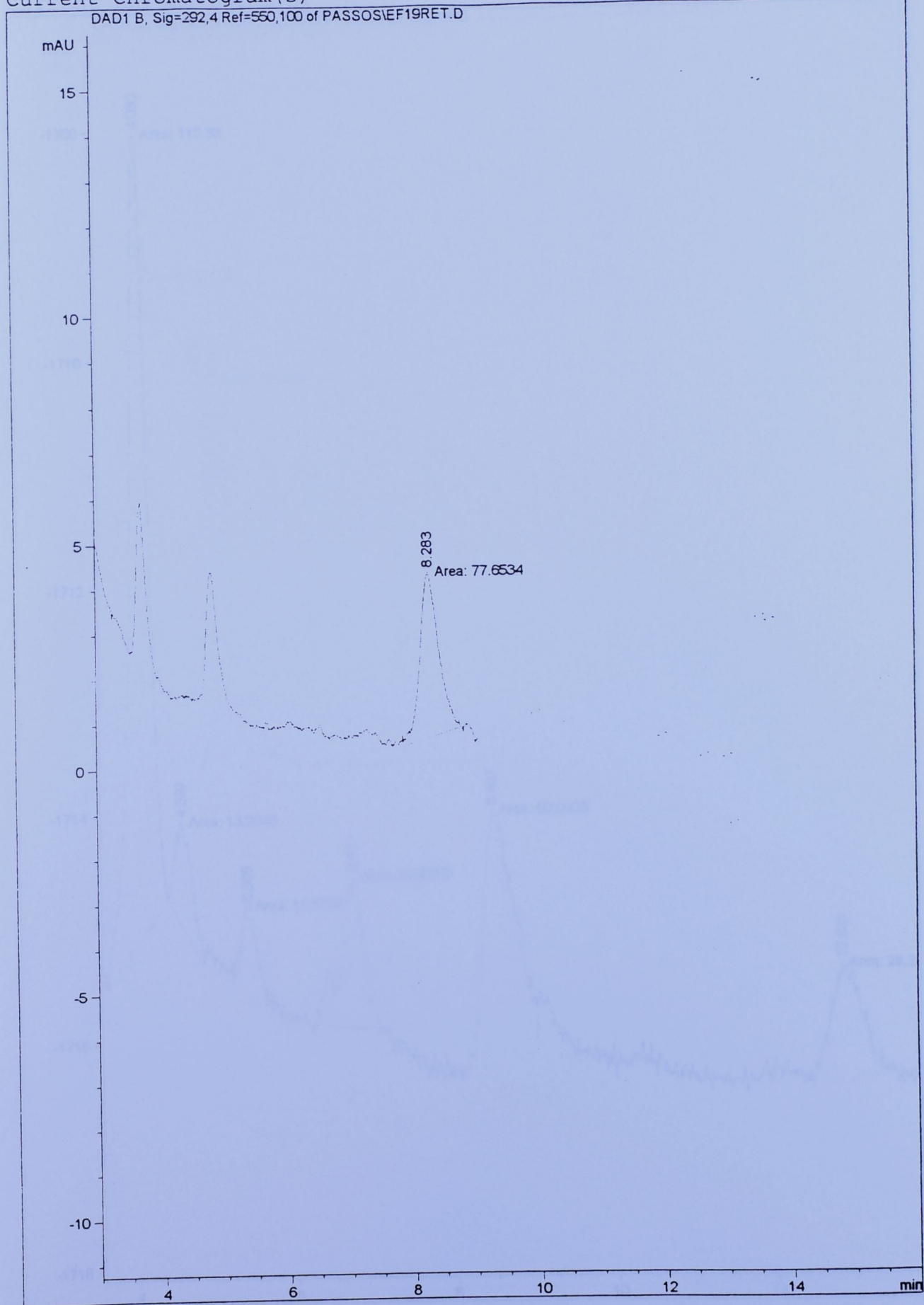
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF19RET.D



Current Chromatogram(s)

Deixa 196

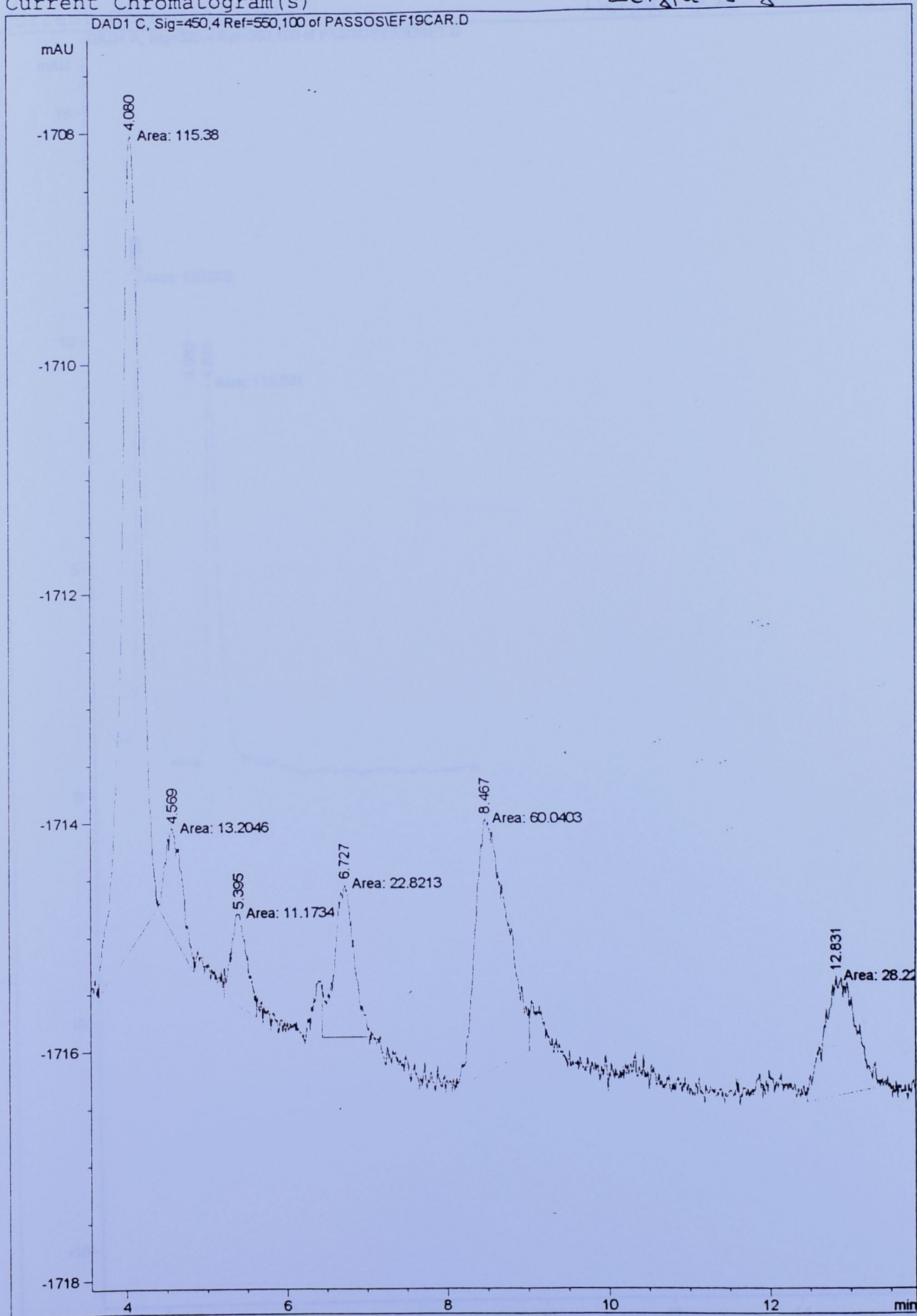
DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOSIEF19RET.D



Current Chromatogram(s)

Delta 198

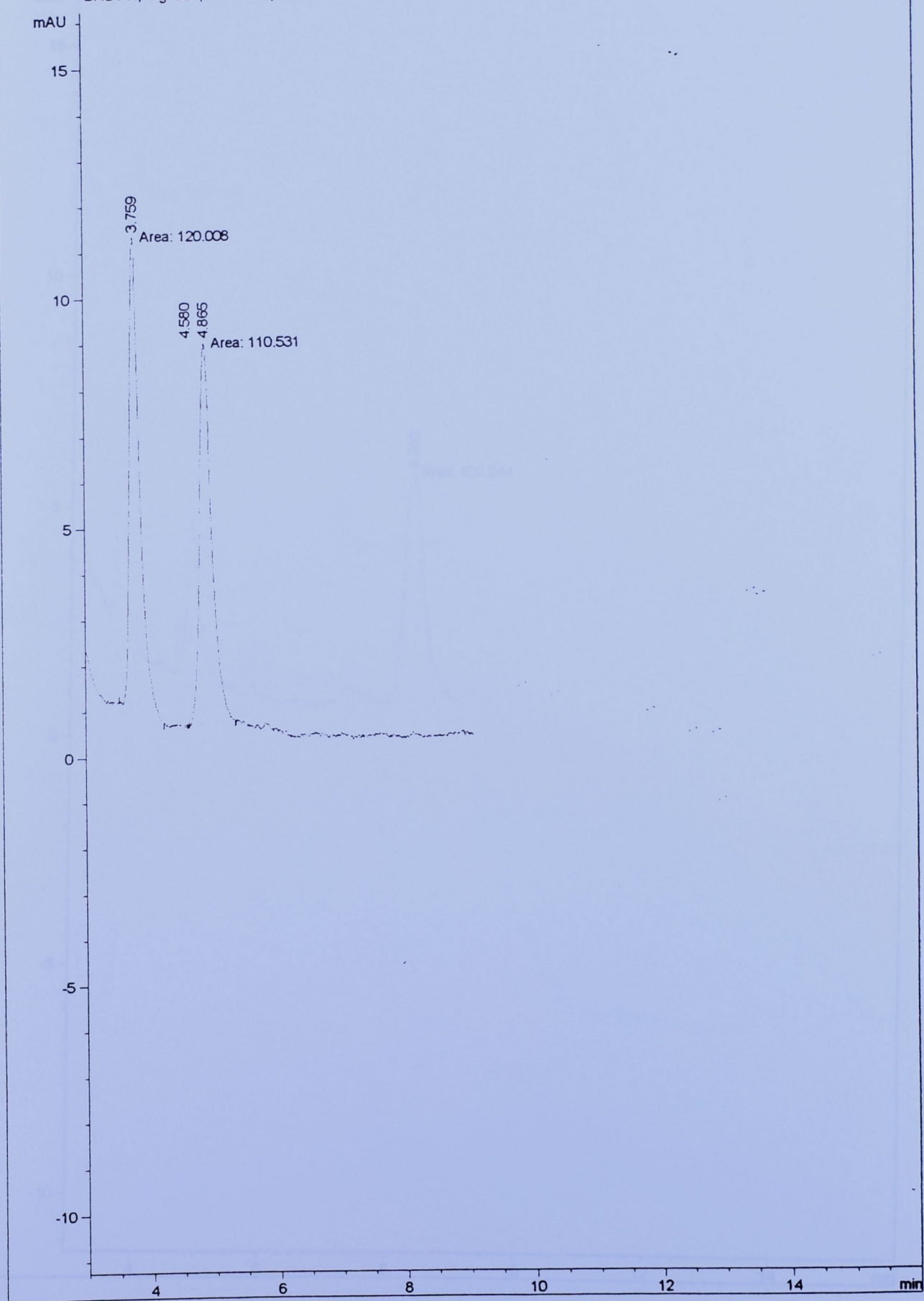
DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF19CAR.D

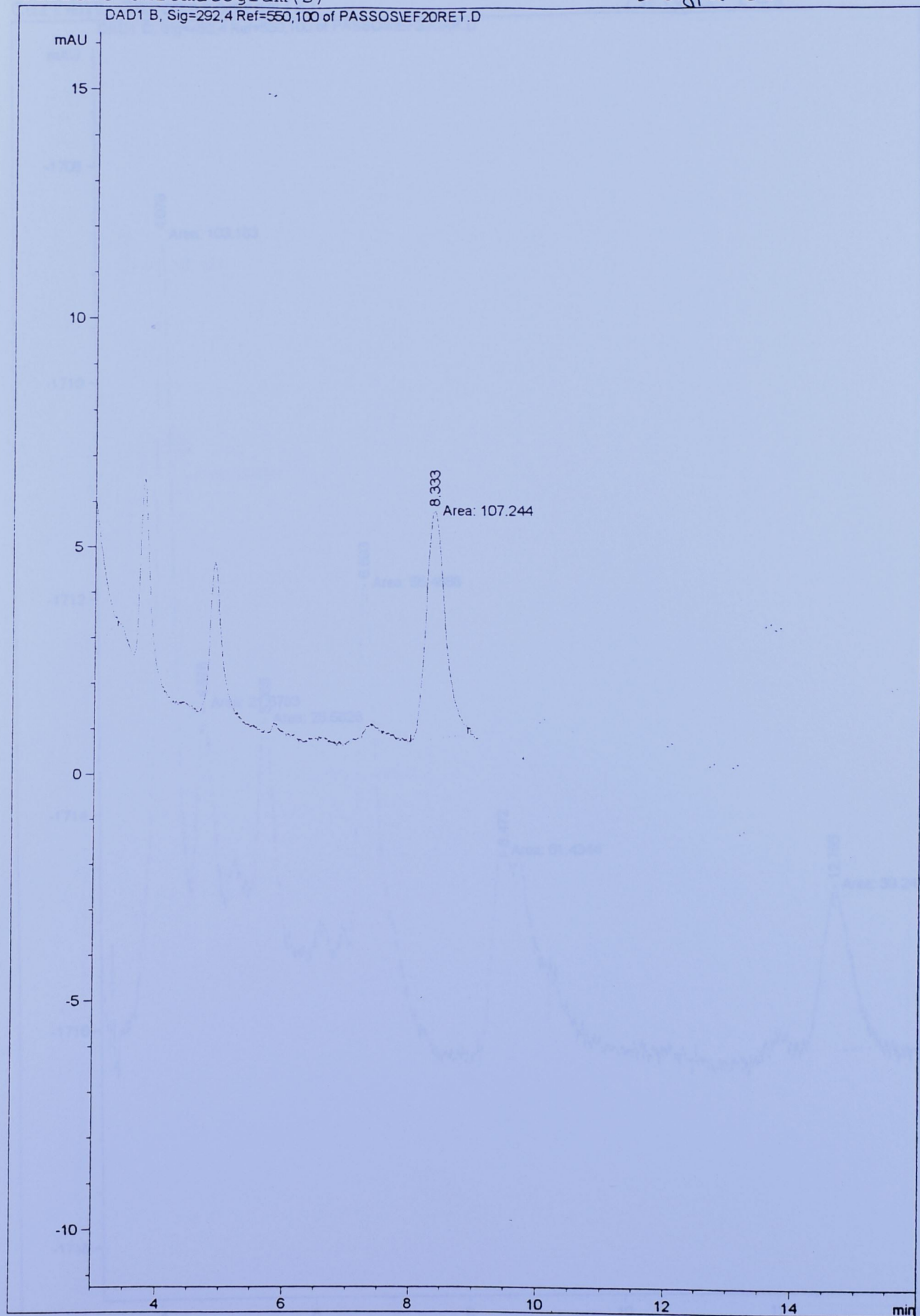


Current Chromatogram(s)

Δcyla 20a

DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOSIEF20RET.D

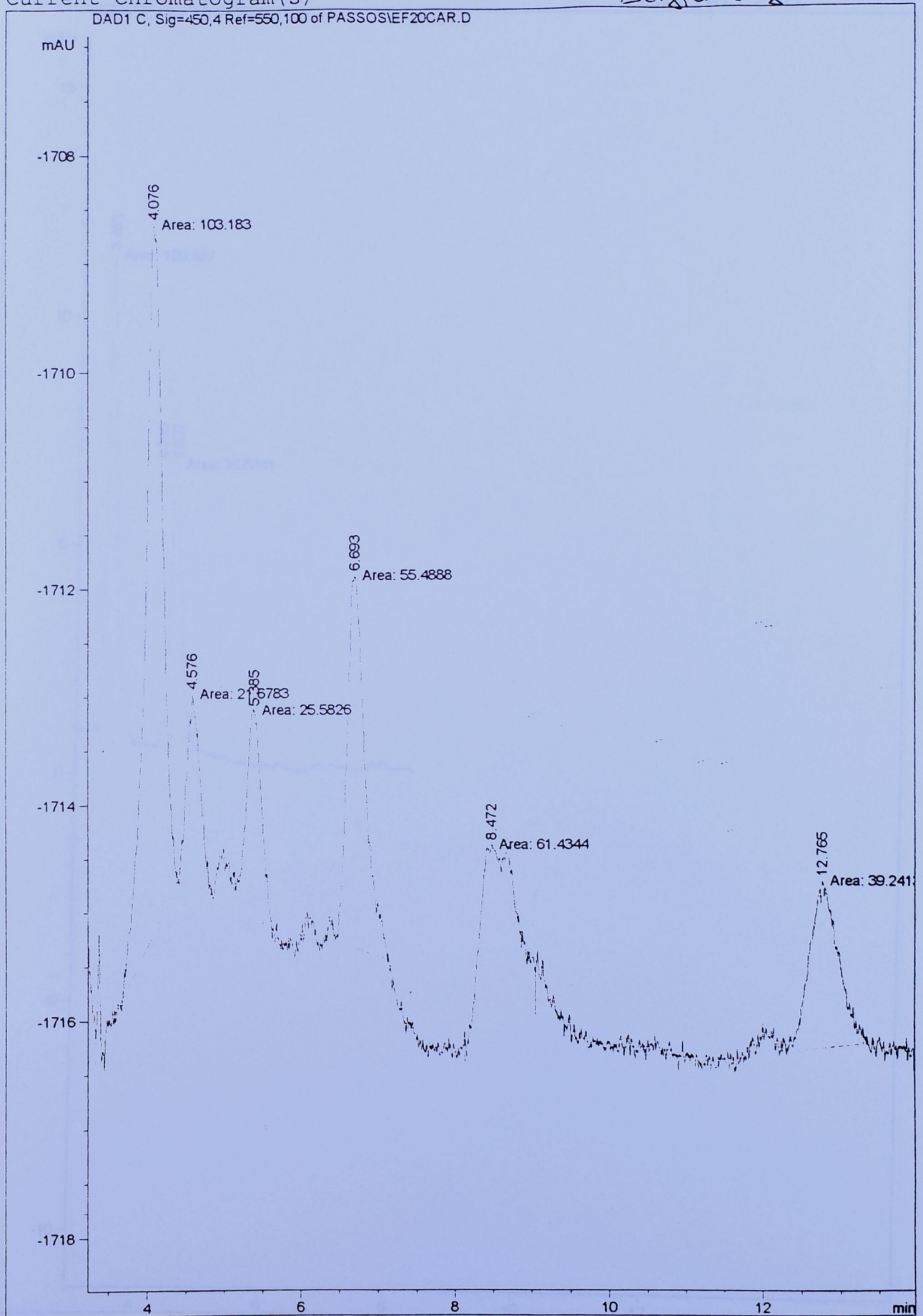




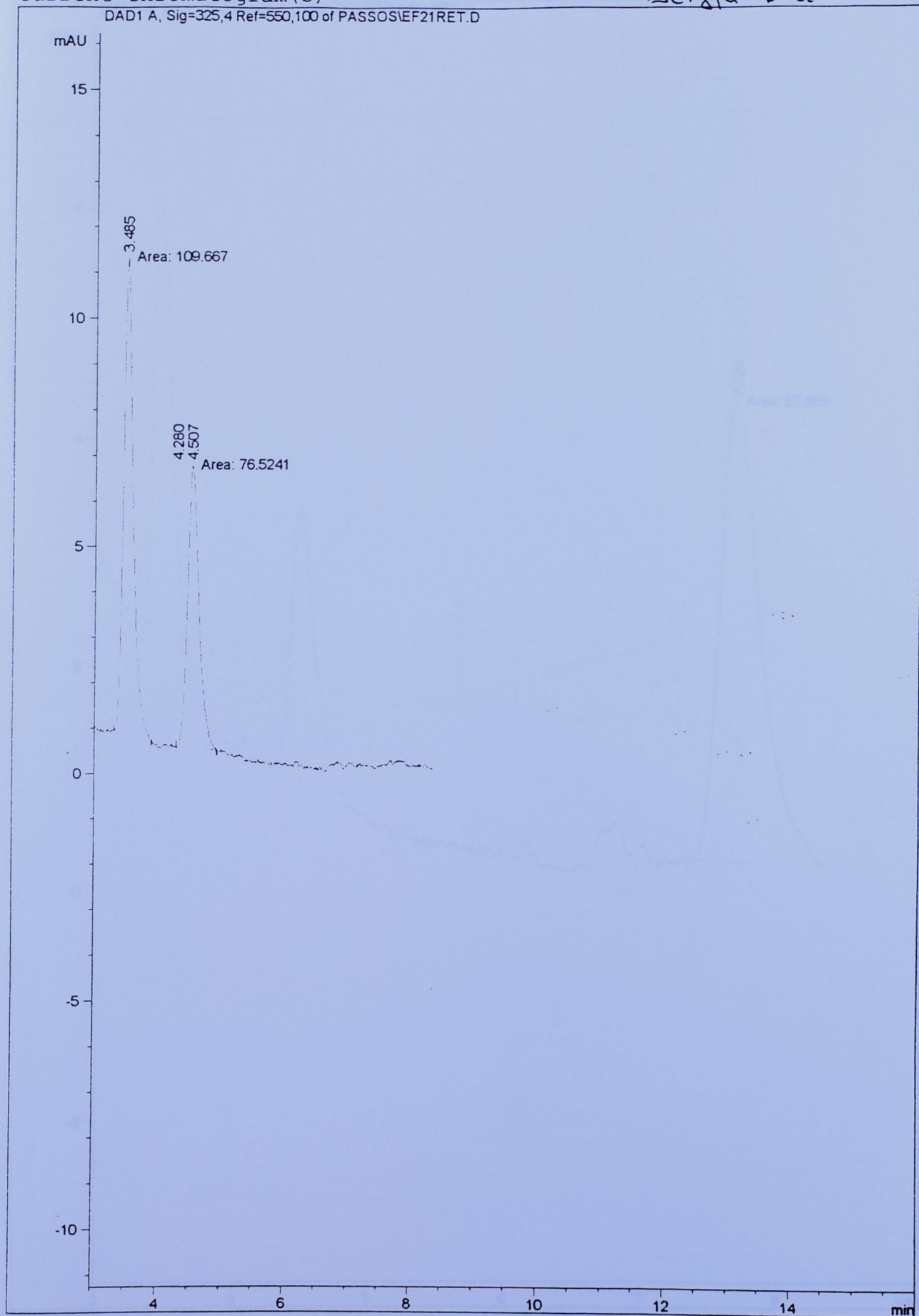
Current Chromatogram(s)

Delta 20x

DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF20CAR.D



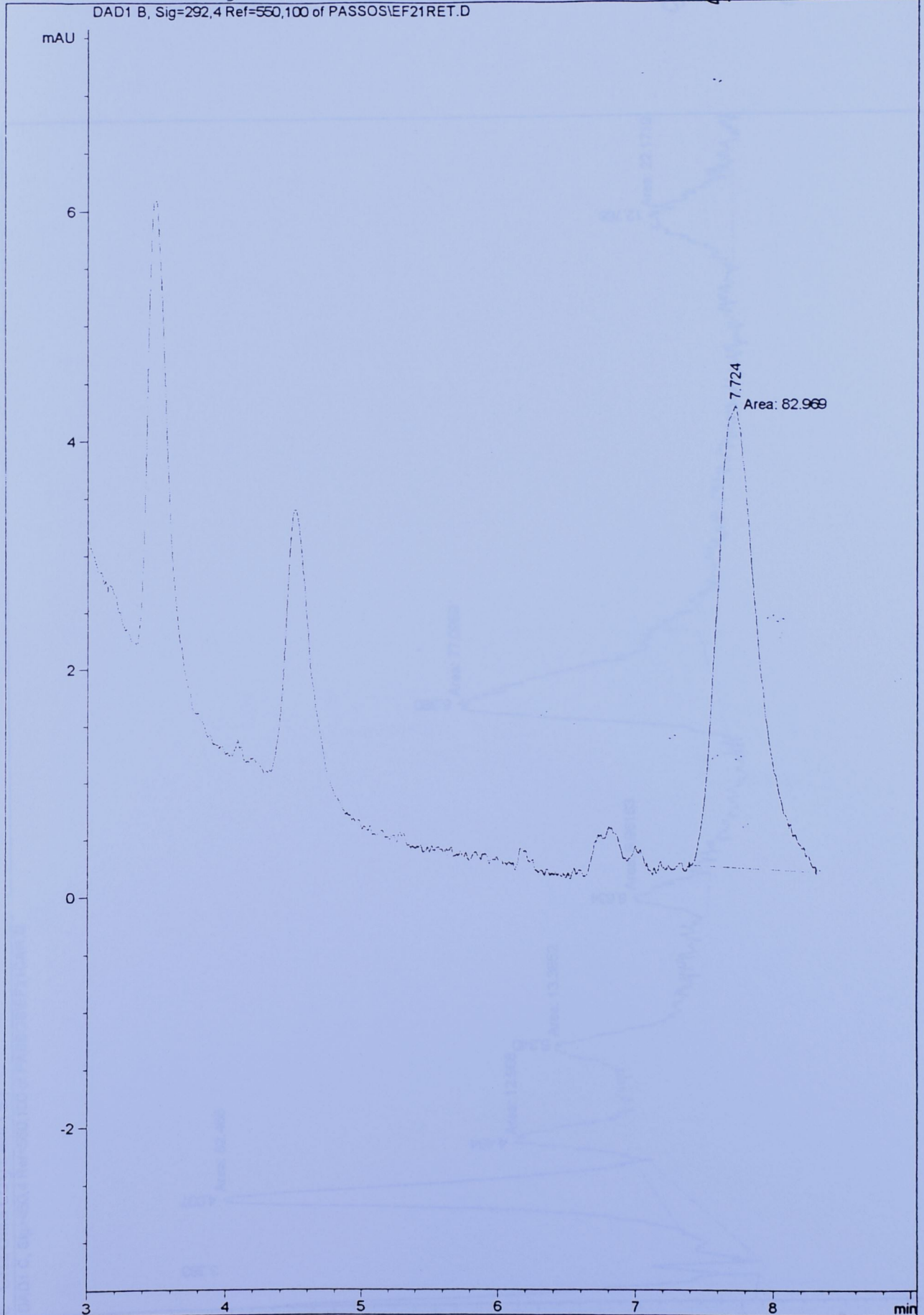
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF21RET.D



Current Chromatogram(s)

Delta 216

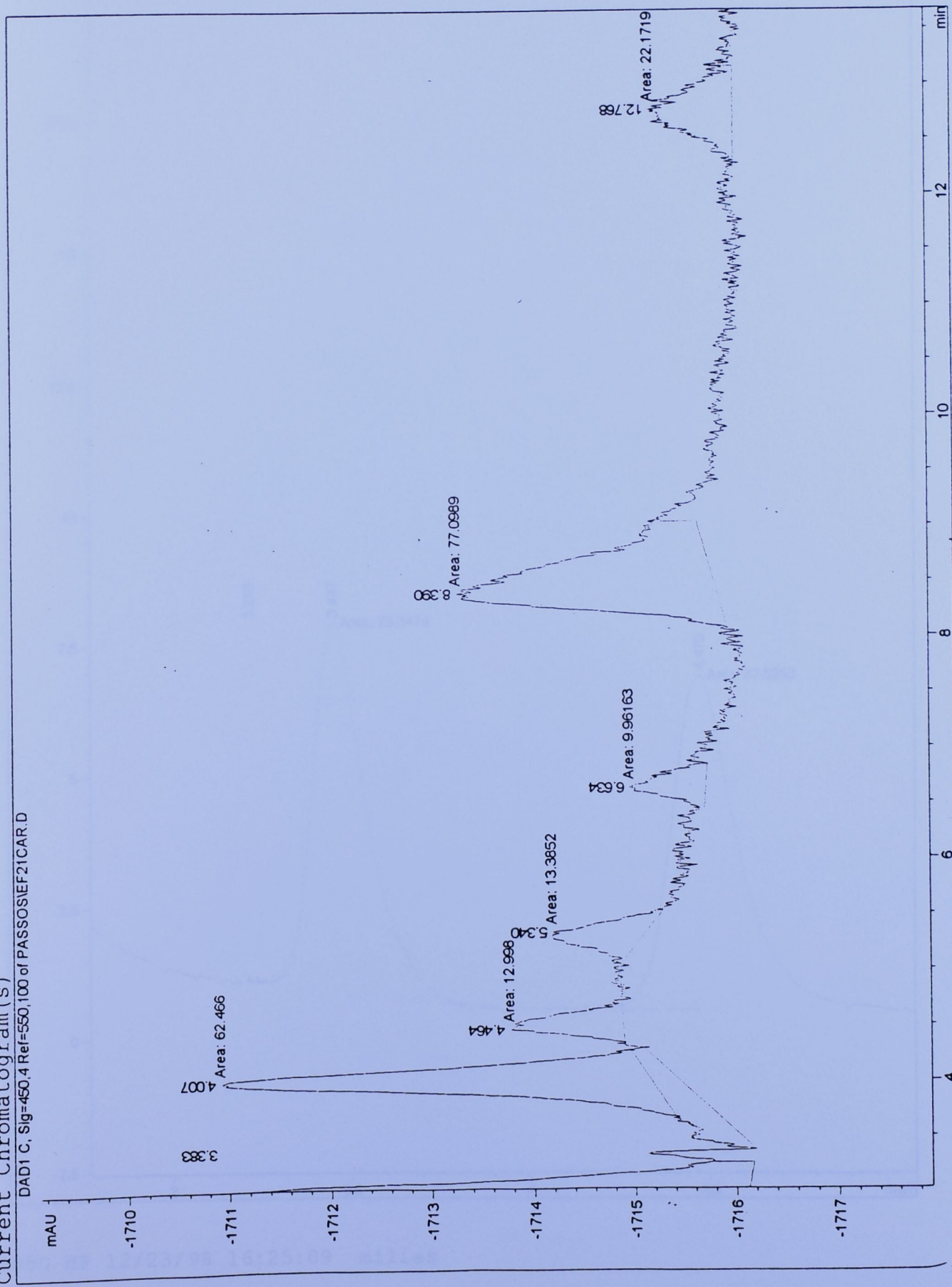
DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF21RET.D



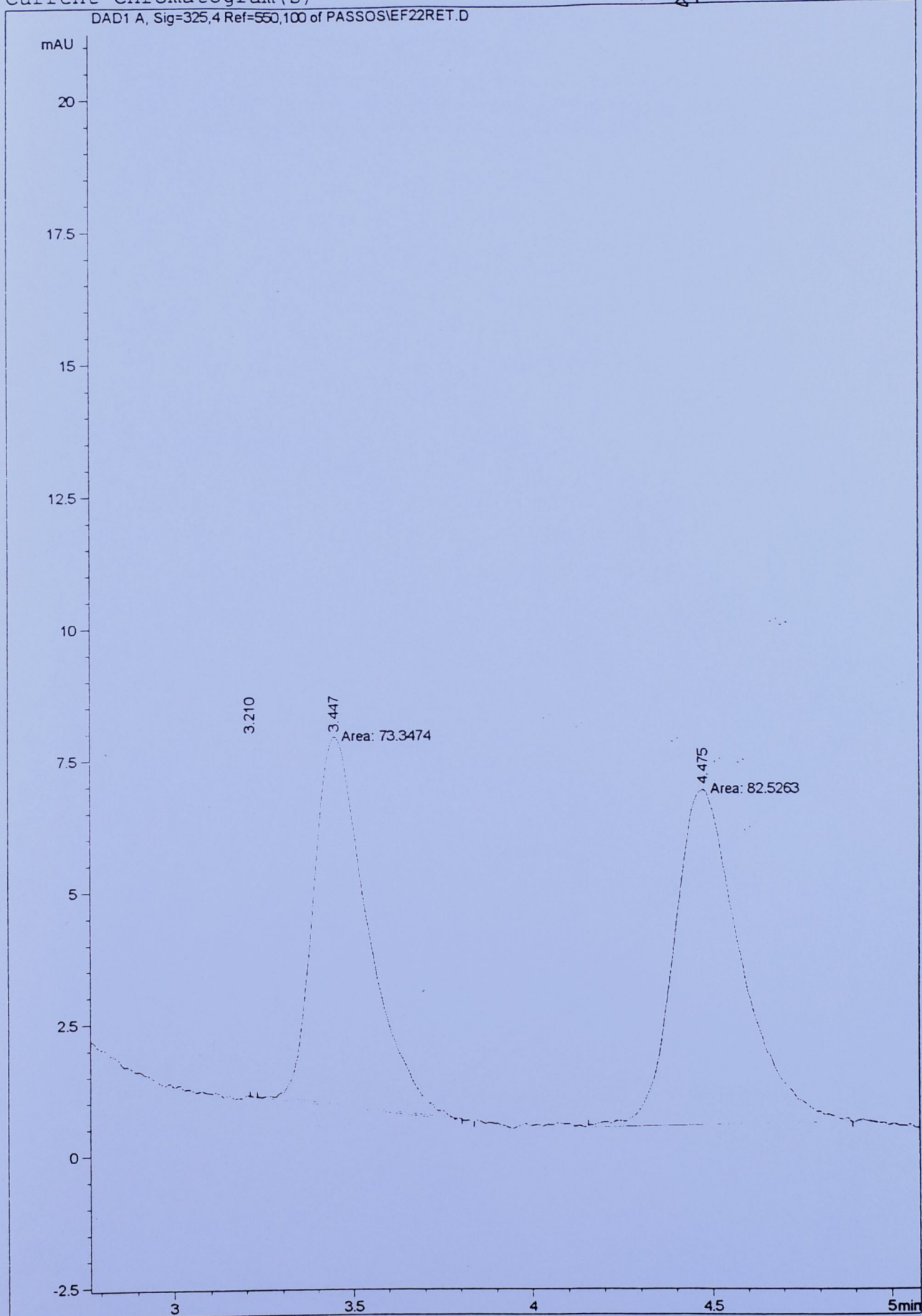
Current Chromatogram(s)

DAD1 C, Sig=450.4 Ref=550.100 of PASSOSIEF21CAR.D

Leigla 218



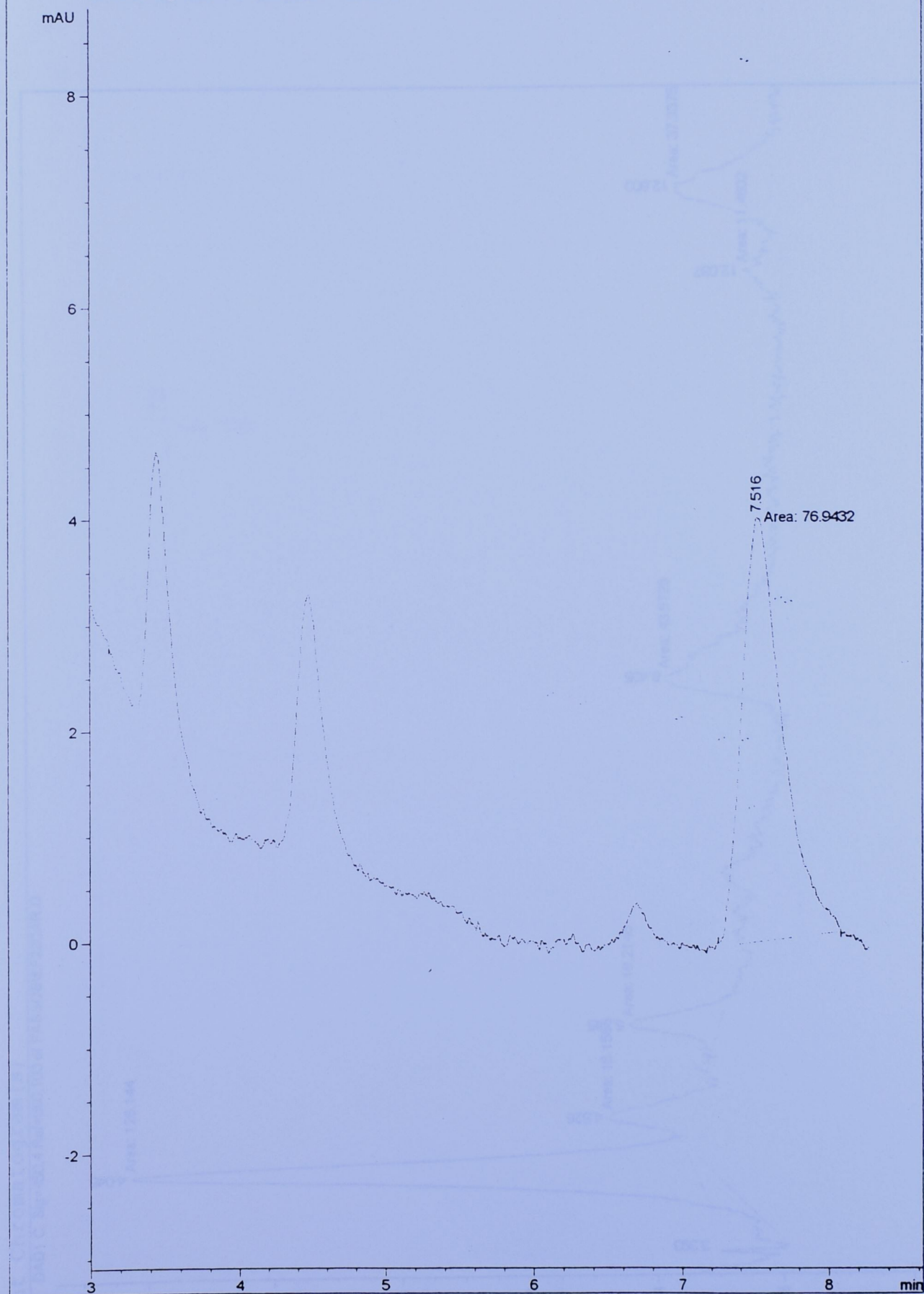
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF22RET.D



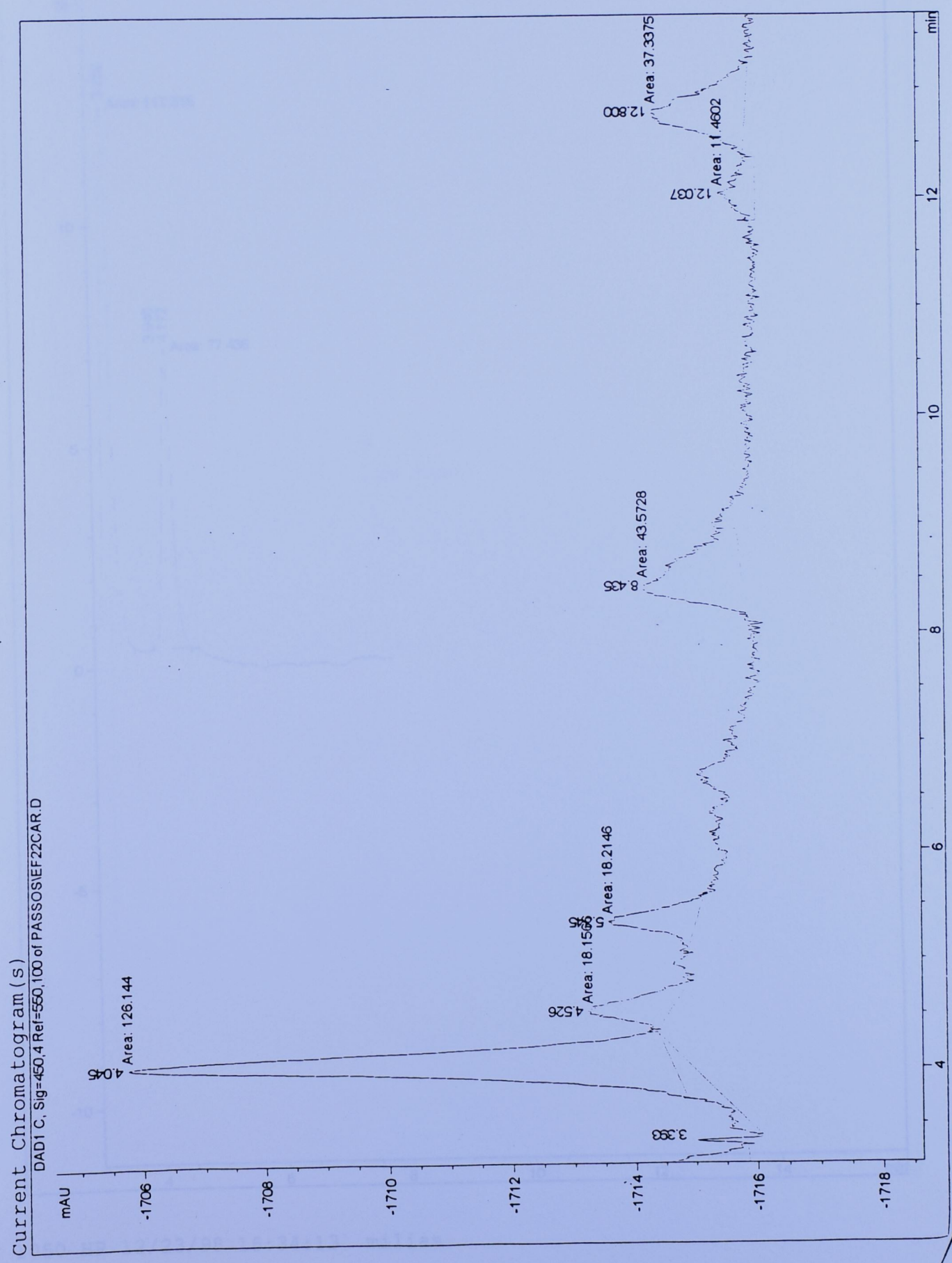
Current Chromatogram(s)

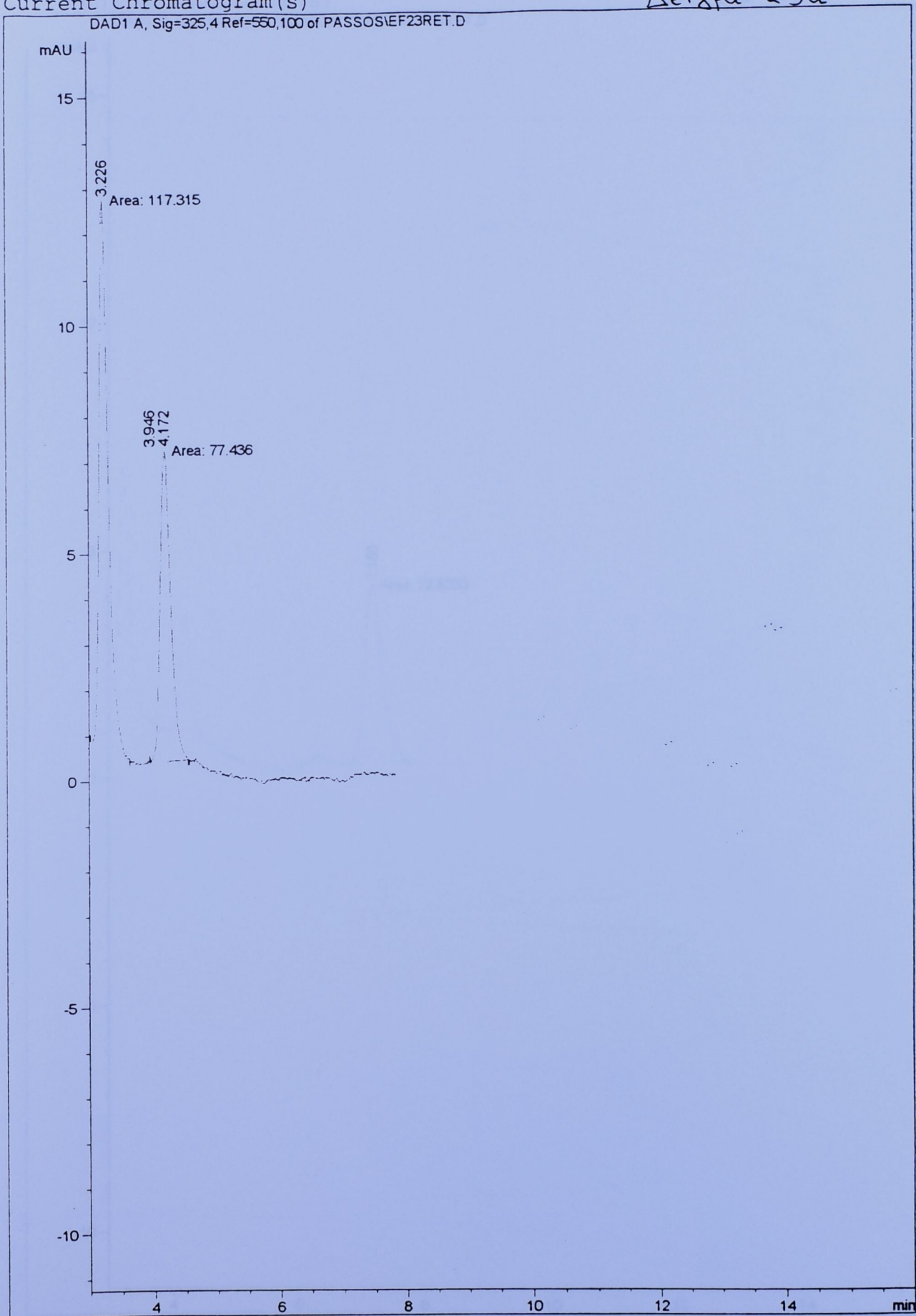
Seiya 22b

DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF22RET.D

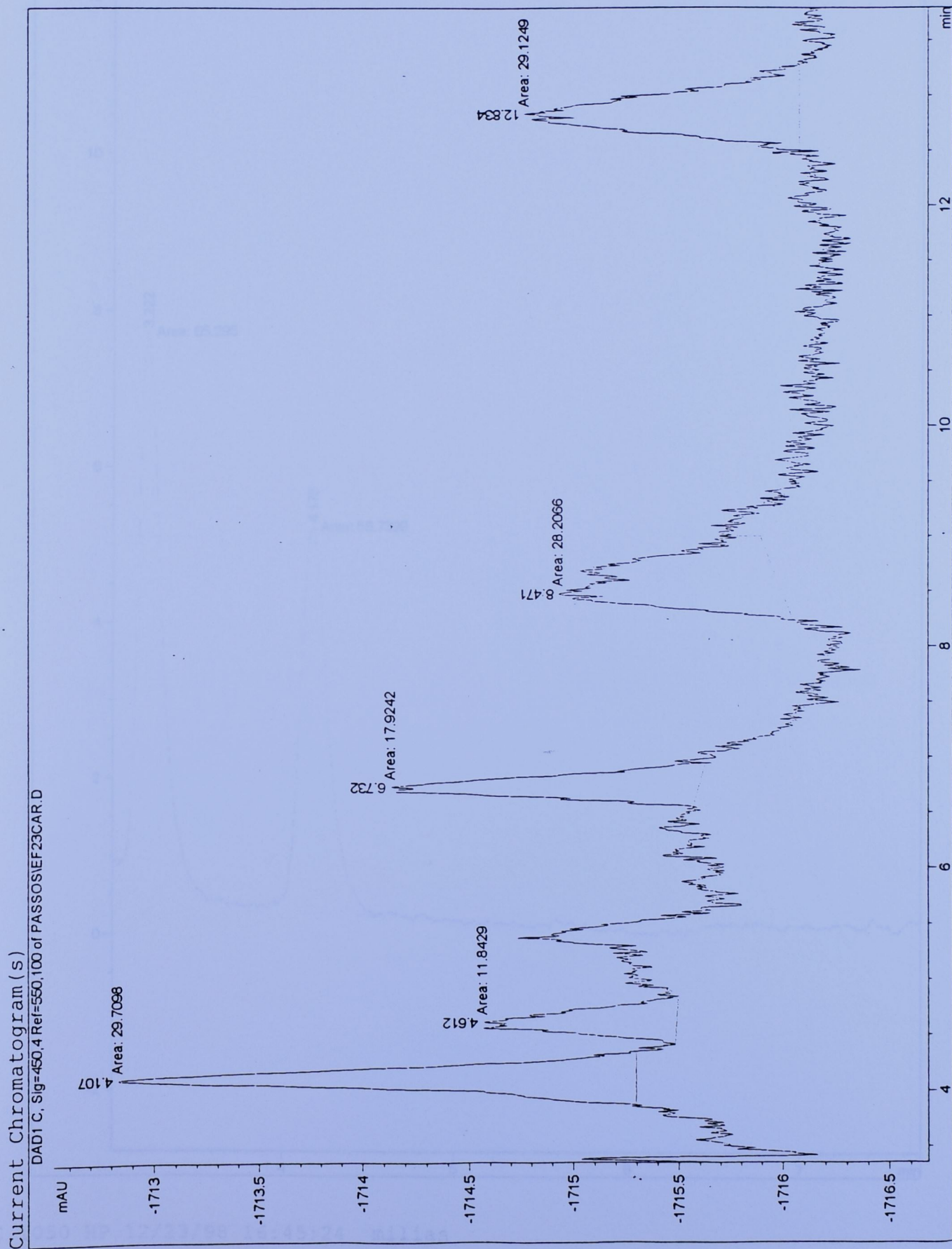


Δε.γ/α 22γ





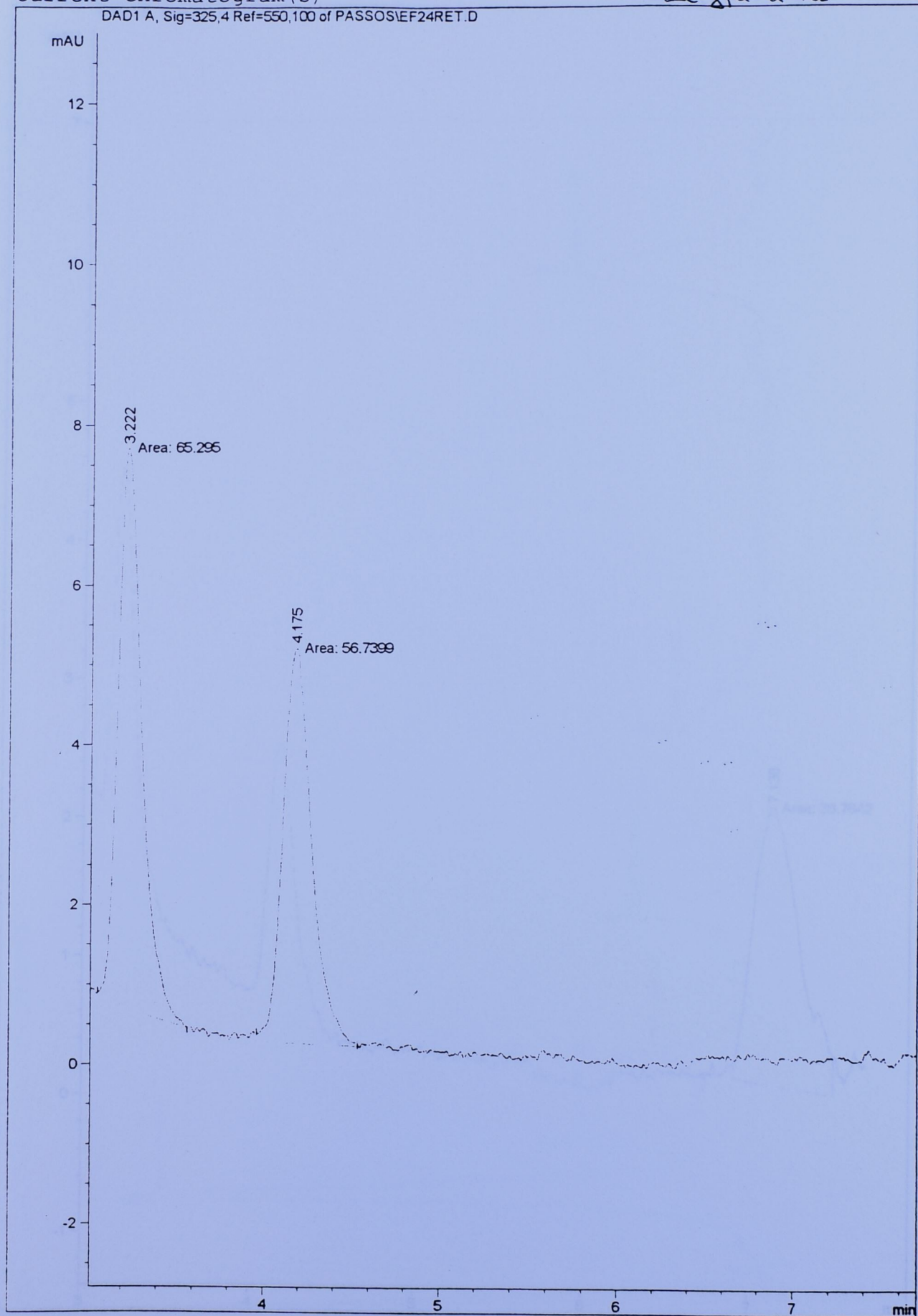




Δείγμα 23γ

Current Chromatogram(s)

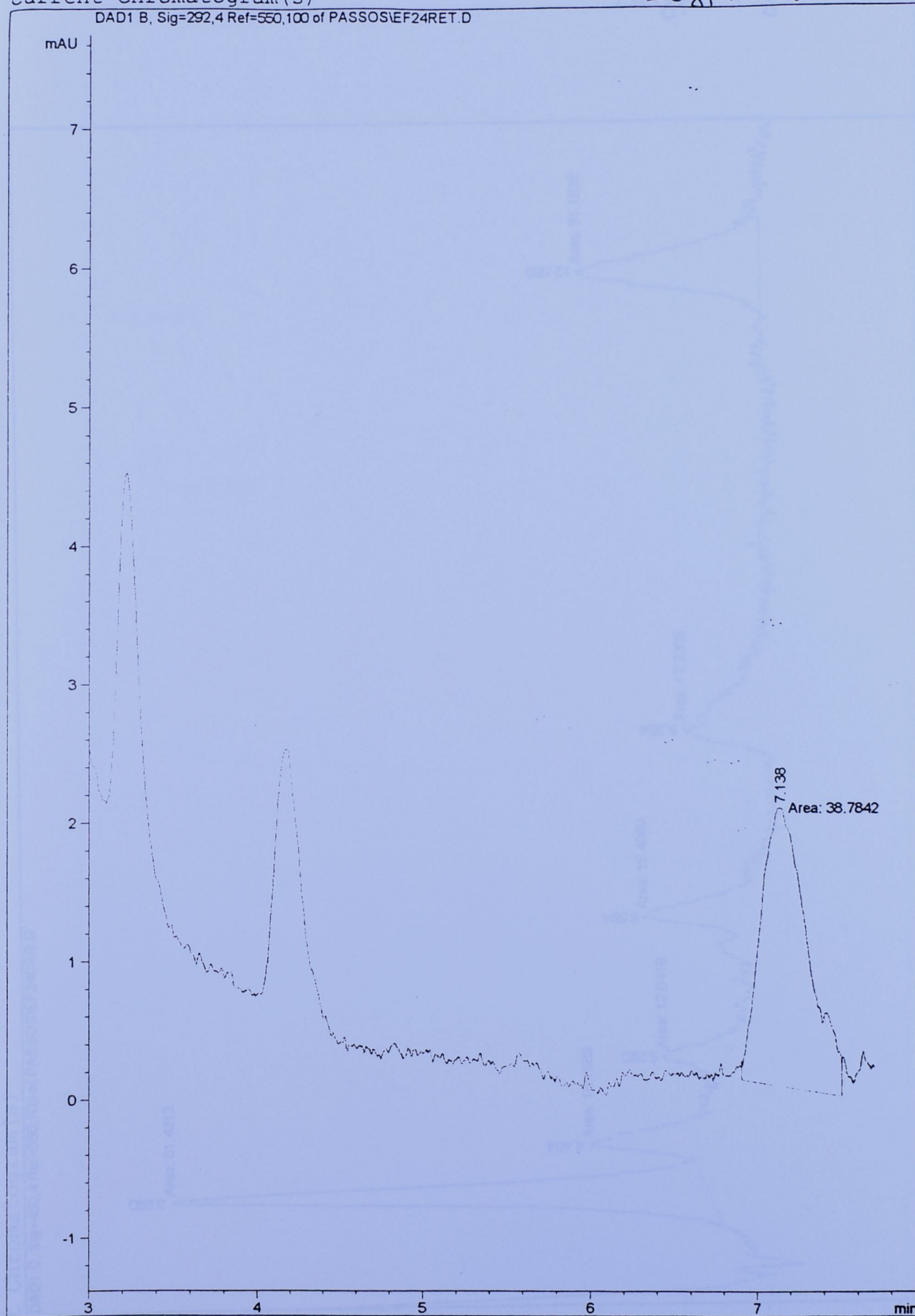
Delta 24a

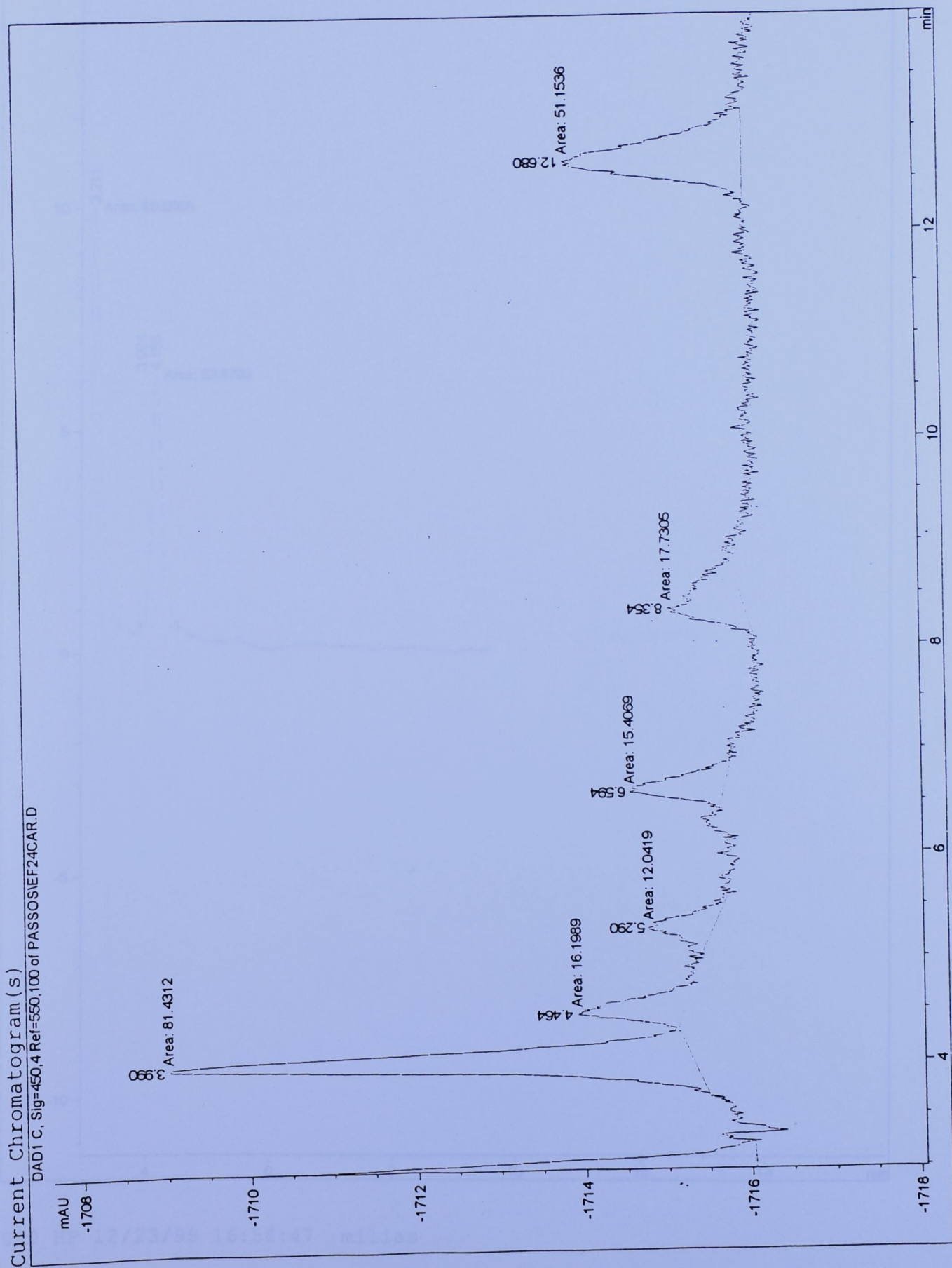


Deixa 248

current Chromatogram(s)

DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOSIEF24RET.D



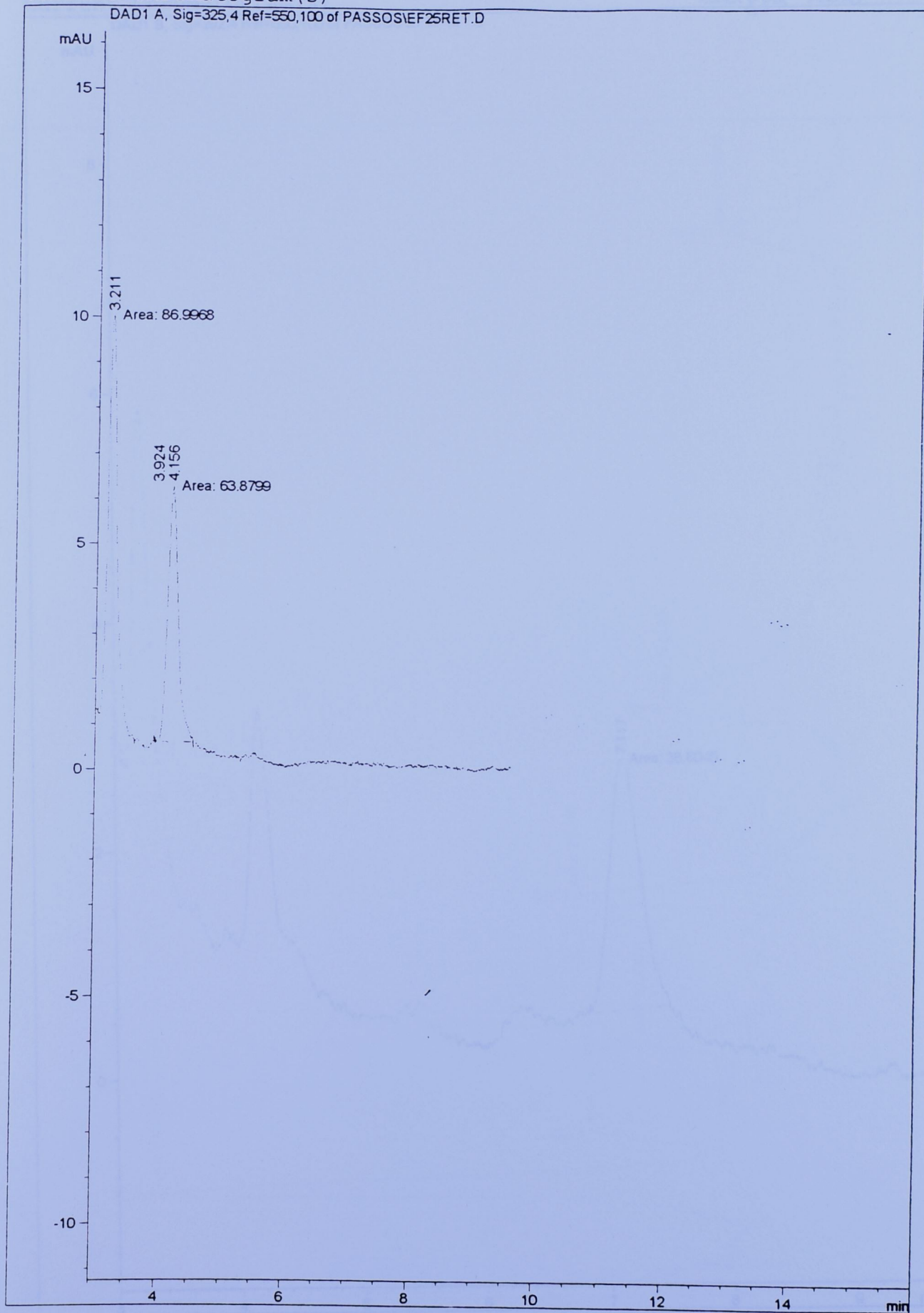


Δειγτα 24γ

Δε.γ/α 25α

Current Chromatogram(s)

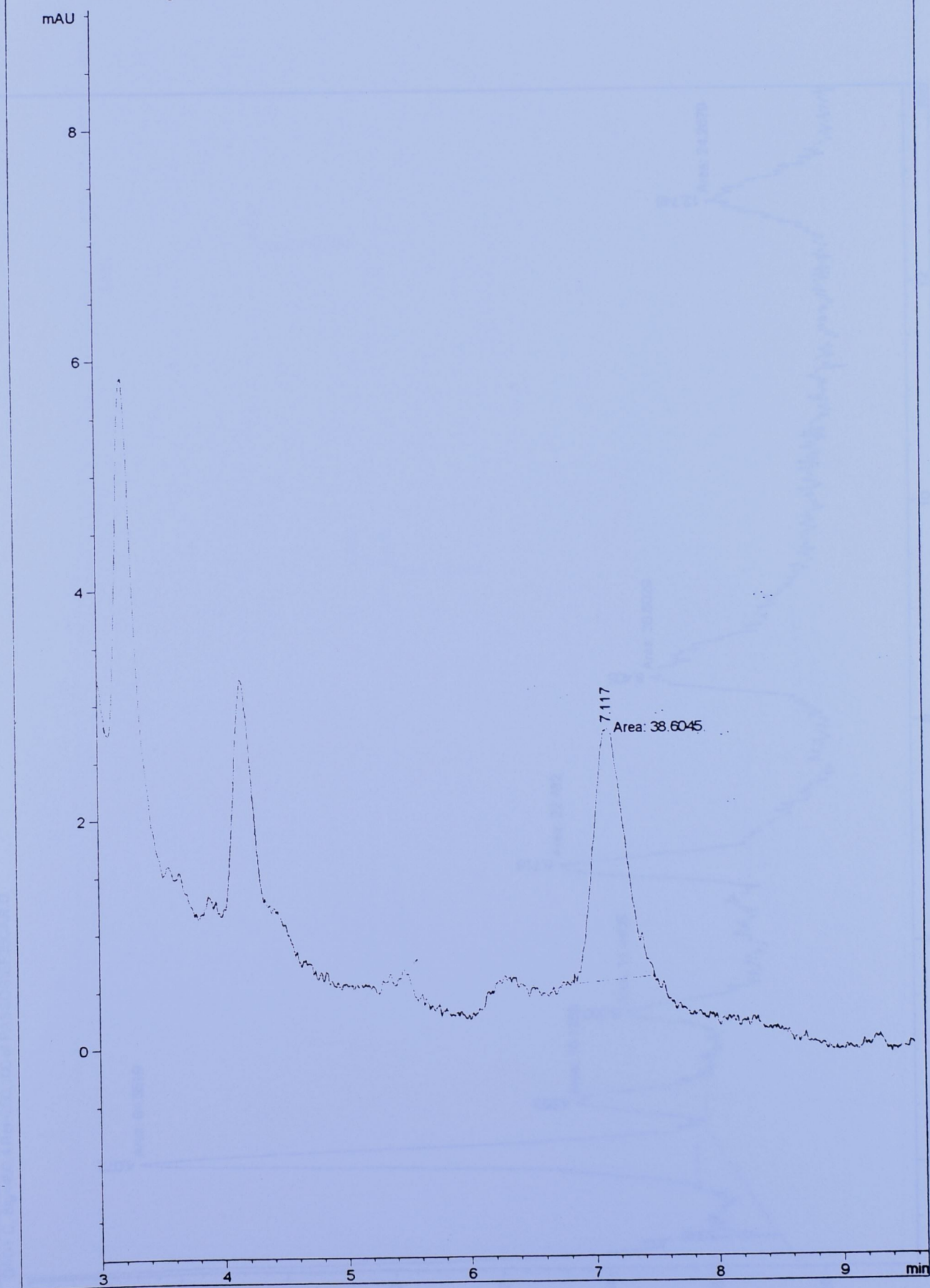
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF25RET.D



Current Chromatogram(s)

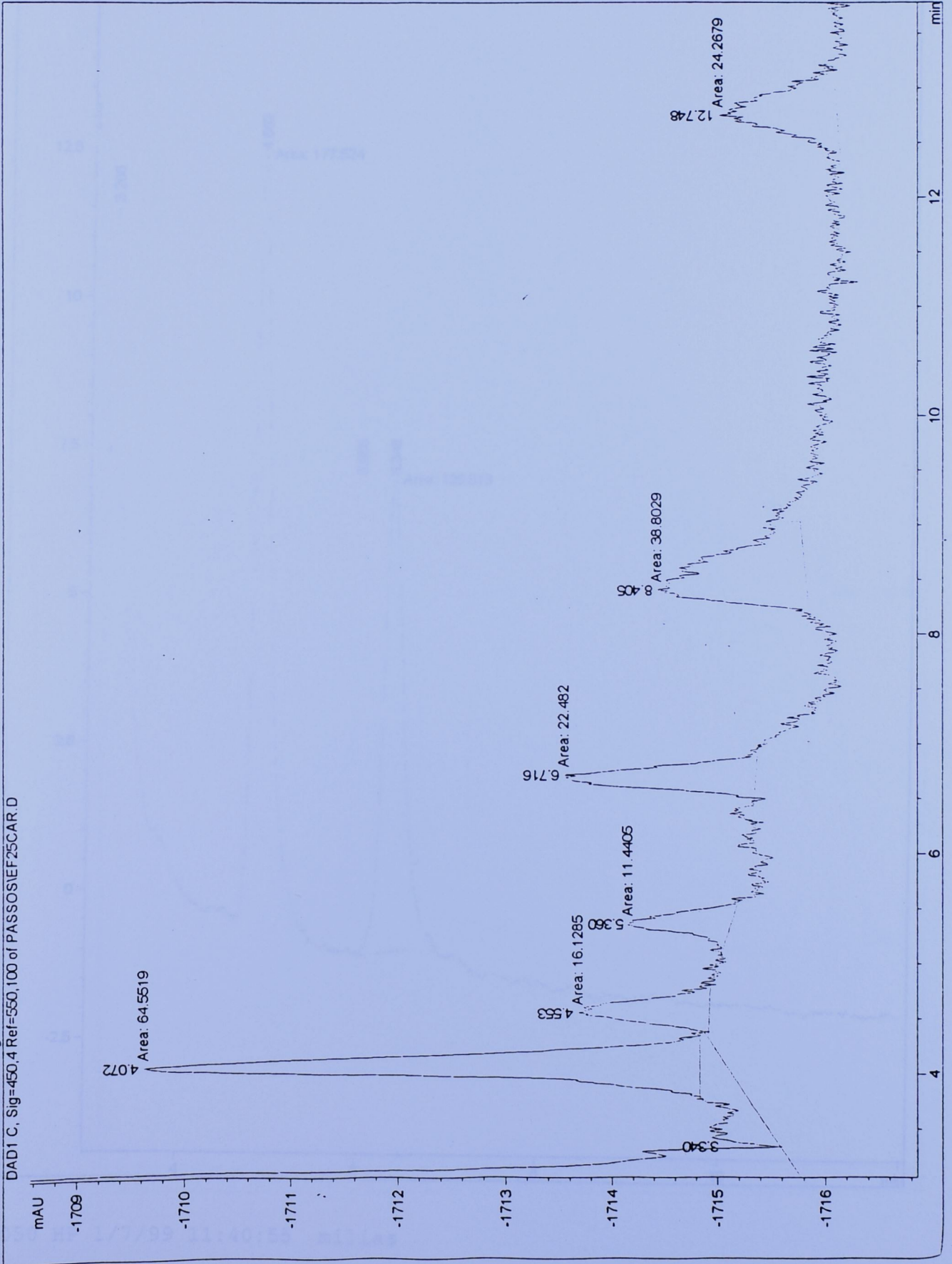
Sigla 25b

DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOSIEF25RET.D



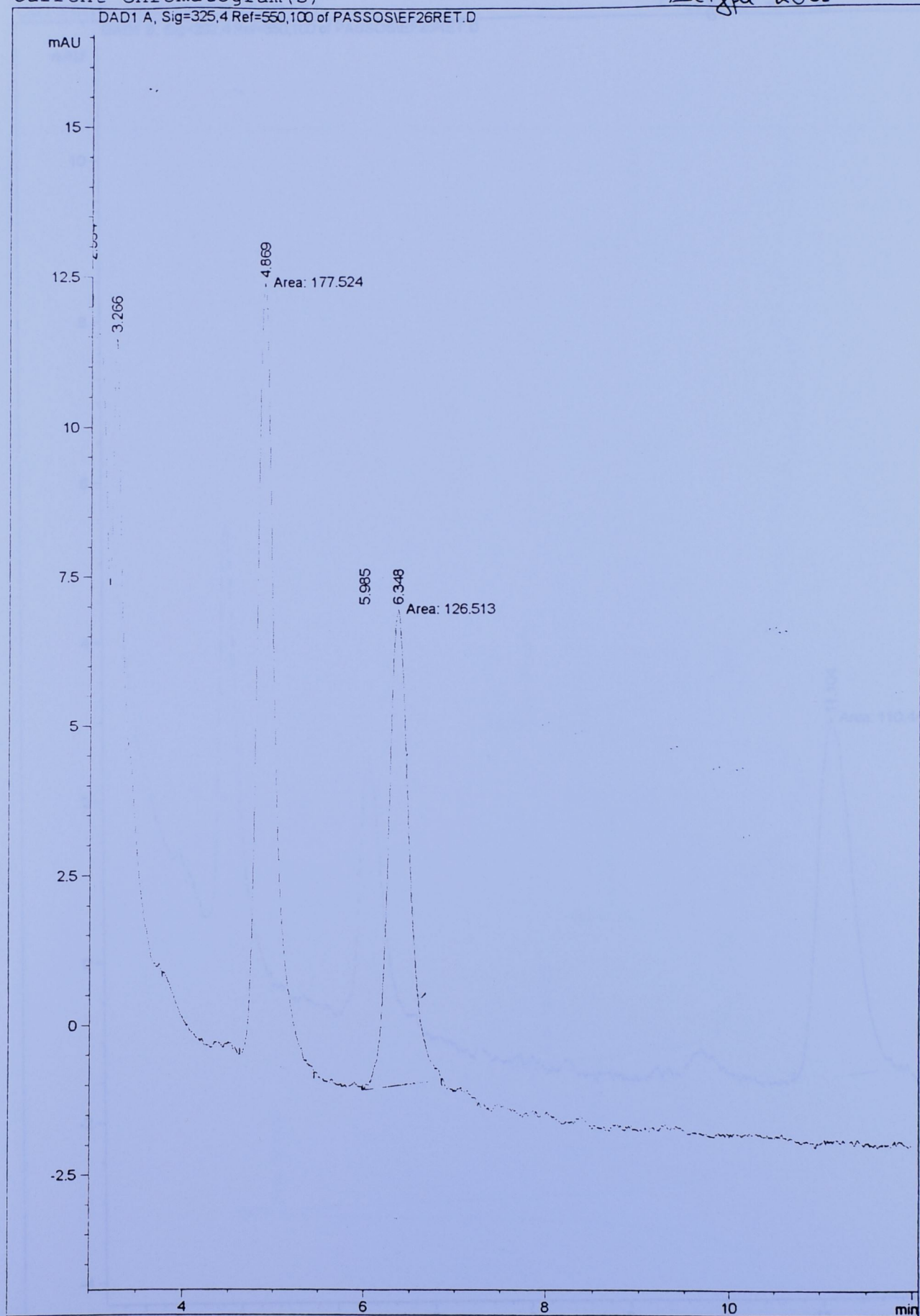
Δείγμα 25γ

Current Chromatogram(s)
DAD1 C, Sig=450.4 Ref=550.100 of PASSOSIEF25CAR.D



12/23/98 13:17:34 milias

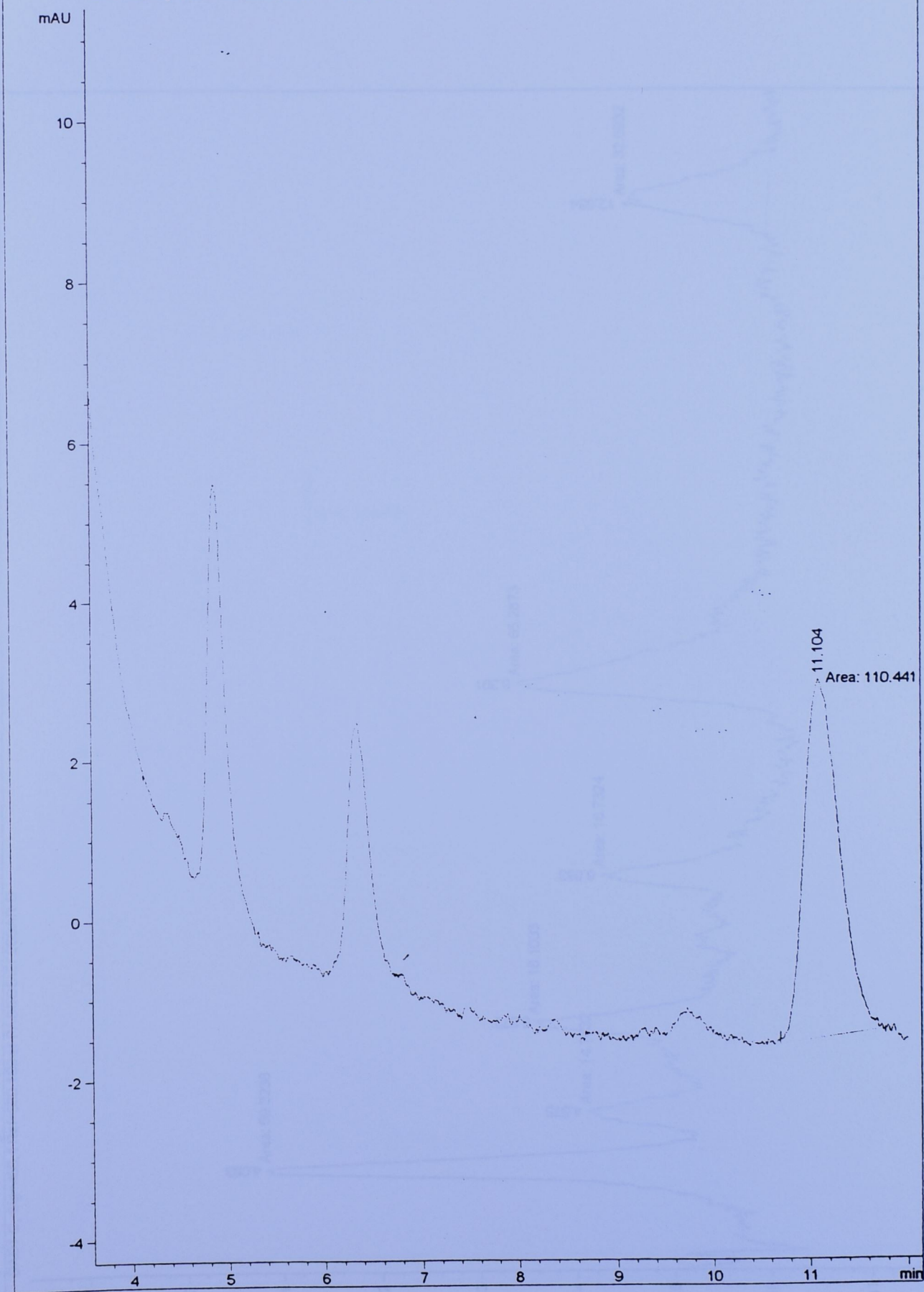
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOSIEF26RET.D



Current Chromatogram(s)

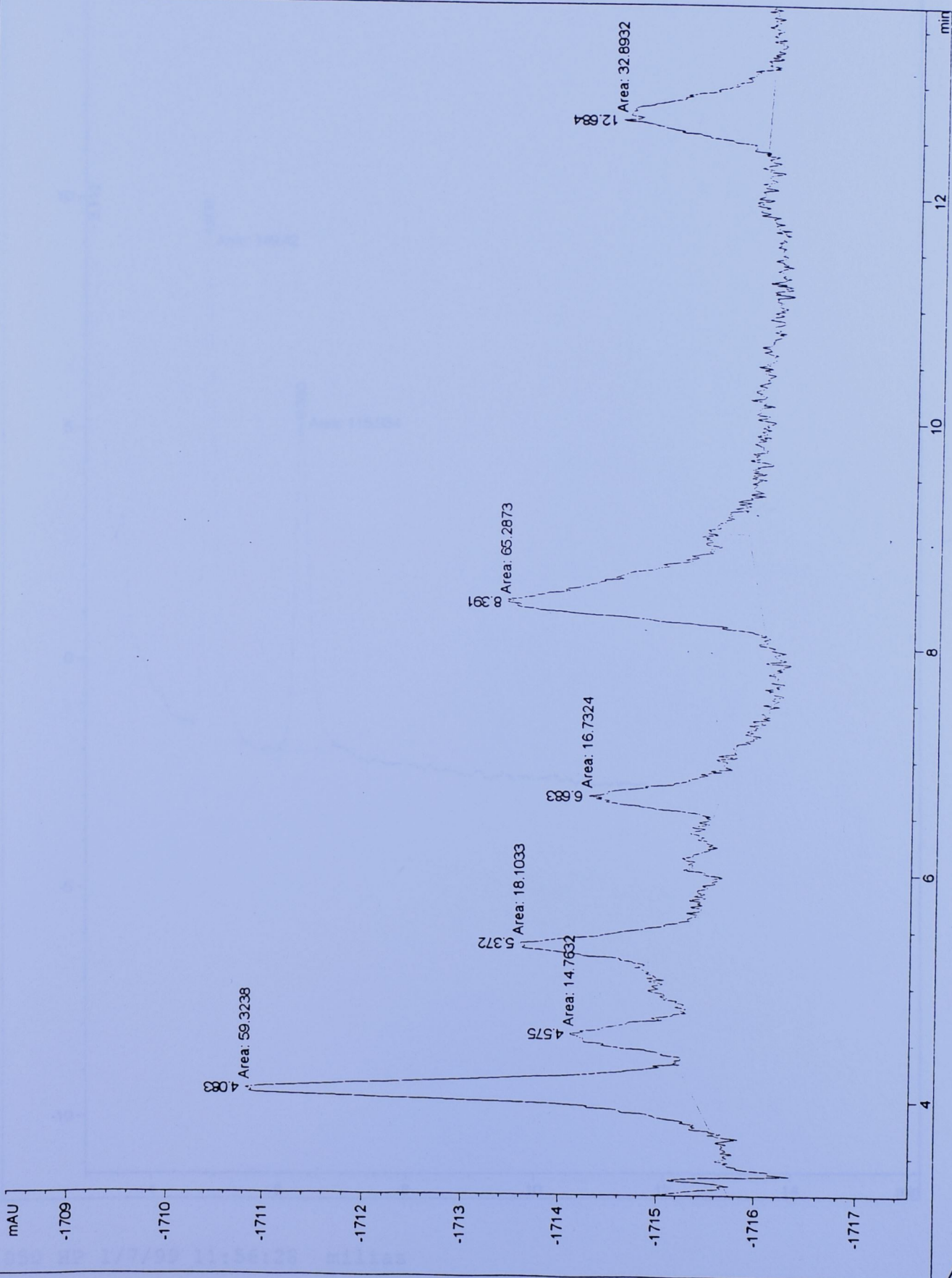
Delta 26b

DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOSIEF26RET.D



Current Chromatogram(s)

DAD1 C, Sig=450.4 Ref=550.100 of PASSOSIEF26CAR.D

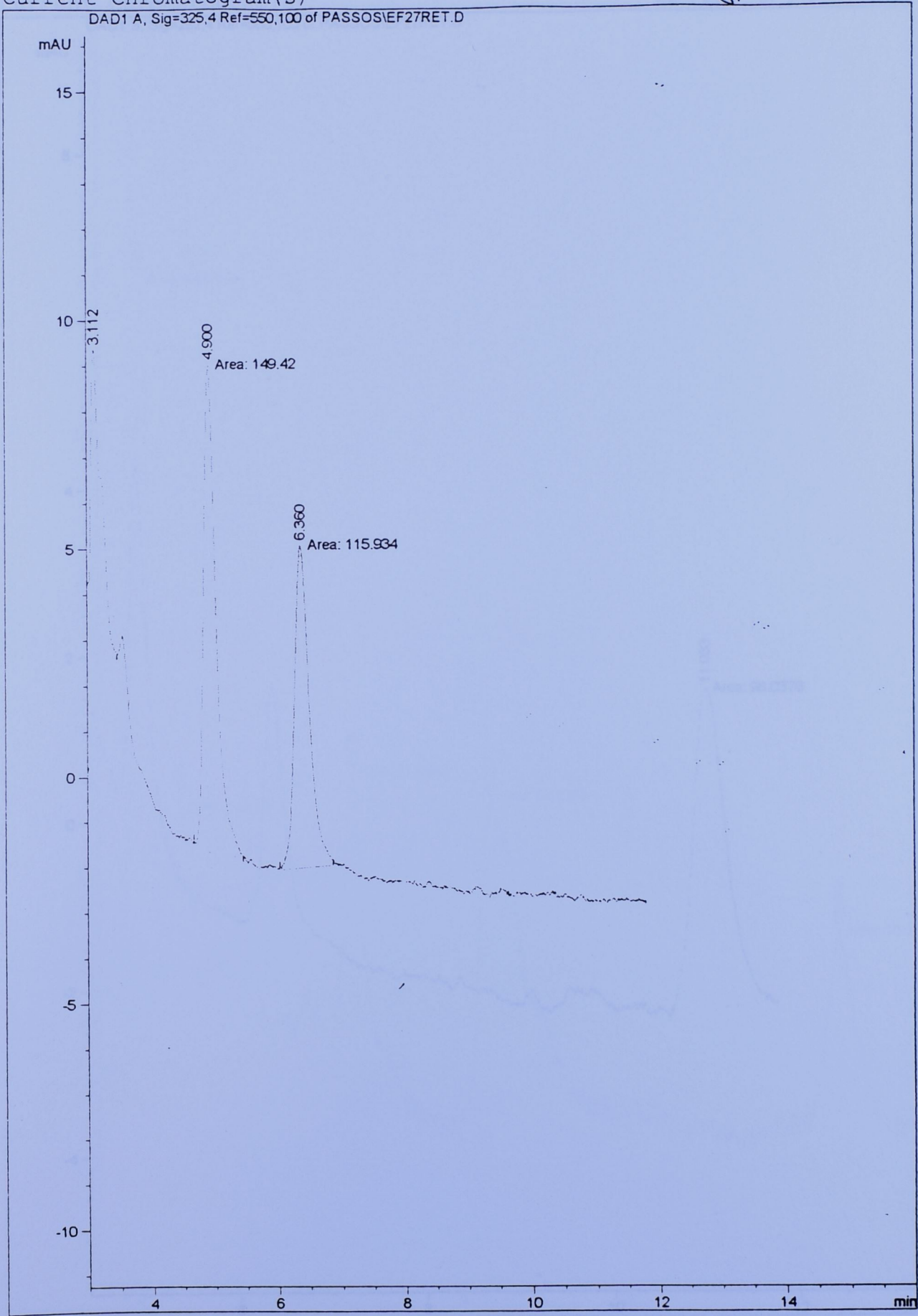


Δείγμα 26γ

Delta 27a

Current Chromatogram(s)

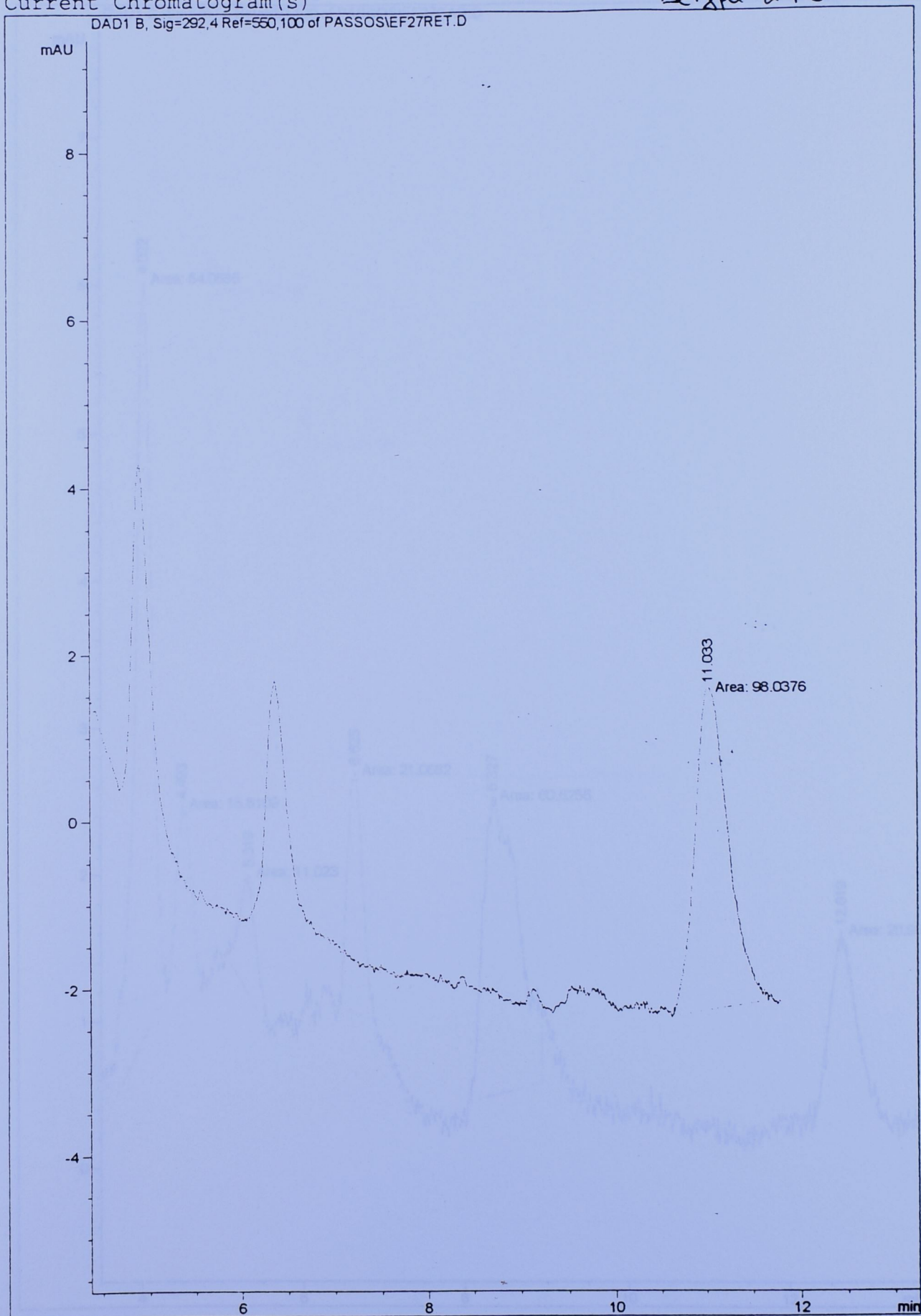
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF27RET.D



Current Chromatogram(s)

Delta 270

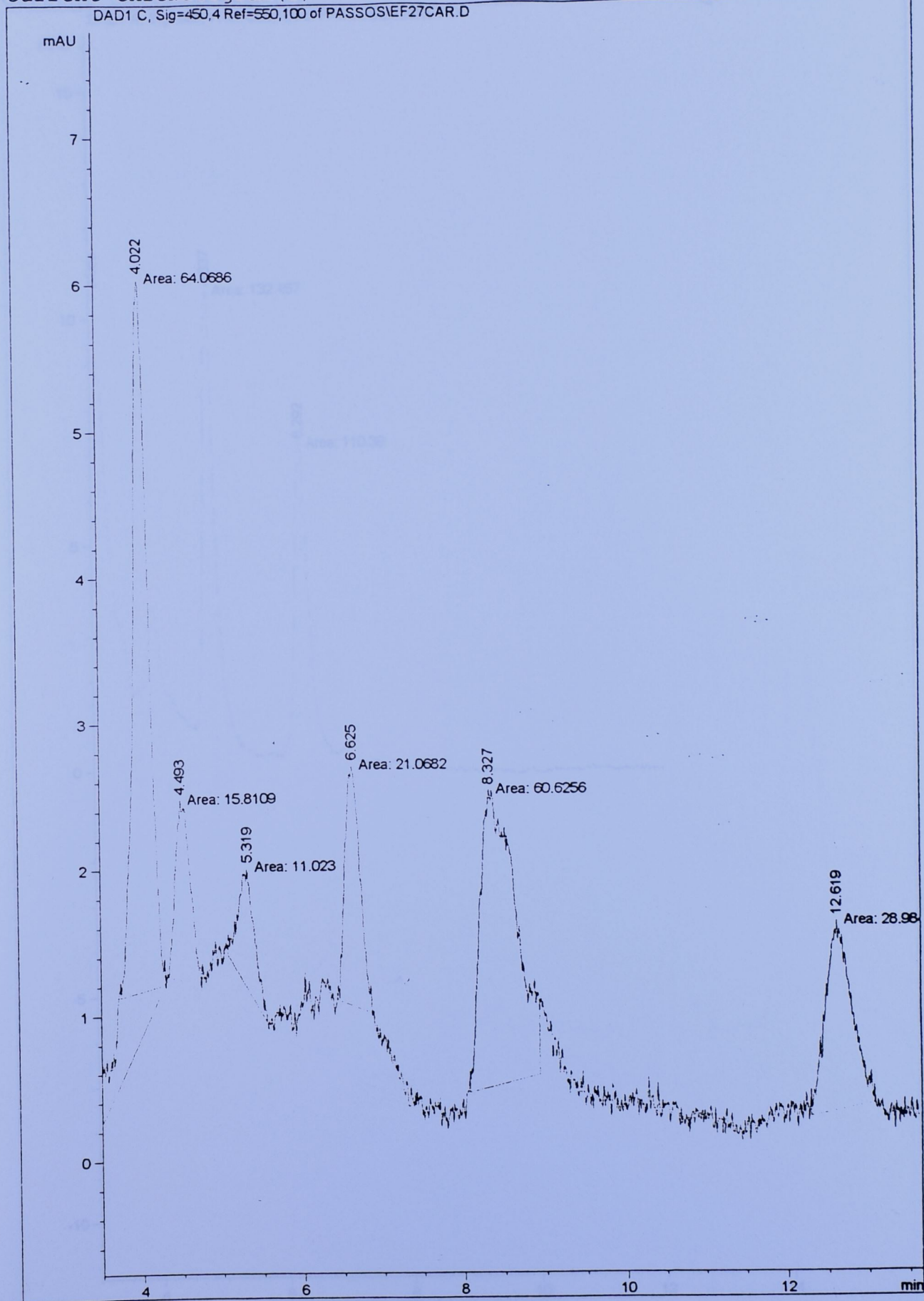
DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF27RET.D



Delta 27x

Current Chromatogram(s)

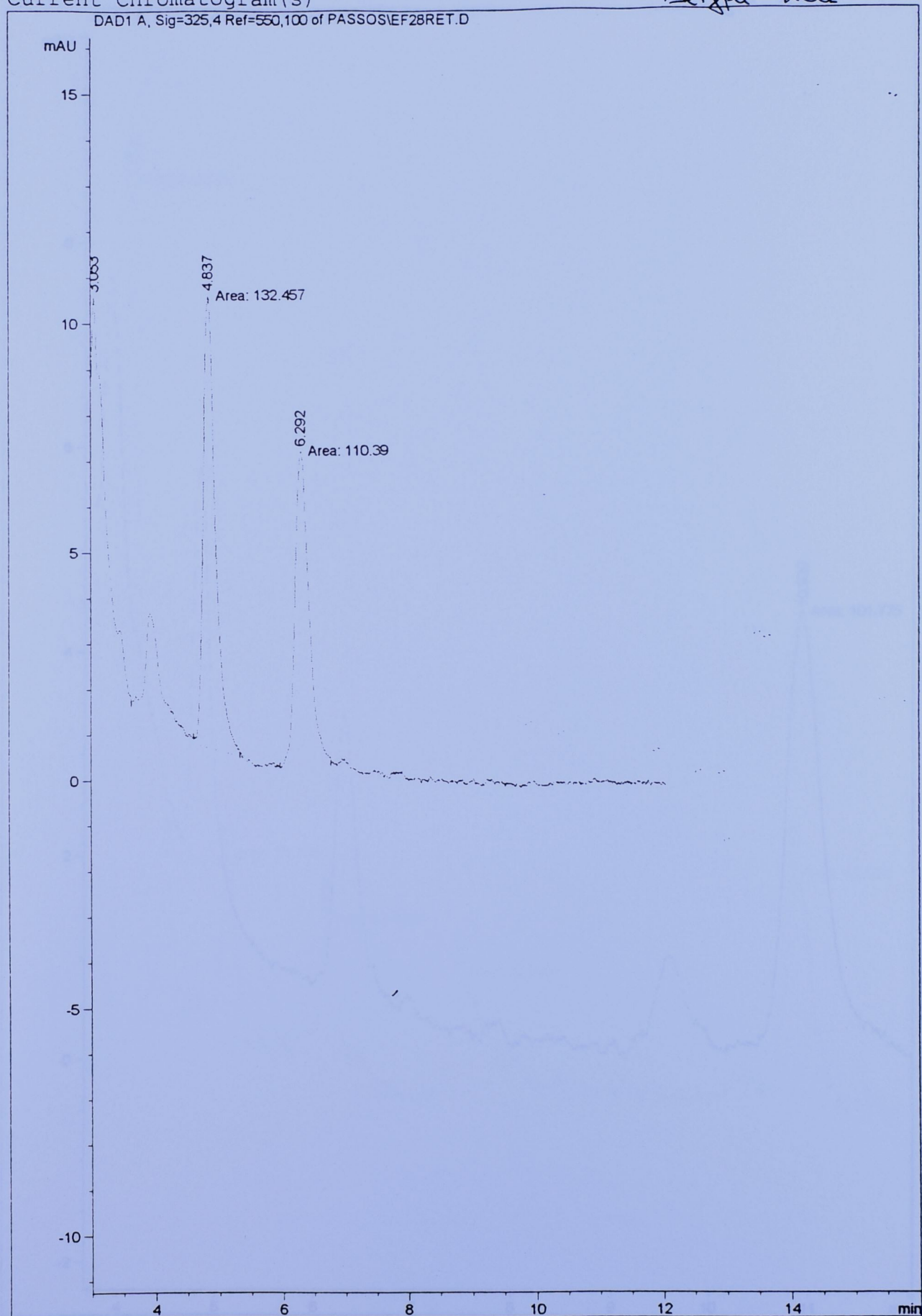
DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF27CAR.D



Current Chromatogram(s)

Delta 28a

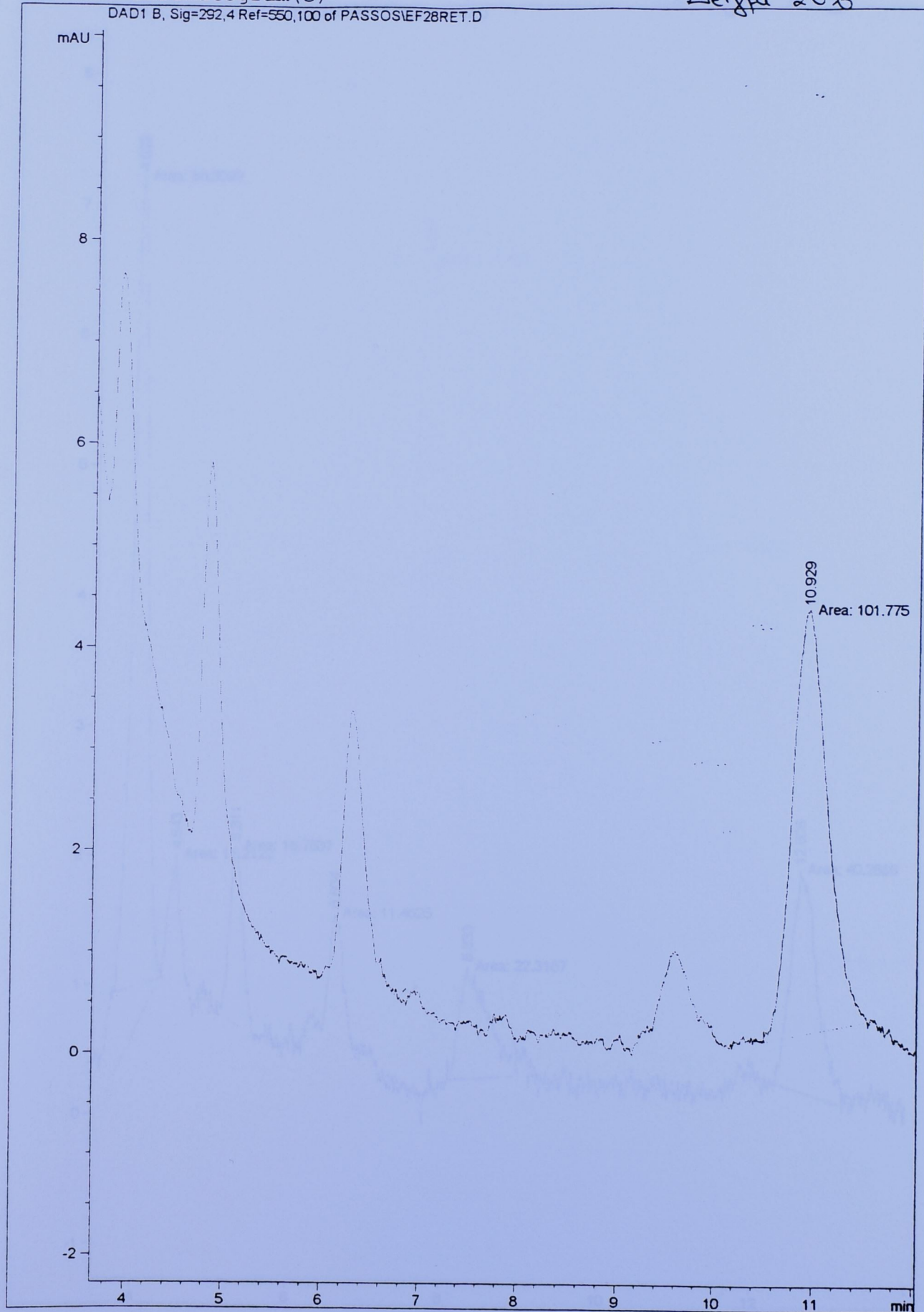
DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF28RET.D



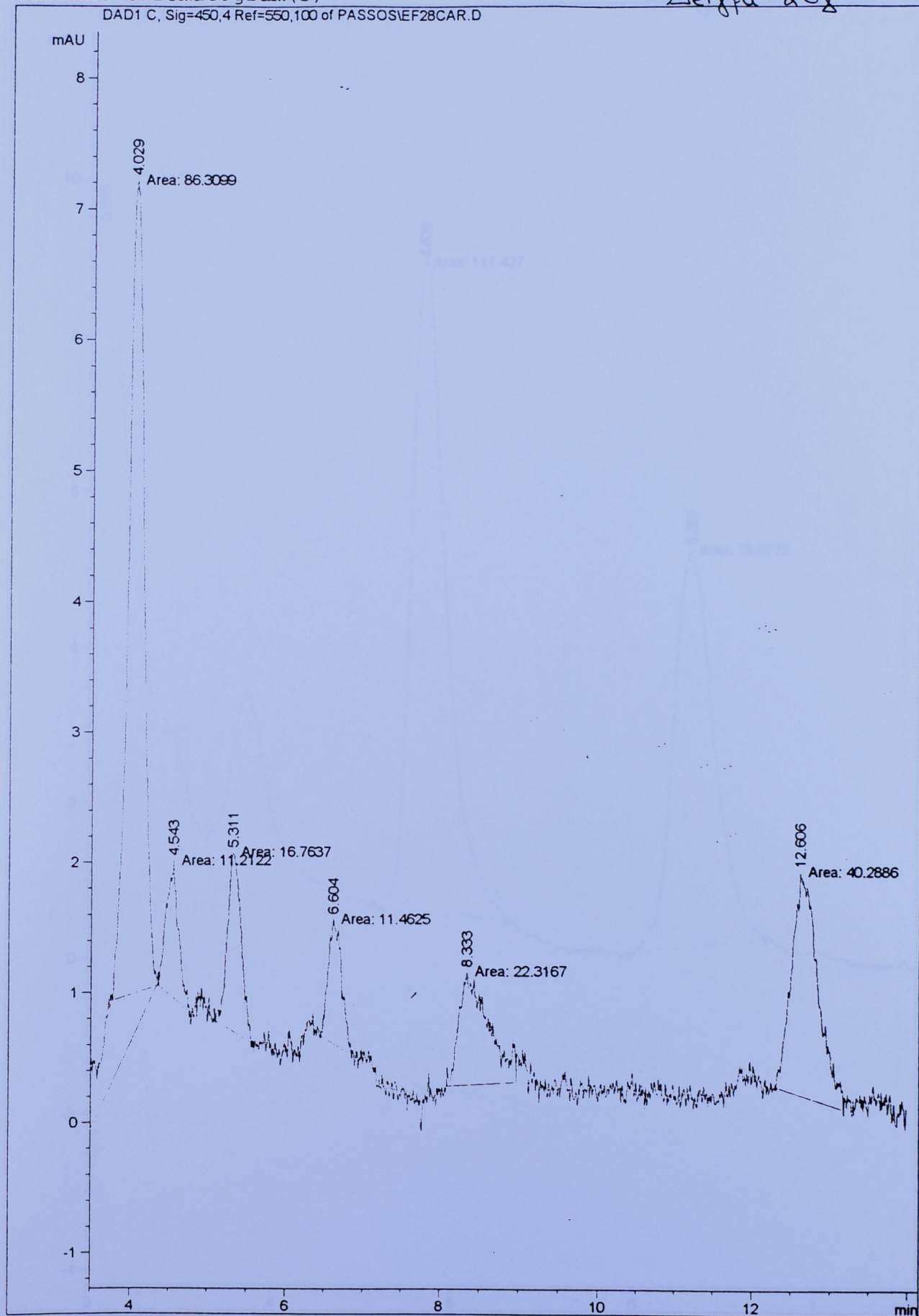
Current Chromatogram(s)

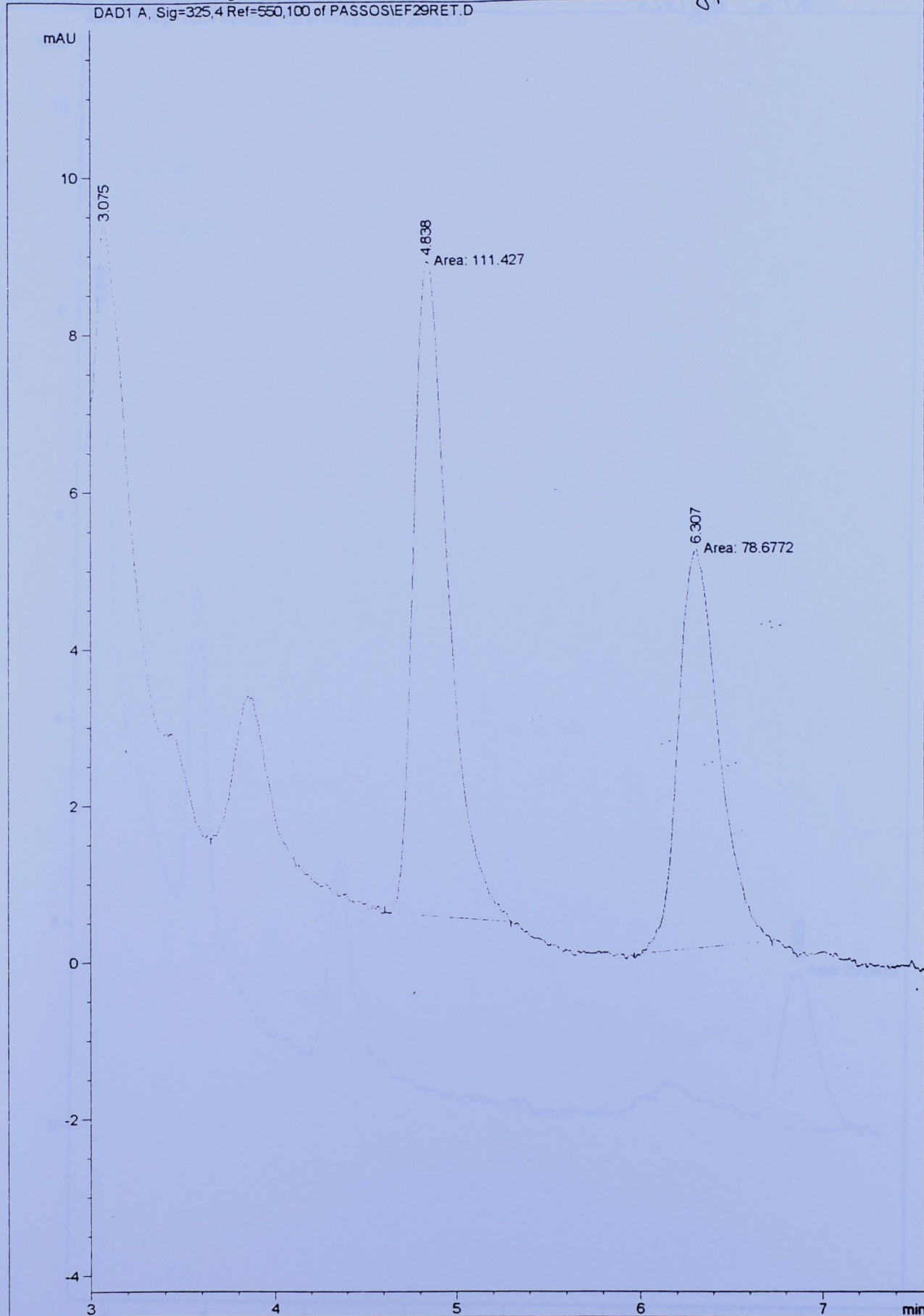
Δείγμα 28b

DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF28RET.D

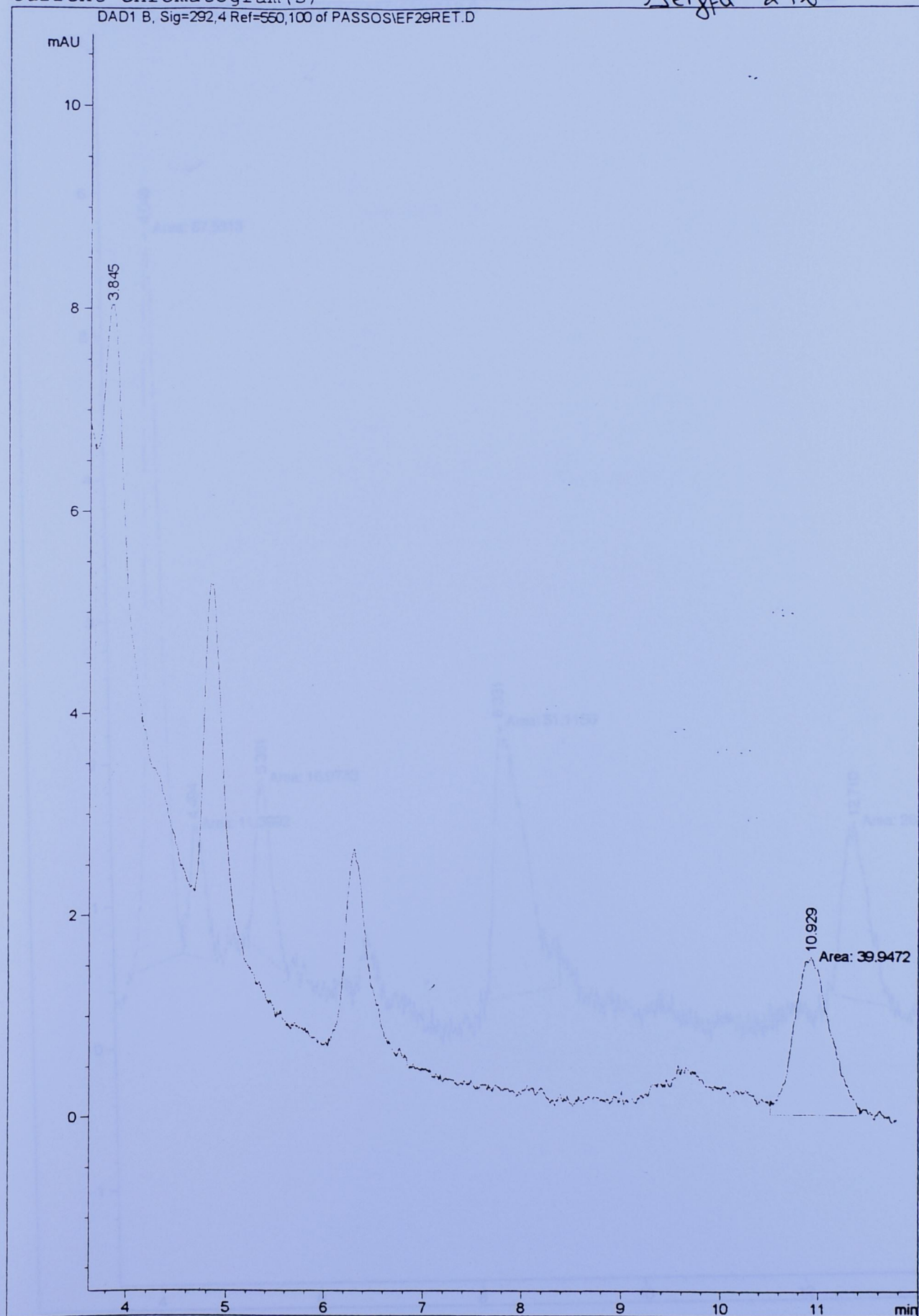


DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF28CAR.D

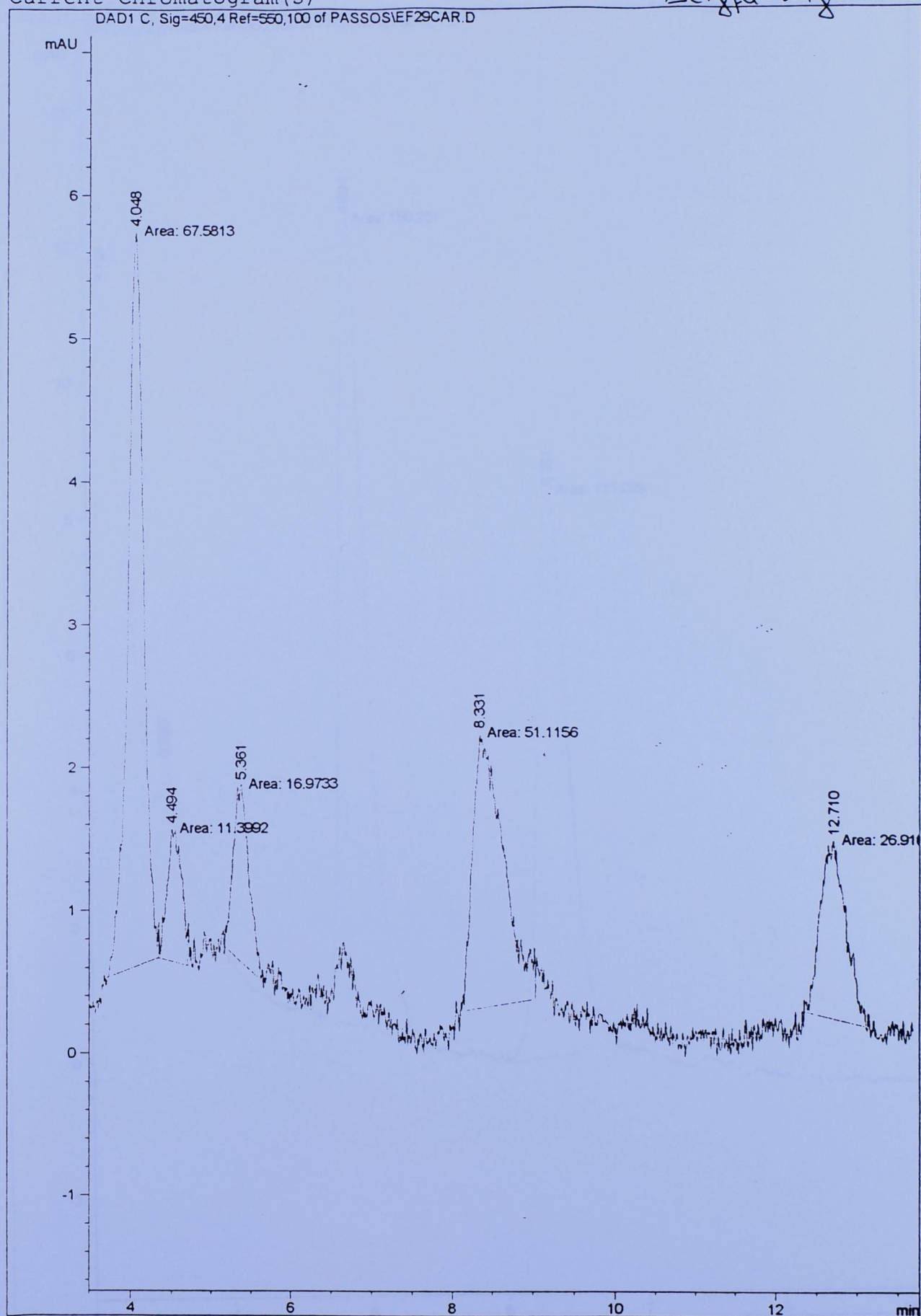




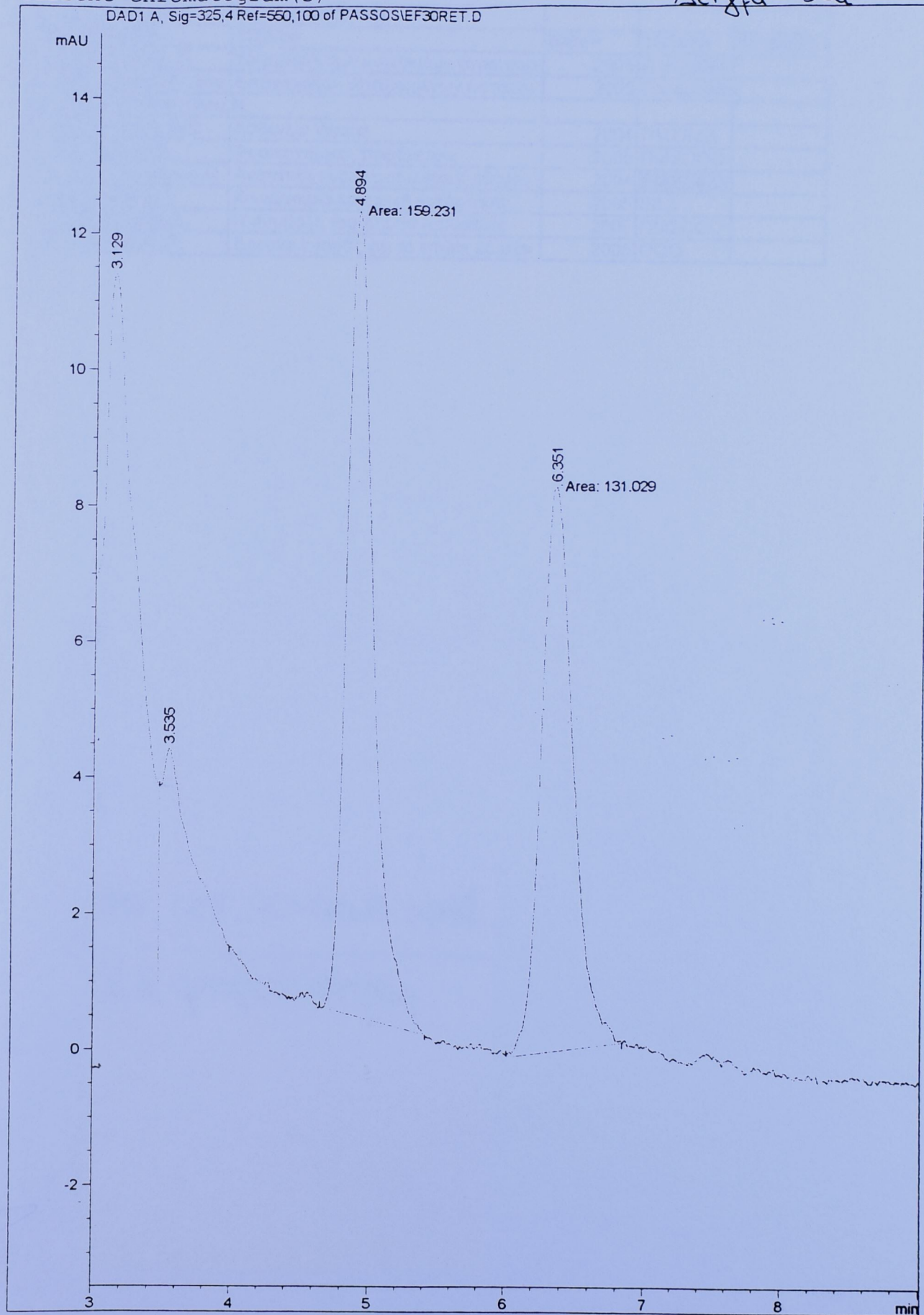
DAD1 B, Sig=292,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF29RET.D



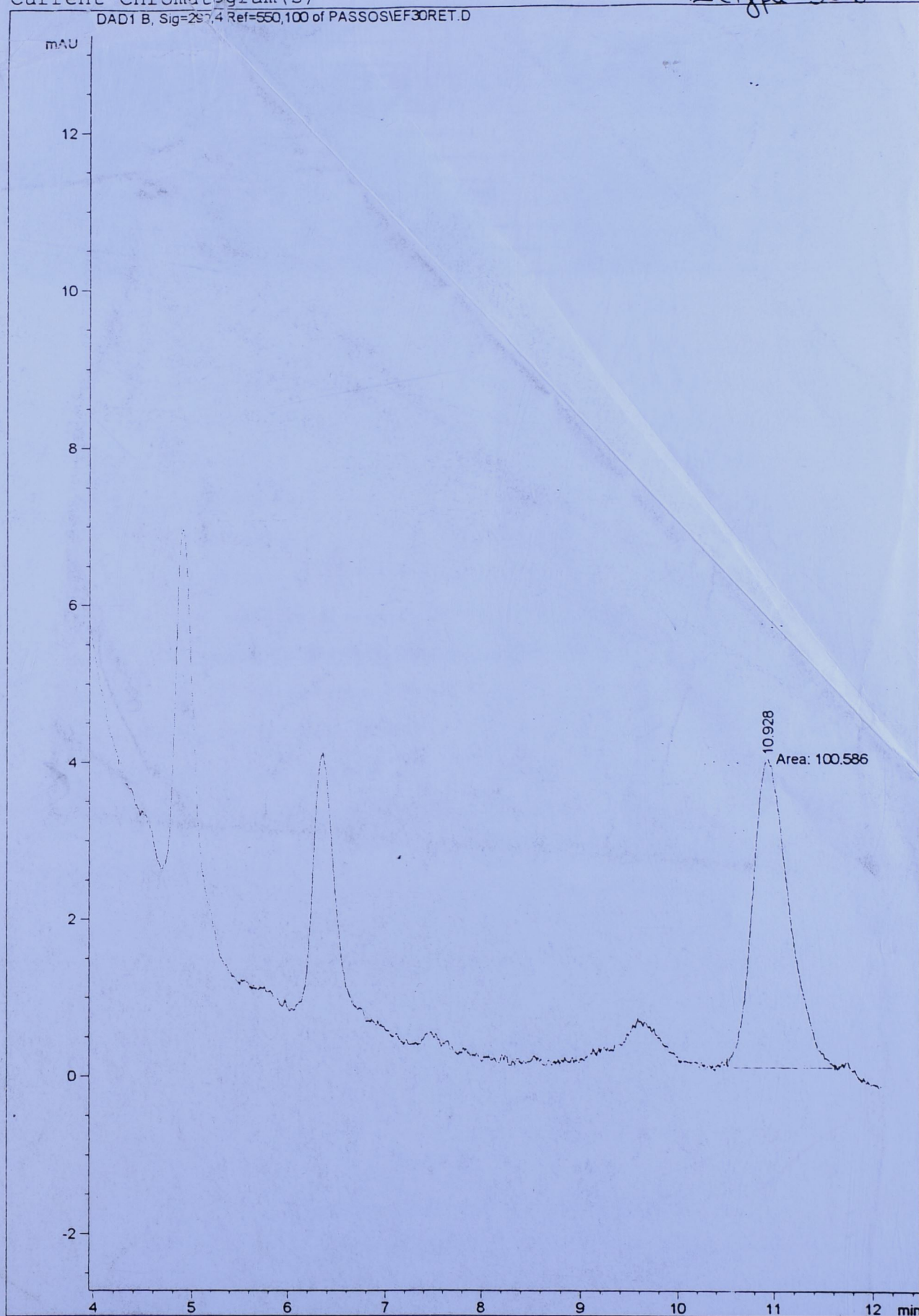
DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF29CAR.D



DAD1 A, Sig=325,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF30RET.D



DAD1 B, Sig=297.4 Ref=550,100 of PASSOS\EF30RET.D



Current Chromatogram(s)

Δεγχα 30x

DAD1 C, Sig=450,4 Ref=550,100 of PASSOS\EF30CAR.D

